

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

CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER* NO PROCESSO DE  
RECONSTITUIÇÃO IMUNE PRECOCE PÓS-TRANSPLANTE DE CÉLULAS-  
TRONCO HEMATOPOÉTICAS E SUA INFLUÊNCIA NA PEGA E NO  
DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO  
(DECH)

CLAUDIA CACERES ASTIGARRAGA

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lúcia Mariano da Rocha Silla

Dissertação de Mestrado

2006

... e ficaremos juntos até o tempo do fim do tempo, colhendo  
os frutos prateados da lua  
os frutos dourados do sol.

*The Song of Wandering Aengus*  
William Butler Yeats

## AGRADECIMENTOS

Tudo tem o seu tempo, as coisas fáceis e as difíceis.

Iniciei o Mestrado sem saber que, diferentemente da grande maioria das pessoas, a finalização desta experiência pontuaria meu amadurecimento profissional.

A paixão por Hematologia surgiu no terceiro ano da Faculdade de Medicina em 1991, a mistura de laboratório, imunologia, genética e suas possibilidades de aplicação que na época quase beiravam a ficção científica, junto com o aprendizado delicado de traduzir a silenciosa doença hematológica para os pacientes formaram uma combinação irresistível. Parte culpa da minha professora e hoje orientadora Lúcia Silla, parte pelo meu próprio temperamento: foi a primeira vez que briguei por um paciente e não seria a última.

Depois vieram os cinco anos de residência, o encontro com os pacientes transplantados de medula óssea, e a honra de escolher e ter sido escolhida por eles.

Final de residência, entrar no mestrado era o que quase todos faziam, foi o que também fiz.

Mas aí a vida começou de verdade e também a eterna sensação de vida-dupla: correr para atender um paciente grave e ao mesmo tempo comprar material para montar o laboratório, coletar amostras para a pesquisa e dar um diagnóstico de leucemia para um novo paciente e sua família. Não conseguir ficar na bancada do laboratório porque o telefone tocava a cada cinco minutos. Correria, eterna correria.

Também tanto aprendizado. Os rituais judaicos da Lígia, a pintura equestre do Fábio, a luta livre do Giuliano, a motocicleta do Tiago, os desenhos da Lara, a ioga da Mariana e os planos de cada um para depois do transplante.

Estudar para cada um, tomar a melhor decisão quanto ao condicionamento, a imunossupressão, o esquema antibiótico, tantas horas de vôo sem hora pra voltar para casa.

Nessa época, prometi que a minha pesquisa tentaria ser relevante e não somente uma etapa a ser vencida.

Hoje, mais de setenta transplantes depois, percebo como tenho sorte com as pessoas da minha vida.

Como trabalhar sem a Alessandra Paz, meu fio-terra e companheira de todas as horas, sem o Gustavo Faulhaber, parceiro da medicina baseada em evidências e de conversas infundáveis sobre o tudo e o nada, sem a Liane Daudt, que consegue misturar sensatez e bom-humor na medida certa?

Como trabalhar sem o carinho e a competência do pessoal do TMO? A risada da Nara, o jeito da Tati, a fibra da Denise, a rapidez da Quênia, todos os tons de rosa da Fabi, o choro de alegria da Claudia Porto.

E o que falar do pessoal do laboratório? O dedo-verde da Elvira nas culturas de células, a persona da Cida, a alegria da Lia. Nunca pensei que fosse discutir células NK tomando champanhe! Adoro o improvável tornado possível.

E seria sorte ou destino ter a minha família? Primeiro lugar onde aprendi que a individualidade pode ser respeitada, mesmo que o dia-a-dia pareça um circo, mas onde as coisas de importância são confortavelmente imutáveis.

Clá, Mano, Zeca, Candida amo vocês independente de onde eu vá.

## DEDICATÓRIA

Para meu avô Manoel, que escapou das formigas na longínqua terra vermelha.

Para Cesar, que me ensinou que em quase tudo há ciência.

Para Candida, que me ensinou que o inexplicável pela ciência não só existe como é belo.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	8
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 BASES TEÓRICAS .....	17
2.1 As células sanguíneas.....	17
2.2 Hematopoese .....	20
2.3 A Célula-tronco ou <i>Stem cell</i> .....	26
2.4 A Célula-tronco Hematopoética .....	31
2.5 Fontes de Células-tronco Hematopoéticas .....	37
3 TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA .....	40
3.1 História do TMO.....	40
3.2 Transplante de Medula Óssea na Atualidade .....	43
3.3 Biologia do Transplante de Medula Óssea .....	46
3.4 Transplante Autólogo de Células-tronco.....	47
3.5 Transplante Alogênico de Células-tronco .....	50
3.5.1 Tópicos em imunogenética do transplante alogênico.....	50
3.5.1.2 O Sistema HLA no transplante. ....	50
3.5.1.3 Resposta Th1/Th2 .....	54
3.5.1.4 Doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD ou DECH) .....	56
3.5.1.4.1 Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (aGVHD) .....	57
3.5.1.4.2 Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (cGVHD) .....	62
3.5.1.4.3 Tratamento de GVHD .....	66
3.5.1.5 Efeito do enxerto-contra-o-tumor (GVL OU GVT).....	67
3.5.1.6 Imunodeficiência Pós-Transplante.....	69
3.5.2 Transplante Alogênico na Atualidade.....	70
3.6 Reconstituição Imune .....	75
3.6.1 Reconstituição Imune Pós TMO Autólogo.....	79
3.6.2 Reconstituição Imune Pós TMO Alogênico .....	84
3.7 Natural Killer .....	89
3.7.2 Morfologia, Citoquímica e Marcadores de Superfície.....	90
3.7.3 Função .....	91
3.7.4 Ontogenia das células NK.....	95
3.7.5 Receptores de Células NK .....	96
3.7.5.1 Os KIRs, os LIRS os receptores lectina <i>-like</i> .....	99

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	114
ANEXO .....	136
IMPACT OF EARLY RECOVERY OF NK CELLS ON RELATED DONOR ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANT AND ITS EFFECT ON ENGRAFTMENT AND GVHD DEVELOPMENT .....	176

## LISTA DE ABREVIATURAS

APCs – Células apresentadoras de antígenos

BCRs – receptores de células B

BM – Medula óssea

CB – cordão umbilical

CCO – Célula de cordão umbilical

CD4+ – Células T helper

CICLT – Células iniciadoras de cultura de longo termo

CNT – Células nucleadas totais

CPP – CÉLULA PROGENITORA PERIFÉRICA

CSF – *Colony Stimulating Factor*

CLTD – *Type lectin-like NK receptor domains*

CTL – Linfócitos T citotóxicos

DECH, GVHD OU GVH – DOENÇA-ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO

DH – Doença de Hodgkin

DLA – *Dog leukocyte antigens*

DLI – Infusão de linfócitos do doador

EBMT – GRUPO EUROPEU DE TRANSPLANTE DE MEDULA OSSEA E CÉLULAS PROGENITORAS PERIFÉRICAS

EBV – EPSTEIN-BARR VÍRUS

ECL OU GVL – EFEITO-ENXERTO-CONTRA-LEUCEMIA

ECM – MATRIZ EXTRA-CELULAR

FACS – FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORT

GCS-F – Fator Estimulador/Crescimento De Colônia Granulocítica



GVL OU GVT – EFEITO DO ENXERTO-CONTRA-O-TUMOR; EFEITO ENXERTO-  
CONTRA-LEUCEMIA

HLA – Antígenos leucocitários humanos (Human Leukocyte Antigens)

HSC – CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS

hsp70 – Proteínas de choque térmico

IBMTR – Registro Internacional de Transplantes de Medula Óssea

INF- $\gamma$  – Interferon gama

INF- $\alpha$  – Interferon alfa

Ig – Imunoglobulinas

IL-1 – Interleucina-1

IL-2 – Interleucina-2

IL-4 – Interleucina-4

IL- 6 – Interleucina-6

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

ITAMs – Limunorreceptores baseados em Tirosina promotores de ativação

ITIMs – Limunorreceptores baseados em Tirosina promotores de inibicao

KIR – *Killer-cell-immunoglobulin-like receptor*

LAK – *lymphokine-activated-killer cells*

LIRs – *leukocyte Ig-like receptors*

LMA – Leucemia mielóide aguda

LMC – Leucemia mielóide crônica

LÑH – Linfoma não-hodgkin

LTRCs – Células repopuladoras a longo prazo

mHa – Antígenos menores de histocompatibilidade

MHC – Complexo Maior de histocompatibilidade

MO – Medula óssea

MTX – Metotrexate

NCAM – Molécula de adesão celular neural

NK – Natural killer

NMDP – Programa Nacional de doação de medula óssea americano

PB – Sangue periférico

PBSCT – Transplante de células-tronco periféricas

Receptores KIR – *killer-immunoglobulin-like-receptors*

SCF – Fator de crescimento de célula tronco

SMD – Síndromes mielodisplásicas

STRCS – CÉLULAS REPOPULADORAS A CURTO PRAZO

TBI – Irradiação corporal total

TCOB – Transplante de células de cordão umbilical

TCP – TRANSPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS PERIFÉRICAS

TCR – Receptor de célula T

TGF- $\beta$  – FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DE CRESCIMENTO BETA

Th1 – T-helper do tipo 1

Th2 – T-helper do tipo 2

TMO – Transplante de medula óssea

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

TRECs – Círculos de excisão de receptores de células T

TRM – Taxa de mortalidade relacionada ao transplante

UCB – Unidade de cordão umbilical

UFC – Unidade formadora de colônia

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 – CÉLULAS-TRONCO ADULTAS HUMANAS E SUA DIFERENCIAÇÃO PRIMÁRIA .....</b>	<b>29</b>
<b>TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DAS HSCS DE DIFERENTES FONTES.....</b>	<b>36</b>
<b>TABELA 3 – FONTES DE CÉLULAS-TRONCO .....</b>	<b>38</b>
<b>TABELA 4 – INDICAÇÕES DE TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS. ....</b>	<b>45</b>
<b>TABELA 5 - CLASSIFICAÇÃO DE GVHD AGUDO.....</b>	<b>61</b>
<b>TABELA 6 – TIPOS DE KIR COM ESPECIFICIDADE PARA HLA CLASSE I .....</b>	<b>100</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Hematopoese.....	20
<b>FIGURA 2</b> – Hematopoese e citocinas.....	26
<b>FIGURA 3</b> – Diferenciação de célula-tronco em tecidos germinativos.....	28
<b>FIGURA 5</b> – MHC Classe I e Classe II, Adaptado de Nardi (60). ....	52
<b>FIGURA 6</b> – Patofisiologia do GVHD agudo. ....	60
<b>FIGURA 7</b> – GVHD agudo de pele.....	62
<b>FIGURA 8</b> – GVHD crônico ocular .....	65
<b>FIGURA 9</b> – GVHD crônico de pele .....	66
<b>FIGURA 10</b> – Regulação da resposta NK por receptores de ativação e inibição . ....	97

## 1 INTRODUÇÃO

O papel do sistema imunológico, e sua utilização no controle do crescimento de células tumorais, tem sido objeto de discussão e estudo há vários anos. A teoria de “vigilância imunológica” postula que os tumores, principalmente aqueles secundários a vírus oncogênicos, provocam uma resposta imunológica no indivíduo, o que leva à destruição das células tumorais (1). Os estudos envolvendo a identificação das células e substâncias relacionadas à supressão tumoral, seus mecanismos de ação contra as neoplasias e a potencialização da resposta imune aos tumores e sua modulação, levaram ao desenvolvimento de um campo extremamente promissor: a imunoterapia (2).

Para o desenvolvimento desta área de estudo, foi – sem dúvida – essencial o conhecimento dos fenômenos envolvidos na reconstituição imune proporcionados pelos **transplantes de medula óssea**.

O transplante de medula óssea tem sido usado como opção terapêutica com potencial curativo em uma gama imensa de doenças incluindo neoplasias hematológicas, anemia aplásica, distúrbios de células vermelhas e imunodeficiências congênitas (3). Nestes procedimentos, o paciente recebe – classicamente – um *condicionamento* com altas doses de quimioterapia e/ou irradiação corporal total para ablação das células maduras da medula óssea e da maioria das células progenitoras; posteriormente, recebe células que vão reiniciar o seu sistema imunoematopoiético.

As células que reiniciam o sistema imunoematopoiético são chamadas **células-tronco ou *stem cells* hematopoiéticas**.

O paciente pode receber células coletadas anteriormente de sua própria medula (transplante autólogo de medula óssea), células coletadas a partir de seu sangue periférico por aférese (transplante de células periféricas autólogas).

No transplante alogênico de medula óssea, o paciente recebe medula ou células progenitoras periféricas de um doador relacionado HLA compatível (irmão, mais freqüentemente) ou não-relacionado HLA compatível (doador cadastrado em “bancos” de registros de HLA). No transplante alogênico, pode-se observar rejeição imunológica do enxerto por células imunocompetentes do receptor, também a doença-enxerto-contrá-hospedeiro (DECH, GVHD, GVH) em que as células imunocompetentes do doador (linfócitos T) “atacam” o receptor da medula óssea (4,5,3).

Observou-se que os pacientes que recebiam medula manipulada para retirada de linfócitos T (medula T depletada) tinham um índice muito menor de DECH, mas, em compensação, apresentavam imunodeficiência de longa duração, associada com aumento de risco de recaída, rejeição do enxerto e reativação de infecções virais. Os pacientes com GVH mais importante quase nunca recaíam (6,7).

Reconheceu-se – a partir daí – o *efeito-enxerto-contrá-leucemia* (ECL ou GVL), que se caracteriza pelo reconhecimento e pela destruição de células leucêmicas por parte das células do doador, num processo de resposta imune contra células malignas residuais na medula do receptor invisíveis ao exame morfológico, ou seja, resposta imune contra *doença residual mínima* (8,9,10).

Somente 25 a 30% dos pacientes têm doador para TMO alogênico imunologicamente compatível na família (transplante alogênico aparentado). Nos registros internacionais de doadores de medula óssea, existem mais de cinco milhões de doadores voluntários HLA – tipados, mas, mesmo assim, as chances de ser encontrado um doador HLA compatível não-relacionado (não-aparentado) varia de

acordo com a raça do receptor; entre aproximadamente 60 a 70% para caucasianos e menos de 10% para outras raças (11).

Um obstáculo para a realização de transplantes alogênicos clássicos é o tempo dispendido entre o registro do receptor, a identificação do doador compatível e a efetiva chegada das células coletadas até o paciente. Some-se à dificuldade de encontrar um doador completamente compatível, a limitação de idade dos pacientes: o condicionamento clássico é muito severo para pacientes idosos. Tais motivos inviabilizam a realização do transplante alogênico em metade dos pacientes com indicação para tal. (11).

Podemos entender o interesse intenso da comunidade científica internacional em novas modalidades de transplante alogênico como o transplante de medula não-mieloablativo (mini-transplantes) e o transplante haploidêmico, com o qual teríamos a possibilidade de ultrapassar a barreira da idade e a da completa compatibilidade HLA, respectivamente.

O nome transplante de medula óssea (TMO) se consagrou pelo uso e, muitas vezes, é usado como sinônimo de transplante de células progenitoras periféricas (TCPP). Este transplante de células progenitoras periféricas autólogas substituiu o transplante de medula óssea autóloga, que hoje em dia é usado em pacientes nos quais não foi possível fazer boa coleta de células periféricas (12).

É importante salientar que, neste tipo de transplante, a ocorrência de DECH é muito pequena, mas que, em compensação, a taxa de recaída é grande, ou seja, não há GVL (13).

As células capazes de realizar supressão tumoral (linfócitos T, células NK, células dendríticas) estão presentes após reconstituição imune em todos os tipos de transplante de células progenitoras hematopoéticas, mas o seu surgimento e a

retomada de suas funções citotóxicas diferem de acordo com o tipo de transplante (14,15).

A presença destas células não significa ação antitumoral específica; elas fazem parte da resposta imunológica normal do indivíduo a vírus e a outros agentes. A maneira pela qual são estimuladas a fazer supressão tumoral, e a potencialização deste efeito, também são objetos de estudo para a imunoterapia.

Existe um grande interesse em melhorar a recuperação imune pós-transplante na tentativa de erradicar a doença residual. Para tanto, uma das células bastante estudadas é a NK (natural killer), que é espontaneamente citotóxica para uma variedade de células tumorais frescas ou obtidas através de culturas tendo a sua atividade aumentada pelo uso da interleucina-2 (16).

As células NK pós-transplante têm uma recuperação imune precoce no transplante de medula como um todo, é especialmente rápida no transplante de células progenitoras periféricas autólogas; o que talvez possa contribuir para uma recuperação clínica mais rápida nestes pacientes (17).



## 2 BASES TEÓRICAS

### 2.1 AS CÉLULAS SANGUÍNEAS

Indivíduos normais requerem, diariamente, a produção de bilhões de células sanguíneas diferenciadas. As células sanguíneas maduras são derivadas de células-tronco indiferenciadas e células progenitoras. O processo altamente orquestrado da formação e do amadurecimento das diversas células sanguíneas e homeostase é denominado *hematopoese* (18,19).

A complexidade deste sistema é imensa, visto que durante toda a vida – a cada hora – necessitamos produzir cerca de  $1 - 5 \times 10^9$  eritrócitos e  $1 - 5 \times 10^9$  leucócitos. Precisamos também de resposta rápida ao stress agudo (perda abrupta de sangue e infecção), bem como do retorno a homeostase. É ainda necessário manter um pool de células indiferenciadas, que darão origem às demais quando necessário. As células sanguíneas deverão manter-se funcionais em locais muito distantes da medula óssea, onde a maioria é originada.

Durante a vida adulta, o indivíduo tem na medula o principal sítio hematopoético. As células sanguíneas apresentam necessidade de regeneração constante, contínua e eficiente. Isto se deve ao fato de que os variados tipos celulares apresentam um tempo relativamente curto de vida que varia de um dia até poucos meses, embora subpopulações pequenas de células possam sobreviver durante um longo período de tempo (20,19,21).

Existem duas linhagens celulares primordiais: a linfóide e a mielóide (22,23,24,21).

Os progenitores mielóides originarão os seguintes tipos celulares:

**Eritrócitos:** são células anucleadas cuja função é essencialmente a de transportar os gases respiratórios no organismo; para isso, apresentam a característica especial de sofrer deformação celular permitindo a sua passagem através de capilares.

**Neutrófilos:** são os leucócitos mais abundantes, correspondendo a 60-70% do total. Apresentam mobilidade e capacidade de fagocitose sendo, portanto, especialmente importantes no processo de defesa contra infecções.

**Eosinófilos:** estão presentes em pequeno número no sangue. São semelhantes morfológica e funcionalmente aos neutrófilos e parecem ser capazes de fagocitar, embora esta não seja sua principal função e sim a de secretar substâncias a partir de seus grânulos fazendo combate a parasitas como, por exemplo, os helmintos.

**Basófilos/Mastócitos:** são encontrados em pequeno número na circulação sendo freqüentemente encontrados nos tecidos. Apresentam grandes quantidades de substâncias envolvidas em reações de hipersensibilidade imediata, tais como histaminas, serotonina e heparina. Estão presentes principalmente nas mucosas, onde os linfócitos T estimulam sua proliferação; encontram-se também em volta dos vasos e no tecido conjuntivo.

**Monócitos:** correspondem a cerca de 2-8% dos leucócitos. Quando migram aos tecidos, sofrem modificações morfológicas e metabólicas resultando em macrófagos e células apresentadoras de antígenos. Dessa forma, desempenham variadas funções como citotoxicidade, secreção de moléculas, quimiotaxia, fagocitose, pinocitose e apresentação de antígenos.

**Megacariócitos:** são grandes células cujo volume citoplasmático chega a ser dezesseis vezes maior do que o das outras células sanguíneas. Do citoplasma dos megacariócitos se originam as plaquetas, fragmentos que desempenham papel

importante na coagulação, também estando envolvidas na resposta imune ao liberarem histamina e serotonina acumuladas em suas vesículas.

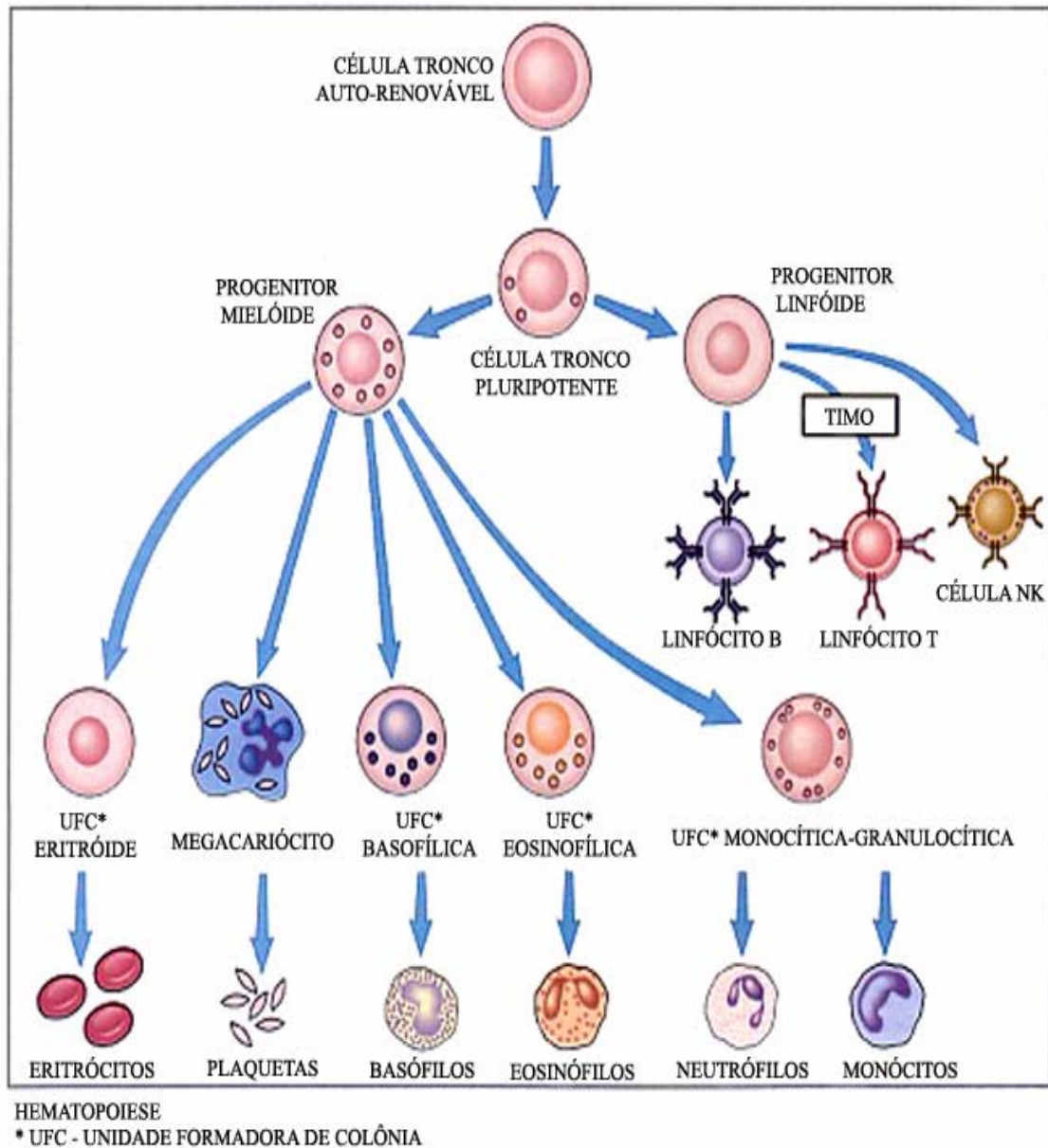
Os linfócitos, que representam em torno de 20% do total de leucócitos presentes na circulação adulta, estão especialmente envolvidos no processo de resposta imunológica, desempenhando funções que vão desde o reconhecimento de moléculas até a produção de resposta imune.

Os progenitores linfóides originarão os seguintes tipos celulares:

**Linfócitos B:** representam em torno de 5-15% do total de linfócitos circulantes e caracterizam-se pela produção de imunoglobulinas (anticorpos). Estas moléculas podem estar inseridas na membrana celular onde atuam como receptores específicos de antígenos, ou então podem ser secretadas, participando da imunidade humoral.

**Linfócitos T:** são células relacionadas com a imunidade celular, pois participam da resposta imune do hospedeiro contra microorganismos de multiplicação intracelular – da rejeição a enxertos –; da produção de vários fatores que interferem na atividade dos linfócitos B e de outras células do sistema hematopoético.

**Células *Natural Killer* (NK):** São linfócitos do sistema imune inato, que têm função precoce durante infecção via produção de citocinas e lise de células infectadas. Conforme detalhado adiante, apresentam a característica de mediar citotoxicidade espontânea sem sensibilização prévia contra diversas células alvo tumorais ou infectadas por vírus. A heterogeneidade funcional das populações de células NK se origina da expressão diferenciada de vários receptores de inibição e ativação na superfície celular.



**FIGURA 1** – Hematopoese  
Fonte: Abbas (21)

## 2.2 HEMATOPOESE

O processo de hematopoese envolve a complexa relação entre processos genéticos intrínsecos das células sanguíneas e de seu ambiente. Essa relação determina quando e como células-tronco hematopoéticas, progenitores e células

maduras, permaneçam quiescentes, proliferem, diferenciem-se, façam auto renovação ou vão à apoptose (morte celular programada) (25). Todos os mecanismos genéticos e ambientais que governam a produção sanguínea operam dentro do relativo equilíbrio destes processos celulares fundamentais. Sob condições normais, a maioria das células-tronco hematopoéticas e muitos progenitores estão quiescentes na fase G0 do ciclo celular; entretanto muitos dos progenitores mais maduros estão proliferando e produzindo células maduras. Na ausência de fatores de stress, o equilíbrio da produção é mantido pela taxa de apoptose entre progenitores e células maduras.

Quando há fatores de stress como infecções e sangramentos, muitos processos ocorrem: *pools* de células armazenadas na medula, ou aderidas ao endotélio, são rapidamente colocadas na circulação para fazerem a localização da injúria; alguns progenitores e algumas células maduras vão à apoptose; progenitores e células-tronco quiescentes são estimulados por fatores de crescimento a proliferarem-se e diferenciarem-se em leucócitos maduros, eritrócitos e plaquetas. Quando o sangramento, infecção, ou outro fator de stress cessa, e a demanda por células sanguíneas retorna ao normal, os processos anti-apoptóticos e proliferativos iniciados são concluídos, as células sanguíneas são redistribuídas aos seus locais de armazenamento, e a cinética da hematopoese retoma aos níveis basais.

Este processo repete-se inúmeras vezes durante a existência do indivíduo e é observado – de forma aumentada – após quimioterapia e transplante de medula óssea (19).

A medula óssea, presente na cavidade de praticamente todos os ossos do organismo, apresenta-se como um tecido onde células hematopoéticas – de diferentes linhagens e estágios de diferenciação – encontram-se em íntima relação com as células do estroma.

No sistema hematopoético existe um *pool* constante de células indiferenciadas denominadas células-tronco ou *stem cells*, consideradas células pluripotentes, auto-renováveis e capazes de originar e reconstituir as diferentes linhagens das células maduras (26).

Prova disso são estudos realizados em indivíduos leucêmicos transplantados com células de medula óssea alogênica provenientes de doadores femininos heterozigotos para marcadores presentes no cromossoma X (Orlic e Bodini, 1994). A inativação ao acaso do cromossoma X permitiu o rastreamento da progênie destas células. Foi observada – nos indivíduos receptores – uma grande maioria de linfócitos e granulócitos expressando os mesmos marcadores, indicando que uma célula ou um pequeno conjunto de células com o mesmo cromossoma X inativado foi responsável pela inativação de todas as linhagens celulares hematopoéticas (27).

Provavelmente os reguladores do ambiente da hematopoese mais bem caracterizados são as citocinas. As citocinas são uma grande família de proteínas que mediam efeitos positivos ou negativos sobre a quiescência, apoptose, proliferação e diferenciação das células. Dentre as citocinas, temos os fatores estimuladores de formação de colônia (*Colony Stimulating Factor* – CSFs) em número de quatro: CSFs: IL-3, GM-CSF, G-CSF e M-CSF. Além desses – de atuação mais específica – são identificadas ainda citocinas como a (IL-1), IL-4, IL-5 e IL-6 que exercem atividades estimulatórias, diretas ou indiretas, para determinadas células hematopoéticas. Segundo Minden (28), os fatores de crescimento podem ser classificados entre os que atuam predominantemente em diferentes fases de diferenciação celular (precoce ou tardia); os que atuam em uma ou várias linhagens; os que atuam diretamente estimulando o crescimento das células, ou ainda aqueles que atuam como fatores acessórios.

Uma característica comum aos fatores de crescimento hematopoéticos é o seu tamanho relativamente grande que impede sua direta penetração na célula-alvo. Para isso ela apresenta – exposto em sua membrana – um sítio receptor para o fator que, quando ligado a este receptor específico, transmite uma sinalização ao interior da célula-alvo (29).

Estas sinalizações incluem ativação de tirosina quinase, como quinase de adesão focal, pp60src, c-ABL, quinases MAP, quinases de junção e proteína C quinase. As citocinas também modulam os mediadores de crescimento e diferenciação celular como c-src, fosfoinositidas, proteína C, fatores de crescimento mediadores de sinalização (19).

Citocinas como interleucina 3 (IL-3) e GM-CSF induzem a proliferação celular enquanto outras citocinas como flt – 3 e kit ligante protegem as células contra a apoptose e as sensibilizam para os efeitos das citocinas produtoras de crescimento. As citocinas também podem facilitar as interações entre células-tronco e elementos do microambiente, incluindo componentes da matriz extracelular (ECM).

As citocinas reguladoras das células-tronco incluindo o fator de transformação de crescimento beta (TGF-  $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ) modulam a atividade do ciclo celular e a pega do enxerto pós transplante de medula.

As citocinas de regulação hematopoéticas são produzidas tanto por mecanismos autócrinos quanto parácrinos e muitas vezes, são produzidas por células não – hematopoéticas, incluindo o estroma da medula óssea e o endotélio (19).

As quimiocinas são outra classe de proteínas, importantes reguladoras da hematopoese. Estas moléculas regulam o tráfego das células sanguíneas e o “*homing*” nos tecidos necessitados; podem ser reguladoras de crescimento positivas ou negativas. As quimiocinas regulam uma variedade de processos como inflamação,

migração e desenvolvimento leucocitário, angiogênese, crescimento de células tumorais e metástases. As quimiocinas ligam-se a uma ou mais proteínas (proteína estruturalmente relacionada à guanina) ligadas a receptores transmembrana. Na hematopoese, as quimiocinas podem inibir o crescimento dos progenitores, regulam a migração dos progenitores hematopoéticos e mediam o desenvolvimento das células T no timo. Como exemplo, poderíamos citar a quimiocina SDF-1 (que se liga ao receptor CCXR-4), essencial no tráfego das células-tronco no embrião em desenvolvimento, media o *"homing"* das células-tronco e das células progenitoras para a medula óssea após transplante de medula e também a mobilização de células-tronco para coleta de células-tronco periféricas para transplante (26,30).

Outros importantes reguladores do ambiente da hematopoese são os elementos da matriz extracelular, outras células hematopoéticas e não-hematopoéticas, nutrientes, vitaminas e uma variedade de processos fisiológicos.

As células-tronco hematopoéticas e células progenitoras ligam-se fortemente a componentes de elementos da matriz extracelular como sulfatos de heparina, quimiocinas, colágenos, lamininas, trombospondina-1, fibronectina e outros. Estas moléculas auxiliam na localização das células-tronco hematopoéticas e células progenitoras dentro da gama imensa de citocinas reguladoras positivas ou negativas e outros reguladores de crescimento.

Os componentes da matriz extracelular (ECM) e componentes do estroma medular podem, diretamente, mediar sinais para as células-tronco hematopoéticas (HSC) ativando o crescimento, protegendo estas células dos mecanismos apoptóticos ou modulando respostas a fatores reguladores positivos ou negativos. As moléculas de adesão nas HSCs e células progenitoras que mediam a ligação aos componentes da ECM incluem as integrinas, selectinas e mucinas. A aderência das células ao



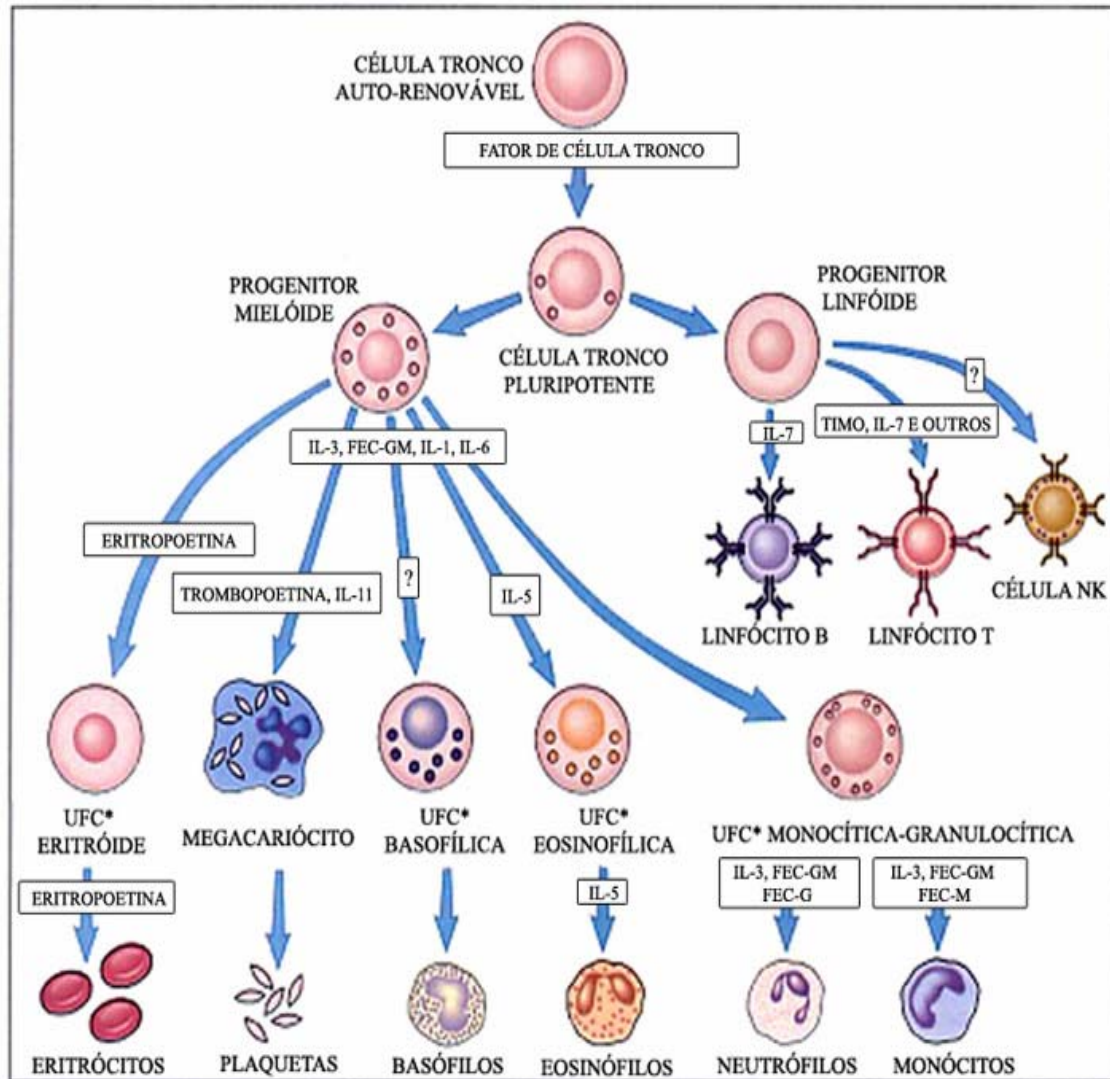
microambiente pode iniciar novos processos de sinalização e alterações bioquímicas intracelulares (31).

As células hematopoéticas e não-hematopoéticas que podem regular a hematopoese incluem células NK, células T, macrófagos, fibroblastos, osteoblastos, adipócitos. Estas células podem produzir importantes fatores de crescimento, facilitar a pega ou induzir a apoptose.

Um número de vitaminas, nutrientes, elementos (zinco, selênio, cobre, vitaminas A, D e E) são críticos para a hematopoese. Retinóides e principalmente antagonistas retinóides têm papel importante na diferenciação celular, mesmo em baixas concentrações.

Um grande número de processos fisiológicos também pode afetar a hematopoese, incluindo o stress espoliativo causado pelo movimento dos fluidos ao redor das células, as forças mecânicas de atração e repulsão entre as células, a concentração de oxigênio, a tridimensionalidade do microambiente, o estado redox do microambiente.

Além da grande quantidade de fatores ambientais que regulam a hematopoese, um número de eventos genéticos intrínsecos, também são críticos. A família Rb, a E2f, as ciclinas, SCL, Hox e outras famílias de genes parecem regular a proliferação e a auto-renovação das células-tronco hematopoéticas primitivas. A família bcl, além de outras, regula a apoptose nas células hematopoéticas. Uma variedade de genes – como C/EBP, MyD, PaxB e Ikaros – parece ter papel crucial na diferenciação da célula-tronco hematopoética e no comprometimento com linhagem celular.



### HEMATOPOIESE

\*UFC - UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA

IL - INTERLEUCINA

FEC - FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA

FEC-G - FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA GRANULOCÍTICA

FEC GM - FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA GRANULOCÍTICA MONOCÍTICA

FEC M - FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA MONOCÍTICA MACROFÁGICA

**FIGURA 2** – Hematopoese e citocinas.

Fonte: Abbas (32).

### 2.3 A CÉLULA-TRONCO OU STEM CELL

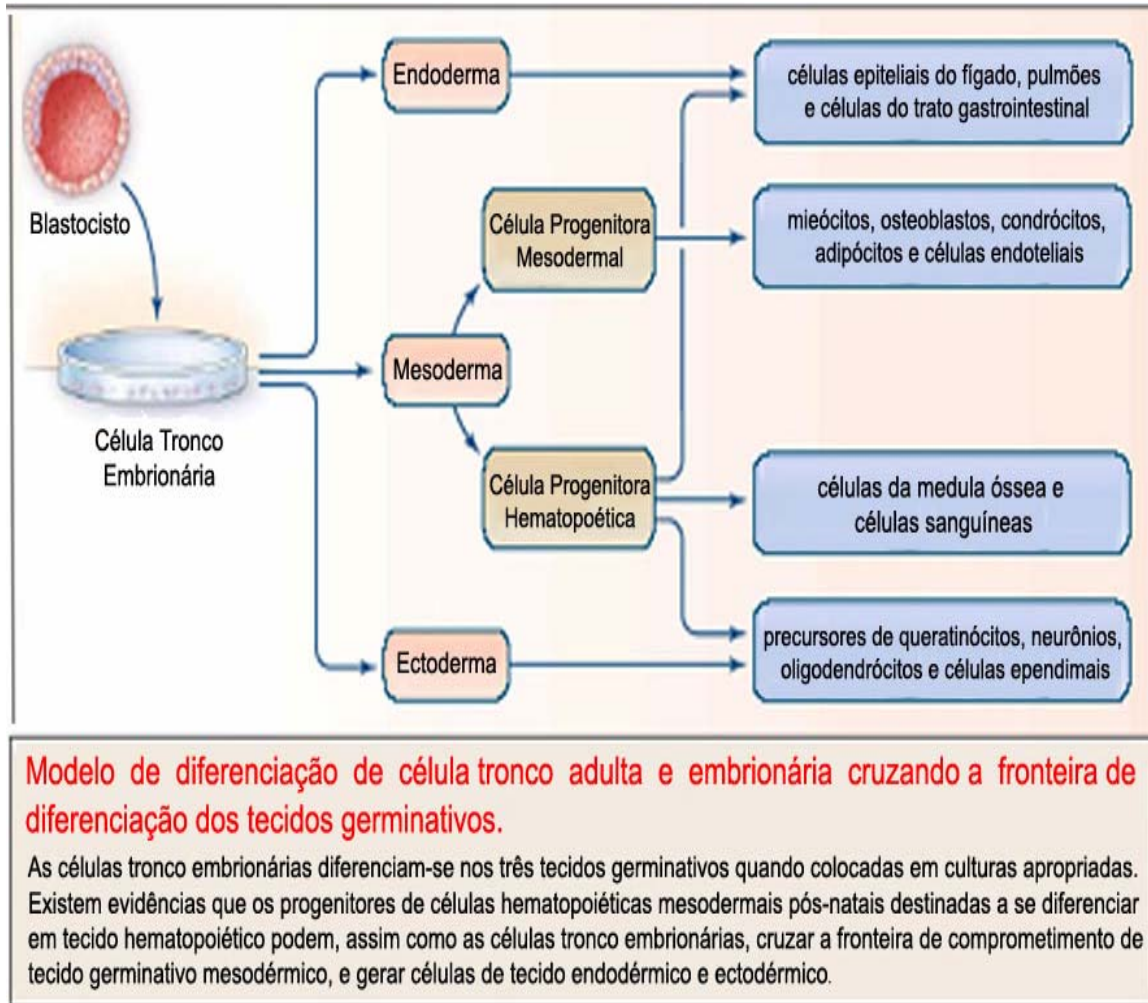
O sistema hematopoético tem sido, tradicionalmente, visto como um sistema organizado, hierárquico, com uma célula-tronco auto-renovável no topo, células

progenitoras comprometidas no meio e células precursoras restritas a linhagem única que dão origem a células terminalmente diferenciadas no final (vide FIGURA 1 e 2).

Este conceito clássico – o de a célula-tronco ser restrita a uma linhagem órgão específica – tem sido questionado pela sugestão de que células-tronco adultas, incluindo a célula-tronco hematopoética, retêm um grau de **plasticidade** previamente desconhecido, que permite a elas diferenciarem-se através das fronteiras de linhagem, tecido e células germinativas (33,34).

Um conceito de plasticidade globalmente aceito ainda deve ser definido, mas em geral este termo refere-se à recém-descoberta habilidade das células-tronco de ultrapassar barreiras de linhagens e adotar os perfis de expressão e os fenótipos funcionais característicos de outros tecidos (35).

Uma célula-tronco verdadeira deve satisfazer alguns critérios operacionais: a. deve ser clonogênica, capaz de auto-renovação ilimitada por divisão simétrica; b. deve ser capaz de divisão assimétrica: uma célula filha idêntica à célula mãe; a outra, célula filha, dando origem a tipos múltiplos de células diferenciadas, representando os três tipos de tecidos germinativos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma); c. deve ser originada de uma fonte embrionária, ou de célula-tronco adulta.



**FIGURA 3** – Diferenciação de célula-tronco em tecidos germinativos.  
 Fonte: Körbling e Estrov (34).

Desta forma, as reservas de células-tronco hematopoiéticas podem contribuir para o desenvolvimento de outras linhagens celulares como pâncreas ou fígado.

**TABELA 1 – CÉLULAS-TRONCO ADULTAS HUMANAS E SUA DIFERENCIAÇÃO PRIMÁRIA**

TIPO CELULAR	Localização Tecidual Específica	Células ou Tecidos Produzidos
Células-tronco hematopoéticas	Medula óssea, sangue periférico	Medula óssea e células sanguíneas linfohematopoéticas
Células-tronco mesenquimais	Medula óssea, sangue periférico	Osso, cartilagem, tendão, tecido adiposo, músculo, estroma medular, células neuronais.
Células-tronco neurais	Células endoteliais, astrócitos (zona subventricular) do sistema nervoso central.	Neurônios, astrócitos, oligodendrócitos
Células-tronco hepáticas	Ductulos biliares terminais (células de Hering) ou próximo a eles.	Células ovas que subsequentemente geram hepatócitos e células ductulares.
Células-tronco pancreáticas	Intra-ilhotas, células nestina positivas, células ovas e células ductais.	Células Beta
Células-tronco músculo esqueléticas ou células satélites	Fibras musculares	Fibras músculo - esqueléticas
Células-tronco da pele (queratinócitos)	Lâmina basal da epiderme, zona búlgea do folículo piloso.	Epiderme, folículos pilosos.
Células-tronco epiteliais do pulmão	Traquéia basal e células secretoras de muco, células Claras bronquiolares, pneumócito alveolar tipo II.	Células mucosas e ciliadas, pneumócitos tipo I e tipo II.
Célula-tronco do epitélio intestinal	Células epiteliais localizadas ao redor de cada cripta.	Células de Paneth, enterócitos com borda ciliada, células secretoras de muco e células enteroendócrinas vilosas.

**Fonte:** Körbling e Estrov (34).

O início da compreensão da plasticidade das células-tronco originou da observação que células do doador de medula óssea foram encontradas em tecidos não hematopoéticos do receptor. Os abundantes relatos na literatura sugerem que, sob condições adequadas, as células-tronco podem contribuir para – virtualmente – qualquer tecido (33).

Especula-se sobre os mecanismos de plasticidade: provar um, não exclui os outros. Existem quatro modelos de mecanismos de plasticidade: a) A diferenciação de células-tronco pluripotentes: modelo consistente com o paradigma existente de que as células sempre vão de um estado menos diferenciado para um mais. Este modelo prediz que existe uma célula altamente pluripotente ainda não comprometida com a linhagem hematopoética e que mantém a habilidade de diferenciar-se em múltiplos e diversos tipos celulares. b) Transdiferenciação indireta: a célula-tronco modifica o seu padrão de expressão gênica para um padrão de célula completamente diferente, através de uma via de dediferenciação/rediferenciação que, provavelmente, passa através de um tipo celular intermediário ainda desconhecido. c) Transdiferenciação direta: a célula-tronco modifica o seu padrão de expressão gênica diretamente para um padrão de célula completamente diferente. d) Fusão: na fusão, as células-tronco da medula óssea adquirem um fenótipo não-hematopoético; uma célula derivada da medula, talvez um macrófago, funde-se a uma célula não-hematopoética; o núcleo da célula derivada da medula assume o padrão de expressão gênica da célula não-hematopoética; os dois núcleos não necessitam fundir-se. Estes modelos não são mutuamente exclusivos. A dediferenciação através de um tipo celular intermediário representa uma célula-tronco altamente pluripotente com a capacidade de diferenciar-se diretamente em tipos celulares múltiplos, ou ter a capacidade de fundir-se com diferentes tipos celulares (35, 34,25).

A plasticidade das células-tronco tem sido um campo de pesquisa intenso e excitante, visto o potencial terapêutico da célula-tronco em reparo à injúria tecidual, formação de diversos tecidos e talvez órgãos para transplante, mas ainda há muito a ser compreendido e discutido do ponto de vista ético e econômico, antes de utilizarmos estas células de maneira rotineira nos tratamentos de um número imenso de patologias (36,37).

#### 2.4 A CÉLULA-TRONCO HEMATOPOÉTICA

O transplante de células-tronco hematopoéticas humanas tem sido usado para reconstituir a hematopoese, após mieloablação nos últimos trinta anos. Neste ponto, torna-se importante introduzirmos alguns conceitos da imunologia dos transplantes: um enxerto transplantado de um indivíduo para o mesmo indivíduo é chamado enxerto autólogo ou **auto-enxerto**; um enxerto transplantado entre dois indivíduos geneticamente idênticos ou singênicos é chamado de **enxerto singênico**; um enxerto transplantado entre dois indivíduos geneticamente diferentes, mas da mesma espécie, é chamado enxerto alogênico ou **aloenxerto**; um enxerto transplantado entre indivíduos, de espécies diferentes, é chamado enxerto xenogênico ou **xenoenxerto**.

As moléculas que são reconhecidas como estranhas nos aloenxertos são chamadas **aloantígenos**; as dos xenoenxertos são chamadas **xenoantígenos**. Os linfócitos ou anticorpos que reagem com os aloantígenos ou xenoantígenos são descritos como **aloreativos** e **xenoreativos**, respectivamente (38).

As propriedades críticas das HSCs para transplante são: habilidade de pega, velocidade de pega e durabilidade da pega. Diferenças na hierarquia das HSCs e nas suas capacidades proliferativas x diferenciadoras determinam estas propriedades (39).

Até recentemente, os transplantes eram realizados somente com coleta de HSC da medula óssea. Também encontramos HSC no sangue periférico coletado de pacientes tratados com quimioterapia e/ou administração de citocinas, denominado progenitores de “sangue periférico mobilizado” ou em células de sangue de cordão umbilical; estas fontes de HSC têm sido cada vez mais usadas. Estudos em animais, e a observação da recuperação da hematopoese em pacientes transplantados, levaram à observação de que existem diferenças sutis na habilidade proliferativa e diferenciadora das HSC, dependendo da fonte de coleta; essas diferenças podem levar à reconstituição da hematopoese precoce ou tardia, após a pega do enxerto, conforme as propriedades acima descritas (40,26).

A célula-tronco hematopoética humana passa a maior parte do tempo em  $G_0$  (41) trata-se de uma célula rara – se comparada a outras – na medula óssea de camundongos estima-se que exista 1 HSC para cada 10.000 células, em humanos esta quantidade deve ser ainda menor (42).

A transição desta célula primitiva para as células funcionais do sistema hematopoético ocorre através de vários estágios intermediários que se caracterizam pela progressiva perda da capacidade de auto-renovação e progressiva restrição à determinada linhagem. A cada divisão subsequente, a célula progenitora resultante torna-se mais comprometida e restrita a uma linhagem hematopoética e, após sucessivas transformações de diferenciação, finalmente estão formadas as células sangüíneas maduras (42).

A maioria das HSC humanas expressam o antígeno CD34, que também é expresso em progenitores comprometidos e progenitores não hematopoéticos. HSC são linhagem-negativos ( $Lin^-$ ), não expressam CD38, mas expressam c-Kit e Thy-1. Em camundongos as HSC não expressam uniformemente CD34; somente as HSC presentes, após transplante de medula ou durante a administração de fator de



crescimento, são CD34<sup>+</sup>. Algumas HSC humanas também podem ser encontradas dentro da fração CD34<sup>-</sup>. Não se sabe se as HSC CD34<sup>-</sup> são precursoras das HSC CD34<sup>+</sup> tampouco se sabe se essas células são fontes melhores para transplantes e/ou expansão ex-vivo. É importante salientar que, na avaliação de pacientes que receberam medula óssea CD34<sup>+</sup> nas quais a hematopoese multilinear havia sido restabelecida por pelo menos sete anos, não foram encontradas células CD34<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup> na medula óssea.

As HSC humanas também expressam CD133 e o transportador Berp-1 (também conhecido como ABCG2), que faz o efluxo de certas moléculas, incluindo o Hoechst 33342. Isto permite a seleção de HSC baseada na ausência de coloração de Hoechst, que é observada como perfil “*side population*”, na análise FACS (*fluorescence-activated cell sort*) (35).

Dependendo da fonte de células, a frequência de HSC humanas (CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> selecionadas por FACS), ou “*side population*” é de 1200-1500 células. Como não se sabe como purificar uma população homogênea, faz-se necessário o uso de ensaios funcionais de HSC. Em camundongos, as células repopuladoras – a curto prazo – (STRCs), são medidas como células que previnem a morte de receptores letalmente irradiados, enquanto as células repopuladoras a longo prazo(LTRCs) são estimadas pelo seu transplante bem-sucedido em recipientes secundários. A medida mais definitiva das LTRCs murinas é sua capacidade de competir com outras HSC pela pega. Como não podemos fazer experimentos in vivo de repopulação celular em humanos, ensaios substitutos foram realizados para quantificar HSC. O número, habilidade proliferativa e habilidade de diferenciar-se em linfócitos B e T das células progenitoras, podem ser observados em culturas de longo termo; ao contrário dos camundongos, porém, não há prova de que os progenitores humanos observados *in vitro* correlacionem-se com as LTRCs. O único “ensaio” verdadeiro para a presença de

HSCs é a sua habilidade de reconstituir o sistema hematopoético de um receptor que passou por um regime mieloablativo (26,35).

Durante o desenvolvimento fetal e precocemente na fase pós-natal, as HSCs multiplicam-se *in vivo* o que resulta na expansão do *pool* de HSCs. Durante o desenvolvimento – e durante toda a vida do indivíduo – ocorrem mudanças qualitativas sutis nas HSCs. HSCs de fígado fetal de camundongos têm maior potencial proliferativo que HSCs de medula óssea pós-natal de doadores jovens e idosos. A frequência de progenitores que podem reconstituir somente a linhagem linfóide ou mielóide, mas não ambas, aumenta com a idade. Este fenômeno é acentuado após transplantes seqüenciais ou manipulação *in vitro*, o que sugere que HSCs “unilineares”, menos primitivas se tornem mais freqüentes com a idade ou com stress hematopoético.

Existe um crescente consenso de que a população de HSCs, embora mantendo a quantidade normal de células sanguíneas durante toda a vida do indivíduo, perca a reserva funcional capaz de manejar situações de stress que requeiram produção de grandes quantidades de progênie.

Surpreendentemente, o número de HSCs e de células progenitoras não declina dramaticamente com a idade; em algumas linhagens de camundongos, inclusive, aumenta. O efeito do envelhecimento – aparentemente – é mais importante na qualidade do que na quantidade das HSCs (43).

Aparentemente as HSCs de cordão umbilical (CB) recém-coletado expressam, em sua maioria, os mesmos marcadores fenotípicos constantes nas células da medula óssea adulta, com exceção da expressão dos antígenos HLA-DR, que estão ausentes ou expressos em níveis muito baixos em células primitivas da medula óssea, mas expressos em altos níveis nas células primitivas de cordão umbilical. Funcionalmente, diferenças são muito maiores, as HSCs de sangue de cordão têm habilidade

proliferativa superior em culturas de longo termo, maior número de células primitivas iniciadoras de cultura de longo termo e maior habilidade de pega em camundongos SCID (40).

O sangue periférico (PB) mobilizado com fator estimulador de colônia granulocítica (GCS-F), tornou-se a fonte de células preferidas para transplante pela recuperação precoce de neutrófilos e plaquetas, que parece estar ligado ao número aumentado de STRCs.

Comparadas as células CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> da medula óssea (BM), as células CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> mobilizadas do sangue periférico (PB), as células da medula tem maior capacidade proliferativa e diferenciadora. Em modelos de transplantes xenogênicos, é necessário um maior número de HSCs de PB mobilizado que BM para realizar a reconstituição hematopoética; em ensaios de repopulação secundária e terciária, a capacidade de repopulação a longo prazo do PB mobilizado é inferior a da BM. Estes estudos devem ser interpretados cuidadosamente, visto não haver evidência clínica de que haja falha de pega em transplante alogênico realizado com PB mobilizado. Entretanto, a qualidade inferior das HSCs no PB mobilizado pode não ficar óbvia precocemente pós-transplante podendo tal fato ser creditado à grande dose de células geralmente utilizadas; são necessários estudos de seguimento de longo prazo para revelar possíveis defeitos no *pool* de HSCs do PB mobilizado após a pega.

**TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DAS HSCS DE DIFERENTES FONTES**

	<b>MO</b>	<b>CPP</b>	<b>CCO</b>
<b>FENÓTIPOS</b>			
CD34 <sup>+</sup> = bright (mais primitiva)	< 1%	-	14%
CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup>	11%	-	68%
CD34 <sup>+</sup> / CD13 <sup>+</sup> /CD33 <sup>+</sup> (comprometimento mielóide)	43%	86%	96%
CD34 <sup>+</sup> / CD19 <sup>+</sup> (comprometimento linfóide B)	19%-24%	<=5%	<=5%
<b>ENSAIOS FUNCIONAIS</b>			
UFC (progenitores comprometidos)	+	++	+++
CICLT (progenitores das três linhagens)	+	+	+++

**Fonte:** Scmitz (39).

A adição de citocinas de ação precoce, como o fator de crescimento de célula-tronco (SCF) ao uso de GCS-F, aumenta a mobilização de HSCs de repopulação a longo prazo em camundongos. Em mamíferos maiores como cães, babuínos e humanos, o uso de PB obtido com mobilização combinada de SCF e GCS-F leva a uma reconstituição hematopoética mais precoce (26).

## 2.5 FONTES DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTIICAS

*Stem cells* hematopoéticas existem em três categorias gerais: autólogas, singênicas e alogênicas que podem ser usadas para reconstituição de hematopoese, após altas doses de quimioterapia mieloablativa. Em geral, a seleção da fonte de *stem cell* a ser usada depende de uma série de fatores, dentre eles, a disponibilidade das células e o tipo de patologia pelo qual o paciente está sendo transplantado.

A disponibilidade das *stem cell* acaba sendo o fator crítico para o tipo de infusão de *stem cell* que será realizada (44).

Encontramos as HSCs na medula óssea (BM), no sangue periférico (PB) e no sangue de cordão umbilical (CB). Devido ao método de coleta, existem limitações práticas em relação ao “tamanho” do enxerto a ser coletado; este limite é um problema maior para CB, menor para BM e menor ainda para PB. Estas limitações de coleta levam a diferenças quantitativas importantes entre as células-tronco e os linfócitos em cada fonte, com o PB representando a fonte mais rica, o CB a mais pobre em células-tronco hematopoéticas, e o PB sendo superior às outras duas em quantidade de linfócitos. Existem também diferenças qualitativas em termos de HSCs e de linfócitos, conforme o tipo de fonte usada em cada transplante.

**TABELA 3 – FONTES DE CÉLULAS-TRONCO**

Dose Mediana (limites) para receptores alogênicos				
	CPP	MO	CCO	Comentários
<b>CNT infundidos</b>		4,2 (3,0-6,0)	0,38 (0,24-3,6)	Comparação em crianças recebendo CO ou MO.
<b>CNTx10<sup>8</sup>/kg</b>	7,0(2,6-4,0)	3,1(1,6-4,5)	-	Comparação randomizada
			0,2 (0,1-0,63)	TCOB Adulto
<b>CD34x10<sup>6</sup>/kg</b>	4,2 (1,4-19)	1,4 (0,3-4,2)	0,12 (0,02 -1,7)	CPPxMO, TCOB adulto
<b>CD3x10<sup>8</sup>/kg</b>	1,8 (0,7-3,7)	0,3 (0,1-1,3)	0,05 (0,009-0,09)	CPPxMO, TCOB adulto

CNT, células nucleadas totais; TCOB, transplante de células de cordão umbilical; CPP, célula progenitora periférica; MO, medula óssea; CCO, células de cordão umbilical. Os linfócitos também variam em seus atributos, se em CB, BM ou PB.

**Fonte:** Adaptado de Abrahmsen IW, Somme S, Heldal D, Egeland T, Kvale D Tjonnfjord EG (45)

O GCS-F aumenta a proporção de linfócitos T-helper do tipo 2 (Th2), que produzem interleucina-4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10). Estas citocinas são protetivas para GVHD, ao contrário do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), produzidas pelos linfócitos helper do tipo 1 (Th-1).

Pode haver supressão da proliferação de células T induzidas por aloantígenos em sangue periférico mobilizado pelo alto conteúdo de células CD14<sup>+</sup>; a supressão da

resposta aloimune exercida pelas células T, pode ocorrer pelo conteúdo aumentado de um raro subtipo de linfócito CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, e células T com TCR $\alpha\beta$  (45).

Os linfócitos de CB diferem dos de adultos por terem uma proporção maior de células CD45RA<sup>+</sup>. Apesar disso, no CB há números normais de células precursoras T helper e citotóxicas. Nesta fonte de HSC, os linfócitos têm habilidade proliferativa menor, quando reestimulados e toxicidade somente limitada a alvos alogênicos. A função das células natural killer (NK) é, similarmente, diminuída em CB, mas pode ser rapidamente ativada à célula LAK, com atividade comparável ou superior à das células do PB (40)

Estas diferenças nas propriedades dos linfócitos caracterizam as diferenças em termos de qualidade, da recuperação imune e do desenvolvimento de GVHD, entre transplantes de medula óssea, sangue periférico mobilizado e sangue de cordão umbilical (5).

### 3 TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

#### 3.1 HISTÓRIA DO TMO

TMOs são realizados na intenção de reconstituir a função medular em pacientes com alterações hematológicas e imunológicas para: tratar neoplasias hematológicas, corrigir defeitos genéticos manifestados em células hematopoéticas, permitir aumento da dose-intensidade na quimioterapia e quando da realização de radioterapia com extensão de campo em alguns tumores sólidos selecionados.

Embora já houvesse tentativas esporádicas de usar a medula óssea por seu efeito terapêutico em anemias e leucemias por via oral, intramuscular e mesmo por via endovenosa, a primeira explosão da bomba atômica em 16 de julho de 1945 foi o que proveu maior estímulo para pesquisa no campo do transplante de medula óssea. Inicialmente, a pesquisa possuía importante patrocínio de agências governamentais, a quem interessava entender a patofisiologia da injúria causada pela radiação ionizante em humanos (46).

A história do transplante de medula óssea inicia-se em 1949 com os estudos de Jacobson et al, que observaram que a proteção do baço em camundongos letalmente irradiados permitia a sua sobrevivência. Lorenz et al, relatam que uma infusão de células do baço ou da medula também os protegia. Inicialmente se pensou que o fenômeno conhecido como “proteção contra a irradiação” fosse devido a fatores humorais. Em 1954, Barnes e Loutit após revisão de seu próprio experimento e dos experimentos de outros grupos, propuseram que: “a hipótese química não havia sido provada pela completa exclusão da hipótese celular”. Fortes evidências de suporte à hipótese celular vieram em 1955 quando Main e Prhen, em seus estudos, registram que camundongos irradiados – protegidos por infusão de medula alogênica –



demonstraram tolerância a um enxerto de pele do doador. Pouco tempo depois, Ford et al demonstraram que camundongos letalmente irradiados, protegidos por infusão de medula, tinham características citogenéticas medulares do doador (47).

Nos anos cinquenta, observações fundamentais foram feitas em murinos, o que levou a descoberta de que células de medula óssea com pega bem sucedida poderiam montar um “ataque imune” contra o receptor, resultando numa síndrome conhecida como “doença secundária”. A doença era o resultado de uma reação imune das células linfóides contra os tecidos do receptor, hoje conhecida como doença do enxerto contra hospedeiro (DECH, GVH ou GVHD). Uphoff relatou que, em transplantes alogênicos, a severidade da reação imune das células do doador contra os tecidos do receptor era controlada por fatores genéticos. Nesta época, também foi demonstrado que o metotrexate (MTX) como agente imunossupressivo, poderia prevenir ou melhorar a reação GVH. Em 1954, Miescher e Fauconnet reconheceram anticorpos induzidos por gestação ou transfusão que reagem com antígenos nos leucócitos. Dausset e van Rood usaram estes anticorpos para descrever os grupos dos antígenos leucocitários humanos (HLA).

O resgate com células autólogas – os com células singênicas apresentavam, relativamente, poucas complicações comparadas as apresentadas aos dos transplantes feitos por células alogênicas que apresentavam GVHD. Esta doença, freqüentemente fatal e devastadora, acometia principalmente a pele, o intestino e o fígado (46).

Nas décadas cinquenta e sessenta, quase todas as tentativas de obter pega duradoura em humanos foram mal-sucedidas. Mathé et al obtiveram a primeira pega persistente de medula óssea alogênica em um paciente com leucemia, que faleceu com diversas complicações, provavelmente ligadas a GVHD crônico.

Os anos sessenta foram marcados pelos estudos em cães. A prova da importância dos grupos leucocitários no transplante de medula óssea veio do estudo do DLA (*dog leukocyte antigens*); também se observou que as HSCs poderiam ser obtidas a partir do sangue periférico.

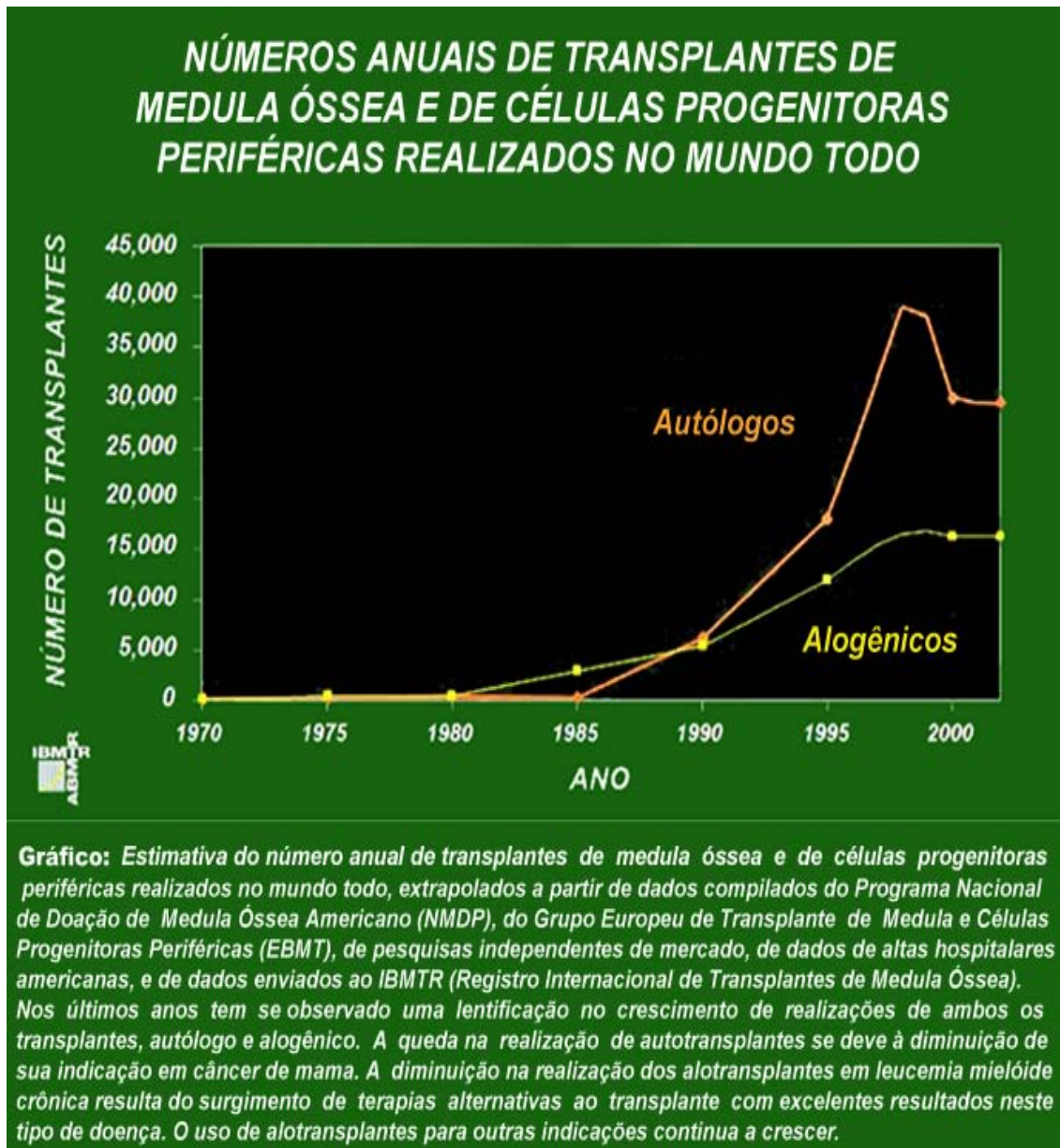
No final dessa década, foram desenvolvidos novos antibióticos, novas drogas anti-neoplásicas e transfusão de plaquetas. Também nessa época, o estudo do HLA (MHC em humanos) estava cada vez mais desenvolvido, finalmente foi compreendida a importância do complexo maior de histocompatibilidade ou MHC (segmento cromossômico onde se localizam genes que fazem apresentação de antígenos ao sistema imune, ou seja, contribuem para a regulação da resposta imune), e passaram a ser realizados transplantes alogênicos entre doador e receptor aparentados herdeiros dos mesmos determinantes de MHC (38).

Em 1969, o grupo de Seattle iniciou uma série de transplantes alogênicos usando familiares HLA compatíveis para leucemia refratária e anemia aplástica. Em 1977 novamente o grupo de Seattle reportou que de 100 pacientes submetidos a TMO alogênico com doador aparentado-HLA compatível, dezessete estavam vivos 1 a 3 anos pós transplante. Em 1999, mais de 23 anos pós transplante, oito destes dezessete estavam vivos e bem (47).

No relativamente curto período de tempo de quarenta anos, o transplante de medula óssea evoluiu de uma atividade laboratorial altamente experimental para uma modalidade terapêutica curativa e bem estabelecida de doenças neoplásicas, doenças relacionadas à falência medular e doenças genéticas selecionadas.

### 3.2 TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA NA ATUALIDADE

Com a compreensão mais apurada da imunologia do transplante de medula óssea a realização deste procedimento, tornou-se muito mais freqüente na terapia de diversas patologias (vide TABELA 4). Em 1970 os transplantes alogênicos quase não eram realizados; em 1993 tivemos por volta de 7000 no mundo inteiro. O mesmo ocorreu com os transplantes autólogos que de 1975 a 1980 eram pouco freqüentes e em 1993 foram realizados 9000 no mundo (48). Estima-se que, no ano de 2000, foram realizados em torno de 15.000 transplantes alogênicos e mais de 25.000 transplantes autólogos (49).



**FIGURA 4** – IBMTR: Transplantes de medula óssea e de células progenitoras periféricas no mundo.

**TABELA 4 – INDICAÇÕES DE TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS.**

Doenças Tratadas com Transplante de Medula Óssea	
<b>Não- malignas</b>	<b>Malignas</b>
Anemia Aplástica	Leucemia Mielóide Aguda
Anemia de Fanconi	Leucemia Linfóide Aguda
Síndrome de Diamond-Blackfan	Leucemia de Células Cabeludas
Anemia Falciforme	Mielodisplasias
Talassemias	Leucemia Mielóide Crônica
Hemoglobinúria Paroxística Noturna	Leucemia Linfocítica Crônica
Mielofibrose	Doença de Hodgkin
Neutropenia Congênita	Linfoma não-Hodgkin
Síndrome de Chédiak-Higashi	Mieloma Múltiplo
Doença Granulomatosa Crônica	Outros Tumores Sólidos
Trombastenia de Glanzmann	
Osteopetrose	
Doença de Gaucher	
Mucopolissacaridose	
Deficiências Imunes	
Doenças auto-imunes	

**Fonte:** Adaptado de Wintrobe (50).

Em geral, a fase inicial do transplante de medula óssea divide-se em fase de condicionamento com quimioterapia, irradiação corporal total (TBI), imunoterapia associados ou isolados; infusão das células progenitoras por via endovenosa; fase de

aplasia; recuperação hematológica com pega do enxerto. Existem os transplantes de medula óssea singênicos (TMO singênico), em que o doador é geneticamente idêntico ao receptor (transplante entre gêmeos); os transplantes de medula óssea alogênicos relacionados (TMO alogênico) em que o doador é aparentado e com MHC compatível; transplantes de medula óssea não-relacionado (TMO alogênico), em que o doador é MHC compatível, mas não é aparentado com o receptor; TMO autólogo, em que o paciente tem sua própria medula coletada prévia à quimioterapia mieloablativa; transplante de células progenitoras periféricas autólogas (células-tronco ou *stem cells*), através do qual as células são coletadas por meio de aférese de sangue periférico. Atualmente - conforme o tipo de doença tratada - pode-se usar células progenitoras periféricas do doador para transplantes alogênicos.

No ano de 2002, regimes de condicionamento menos intensivos (mini-transplantes), foram usados em 25% de todos os alotransplantes (site lbmtr, 2005). Reconstituições hematopoéticas bem-sucedidas têm sido alcançadas com o uso das células do sangue de cordão umbilical em humanos. Uma excitante nova área de pesquisa surgiu com a realização dos transplantes alogênicos haploidênticos, com os quais podem ser realizados procedimentos que ultrapassam a barreira do HLA (11).

Hoje o renovado entendimento da imunologia dos aloenxertos e das células-tronco abriram caminho para uma nova era em relação aos transplantes de células-tronco, o que se traduz no progresso da área da imunoterapia.

### 3.3 BIOLOGIA DO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

A biologia do transplante de medula óssea é determinada por três tipos diferentes de células transplantadas do doador: linfócitos T maduros, células progenitoras comprometidas com a linhagem linfóide e stem cell hematopoética. A

biologia destes três tipos celulares diferentes define os eventos clínicos biológicos que ocorrem após o transplante (51,52).

### 3.4 TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO

Numerosos estudos em camundongos, cães e primatas demonstraram a efetividade do transplante de medula óssea autólogo em proteger os animais de irradiação feitas em doses potencialmente letais. Os transplantes de medula óssea autóloga foram usados em humanos pela primeira vez, nos anos cinqüenta. Apesar da proteção contra a toxicidade medular, nesta época, o benefício clínico deste procedimento era questionado. (47). Atualmente, a escolha do transplante de HSC autólogas baseia-se no conceito de dose-intensidade introduzido por Hyrniuk e Bush em 1984. O efeito dose-resposta é definido como a correlação do efeito da droga com o aumento da dose; a hipótese é a de que a dose-intensidade correlaciona-se com a resposta, que por sua vez, correlaciona-se com a sobrevida. Usa-se, então, o resgate com células autólogas após regimes de condicionamento com quimioterapia com dose-intensidade aumentada (53).

Teoricamente todos têm capacidade de doar HSC autólogas, mas pacientes submetidos à terapia citotóxica extensa prévia, ou que tenham tido envolvimento importante da medula por células malignas, podem inviabilizar esta fonte de HSC. Dependendo do tipo de doença, a medula óssea autóloga ou células-tronco periféricas podem ser usadas quando outros doadores não estão disponíveis e – freqüentemente - são o tipo de TMO de escolha.

A medula óssea é obtida por aspirações repetidas da crista ilíaca posterior, sob anestesia geral ou epidural. Também se pode coletar medula da crista ilíaca anterior

ou do esterno, se grande quantidade é desejável. O objetivo de volume coletado é de 10-15 ml/kg do receptor ou do doador, se este for o menor indivíduo.

Atualmente o transplante autólogo de medula óssea é derivado de células-tronco “mobilizadas” com fatores de crescimento de colônia já citados anteriormente (GCS-F; GM-CSF) e/ou quimioterapia, posteriormente, coletadas por técnica de aférese. Esta “mobilização” significa que fazemos uma estimulação farmacológica para que as células-tronco que estão dentro do compartimento ósseo venham para a periferia (sangue periférico), o que possibilita uma coleta mais rica em progenitores imunohematopoiéticos. Alguns investigadores consideram  $2,5 \times 10^6$ /kg CD34<sup>+</sup> pelo peso do receptor, dose mínima para obter uma recuperação hematopoética completa. Uma recuperação hematopoética mais rápida e sustentada de neutrófilos e plaquetas correlaciona-se com número aumentado de HSCs CD34<sup>+</sup> (mais de  $5 \times 10^6$ /kg) (50).

Esta técnica de transplante tem recuperação hematopoética mais rápida, ou seja, a recuperação das plaquetas, do hematócrito e dos leucócitos é mais veloz, possibilitando a alta hospitalar mais precoce (39). Elas podem ser infundidas até anos após sua coleta, dependendo do modo como foram congeladas (criopreservadas). Elas podem ser “tratadas” antes da criopreservação com anticorpos monoclonais, agentes quimioterápicos, ou em culturas de longo termo para fazer destruição da doença residual mínima (possibilidade de **imunoterapia**) (54).

Este tipo de transplante tem sido usado com sucesso em pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA), linfoma não-hodgkin (LÑH) e doença de hodgkin (DH). A sobrevida livre de doença foi prolongada em pacientes com Mieloma Múltiplo. Existem novas estratégias em discussão envolvendo transplante autólogo em doenças como a leucemia mielóide crônica após uso de imatinib e as síndromes mielodisplásicas (55).



As complicações mais freqüentes deste tipo de transplante são a toxicidade envolvendo pulmões e fígado, em grande parte secundárias à quimioterapia mieloablativa. Não há necessidade de compatibilidade HLA; o GVHD e suas complicações, não são características do transplante com células autólogas, mas podem ocorrer (relação com dano ao tecido tímico) (56) Conseqüentemente, o tempo de hospitalização é menor assim como menor é o número de mortes decorrentes deste tipo de transplante. Em compensação, o enxerto pode ter células tumorais clonogênicas que contribuem para recaída ou doença persistente e também não há células efectoras capazes de montar uma resposta alogênica contra as células tumorais (efeito enxerto-contra-leucemia).

Apesar destas observações, o transplante autólogo pode ser uma terapia antitumoral potente, aumentando a sobrevida livre de doença para níveis maiores que 50% em algumas populações selecionadas, tais como pacientes com linfomas responsivos à quimioterapia, que vão a transplante de HSC autólogas (53).

Atualmente, a melhoria na terapia de suporte e o uso de células progenitoras periféricas fizeram do transplante autólogo uma terapia factível para uma maior população de pacientes com neoplasia hematológica e tumores sólidos. Embora um maior número de pacientes, incluindo pacientes mais velhos, consigam fazer transplante autólogo, um dos maiores obstáculos ao sucesso a longo prazo continua sendo a recaída.

Embora complicações a longo e curto prazo sejam menos comuns em transplante autólogo comparado com os transplante alogênico, a mielodisplasia continua sendo um paraefeito problemático a longo prazo, principalmente nos pacientes com linfoma de Hodgkin (57).

### 3.5 TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO

#### 3.5.1 Tópicos em imunogenética do transplante alogênico

##### 3.5.1.2 O Sistema HLA no transplante.

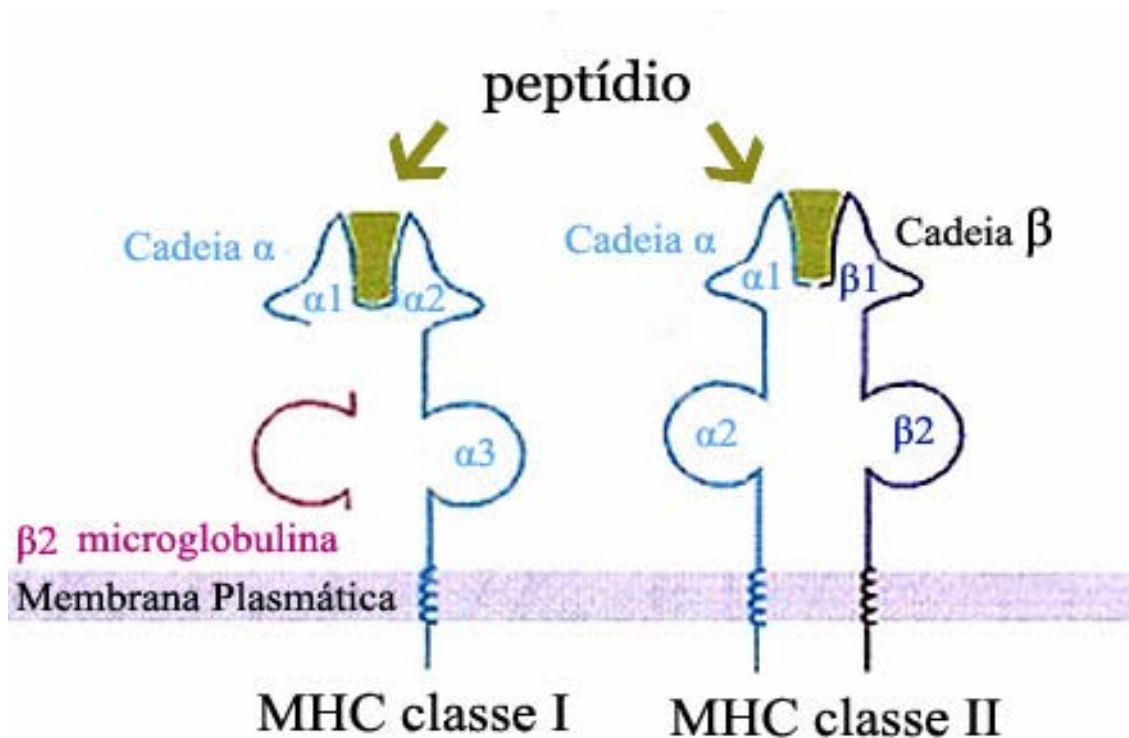
O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) é, como denominamos, uma família de genes que tem uma função primordial no reconhecimento imune da compatibilidade tissular, ou seja, eles permitem ao organismo reconhecer entre o que é “self” e “nonself” (5). As moléculas do MHC são responsáveis pela ligação e apresentação de peptídeos aos linfócitos T. Em humanos, os genes do MHC foram denominados de HLA (Human Leukocyte Antigens) (58). As moléculas de HLA ocorrem na maioria das células nucleadas e não são limitadas a leucócitos. Os genes do HLA estão entre os sistemas genéticos mais polimórficos que conhecemos; isto significa que há um número extremamente grande de alelos em cada locus (em alguns casos até 100 deles), sendo que cada um deles apresenta-se com frequência relativamente alta na população. Em consequência disso, os indivíduos são geralmente heterozigotos para os loci do MHC; é difícil encontrar indivíduos não aparentados que apresentem os mesmos alelos nestes genes, isto é, que sejam MHC-compatíveis (59).

O sistema HLA está localizado no braço curto do cromossoma 6 e é dividido em três grupamentos genéticos distintos: Classe I, Classe II e Classe III.

As moléculas de classe I incluem as proteínas HLA-A, HLA-B e HLA-C em humanos; são diméricas, compostas por uma cadeia  $\alpha$  de 47 kDa e uma cadeia  $\beta$  menor ( $\beta_2$ -microglobulina), que é codificada por um gene fora do MHC, no cromossoma 15. A maior parte delas estende-se para fora da célula, um segmento

hidrofóbico atravessa a membrana e a extremidade carboxi-terminal é intracelular. Na extremidade amino-terminal, a molécula tem uma estrutura que forma uma fenda, onde ocorrem as ligações aos peptídeos; fragmentos protéicos de nove a onze aminoácidos, originados da fragmentação de proteínas e que serão desta forma apresentados ao sistema imune.

As moléculas de classe II são HLA-DP, DQ e DR. São também diméricas, mas as cadeias são de tamanho semelhante: a cadeia  $\alpha$ , de 32 a 34 kDa; a cadeia  $\beta$ , de 29 a 32 kDa. Ambas codificadas por genes do MHC. Na extremidade terminal, também está presente a fenda onde se ligará o peptídeo a ser apresentado ao sistema imune (57).



**FIGURA 5** – MHC Classe I e Classe II, Adaptado de Nardi (60).

As moléculas de Classe III não apresentam uma relação tão direta com a resposta imune como as de Classe I e II. Incluem componentes do sistema complemento (C2, C4A, C4B e Fator B) e a enzima 21-hidroxilase. São ainda codificadas por genes do MHC, proteínas de choque térmico (hsp70) e citocinas (fator de necrose tumoral-TNF, linfotóxina-LT e linfotóxina β-LT β).

Os receptores de antígenos em linfócitos B são as imunoglobulinas (Ig), que podem reconhecer antígenos em sua forma nativa ou solúvel; os receptores de linfócitos T (TCR) somente reconhecem antígenos depois que os mesmos são fragmentados por outras células e estes fragmentos (peptídios) são apresentados na superfície destas células combinados a moléculas do MHC.

Células T citotóxicas reconhecem antígeno, apresentado por moléculas de MHC classe I, pela presença da molécula CD8. Células T helper reconhecem antígenos, apresentados por moléculas de classe II, pela presença da molécula CD4 (61).

O HLA se torna especialmente importante quando considerados os transplantes de órgãos e tecidos, já que a rejeição imunológica correlaciona-se com o grau de disparidade existente entre o HLA do doador e receptor (62).

A rejeição de órgãos tem mecanismos imunológicos, e o papel das moléculas do MHC é tão importante, a ponto de ser o que permitiu a identificação e lhe deu o nome (complexo principal de **histocompatibilidade**). Nos casos em que o aloenxerto difere do hospedeiro em relação a loci de classe I e II, tanto células T CD4<sup>+</sup> como células T CD8<sup>+</sup> são ativadas pelo reconhecimento das moléculas de MHC alogênico do enxerto. Apesar de a rejeição ser um evento freqüente em transplantes de órgãos sólidos, no transplante alogênico de células-tronco, a incidência de falha de pega por mecanismo de rejeição das HSC transplantadas é relativamente baixa, porém com alta taxa de mortalidade, o que é extremamente associada com o grau de disparidade entre o HLA do receptor e do doador. Em receptores de transplante por neoplasia hematológica, com doadores HLA idênticos aparentados a incidência é de 1-2%, este número sobe para 10-20% quando o doador é não-relacionado (62).

Não existe transplante alogênico de HSC sem tipificação e grau aceitável de compatibilidade HLA. Geralmente, todos os alelos de um loci HLA, pela sua ligação próxima, são transmitidos como uma unidade para a geração seguinte. Esta unidade, chamada **haplótipo**, engloba a seleção de alelos contidos no complexo HLA de um dos cromossomas 6. Um pai ou mãe e o filho são usualmente haploidênticos, o que significa que compartilham um, e somente um, haplótipo HLA.

Irmãos, geralmente, têm uma chance de 25% de serem HLA idênticos, 50% de chance de serem haploidênticos e 25% de chance de serem completamente diferentes no que diz respeito ao HLA (63)

Para identificação, estão disponíveis técnicas sorológicas, celulares, bioquímicas e moleculares. As técnicas moleculares têm maior sensibilidade, mas os parâmetros realmente importantes para avaliação da técnica empregada são: fonte de HSC, grau de resolução e tempo necessário para realização da técnica, o número de amostras necessárias e o nível de experiência da instituição com as diferentes técnicas (62).

### 3.5.1.3 Resposta Th1/Th2

O sistema **imune adaptativo** evoluiu com o objetivo de reconhecer, discriminar e memorizar antígenos e patógenos estranhos. Para tanto, foram desenvolvidas células especializadas, capazes de capturar qualquer coisa que atravessa as barreiras epiteliais do indivíduo, iniciando uma resposta imune.

O “comandante supremo” deste sistema é o linfócito T que regula todas as operações de defesa. Os linfócitos T constituem uma população diversa. Células T helper naive (CD4+), proliferam-se e diferenciam-se em células efetoras secretoras de citocinas, em resposta à ligação do TCR à plataforma MHC, com um padrão polarizado de secreção citocínica, variando conforme o tipo de antígeno. Existem duas categorias maiores destas células: uma delas (CD4+,Th2), ativa as células B para produção de anticorpos; a outra – (CD4+,Th1) – ativa os macrófagos para imunidade mediada por célula (64,65).

A subpopulação de linfócitos CD4<sup>+</sup>-Th2 promove defesa contra infecções extracelulares e infecções helmínticas, enquanto a subpopulação de linfócitos – CD4<sup>+</sup>-Th1 – age contra infecções bacterianas intracelulares, fúngicas e protozoários.

As células Th1 coordenam a ativação de macrófagos e constituem o mecanismo de defesa celular mais importante contra patógenos intracelulares. A ativação de macrófagos é mediada pelo interferon gama (INF- $\gamma$ ), a principal citocina produzida pelas Th1. Macrófagos ativados pelo INF-  $\gamma$  rapidamente destroem bactérias intracelulares suscetíveis. Com esta destruição há produção de interferon alfa (INF- $\alpha$ ), que tem efeito sinérgico com o INF- $\gamma$ . Na indução de imunidade Th1, os macrófagos infectados produzem interleucina dois e interleucina doze (IL-2 e IL-12), que ativa as células NK e ativa a produção de INF- $\gamma$  que, subsequente, induz a diferenciação Th1.

Existem algumas doenças que podem ser associadas com resposta desproporcional Th1 ou Th2. Uma série de condições inflamatórias *in vivo*, podem estar relacionadas a preponderância de resposta Th1 ou resposta Th2 insuficiente, um bom exemplo disso é a doença inflamatória intestinal. Existem relatos de doenças auto-imunes, tais como artrite reumatóide e esclerose múltipla estarem relacionadas a patologias de Th1 ou resposta Th2 regulatória insuficiente.

A resposta Th2 estimula a resposta imune mediada por anticorpos, ativa mastócitos e leva à eosinofilia tecidual. A resposta Th2 reduz a reação inflamatória mediada por monócitos e macrófagos, mas mediam respostas inflamatórias via basófilos e eosinófilos, produz IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e IL-15, que são citocinas mediadoras de reações alérgicas. Em doenças como asma brônquica e fibrose hepática, temos preponderância de resposta imune Th2 (66). Ambas produzem IL-3, TNF- $\alpha$  e GM-CSF.

Usando nosso entendimento da biologia Th1/Th2 no escopo do transplante de medula, a patogênese da doença-do-enxerto-contra-o-hospedeiro (DECH ou GVHD), é, primariamente, descrita como um processo do tipo Th1.

#### 3.5.1.4 Doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD ou DECH)

Como para os demais transplantes, a maior dificuldade para o transplante de HSC alogênicas é a diversidade entre as moléculas do MHC de receptores e doadores. Existem centenas de variantes de cada molécula classe I ou classe II; mesmo pequenas diferenças entre elas podem causar respostas de células T aloreativas, que prejudicam o sucesso do transplante. Para o transplante de órgãos sólidos o maior perigo é a rejeição do órgão transplantado pelo sistema imune do receptor, mas no transplante de HSC, a situação é diferente.

A terapia mieloablativa abala o sistema imune do receptor a tal ponto, que a rejeição é um problema menor comparado à resposta imune das células T do doador contra as moléculas alogênicas de MHC do receptor (67). Quando esta situação ocorre, células T citotóxicas, efetoras, CD8<sup>+</sup> do doador, reagem a antígenos do receptor apresentados por células apresentadoras de antígenos (APCs) e atacam os tecidos do receptor, com ativação seqüencial das células T e monócitos/macrófagos do doador.

Os efeitos em cascata da produção desregulada de citocinas são manifestações inflamatórias severas, que reconhecemos clinicamente como doença do enxerto-contra-o-hospedeiro aguda (DECH ou GVHD). Sobrevidas de longo prazo, também são afetadas de maneira adversa pelo GVHD crônico, que têm manifestações clínicas e patológicas diversas do GVHD agudo, mimetizando uma doença auto-imune. Os principais órgãos alvo do GVHD agudo são pele, fígado, intestino, pulmões



e tecidos linfóides. O GVHD crônico, que geralmente ocorre após 100 dias do transplante alogênico, afeta os mesmos tecidos e também articulações e superfícies mucosas (68).

O GVHD é uma condição que varia em severidade e pode ser fatal. Mesmo quando o doador e o receptor são HLA idênticos, pode acontecer GVHD, usualmente mediado por células T que são específicos para **antígenos menores de histocompatibilidade (mHa)**. Estes antígenos são derivados de proteínas citoplasmáticas do “*self*”, apresentadas por moléculas MHC classe I, da superfície celular.

São duas as características importantes dos mHa: sua distribuição restrita aos tecidos e a imunodominância que alguns deles exibem. Os antígenos menores de histocompatibilidade podem ocorrer devido a polimorfismos de outras proteínas não-HLA, às diferenças nos níveis de expressão das proteínas ou diferenças genômicas entre homens e mulheres (como os antígenos H-Y, codificados pelo cromossoma Y, que pode estimular GVHD quando uma irmã doa HSC para um irmão HLA-idêntico). Outros exemplos destes antígenos são antígenos de transmissão materna, aloantígenos epidérmicos e antígenos virais. Os antígenos virais apresentados pelo receptor funcionam como antígenos menores de histocompatibilidade no GVHD agudo e podem explicar o risco aumentado de GVHD em pacientes submetidos a transplante alogênico, com infecções por herpes e citomegalovírus (69)

O GVHD crônico e o agudo são mais comuns pós-transplantes com PB comparados a transplantes com BM (70).

#### 3.5.1.4.1 Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (aGVHD)

O GVHD agudo é classificado por escore clínico que envolve órgãos e sistemas individuais e por uma classificação geral, que varia de grau I-IV, sendo a de grau I a mais leve; a de grau IV, a mais severa. A probabilidade de GVHD agudo graus II-IV, em transplantes sem manipulação do enxerto, é de 40% para doadores HLA-genotipicamente idênticos; 50% para doadores fenotipicamente idênticos; 75% para mismatches em um locus; 80% para mismatches em dois loci; 90% para mismatches em três loci. O grau de severidade de GVHD depende do locus que é discrepante (HLA-D>HLA-A>HLA-B). Mismatches em HLA-D não são permissíveis, mas mismatches nos locus A e B podem, por vezes, serem tolerados. (71)

A patofisiologia do GVHD agudo pode ser considerada, de maneira seqüencial, em três etapas, sendo o condicionamento a fase 1, a ativação de células T, a fase 2 e os efetores inflamatórios, a fase 3; primariamente, é um processo do tipo Th1.

A primeira fase do GVHD agudo, na realidade, ocorre antes da infusão das células do doador. As células T do doador são infundidas em um receptor que foi profundamente lesado pela sua doença base, por infecções e pelo regime de condicionamento do transplante. Todas estas situações levam a mudanças pró-inflamatórias importantes no endotélio e nas células epiteliais. Existe ativação celular e liberação de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , interleucina-1(IL-1) e interleucina-6 (IL-6). Estas citocinas levam a supregulação dos antígenos do receptor e das moléculas de adesão, permitindo que as células T respondam aos antígenos do receptor. A lesão à mucosa do trato gastrointestinal, induzida pelo condicionamento prévio, permite que bactérias e endotoxinas bacterianas, entrem na circulação e aumentem a secreção de citocinas inflamatórias derivadas dos macrófagos.

A segunda fase inclui apresentação de antígeno e, com subsequente ativação, proliferação e diferenciação das células T do doador. A aloreatividade produzida *in vivo* requer processos controlados pelos órgãos linfóides secundários. As células T do

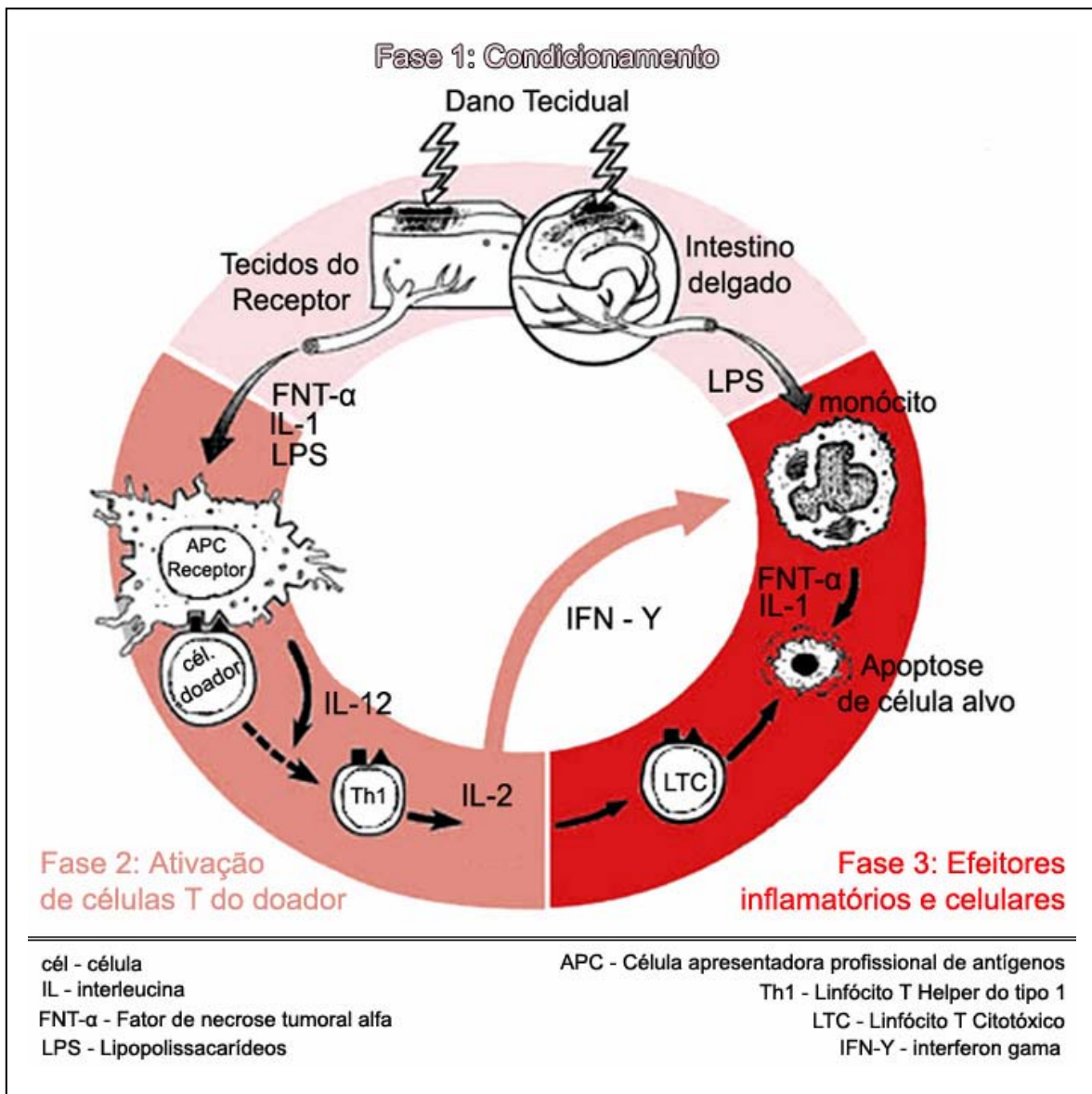
doador reconhecem os antígenos do receptor apresentados pelas APCs do receptor ou do doador que apresentam, de maneira cruzada, antígenos do receptor; diferenciam-se em células T helper 1 (Th1), que secreta INF- $\gamma$  e IL-2. Foi demonstrado que a APC do receptor é crítica em um modelo de GVHD mediado por linfócito T CD8 em mismatch de antígeno menor de histocompatibilidade (mHa). O papel exato das APCs na indução do GVHD ainda deverá ser elucidado.

A terceira fase é uma cascata complexa de múltiplos efetores. A regulação das células efectoras para tecidos-alvo é feita por um conjunto complexo de sinais quimiotáticos onde vários receptores podem ser ativados simultânea ou sucessivamente. As células TH1 que se diferenciaram na segunda fase induzem à formação de CTLs (linfócitos T citotóxicos) e ativam as células Natural Killer (NK), estas células atacam várias células-alvo do receptor através de FasL e perforinas. As células Th1, em resposta à estimulação das endotoxinas que entraram na circulação sistêmica através do TGI, ativam os macrófagos, levando ao aumento de produção das citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e óxido nítrico. Estas moléculas citotóxicas atacam diretamente vários tecidos do receptor, o que caracteriza as manifestações clínicas do GVHD agudo (5,72).

Devido ao fato de as células Th1 produzirem IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  durante o GVHD, a modulação da tempestade citocínica pode ser atingida através de inibição específica ou geral de citocinas inflamatórias, ou através de aumento da imunidade Th2, com efeito regulatório; existem estudos em andamento sobre a regulação Th2 do GVHD (66).

Um dado interessante é a relação entre infecção viral e GVHD agudo. Estudos indicam que infecções virais podem ativar células NK levando à proliferação, blastogênese e produção de INF- $\gamma$ . Esta, por sua vez, contribui na formação de um

“estado antiviral” que; por outro lado, favorece a resposta Th1 e conseqüente possibilidade de surgimento de GVHD agudo (73).



**FIGURA 6** – Patofisiologia do GVHD agudo.

Os mecanismos patológicos do GVHD como três etapas sequenciais: (1) condicionamento do receptor; (2) ativação de células T do doador, adesão, coestimulação e produção de citocinas; (3) efetores citolíticos e inflamatórios. Adaptado de Ferrara (68).

Em 1995 foi publicado o consenso da graduação do GVHD agudo (75):

**TABELA 5 - CLASSIFICAÇÃO DE GVHD AGUDO.**

	<b>Órgão/extensão de envolvimento</b>		
	<b>PELE</b>	<b>FÍGADO</b>	<b>TRATO INTESTINAL</b>
<b>Estadio</b>			
<b>1</b>	Rash em 25% da pele	Bilirrubina entre 2-3 mg/dl	Diarréia > 500ml/dia ou náusea persistente
<b>2</b>	Rash em 25-50% da pele	Bilirrubina entre 3-6 mg/dl	Diarréia > 1000ml/dia
<b>3</b>	Rash em >50% da pele	Bilirrubina entre 6-15 mg/dl	Diarréia >1500ml/dia
<b>4</b>	Eritrodermia generalizada com formação de bolhas	Bilirrubina >15 mg/dl	Dor abdominal severa com ou sem íleo
<b>Grau</b>			
<b>0</b>	Nenhum	Nenhum	Nenhum
<b>I</b>	Estadio 1-2	Nenhum	Nenhum
<b>II</b>	Estadio 3	ou Estadio 1	ou Estadio 1
<b>III</b>	-	Estadio 2-3	ou Estadio 2-4
<b>IV</b>	Estadio 4	ou Estadio 4	-

Veja a ilustração:



**FIGURA 7** – GVHD agudo de pele

#### 3.5.1.4.2 Doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (cGVHD)

O GVHD crônico tem incidência global 20 a 70% em pacientes que sobrevivem mais de 100 dias pós-transplante e sua patogênese permanece ambígua. É a maior causa de mortalidade não-relacionada à recidiva no período superior a dois anos pós-transplante (75) Trata-se muito mais de um processo fibrótico; o aGVHD reflete mais apoptose e necrose (76).

Tradicionalmente se diferenciavam os dois tipos de GVHD pelo tempo pós-transplante do diagnóstico. GVHDs diagnosticados pós cem dias do transplante,

geralmente, eram crônicos; diagnósticos anteriores a esse período, geralmente, eram GVHDs agudos. Definições mais recentes apontam as manifestações clínicas como mais importantes nesta diferenciação do que o tempo pós-transplante.

O diagnóstico de GVHD agudo está altamente relacionado ao aparecimento de GVHD crônico, mas 25 a 35% dos pacientes com cGVHD não tiveram nenhuma manifestação de aGVHD. 20 a 30% dos pacientes que tiveram diagnóstico de aGVHD, não desenvolverão cGVHD (77).

Em humanos, o diagnóstico de cGVHD é extremamente raro em transplantes autólogos e singênicos, em relação aos transplantes alogênicos, o início do cGVHD ocorre geralmente de 4 a 6 meses pós-transplante; raramente aparecendo antes do D+80 e menos de 5% dos casos após um ano de transplante.

A patofisiologia do cGVHD permanece caracterizada de maneira pobre. Uma das maiores dificuldades no estudo do GVHD crônico em humanos é a dificuldade de estabelecer um modelo animal que mimetize, de maneira adequada, a doença em humanos. Existem maneiras de induzir GVHD crônico em camundongos que desenvolvem doença *lupus-like*, com envolvimento renal e formação de autoanticorpos e ativação policlonal de células B. Apesar de não ser relevante para modelo de GVHD em humanos (em humanos, células B do receptor não sobrevivem ao transplante e glomerulonefrite é uma manifestação extremamente pouco comum em GVHD crônico), ele demonstra duas situações-chave no GVHD crônico em humanos: a patofisiologia desta doença depende, aparentemente, da presença constante de células T do doador aloreativas ao receptor; a ativação linfocitária, predominante, é do tipo Th2.

O entendimento atual da etiologia do GVHD crônico em humanos baseia-se no entendimento que células T patogênicas do doador; proliferam em resposta a aloantígenos ou autoantígenos não-verificados pelo timo normal ou mecanismos de deleção periféricos. Células críticas na promoção de tolerância podem estar ausentes

no doador ou receptor. Essas células T patológicas atacam diretamente tecidos-alvo através de ataque citolítico, secreção de citocinas inflamatórias e fibrosantes, ou produção da ativação de células B e produção de autoanticorpos. O dano tecidual leva à fibrose e disfunção (76).

O timo tem um papel crítico na prevenção da autoimunidade, via eliminação de células T autorreativas. Isso sugere que a GVHD crônica é causada por células T autoreativas que escapam da seleção negativa no timo, que está lesado pelos regimes de condicionamento, GVHD aguda e/ou atrofia relacionada à idade. O GVHD crônico que ocorre geralmente meses após o transplante, pode ser secundário a resposta imune Th2 a células T CD4+ do doador, que escaparam da seleção tímica negativa e que permanecem reconhecendo antígenos MHC apresentados pelas APC do receptor. Estas células T CD4+ auxiliam as células B do receptor a sintetizar anticorpos contra vários antígenos teciduais do receptor (78).

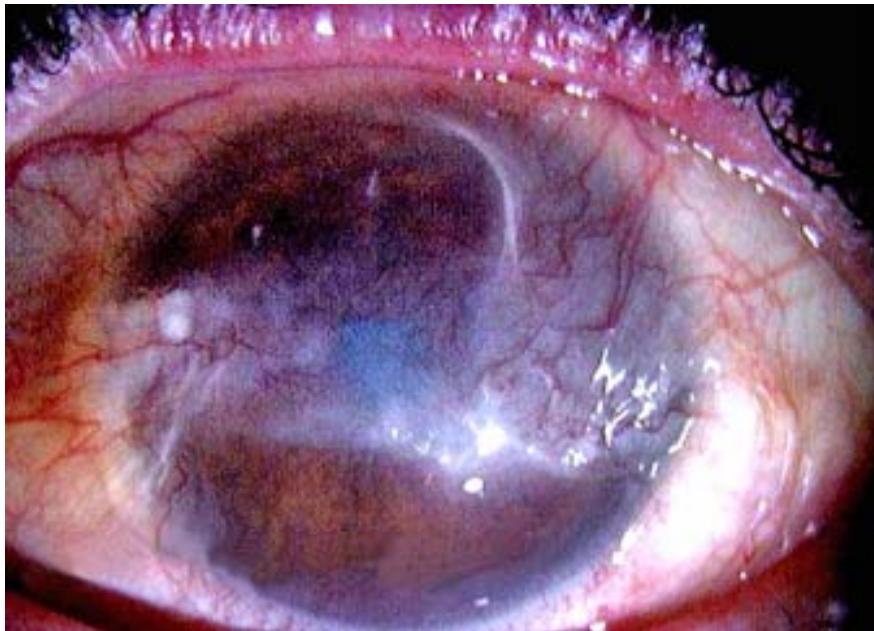
A pele é o tecido mais frequentemente envolvido (80% das vezes), podem ocorrer despigmentação, pápulas liquenóides, fibrose subcutânea e dérmica com alopecia. Envolvimento oral (70%) inclui líquen plano, ulcerações, atrofia e xerostomia. Olho seco é comum, podendo evoluir para ceratoconjuntivite sicca. Outras manifestações menos comuns incluem bronquiolite obliterante, sinusites de repetição, tendinites, fasciites, miosites e deficiência imunológica.

A primeira graduação de GVHD crônica foi feita em 1980 por Schulman (79) e dividida entre limitada e extensa. Em 2003 foi publicada uma nova graduação clínica com cálculo de escore com valor prognóstico (80) Finalmente em dezembro de 2005 foi publicado o consenso em diagnóstico e estadiamento de GVHD crônico pelo projeto de desenvolvimento de consenso em critérios para ensaios clínicos em doença do enxerto contra o hospedeiro do NIH (National Institute of Health) nos Estados Unidos. Este consenso em diagnóstico teve por objetivo definir os critérios para



diagnóstico de cGVHD, propor um novo escore clínico (0-3), que descreve a extensão e a severidade do envolvimento de cada órgão ou sítio acometido em qualquer momento, levando em conta o impacto funcional; acrescido do objetivo de determinar novos *guidelines* para verificação de severidade de cGVHD baseado no número de órgãos e sítios envolvidos e no grau de envolvimento (baixo, moderado ou severo). Espera-se que a publicação destes *guidelines*, oportunize a reprodutibilidade nos resultados das publicações em cGVHD e resulte em evolução do conhecimento nesta área (81).

Vide ilustrações:



**FIGURA 8** – GVHD crônico ocular



**FIGURA 9** – GVHD crônico de pele

#### 3.5.1.4.3 Tratamento de GVHD

Apesar de terem acontecido muitos avanços na prevenção e no tratamento do GVHD incluindo ciclosporina, FK506 e terapias combinadas com outros imunossupressores e anticorpos, esta síndrome continua trazendo grande morbidade e mortalidade aos pacientes submetidos a transplantes alogênicos. Novos agentes promissores estão sendo pesquisados, assim como indutores de tolerância específica a antígenos do receptor e, sem dúvida, o entendimento cada vez maior da fisiopatogenia do GVHD auxiliará no sucesso dos novos tratamentos (82).

### 3.5.1.5 Efeito do enxerto-contra-o-tumor (GVL OU GVT)

No transplante autólogo de HSC, as células-tronco são coletadas ou da medula óssea ou em sangue periférico mobilizado de um paciente e, posteriormente, reinfundidas no mesmo indivíduo, após terapia mieloablativa. Como o doador e o receptor são a mesma pessoa, não há barreira genética neste tipo de transplante e o GVHD não é um problema. Em compensação, os níveis de recaída da doença-base e falha de pega são maiores em relação aos transplantes alogênicos. Efeito semelhante foi observado em pacientes que tiveram seu enxerto T-depletado para prevenção de GVHD agudo. Apesar de o GVHD ter sido efetivamente reduzido, a incidência de recaída e falha da pega foi aumentada. Os benefícios do GVHD também foram observados em transplantes entre irmãos HLA-idênticos, nos quais respostas de linfócitos T contra antígenos menores de histocompatibilidade e, conseqüente GVHD, correlacionaram-se com maior sobrevida livre de doença. Em conjunto, estas observações indicam que algum tipo ou nível de reação GVH mediada por célula T, facilita o processo da pega e da erradicação tumoral. A superioridade na pega pode ser atribuída a células T alorreativas do enxerto que “limpam” a medula óssea do receptor, atacando as células do receptor que poderiam iniciar a aloreação, ou serem efectoras dela.

A eliminação das células tumorais residuais é devida às células T aloreativas do enxerto, que lisam células tumorais alogênicas, pela expressão de alguns “alvos” HLA classe I, compartilhados com as células saudáveis do receptor. Este tipo de resposta antitumoral é conhecido como **efeito enxerto-contra-leucemia ou enxerto-contra-tumor** (GVL ou GVT) (67).

Na infusão de linfócitos do doador (DLI), também pode ser observado o efeito GVT. O efeito citotóxico do DLI é tão importante que pode levar à aplasia medular em

mais de 50% dos pacientes. A dose e a frequência, ótimas para DLI, ainda não são conhecidas. As infusões de leucócitos do doador estão associadas com GVHD em mais de 80% dos casos, mas nem todos os pacientes responsivos a esta terapia apresentam GVHD, o que implica a existência de mecanismos para GVL associado a GVHD e GVL independente de GVHD (83,84).

Em 2000 foi publicado o trabalho do Leukemia Working Party do European Group for Blood and Marrow transplantation, onde foram analisados em um período de treze anos, 5200 transplantes autólogos e 1039 transplantes alogênicos aparentados HLA-idênticos onde não houve evidências de GVHD crônico ou agudo. Os receptores de transplantes alogênicos HLA-idênticos, sem GVHD tiveram um menor risco de recaída e uma melhor sobrevida livre de doença que os pacientes submetidos a transplante autólogo. Podendo esse fenômeno ser resultante de efeito enxerto contra tumor na ausência de GVHD.

Existem muitas remissões prolongadas após transplante como resultado de efeito GVL contra moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) e contra antígenos menores de histocompatibilidade (mHa). As moléculas mHa podem ser expressas em níveis variados em diversos tecidos; são as responsáveis pela aloreatividade entre receptores e doadores HLA-idênticos. Há demonstração de que alguns mHa conhecidos estão expressos na superfície de células de leucemia mielóide e linfóide. Os linfócitos T citotóxicos podem reconhecer e lisar estas células que expressam estes mHa "*nonself*".

Como é um reconhecimento feito dentro do contexto das moléculas do MHC, este mecanismo é conhecido como **citotoxicidade restrita ao MHC**. Especula-se que os mHa - presentes tanto nas células normais quanto nas leucêmicas - poderiam explicar o porquê da associação próxima entre GVL e GVHD. As diferenças quantitativas na apresentação de antígeno poderiam ser responsáveis pela

variabilidade na associação GVHD-GVL. Por outro lado, alguns mHa são restritos a tecidos específicos: um “antígeno menor mielóide”, que estaria presente somente em células mielóides normais do receptor e em células de leucemia mielóide e poderia provocar uma “reação anti-mielóide”, o que configuraria GVL sem GVHD. Existe também a possibilidade de que alguns antígenos estejam presentes somente nas células leucêmicas - que também poderiam produzir um efeito GVL, sem GVHD. No futuro, técnicas especiais de depleção T talvez possam permitir prevenção de GVHD sem perda expressiva do efeito GVL. Diferenças em moléculas de mHa associadas à hematopoese ou a presença de antígenos associados à leucemia nas células leucêmicas do receptor podem ser utilizadas como alvos para imunoterapia. (83,84).

#### 3.5.1.6 Imunodeficiência Pós-Transplante

O transplante de medula óssea é – freqüentemente - acompanhado de imunodeficiência clínica. Vários fatores podem contribuir para a resposta imune defeituosa dos receptores de transplante, por exemplo: os pacientes com tais reações podem ser incapazes de refazer o repertório linfocitário completo; o enxerto transplantado pode não conter um número ou variedade suficiente de progenitores linfóides auto-renováveis. (85).

Como consequência da imunodeficiência, os receptores de medula óssea são muito suscetíveis a infecções virais (especialmente citomegalovírus), infecções bacterianas e fúngicas. Estes pacientes também são suscetíveis a linfomas de células B ligados à infecção por Epstein-Barr vírus (EBV). A imunodeficiência de pacientes pós- transplante de medula óssea pode ser mais intensa do que a de outros pacientes imunossuprimidos. Após o transplante, o grau de imunodeficiência é influenciado pelo tipo de terapia imunossupressiva empregada e pela presença de GVHD, se ocorrer. A

recuperação do estado de imunodeficiência é mais rápida após transplante autólogo, comparado a transplante alogênico. Em três meses, a maioria dos pacientes demonstra recuperação da imunidade celular T específica para herpes simples e CMV.

Ocorrendo GVHD crônico, a imunodeficiência de células B e células T pode persistir por anos, prejudicando a produção de imunoglobulinas e função reticuloendotelial. Os pacientes podem receber vacinação, transcorrido o primeiro ano do transplante. Os pacientes costumam ter boas respostas a vacinas contra Influenza, pneumococco, vírus da pólio inativado, difteria, pertussis, toxóide tetânico, e vacinas conjugadas contra hemophilus do tipo B. Já os pacientes em terapia imunossupressora para GVHD crônico, podem não ter respostas sorológicas adequadas (84). Apesar de estes pacientes receberem antibióticos profiláticos de rotina e tratamento preemptivo para CMV, a morbi-mortalidade relacionada às infecções continua, assim como o GVHD: um problema maior na rotina dos pacientes transplantados com células progenitoras alogênicas (38).

### **3.5.2 Transplante Alogênico na Atualidade**

O TMO alogênico está estabelecido como terapêutica curativa para pacientes selecionados que apresentam doenças hematológicas malignas, aplasias de medula óssea e severas deficiências congênitas hematopoéticas ou imunohematopoéticas. Mais recentemente, o TMO tem sido testado como tratamento para tumores sólidos (55).

Embora nos transplantes alogênicos o doador preferível seja um irmão com HLA compatível, somente 25 a 30% dos pacientes têm este doador na família. Doadores singênicos estão disponíveis em menos de 1% dos casos e doadores HLA fenotipicamente compatíveis ou famílias de doadores haploidênticos com um antígeno

não-compatível estão também disponíveis (Parham e MacQuenn, 2003). Em 30% dos casos, um doador fenotipicamente compatível não-relacionado pode ser encontrado nos registros internacionais.

Para algumas doenças específicas tais como aplasia de medula óssea, talassemia e síndromes de imunodeficiência severa combinada, o transplante alogênico é a única opção. No transplante alogênico, pode haver DECH - doença potencialmente fatal e um dos mais importantes de fatores de insucesso no transplante alogênico – sendo a patogênese e o tratamento do GVHD um campo formidável de pesquisa (86,87,88).

Após o sucesso inicial dos TMOS alogênicos de doador compatível não-relacionado, grandes bancos de medula óssea foram estabelecidos. Em 2002 existiam mais de 7 milhões de doadores voluntários de medula óssea em mais de 40 registros em todo o mundo; o National Marrow Donor Program (NMDP) nos Estados Unidos - maior registro único de doadores voluntários – neste ano, contava com mais de 4.000.000 doadores potenciais listados (89).

Mesmo assim, enxertos de doadores não-relacionados não são disponíveis para todos. O tempo de espera para busca no NMDP é em média de quatro meses; problemas tais como a não-disposição dos doadores (30% dos doadores não estão disponíveis para serem reavaliados no momento da requisição) e a não-contemplação das minorias étnicas dificultam a efetivação dos transplantes. Outra fonte de medula óssea alogênica é sangue de cordão umbilical (UCB), sendo o primeiro transplante de células de cordão umbilical bem-sucedido realizado em 1988 pelo grupo da Dra Gluckman em Paris, em um paciente com anemia de Fanconi. Uma vantagem significativa do UCB é a sua rápida obtenção após identificação de uma unidade compatível, em média 13,5 dias nos EUA.

Em 1993, bancos de cordão umbilical estavam bem estabelecidos em Nova York, Dusseldorf e Milão. Dados do IBMTR demonstram que, entre 1999 e 2002, o número de transplantes utilizando UCB, aumentou, mas ainda contabiliza menos de 20% dos transplantes não-relacionados (48). Atualmente existem mais de 130.000 unidades de UCB estocados em bancos de cordão umbilical públicos e privados no mundo todo e foram realizados mais de 3000 transplantes em crianças.

A dose total de células nucleadas de uma UCB é fundamental em termos de pega e sobrevida. A quantidade de células nucleadas é um fator limitante para uso, principalmente em receptores adultos (somente 30% das UCB tem células suficientes para possibilitar pega em um indivíduo de 60 quilos), mas apesar disto esta modalidade de transplante tem sido usada em pacientes adultos selecionados com doenças malignas e não malignas (90,91).

A menor incidência de DECH observada em receptores de células de cordão umbilical de doador não-relacionado pode ser devido a menor resposta imune das células do sangue fetal, comparado às respostas conseguidas com células adultas. (92,91).

Nos **mini-transplantes (transplantes não mieloablativos)**, a idéia é não mais tentar erradicar a doença-base com quimioterapia de altas doses, altamente tóxica, mas usar as células do doador com este propósito (efeito GVT alogênico) (93) e com isso oportunizar, para pacientes mais idosos, o transplante alogênico.

O transplante alogênico leva a um estado de **quimerismo**; presença de células provenientes de dois indivíduos. **Quimera completa** ocorre quando a origem das células hematopoéticas, é inteiramente do doador; **quimeras mistas** ocorrem quando são detectados elementos hematopoéticos, tanto do doador como do receptor; **quimera dividida (split chimera)** é termo usado em situações em que componentes linfóides e mielóides são discordantes em termos de origem celular (94).



.As quimeras mistas foram desenvolvidas em modelos animais como estratégia para induzir tolerância a aloenxertos para transplantes de órgãos sólidos. A observação de que quimeras mistas poderiam ser convertidas em quimeras completas, via infusão de leucócitos do doador (DLI) sem causar GVHD, e que quimeras mistas poderiam ser obtidas a partir de regimes de condicionamento não-mieloablativo, levaram a tentativas de usar este tipo de esquema no tratamento de doenças hematológicas malignas.

A maior experiência com mini-transplantes é em pacientes com linfoma ou leucemia linfocítica crônica, embora existam diversos estudos em curso em doenças malignas e não-malignas. Mini-transplantes para linfomas resultam em taxa de mortalidade relacionada ao transplante (TRM) de 20 a 30% de um até quatro anos após transplante. Como a dose do condicionamento é reduzida, a toxicidade aguda à quimioterapia também parece estar reduzida, embora evidências de menor TRM neste tipo de transplante ainda são pequenas. A maior causa de mortes relacionadas ao procedimento são infecções, seguidas de GVHD e de pneumonite idiopática. Os mini-transplantes mediam um efeito GVT, mas este efeito pode levar meses para acontecer, o que explicaria o efeito pobre deste procedimento em pacientes com doença resistente ou linfoma de alto grau. Em pacientes com linfoma de baixo grau - doença de Hodgkin e LLC - existem evidências de melhor controle tumoral com uma proporção significativa de pacientes estando vivos e sem doença, dois anos após o mini-transplante (91).

Outra modalidade de transplante parte da premissa de que quase todos os pacientes têm um familiar que é idêntico para um haplótipo HLA, e que está disponível para a doação. Cada pai preenche este critério, assim como metade dos irmãos. Neste contexto, o haplótipo HLA compartilhado permite uma reconstituição imune satisfatória das células T que realizam reconhecimento antigênico de forma restrita ao

HLA. O objetivo nestas situações é reduzir, ou prevenir, as conseqüências imunológicas do mismatch do outro haplótipo HLA.

Muitos destes transplantes envolvem mismatches de todos os loci HLA classe I e II, uma situação que acarreta GVHD severo e prognóstico pobre. Por isso este tipo de transplante foi realizado em pacientes que necessitavam de terapia salvadora.

O transplante haploidêntico, HLA-mismatched, com intensificação do condicionamento e mega-doses de enxerto obtidas a partir de coleta de células-tronco periféricas, tem alcançado melhores resultados. O GVHD é prevenido por infusão de células CD34 altamente purificadas; depletadas de células T. Neste inóculo, também estão presentes células de veto (*veto cells*), células acessórias que têm em comum o potencial de neutralizar células precursoras T-citotóxicas do receptor.

Neste tipo de transplante, a pega é bem-sucedida, e a ocorrência de GVHD é muito pequena! (11) Pacientes que recebem transplantes haploidênticos HLA-mismatched, são essencialmente depletados de células T do doador, como vemos pela ausência de GVHD, e não seria esperado que houvesse um efeito significativo GVL mediado por células T. Nestes pacientes, foi descoberto o efeito GVL mediado por células Natural Killer (67,95).

A ocorrência e especificidade de uma resposta benéfica ligada às células NK depende de diferenças no HLA-C, entre doador e receptor, e a resposta é mediada por subpopulações de células que expressam KIR (*killer-cell-immunoglobulin-like receptor*), não inibidos pelos ligantes HLA-C do receptor. Talvez no futuro, busquemos intencionalmente o mismatch que leva ao efeito imunológico benéfico das células NK nos transplantes alogênicos (67,96).

Com o maior entendimento da imunologia das HSCs e dos aloenxertos, somado à sofisticação da tecnologia para manipulação de HSCs, as ferramentas de

imunoterapia no transplante alogênico de HSCs tem sido cada vez mais utilizadas e a exemplo da tecnologia em HLA, certamente passarão “da bancada para a beira do leito” antes do esperado.

### 3.6 RECONSTITUIÇÃO IMUNE

Após transplante, a reconstituição da medula óssea consiste em dois fenômenos diferentes: a recuperação numérica dos elementos celulares da medula óssea e a recuperação funcional das interações entre estas células. Embora o reaparecimento dos neutrófilos e de plaquetas seja considerado o sinal de recuperação hematológica pós- quimioterapia e transplante de células-tronco, este fato não leva em conta a recuperação da função imune. De fato, a recuperação das células participantes da resposta imune humoral e celular pode levar anos no pós-transplante (97,98,99).

O conceito de **pega do enxerto** leva em consideração a recuperação numérica dos elementos da medula óssea através de sua representação indireta pelo hemograma. No TMO, o sinal de pega é o momento em que o número de neutrófilos em sangue periférico é  $\geq 0,5 \times 10^9/l$  por três dias consecutivos. A recuperação de neutrófilos ocorre de 8 a 30 dias após a infusão. A recuperação plaquetária ( $\geq 20 \times 10^9/l$  por três dias consecutivos) se dá em média 21 dias após o transplante. No Transplante Autólogo, a pega de neutrófilos se dá, em média, doze dias após o transplante; a pega plaquetária, em torno de treze dias após a infusão. A documentação da pega é realizada através do exame de quimerismo (confirma se o DNA pós-transplante é do doador ou do receptor, considera-se pega a representação do DNA do doador no exame do receptor) (94).

Os linfócitos são as únicas células do corpo capazes de reconhecer e distinguir diferentes determinantes antigênicos; por isso, são responsáveis por duas características que definem resposta imune adaptativa: especificidade e memória (100). Estas células se originam de células-tronco e passam por estágios de maturação complexos, durante os quais expressam receptores antigênicos e adquirem características funcionais e fenotípicas de células maduras. Os linfócitos B chegam à completa maturidade na medula óssea; os linfócitos T migram para o timo e lá passam pelo processo de diferenciação. Após terem maturado, estas células deixam o timo ou a medula, entram na circulação e povoam os órgãos linfóides periféricos, onde vão se expor a diversos antígenos.

Linfócitos *Naive* são linfócitos maduros, capazes de reconhecer antígenos, mas para os quais ainda não foram apresentados antígenos. Linfócitos não podem ser distinguidos morfológicamente com precisão. Os linfócitos B produzem imunoglobulinas (anticorpos); linfócitos T dividem-se em dois subtipos: células T helper e células T citotóxicas ou citolíticas.

Linfócitos T e B têm receptores antigênicos distribuídos clonalmente, o que significa que há muitos clones destas células com diferentes especificidades antigênicas. Todos os membros de cada clone expressam receptores antigênicos com a mesma especificidade; são diferentes dos receptores de outros clones. Os genes que codificam os receptores antigênicos dos linfócitos T e B são formados por recombinações de segmentos de DNA, durante a maturação destas células. As recombinações somáticas geram milhões de diferentes receptores antigênicos, o que resulta em um extremamente diverso repertório de linfócitos.

A expressão gênica dos receptores antigênicos é central no processo de maturação linfocitária; existem silmilaridades nos processos onde a célula B adquire a habilidade de expressar genes de imunoglobulina (Ig) e a célula T “aprende” a

expressar genes de receptor de célula T (TCR). A maioria das células T helper expressa uma proteína de superfície chamada CD4; as células T citotóxicas expressam uma proteína diferente chamada CD8.

As células Natural Killer são uma terceira população de linfócitos com receptores antigênicos diferentes das células B e T, têm função principal na imunidade inata contra viroses, micróbios intracelulares e células tumorais.

A resposta imune adaptativa pode ser dividida em três fases: reconhecimento de antígenos, ativação de linfócitos e fase efetora. Toda a resposta imune é iniciada pelo reconhecimento antigênico, que leva à ativação linfocitária. Esta ativação requer dois sinais distintos: a presença do antígeno (primeiro sinal); outros produtos microbianos - ou componentes da imunidade inata que respondem aos micróbios (segundo sinal). Como exemplos deste segundo sinal, teríamos as citocinas, as moléculas co-estimuladoras e os produtos da degradação do complemento (hipótese dos dois sinais para ativação dos linfócitos). Na fase efetora da resposta imune, os linfócitos ativados por antígenos realizam funções efetoras que levam à eliminação dos antígenos (60).

Algumas células da progênie dos linfócitos T e B estimulados, não se diferenciam em células efetoras e tornam-se linfócitos de memória funcionalmente quiescentes, capazes de sobreviver por longos períodos. Quanto mais velho o indivíduo, mais células de memória e menos linfócitos *naive* possui.

Os linfócitos de memória conferem proteção imediata em tecidos periféricos e montam respostas imunes a antígenos já conhecidos em órgãos linfóides secundários. Em linfócitos B, estas funções são realizadas por células distintas. A memória protetora é mediada por plasmócitos, que secretam anticorpos; a memória reativa, por células B de memória que proliferam e se diferenciam em plasmócitos - em resposta à estimulação antigênica secundária. Recentemente, entre os linfócitos T, também

surgiu uma divisão similar em termos de “trabalho celular”. Neste modelo, a memória protetora é mediada por células T de memória efetora, que migram para tecidos periféricos com intensa reação inflamatória e realizam função efetora imediata, enquanto a memória reativa é mediada por células T de memória central que migram para áreas de célula T de órgãos linfóides secundários, têm pouco ou quase nenhuma função efetora, mas proliferam prontamente e diferenciam-se em células efetoras em resposta a estimulação antigênica (101).

A ontogenia das células do sistema imune é extremamente complexa; a reconstituição imune destas células, pós-transplante de células-tronco é tão, ou mais complexa, visto que nem sempre remonta à ontogenia prévia (102).

A reconstituição imune envolve diversos componentes: o reaparecimento de células B funcionais, o desenvolvimento de células T tímicas e extratímicas, a reconstituição de células efetoras incluindo células T citotóxicas e células *natural killer*, ainda a apresentação eficiente de antígenos para a reconstituição do repertório imune pré- transplante.

Qualquer debate sobre reconstituição imune em pacientes pós- transplante de HSCs deve se preocupar com a divisão dos que receberam transplante de células autólogas ou dos que receberam transplante de células alogênicas. Ambos os processos envolvem altas doses de quimiorradiação com o objetivo de eliminar neoplasia, mas também envolvem ablação da medula óssea. Além disso, as altas doses de quimioterapia e radioterapia causam dano a outros tecidos, como à mucosa gastrointestinal e oral, à pele, ao tecido linfóide e ao epitélio tímico.

No transplante alogênico, existem ainda problemas adicionais: o maior potencial complicador do pós-transplante alogênico é o GVHD que está intimamente ligado à função imune pós-transplante. Com o objetivo de prevenir GVHD drogas imunossupressoras são usadas e/ou os enxertos são manipulados para redução do

número de células T que causam o GVHD. Mesmo que as drogas imunossupressoras não sejam usadas, sabe-se que o GVHD, por si só, causa efeitos deletérios na função imune, podendo ser responsável por importante hipoplasia linfóide, defeitos de células B e dano ao estroma tímico, que resulta em desenvolvimento alterado de células T. (103).

A compreensão da restauração imune não serve somente para estudos experimentais de imunologia, também tem implicação clínica direta. Técnicas de prevenção de GVHD, com conservação da função imune, estão em desenvolvimento, resposta protetoras de células T contra CMV e EBV estão bem caracterizadas, sendo possível manipular a imunidade antiviral com peptídeos, proteínas e vacinas de células dendríticas ou infusão de células T-antígeno específica. A manipulação da função imune viral serve como modelo da imunoterapia específica contra leucemia no pós-transplante (104,105).

### **3.6.1 Reconstituição Imune Pós TMO Autólogo**

Estudos comparativos demonstram que transplantes de células-tronco periféricas mobilizadas têm recuperação de plaquetas e neutrófilos mais precoce do que transplantes de medula óssea alogênica, levando a menor tempo de hospitalização e redução de custos (17,106,107).

Embora existam similaridades na reconstituição imune pós-TMO alogênico e autólogo, o TMO alogênico envolve a possibilidade de GVHD e o uso de terapia imunossupressora para controlá-la: ambas interferem nos estágios iniciais da reconstituição imune. O transplante de células-tronco autólogas não envolve o GVHD caracteristicamente, ou o uso de drogas imunossupressoras levando a uma

compreensão mais direta dos fatores envolvidos na reconstituição imune após quimioterapia ablativa e resgate (108).

A recuperação de neutrófilos se dá em média doze dias após o transplante autólogo de células periféricas, e a recuperação de plaquetas inicia-se, em média, treze dias após o auto TMO (17).

Em contraste com a recuperação hematológica pós-transplantes autólogos, nos alogênicos a reconstituição imune é mais lenta e difícil de documentar. A recuperação imune envolve diversos componentes da resposta imune tais como: reaparecimento de células B funcionais, desenvolvimento de células T tímicas e extratímicas, reconstituição de células efetoras incluindo células T citotóxicas e células Natural Killer, apresentação eficiente de antígenos para reconstituição do repertório imune pré transplante. A reconstituição pós-transplante das células B – aparentemente – remonta à ontogenia dos linfócitos B, tanto no rearranjo genético das imunoglobulinas, quanto na sua expressão fenotípica (108).

**Talmadge e colaboradores em 1997** demonstraram que a recuperação imune mais precoce ocorre em pacientes que fizeram transplante de células progenitoras periféricas autólogas comparados a pacientes que fizeram transplante de medula óssea autóloga. Esta reconstituição imune mais precoce incluiu aumento significativo na taxa de recuperação de monócitos circulantes (CD14<sup>+</sup>), células Natural Killer(CD56<sup>+</sup>), linfócitos T helper(CD4<sup>+</sup>), células T naive (CD45RA) e células TCRγδ.

Após transplante de medula óssea autólogo (TMO autólogo), ou transplante autólogo de células progenitoras periféricas (PBSCT), as células B se regeneram a partir de diversas origens: Células B do receptor que sobreviveram a condicionamento pré-transplante podendo estar localizadas na medula óssea, nos linfonodos e no baço; células B presentes no enxerto; progenitores de célula-tronco hematopoética que se diferenciam após a pega no receptor; células-tronco residuais do receptor. A



reconstituição da função das células B *in vivo* pós-pega demonstra defeito seletivo com níveis séricos normais de IgM retornando 6 meses pós-transplante, IgG aos doze meses e IgA após dois anos, mais uma vez remontando o desenvolvimento normal das células B (108)

As células-tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea no processo usual migram para o timo, que é o maior sítio de diferenciação de células T. (61). Entretanto, o timo não é o único sítio de diferenciação T, temos também as vias extratímicas que ocorrem na mucosa intestinal, no fígado e em camundongos, na medula óssea. Existe – possivelmente – contribuição destes sítios extratímicos na reconstituição imune pós-transplante.

Após transplante autólogo de medula óssea, o número relativo de células CD3<sup>+</sup> é significativamente reduzido no primeiro mês pós-pega, retornando a níveis normais em torno de três meses pós-transplante. Um decréscimo nos números relativos e absolutos de células CD4<sup>+</sup> no sangue periférico é comum, podendo persistir por um ano ou mais tempo. Por outro lado, o número absoluto e relativo de células CD8<sup>+</sup> é reconstituído muito rapidamente, causando uma inversão na taxa CD4/ CD8 nos meses iniciais pós-transplante (107).

Após altas doses de quimioterapia, foi observada correlação inversa entre o tamanho do timo e o nível de CD4 no sangue periférico, o que dá suporte à noção de que o desenvolvimento de células T helper depende de função tímica residual. A involução tímica inicia-se em torno de um ano de idade e progride na taxa de 3% ao ano até a meia-idade, após diminui para menos de 1 % ao ano. O fato de a reconstituição imune das células T CD8<sup>+</sup> não ser prejudicada de maneira significativa pela involução tímica relacionada à idade, sugere que vias extratímicas contribuem para reconstituição dela. (61,110).

Existe uma predominância de CD28<sup>-</sup> e CD57<sup>+</sup> entre as células CD8<sup>+</sup> que pode ser observada até nove meses após quimioterapia de altas doses. A ausência de expressão de CD28 é semelhante àquela observada em células CD8<sup>+</sup> derivadas de via extratímica. Subtipos funcionais de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> pós-transplante autólogo têm sido estudadas e podendo ser divididas com base na expressão de CD45 (CD45RA e CD45RO).

Células T CD45RO<sup>+</sup> correspondem a células de memória enquanto as células T CD45RA<sup>+</sup> correspondem a células T naive, recém saídas do timo. Durante os três primeiros meses pós TMO, o número de células CD45RA<sup>+</sup> está diminuído, mas retorna ao normal em torno de um ano pós-transplante. O subtipo CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> está profundamente reduzido no pós-transplante e pode reconstituir-se em tempo superior a dois anos, ao contrário da população CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> que normaliza no primeiro mês pós-transplante autólogo de medula.

No transplante autólogo de células-tronco periféricas, as células CD3<sup>+</sup> podem representar mais de 20% das células coletadas por aférese, após estimulação com fator de crescimento de colônia granulocítica (GCS-F), sendo 1 log maior que a de coleta de medula óssea autóloga. Imediatamente após o transplante de células progenitoras, o nível de células CD3<sup>+</sup> retorna ao normal, os níveis de células CD4<sup>+</sup> mantêm-se abaixo do normal, o número de células CD8<sup>+</sup> aumenta resultando em uma taxa CD4/ CD8 reduzida. A recuperação das taxas CD4/CD8 e CD45RA/CD45RO ocorrem mais rapidamente no transplante de células progenitoras periféricas que no transplante de medula óssea.

Assim como as células B, as células T pós autoTMO ou PBSCT podem reconstituir-se a partir de pelo menos quatro fontes: as raras células T do receptor que sobrevivem ao esquema de condicionamento, estas células podem ser encontradas na medula óssea, nos linfonodos ou no baço; as células T presentes no enxerto; as

células-tronco progenitoras do enxerto que se diferenciam no receptor; as células-tronco residuais do receptor. Especula-se que a quantidade de células T presentes no enxerto poderia influenciar a rapidez e a qualidade da recuperação das células T, mas não se sabe o quanto estes linfócitos T transferidos passivamente contribuem para uma imunidade celular sustentada. Pacientes transplantados com enxertos autólogos T depletados têm reconstituição no sangue periférico, de células T e B, muito mais lentamente, comparado a receptores de enxertos autólogos não-manipulados (111).

A funcionalidade das células T pode ser medida em três níveis diversos: proliferação celular, produção de citocinas e capacidade de lise. A proliferação de células T está prejudicada nos primeiros quatro meses, mas – em torno de um ano pós-transplante de medula – encontra-se normalizada. Esta proliferação também está prejudicada no PBSCT, mas a recuperação é mais rápida em relação ao auto TMO. Esta deficiência na proliferação T pode estar – em parte – relacionada ao efeito supressivo da grande quantidade de monócitos presentes na coleta de PBSC com GCS-F (112).

Células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas, restritas ao HLA, CMV específicas podem ser demonstradas três meses pós auto TMO ou PBSCT, na maioria dos pacientes; tendo efeito protetor contra CMV. As células citotóxicas específicas contra EBV estão prejudicadas nos primeiros dois meses após transplante autólogo.

Receptores de auto TMO, tem defeitos significativos na produção de citocinas derivadas de células T, particularmente IL-2, no período inicial pós-transplante.

A terapia mieloablativa causa alterações profundas no sistema imune que levam um ano, ou mais, pós-transplante para recuperação. Neste período, pode ocorrer diminuição do número de fagócitos, subtipos anormais de linfócitos T e síntese alterada de imunoglobulinas. Muitas vezes, embora os elementos envolvidos na

resposta imune estejam quantitativamente normais, existe uma dificuldade grande na execução da resposta imune funcional adequada (86).

No transplante autólogo, existem evidências de que recuperação na contagem absoluta de linfócitos no sangue periférico em valores  $\geq 500$  células/ $\mu$ l, quinze dias pós transplante, teriam um efeito benéfico, inclusive com aumento na sobrevida global em pacientes com mieloma múltiplo, com linfoma não-hodgkin e com câncer de mama metastático (113,114).

As células Natural Killer estão entre as primeiras células que se recuperam no pós-transplante autólogo; em contraste com a função das células T e B, a atividade das células NK é normalizada dentro do primeiro mês pós-infusão, tanto em auto TMO, como - mais rapidamente ainda - em PBSCT. A maturação das NK pode ocorrer na ausência de timo funcional, tanto em camundongos quanto em homens (115,116).

Independentemente da dose de CD34, do regime de condicionamento, diagnóstico, idade, autotransplante único ou tandem, as células NK alcançaram níveis normais um mês pós-transplante (120). No período precoce pós-transplante, quando a imunidade específica ainda está se reconstituindo, as células NK podem ser uma defesa importante contra infecções e recaída de tumor. A expansão das NK com fatores de crescimento imediatamente pós-transplante pode implementar as defesas do receptor e ser uma arma importante em termos de imunoterapia (109).

### **3.6.2 Reconstituição Imune Pós TMO Alogênico**

Nos pacientes submetidos a transplante de células-tronco alogênicas, o estabelecimento do sistema imune, a partir das células do doador no receptor, ocorre em fases que podem levar de meses a anos. Em pacientes que desenvolvem DECH crônico a recuperação imune pode jamais ser completada na sua totalidade. A

primeira fase de recuperação imune se dá por um aumento da contagem de neutrófilos que ocorre de duas a três semanas após infusão de células. Embora sua função esteja aparentemente intacta, apresenta quimiotaxia alterada por um período superior a quatro meses (118). O número de monócitos retorna ao normal no sangue periférico de três a quatro semanas após o transplante. Tal função foi demonstrada a partir do doador, 41 dias pós a infusão e com função geralmente normal. Os macrófagos no pulmão e no fígado são comprovadamente do doador em torno de oitenta dias pós-transplante.

A reconstituição do sistema imune-funcional, inicialmente, envolve a expansão do repertório dos linfócitos T do doador pós-tímicos com fenótipo e funcionamento não-usuais; este evento pode ser arrastado e incompleto em receptores mais idosos (119,110).

Nos primeiros meses pós-transplante de células-tronco, o repertório é dominado por células T expandidas, derivadas do compartimento de células T, do sangue periférico do doador. Neste compartimento temos - de modo predominante - células de memória central e células de memória efetora, com uma população menor de células T *naïve* e de células efetoras finais (120).

Em pacientes submetidos a transplantes alogênicos com depleção de células T, também a reconstituição, inicialmente, se dá através dos linfócitos T circulantes pós-tímicos do doador e neste caso o repertório linfocitário é particularmente reduzido e prejudicado nos primeiros meses pós-transplante (121). Estas células pós-tímicas são grandemente responsáveis pelo sucesso ou fracasso do transplante, devido ao grande impacto na pega, GVHD, GVL e à reativação de viroses.

Em termos de aloreatividade, devemos lembrar que o repertório de células T pós-tímicas do doador teve maturação a partir de processo de diferenciação onde células T imaturas, passaram pelo timo e foram selecionadas negativamente, através

de apoptose induzida por antígeno, por alta afinidade com antígeno próprio ou devido à baixa afinidade com antígeno próprio (negligência ou ausência de estímulo) (61).

No receptor do transplante este repertório maduro, encontra um novo ambiente antigênico via células apresentadoras de antígeno (APCs) do receptor. Reativações de viroses como CMV e EBV, necessitam de nova expansão clonal de células de memória central vírus-específicas.

Há expansão massiva de células T em resposta a viroses como CMV e EBV, em resposta a antígenos menores como HA-1 e HA-2 e em resposta a antígenos expressos de forma aumentada em células leucêmicas como PR-1, BCR-ABL e Tumor de Wilms-1 (WT1). O período precoce pós-transplante é caracterizado por expansões massivas e irregulares de células T, que produzem um repertório distorcido de linfócitos (104,122).

Estudos de aloresposta de células T de doadores a estimulação antigênica do receptor *in vitro*, revelaram expansões importantes de células T, ocupando praticamente 90% do repertório de células T de um paciente morrendo de GVHD. Também demonstraram que células de leucemia podem fazer surgir clones de células T, distintos dos clones que surgem com GVHD, provando molecularmente que efeitos GVHD e GVL podem ser separados!

A expansão massiva de células T pode ser explicada por forte estímulo antigênico associado a estímulo proliferativo que, por sua vez, é associado a ambiente profundamente linfopênico. Existem especulações quanto ao fato de a resposta imune mais potente no pós-transplante envolver células de memória do doador. O fenômeno de forte interação entre os antígenos e as células T é chamado **imunodominância**.

A fase final da reconstituição imune envolve o surgimento de um novo repertório de células T, gerado a partir dos precursores pré-tímicos do doador. Estas células processadas pelo tecido tímico do receptor são tolerantes ao alo-ambiente.

A técnica de quantificação de TRECs (círculos de excisão de receptores de células T) apresenta os linfócitos recém-saídos do timo. Os TRECs são resíduos de DNA circular da recombinação dos TCR, e são evidência do rearranjo de TCR: um processo exclusivo do estágio tímico de maturação dos linfócitos T. Quando os linfócitos entram em processo de expansão pós-tímica, os TRECs ficam mais e mais diluídos a cada divisão celular. A análise dos TRECs pós-transplante de células-tronco revela diferenças em termos de idade na capacidade de “educar” os precursores pré-tímicos do doador no timo do receptor.

Crianças e adultos jovens têm timos funcionais, altos níveis de TREC e reconstituem um novo repertório de células T dentro de um a dois anos pós-transplante. Indivíduos idosos expressam níveis de TREC, significativamente, inferiores aos apresentados pelos jovens; podem nunca chegar a reconstituir função tímica completa. Nestes pacientes, a competência imunológica, continua em grande parte, sendo atribuída ao compartimento de células T pós-tímico (104,123).

O número de linfócitos B nos primeiros meses pós-transplante é muito baixo, mas, lentamente retoma níveis normais num prazo em torno de 9 a 12 meses. A reconstituição destas células pode levar muito mais tempo, especialmente se o paciente desenvolve GVHD crônico e requer terapia imunossupressora prolongada. Além disso, o repertório de células B é usualmente restrito. Avaliação sorológica pós-imunização pode ser um indicador de funcionalidade de linfócitos B, levando em consideração que a resposta depende do tipo de antígeno apresentado.

Respostas a antígenos protéicos podem recuperar-se mais rapidamente que respostas a antígenos compostos de polissacarídeos. Cabe lembrar que a

responsividade das células B está ligada à função de células T helper; se temos CD4 reduzidos em número e função, teremos células B prejudicadas (Lamb LS, 2002). A recuperação linfocitária de modo geral, ocorre mais rapidamente em pacientes pós transplante alogênico de células periféricas comparado a transplante alogênico de medula óssea (125).

Os fatores que potencialmente podem afetar a reconstituição imune pós-transplante alogênico são: imunossupressão, para tratar ou prevenir GVHD; GVHD; idade do receptor (idade tímica); dose de linfócitos T; profunda imunoablação do receptor; imunodominância; células T reguladoras; balanço Th1/Th2; fatores de crescimento como IL-2, IL-12, IL-7; quimerismo linfóide, mismatching de HLA; polimorfismos de genes de citocinas (104,126).

*Natural Killers* são células capazes de mediar a citotoxicidade dependente de antígeno-anticorpo reconstituem-se até os níveis normais em torno de trinta dias pós-transplante, mas podem demonstrar função e fenótipo não usual, principalmente nas primeiras semanas pós-transplante, quando têm expansão maciça (124,127). Sabe-se que, mesmo em enxertos T depletados em transplantes alogênicos, a recuperação NK é a primeira a ocorrer entre os linfócitos (128). As células NK produzem linfocinas, inclusive interleucina 2 (IL-2), que podem contribuir para a recuperação da população de células T.

Em relação à recuperação imune pós-transplante de medula óssea não-mieloablativo (mini-transplante), comparada ao transplante alogênico convencional, o número absoluto de linfócitos, nos primeiros seis meses foram similares; no primeiro ano, as contagens de CD4 *naive* e total, e CD8 *naive* foram maiores em pacientes pós mieloablativo. Os níveis de anticorpos foram similares seis meses e um ano pós-transplante e também pós-vacinações. As taxas de infecção foram menores em pacientes pós-mini nos primeiros três meses, mas maiores após este período.



Aparentemente, a imunidade dos pacientes pós-condicionamento não-mieloablativo é melhor, precocemente pós-transplante, mas este dado não é verdadeiro, se comparado tardiamente com o transplante mieloablativo (129,130)

O entendimento da reconstituição imune pós-TMO alogênico é essencial para a compreensão de fenômenos como a DECH ou GVH e o **efeito-enxerto-contra-leucemia** (GVL ou ECL) (6,131,132,133).

### 3.7 NATURAL KILLER

#### 3.7.1 A Célula

As células *Natural Killer (NK)* foram, originalmente, descritas baseadas na sua capacidade funcional de eliminar células tumorais de origem hematopoética na ausência de estimulação prévia. Subseqüentemente, foram identificadas por anticorpos monoclonais como uma pequena população de linfócitos citolíticos; implicadas em uma série de atividades *in vivo*, como a atividade contra células tumorais, a resistência a infecções virais e a regulação da hematopoese. As células NK, são um subtipo de linfócitos crítico na imunidade inata para a defesa do organismo contra patógenos infecciosos invasivos e transformações malignas, através da elaboração de citocinas e atividade citolítica. As células NK são uma população heterogênea no que diz respeito ao fenótipo e à especificidade de alvo (100,134).

As células Natural Killer são linfócitos envolvidos na resposta imune inata, que têm a habilidade de responder rapidamente a antígenos estranhos nos momentos iniciais da infecção; frequentemente nas superfícies de barreira do indivíduo, onde se dá o encontro inicial entre antígeno e sistema imune. Embora as células NK e os linfócitos T CD8+ restritos ao MHC Classe I, destruam os seus alvos de forma similar,

as células NK não requerem a expressão de MHC classe I nas células-alvo para sua ativação. Ao invés disso, a expressão de moléculas MHC classe I protege a célula alvo contra a lise mediada pelas NK, sugerindo que as células NK podem ser cronicamente inibidas ou ativadas pela presença ou ausência de epitopos *self* (próprios), ao passo que as células T são ativadas pela detecção de epitopos “estranhos” (135).

A hipótese do *missing self* proposta por Karre postula que as células NK protegem os tecidos com expressão normal de MHC classe I e destroem células-alvo, quando estas não expressam – ou expressam de forma aberrante – o MHC classe I. Diferentemente das células T, as NK não têm a capacidade de rearranjar os seus receptores gênicos, o que limita o potencial da diversidade de seu repertório antigênico (136).

### **3.7.2 Morfologia, Citoquímica e Marcadores de Superfície**

As células *Natural Killer* são encontradas no sangue periférico e baço; raramente em outros tecidos linfóides. Morfologicamente se parecem com grandes linfócitos com citoplasma granular (*large granular lymphocyte*). Os grandes linfócitos granulares (LGLs) são células com citoplasma azulado-pálido e alta relação citoplasma-núcleo. Sua principal característica histológica é a presença de grânulos azurofílicos. Eles constituem 10 a 15% das células mononucleares no sangue e baço; são menos representadas em outros tecidos linfóides e no útero gravídico. São o subtipo de linfócito mais frequente no primeiro trimestre gestacional e depois desaparecem (são importantes na implantação fetal) (135,137). Estas células são maiores que os linfócitos típicos com uma maior quantidade de citoplasma que – por sua vez – contêm grânulos peroxidase negativo. LGLs não aderem a superfícies e não tem atividade fagocítica. Assim como os grânulos dos linfócitos T citotóxicos (CTLs),

os grânulos das células NK contêm perforinas e granzimas, ambos importantes na função citotóxica. Os grânulos podem estar presentes em várias formas, dependendo do estágio de ativação celular (102,138,64).

Em humanos, o melhor marcador de superfície para a identificação da célula NK é o CD56 ou NCAM (molécula de adesão celular neural), os níveis de expressão de CD56 variam de acordo com o subtipo de linfócito NK. As células NK são definidas fenotipicamente como linfócitos CD56<sup>+</sup> e CD3<sup>-</sup> (Nakamura, 2002). LGLs são fenotípica e funcionalmente heterogêneos (i.e., CD56<sup>+</sup> / CD3<sup>-</sup> / CD8<sup>-</sup>) e a maioria deles é CD16<sup>+</sup>(FcRγIII), um receptor de afinidade alta e intermediária para IL-2 (aproximadamente 80 a 90%); outros são CD57<sup>+</sup> / CD3<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> TCR-αβ<sup>+</sup>. Ambas as populações são citolíticas, mas as CD57<sup>+</sup>, são células T não restritas ao MHC (ou células NK-like). A população de células CD56<sup>+</sup> são chamadas de NK-LGL, enquanto que as CD57<sup>+</sup> são conhecidas como T-LGL. Ambas as populações são CD2<sup>+</sup> e CD7<sup>+</sup>. A separação entre estes dois tipos celulares não é absoluta e, freqüentemente, detectamos uma população celular intermediária que é CD56<sup>+</sup>/CD57<sup>+</sup>. A relação entre estas células e as que expressam somente um marcador é desconhecida. Embora a maioria das células NK CD56<sup>+</sup>, sejam CD3<sup>-</sup>, pequeno número de células CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> tem sido detectado, e leucemias de grandes linfócitos granulares (LGL) com este mesmo fenótipo têm sido descritas (64).

### 3.7.3 Função

Funcionalmente, as células NK são uma fonte importante de citocinas de imunorregulação inata como, por exemplo, interferon gama (IFN-γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e fator estimulador de colônia granulocítico-macrofágico (GM-CSF), que co-orquestram a resposta imune precoce e contribuem para a resposta

retardada de células T após as infecções. As células NK também têm atividade citotóxica direta ou natural contra algumas células infectadas por vírus, contra células leucêmicas e contra outras células tumorais e também mediam citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) de alvos através do FcγRIII (CD16), um receptor que se liga à porção FC do anticorpo. As células NK são efetoras da resposta imune inata contra tumores e células infectadas por vírus. Ao contrário dos linfócitos T, não expressam os receptores antigênicos que estas células apresentam e são classicamente consideradas como capazes de matar células-alvo de uma maneira não restrita ao MHC (*Major Histocompatibility Complex*) (102,144,134,140).

As células NK podem ser distinguidas por um fenótipo de superfície bastante característico, pelas citocinas que produzem e pela propriedade de desenvolverem resposta citotóxica de forma espontânea, sem sensibilização prévia. Expressam o fenótipo CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD2<sup>dim</sup>.

Dois subtipos de células NK são definidos de acordo com a intensidade de expressão de CD56 na sua superfície celular. Em torno de 90% das NK em humanos são CD56<sup>dim</sup> e expressam altos níveis de CD16, enquanto uma minoria (10%) é CD56<sup>bright</sup> e CD16<sup>dim</sup> ou -. Estes subtipos de NK são funcionalmente distintos com as células CD56<sup>bright</sup> imunorregulatórias produzindo citocinas abundantes, enquanto a citotóxica CD56<sup>dim</sup> funciona como efetora eficiente na lise celular natural ou mediada por anticorpo. As CD56<sup>bright</sup> expressam, constitutivamente, os receptores de alta afinidade e afinidade intermediária para interleucina-2 (IL-2); expandem *in vitro* e *in vivo* em resposta a baixa dose de IL-2. As células NK CD56<sup>dim</sup> em repouso são mais citotóxicas contra alvos sensíveis a NK (linhagens celulares K562 e COLO205) comparadas às NK CD56<sup>bright</sup>. Porém, após ativação com IL-2 ou IL-12 (*LAK cells*), as NK CD56<sup>bright</sup> exibem uma citotoxicidade contra células-alvo, igual ou superior a apresentadas pelas da NK CD56<sup>dim</sup>.

Além disso, as CD56<sup>bright</sup> em repouso e as NK CD56<sup>dim</sup> tem diferenças nos seus repertórios de receptores NK. As CD56<sup>bright</sup> em repouso são células grandes, agranulares que expressam níveis altos de receptores da família *lectina-like* CD94/NKG2, com frações muito pequenas expressando KIR (*killer-cell immunoglobulin receptor*). As NK CD56<sup>dim</sup> em repouso, expressam ambos os receptores KIR e *lectina-like*, numa densidade de superfície relativamente alta em conjunto com grânulos citolíticos abundantes no citoplasma (141,142,143,144)

Existe um subgrupo de células CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>dim</sup> ou - também denominado A-NK (células NK ativadas e aderentes); experiências *in vitro* demonstraram que a resposta deste subgrupo de células a IL-2 é muito mais eficiente, desenvolvendo rápida aderência ao plástico ou a superfícies sólidas; proliferando significativamente melhor. As células A-NK são expressivamente mais citotóxicas contra K562 (linhagem celular de leucemia mielóide) do que as não aderentes, demonstrando que sua adesividade em resposta à IL-2 não é somente relevante para superfícies plásticas, mas também uma propriedade mais geral e biologicamente significativa deste subtipo de NK (145).

As células efetoras ativadas por interleucina-2 têm sido referidas como células LAK (146). Entre os linfócitos, as células NK são as primeiras a responder à ativação a IL-2 *in vitro*, provavelmente porque expressam constitutivamente receptores de afinidade intermediária a esta citocina. A IL-12 estimula a proliferação e a ação citotóxica das células NK, induz à transcrição e secreção de interferon gama, promove o comprometimento de células T em células T helper e a conseqüente produção de citocinas, inclusive IL-2. Foi demonstrado em camundongos a potente ação antitumoral e antimetastática da IL-12 (13). Por sua vez, a célula NK tem papel de imunorregulação em doenças auto-imunes como lupus, esclerose múltipla,

encefalomielite e diabetes tipo 1 (147,148). Também seu papel foi descrito na destruição de parasitas secundária a produção de citocinas na sua ativação (149).

Enquanto a célula T requer apresentação e expansão, a interação entre a célula NK e as outras células dá um sinal positivo **imediate** para a NK destruir o alvo através da liberação de perforina/granzima. As células NK poupam tecidos saudáveis de sua ação citotóxica ao receberem um sinal dominante negativo através de seus receptores KIR (*killer-immunoglobulin-like-receptors*), que interagem com as moléculas de MHC classe I das células-alvo. Quando as células NK entram em contato com células que perderam o MHC classe I, ou que expressam moléculas de classe I não-reconhecidas como próprias (como pode ocorrer em transplantes HLA-mismatched), o sinal negativo não é transmitido e os grânulos de perforina/granzima são liberados. As diferenças no comportamento das células T e das NK, implicam os linfócitos T como maiores efetores de GVHD, as células NK como maiores efetores de GVL e pega em transplantes HLA-mismatched (104)

Apesar de o desenvolvimento na compreensão da recuperação imune através dos transplantes de medula óssea, permanecem ainda importantes questões sobre a diferença efetora das células T e das NK (150).

### 3.7.4 Ontogenia das células NK

A presença de alguns marcadores característicos de células T (CD2,CD7), na superfície das células NK, trouxe o questionamento sobre a origem ontogenética comum destes dois linfócitos. Entretanto, interferências no desenvolvimento das células T, como em camundongos atímicos ou SCID, não têm impacto no desenvolvimento das células NK (38).

Existe evidência de um progenitor comum NKT, progenitores NK tem sido identificados no timo, baseados na expressão de CD56 na população de timócitos. O progenitor comum tem expressão de CD45/CD5 e torna-se uma célula NK comprometida com perda da capacidade de se comprometer em célula T, ao expressar CD56. A diferenciação em célula NK requer uma combinação de *Stem Cell Factor*, IL-7 e IL-2 em presença de um estroma alimentador (151,152).

Precusores de células NK também foram identificados em timos fetais de camundongos; estas células expressam CD16 e podem se diferenciar em timócitos duplo positivos (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), se permanecem em contato com o estroma tímico, ou em células NK se removidos do microambiente tímico. Este fato, novamente, dá suporte à idéia de que o timo não é essencial para o desenvolvimento NK (153,154).

A medula óssea também é um local importante de progenitores NK, que são CD34<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup> e diferenciam-se em células NK maduras na presença - ou ausência - de células estromais. Os progenitores expressam CD7 e CD34, mas são CD33<sup>-</sup>, e a presença de *Stem Cell Factor*, IL-7 e de IL-2 são essenciais, especialmente no estágio precoce de diferenciação (154).

A atividade citolítica contra alvos de célula NK, é detectada no momento da expressão de CD56. Células NK maduras podem ser estimuladas por IL-2 para

aumento da atividade citolítica, aumento do conteúdo granular citotóxico, expressão de moléculas de adesão e aquisição de propriedades atribuídas a células LAK (*lymphokine-activated-killer cells*). Outras citocinas como IL-7 e IL-12 tem efeitos similares, mas em menor grau que as decorrentes de IL-2 (139,164).

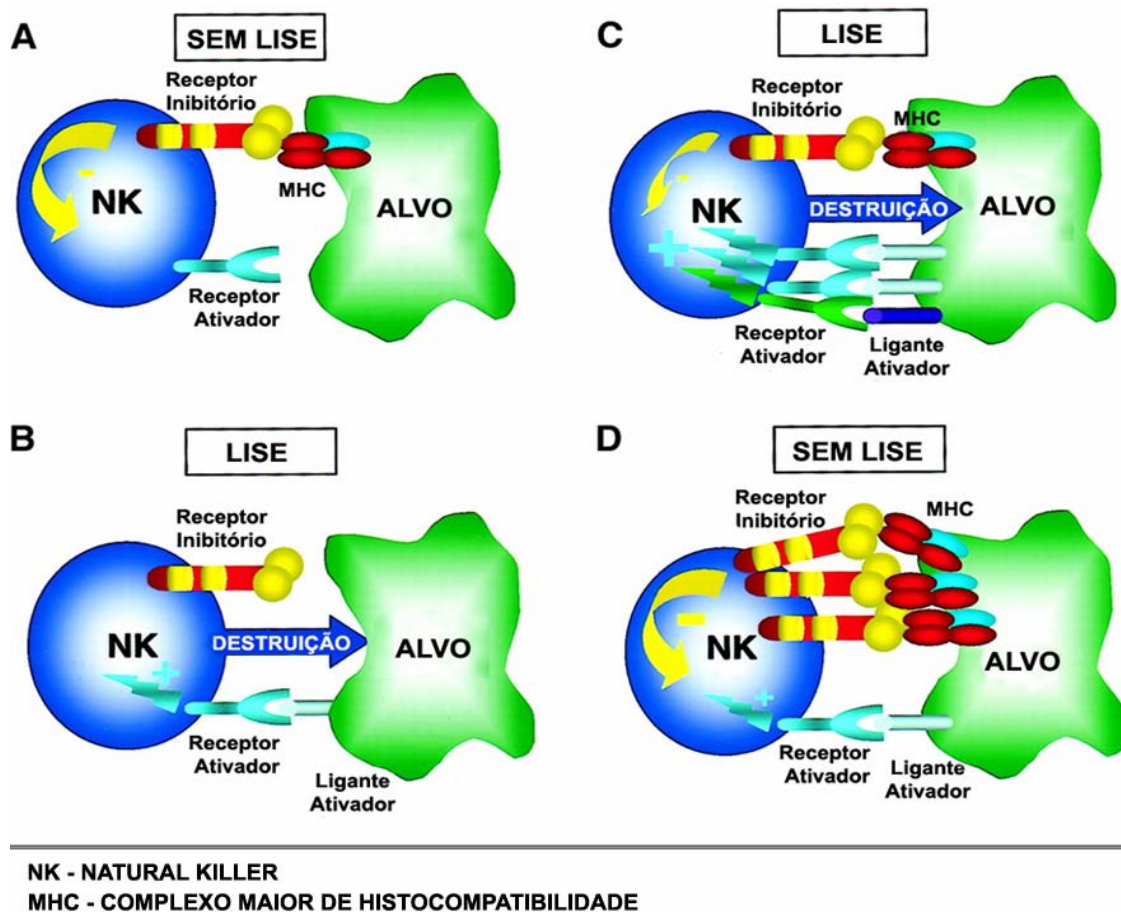
### 3.7.5 Receptores de Células NK

As células NK são componentes celulares importantes da imunidade inata; têm a missão de defender o corpo, imediatamente, contra patógenos e neoplasias em estágio inicial de desenvolvimento. Como consequência, as moléculas de reconhecimento ou os receptores de células NK estão dispostos na superfície celular, sem necessidade de ligação. Outra diferença importante em relação aos receptores de células B(BCRs) e receptores de células T(TCRs) é a de que os receptores NK não reconhecem diretamente os patógenos ou seus produtos, mas a mudança quantitativa das moléculas de MHC secundárias ao contexto infeccioso (38,155,156).

O que controla a resposta NK? Ao contrário das células B e T, as células NK não codificam receptores por rearranjo gênico com alta especificidade para antígenos; a resposta NK pode ser iniciada sem expansão clonal. A atividade citotóxica NK contra células-hematopoéticas-alvo, pode ser facilmente iniciada pela ocupação de diferentes receptores de superfície. Como alguns dos ligantes de ativação destes receptores estão expressos em células saudáveis, a ativação das células NK está sob um controle negativo rígido através de receptores inibitórios (157). A heterogeneidade dos subtipos de células NK deve-se a diferentes expressões de vários receptores de **ativação** e **inibição** na sua superfície celular (158).



Em humanos, três famílias distintas de genes foram identificadas como codificadoras de receptores de moléculas de MHC classe I. Uma primeira família pertence à superfamília Ig e é chamada KIRs (*killer-Ig like-Receptors*). A segunda é, estruturalmente, *Ig-like*, chamada de ILTs (*Ig-like transcripts*); expressos principalmente em células B, T e mielóides, mas alguns estão presentes nas NK; também chamados de LIRs (*leukocyte Ig-like receptors*). A terceira família é a de receptores de lectina (*C-type lectine receptors*) que, atualmente, têm sido chamados de *C-type lectin-like NK receptor domains* (CLTD).



**FIGURA 10** – Regulação da resposta NK por receptores de ativação e inibição (141).

Receptores inibitórios (KIR inibitório, CD94/NKG2A), reconhecem e ocupam seus sítios de ligação (ligantes), que são moléculas de MHC classe I, da superfície da

célula tumoral alvo, iniciando um sinal inibitório. Receptores de ativação (KIRs de ativação, CD94/NKG2C, NKG2D), acoplam-se a ligantes da superfície celular e ativam tanto a célula NK como a destruição de célula alvo.

(A) Quando os receptores inibitórios ligam-se ao MHC, na ausência de uma interação receptor/ligante, uma rede de sinais negativos é gerada, resultando na **não-destruição** da célula-alvo.

(B) Ao contrário da situação anterior, quando receptores de ativação ligam-se aos seus sítios de ligação na célula alvo, na ausência de uma interação inibitória de receptor/ligante, uma rede de sinais de ativação é gerada, levando à destruição da célula alvo. Esta situação é semelhante à que ocorre nos transplantes HLA mismatched em relação à aloreatividade NK em mismatch de epitopo KIR (vide NK e GVL).

As situações de C e D são mais fisiologicamente complexas.

(C) As interações ativadoras de receptor/ligante predominam sobre fracos sinais inibitórios receptor/ligante, resultando em ativação NK e destruição da célula-alvo, isto pode ocorrer quando os ligantes e receptores de ativação estão supra-regulados, amplificando o sinal de ativação que excede o sinal de inibição. Essa supra-regulação ocorre em células transformadas, ou sob forte estresse (células neoplásicas, ou infectadas por vírus).

(D) As interações entre receptores e ligantes inibitórios resultam em uma rede negativa de sinais que previne a destruição da célula-alvo pela célula NK. Este processo ocorre como forma de vigilância das células NK dos tecidos normais do indivíduo.

Uma outra situação que também pode ocorrer é a ausência de ambos os sinais – inibitório e ativador – levando à anergia da célula NK (ausência de ativação).

### 3.7.5.1 Os KIRs, os LIRS os receptores lectina *-like*

As células NK aloreativas são predominantemente caracterizadas pela atividade dos seus receptores que tem especificidade por determinantes de HLA classe I. A família **KIR** (killer-cell immunoglobulin-like inhibitory receptor), inclui receptores para determinantes polimórficos de HLA-A, HLA-B e HLA-C (83)

Há dois subtipos distintos de KIR, os inibitórios e os ativadores. Cada subtipo tem um domínio extracelular idêntico e conseqüentemente relaciona-se a ligantes idênticos. Entretanto, devido a diferenças nos seus domínios transmembrana e intracelular ou citoplasmático, um subtipo de KIR libera sinais de resposta inibitória e o outro subtipo libera sinais de resposta ativadora, mesmo ligando-se a alelos de MHC classe I idênticos (141).

Os KIRs tem 2 ou 3 domínios *Ig-like* e por isso são designados receptores KIR2D ou KIR3D. O domínio citoplasmático dos KIRs poder ser longo (L) ou curto (S) e correspondendo à sua função são inibitórios ou ativadores, respectivamente. Os receptores inibitórios contem um ou dois imunorreceptores baseados em tirosina promotores de inibição (ITIMs). Os receptores de ativação não sinalizam diretamente e devem estar não-covalentemente ligados a moléculas de ITAMs (imunorreceptores baseados em tirosina promotores de ativação) (67,155).

Uma diferença fundamental entre os TCRs e os KIRs, é que o KIR reconhece mais que um alelo de MHC, isto ocorre porque os KIRs reconhecem resíduos conservados dentro de regiões polimórficas do MHC, enquanto os TCRs reconhecem os resíduos polimórficos. Além disso, os KIRs têm uma especificidade precisa por um halótipo de MHC particular. Isto ocorre por variações em aminoácidos específicos nas moléculas KIR.

Os ligantes para os KIRs são alelos das três moléculas de MHC classe I, HLA-A, HLA-B e HLA-C, que pode conferir proteção contra a lise promovida pelas células NK. Geralmente, receptores KIR3D reconhecem HLA-A e HLA-B, enquanto receptores KIR2D reconhecem alelos de HLA-C. Em geral, os peptídeos têm um papel mínimo na ligação, o que distingue de maneira importante as ligações KIR-MHC das TCR-MHC (159,157).

**TABELA 6 – TIPOS DE KIR COM ESPECIFICIDADE PARA HLA CLASSE I**

<b>KIR</b>	<b>Ligante</b>
<b>KIR3DL2</b>	<b>HLA-A</b>
<b>KIR3DL1</b>	<b>HLA-B</b>
<b>KIR2DL1</b>	<b>HLA-C</b>
<b>KIR2DL2</b>	<b>HLA-C</b>
<b>KIR2DL3</b>	<b>HLA-C</b>

**Fonte:** Jeffrey J. Molldren, Warren D. Shlomchik (83).

Os determinantes nas moléculas de HLA que são reconhecidos por estes receptores são chamados epitopos KIR. Além dos KIR, há receptores lectina-like, que são heterodímeros de CD94 com uma subunidade de proteína da família NKG2. Estes receptores são específicos para complexos HLA-E com peptídeos derivados de seqüências específicas de cadeias pesadas de HLA-A, HLA-B e HLA-C. O locus gênico da família KIR é localizado no braço longo do cromossoma 19 e é organizado em três regiões gênicas constantes (KIR3DL3, KIR2DL4 e KIR3DL2) e regiões gênicas variáveis.

Ao *cluster* de genes KIR localizados em um cromossoma, denominamos haplótipo KIR, que é mais bem organizado em haplótipo do grupo A e haplótipo do grupo B. O do grupo A tem menos genes, mas com maior tendência a polimorfismo, os do grupo B tem maior quantidade de genes, incluindo os genes de ativação KIR. O genótipo KIR é uma soma dos dois haplótipos KIR. A probabilidade de doador-receptor não-relacionados sere KIR compatíveis é de menos de 2%.

Embora exista uma substancial diversidade nos receptores de células NK, o padrão de aloreatividade dominante é de dimorfismo que resulta na expressão de dois epitopos de HLA-C, que resulta na diferença única de um aminoácido na posição 80. Indivíduos podem ser homozigotos ou heterozigotos para esse dimorfismo. A maioria dos indivíduos tem KIRs que são específicos para ambos os epitopos de HLA-C, por isso o padrão de aloreatividade entre dois indivíduos pode, freqüentemente, ser predito por suas tipagens de HLA-C. Indivíduos heterozigotos podem ter algumas células NK que reconheçam e “matem” células alvo de um indivíduo homozigoto, enquanto células NK derivadas de um doador homozigoto, não “matariam” células alvo de um receptor heterozigoto, desde que as células alvo expressem ambos os dimorfismos e podem por isso, enviar um sinal inibitório para cada tipo de célula NK homozigota derivada do doador.

LIR-1 é um membro da família LIR (LIR-1 a LIR-8) e é expresso em monócitos, células B, células dendríticas e algumas células NK. Os LIR têm dois a quatro domínios extracelulares *Ig-like* e ITIMs na região citoplasmática, desta forma, o contato com moléculas do MHC protegem a célula alvo da lise.

O Lir-1 liga-se a molécula de citomegalovírus humano com uma afinidade 1000 vezes mais alta do que a do MHC classe I do hospedeiro e esta ligação leva a um sinal inibitório, ilustrando a alteração na resposta imune causada por vírus, protegendo a célula infectada por CMV da destruição pela NK (64,83,160).

Os membros da família de receptores lectina-*like* tipo-C são homodímeros ou heterodímeros, que consistem de uma cadeia invariável CD94 e uma segunda subunidade de um dos membros da família NKG2 (A,B,C e E). A função das proteínas heterodiméricas depende das regiões citoplasmáticas das cadeias variantes, ou seja, região citoplasmática curta (NKG2C,E) ou longa (NKG2A,B), correspondem a função ativadora ou inibitória respectivamente. As subunidades inibitórias têm um par de ITIMs na região citoplasmática, enquanto que as subunidades ativadoras se associam com as ITAMs contidas na molécula adaptadora DAP12. A proteína NKG2D forma um homodímero e é um receptor de ativação (não forma par com CD94). Cada subunidade é formada por um domínio extracelular lectina-*like* Tipo-C também conhecido como domínio de receptor NK ou NKD. O NKD liga-se a proteínas e não a carboidratos, que são os ligantes para as lectinas tipo-C clássicas e também a sua estrutura difere dessas lectinas.

Os ligantes para o receptor NKG2D são as moléculas relacionadas ao MHC classe I, MICA e MICB que estão supra-reguladas em células infectadas por vírus e muitos tumores. São minimamente expressas em tecidos normais, mas estão supra-reguladas em células sob stress (64,83,161).

### **NK no TMO (Rejeição X Pega)**

As células Natural Killer são linfócitos envolvidos na resposta imune inata, que tem a habilidade de responder rapidamente a antígenos estranhos nos momentos iniciais da infecção, frequentemente nas superfícies de barreira do indivíduo, onde se dá o encontro inicial entre antígeno e sistema imune. A importância da célula NK para o transplante vem da sua habilidade para reconhecer aloantígenos MHC classe I, ou seja, a sua aloreatividade.

Os estudos sobre a diferença de aloreatividade de células T e NK, começaram há mais de 30 anos em transplantes entre camundongos haploidênticos. Surpreendentemente, camundongos F1 letalmente irradiados rejeitaram transplantes de medula aparentados, e não rejeitaram enxertos de órgãos sólidos (fenômeno denominado de resistência híbrida). A rejeição do enxerto de órgão sólido, que é mediada por célula T, não ocorreu devido ao fato que toda a população de células T dos camundongos F1 era tolerante as moléculas de MHC codificadas por ambos os haplótipos aparentados. Por outro lado, nos camundongos F1 houve rejeição da medula óssea aparentada, secundária a presença de subpopulações de células NK que não eram inibidas por nenhuma das moléculas de MHC classe I do haplótipo aparentado transplantado, e desta forma “enxerga” o outro haplótipo MHC próprio como “ausente” (*missing self*). O conhecimento de que a “resistência híbrida F1” é um fenômeno mediado pelas NK é recente, por muitos anos este fato era curioso e inexplicável (67).

Hoje, sabe-se que cada célula NK expressa um ou mais receptores inibitórios, que através da interação com as moléculas do HLA classe I, impede que as NK “matem” células autólogas saudáveis. A aloreatividade das células NK, resulta da situação em que o tipo de HLA das células NK do doador, inclui um epitopo KIR que não é parte do tipo de HLA das células alvo do receptor alogênico. Existem certas células NK do doador que, quando presentes no receptor, têm um receptor inibitório específico para um epitopo KIR específico do doador que não é expresso nas células alvo do receptor. Na ausência de um sinal inibitório mediado pelas moléculas KIR, é permitida a ativação das células NK, através de outros receptores de ativação. Este fenômeno foi denominado “*missing self*” nas células alvo do receptor e é a base para a “resistência híbrida F1”, descrita muitos anos antes em experimentos de transplante em murinos (133).

Por causa da sabida citotoxicidade das células NK, seria lógico pensar que as células NK residentes na medula óssea, poderiam reconhecer e eliminar células-tronco hematopoéticas alogênicas, através de mecanismos citolíticos, mas se demonstrou em camundongos que a população de células-tronco não é afetada diretamente pelas células NK, o mesmo ocorrendo em experiências *in vitro* (162,163). Outro estudo demonstrou que as células LAK apresentam baixa toxicidade as células normais da medula óssea, sem afetar a atividade contra células tumorais pela presença das células normais (164).

Evidência direta de envolvimento das células NK do receptor com rejeição do enxerto, ainda não foi encontrada, mas o fenômeno da resistência híbrida é frequentemente lembrado como evidência para rejeição mediada por NK, mas acredita-se que seu papel neste contexto é de pouca importância, visto que a resistência híbrida só ocorre quando é infundido um número pequeno de células do doador, e que não ocorre quando o receptor é tratado previamente ao transplante com ciclofosfamida, irradiação ou imunoglobulina antitimocítica. A relevância do fenômeno da resistência híbrida em humanos é controversa (165,51,153).

Alguns estudos reforçam a idéia que as células NK podem promover a pega; em camundongos, a administração precoce de células LAK, após o transplante de medula óssea alogênico, leva a pega mais rápida e menor rejeição, especialmente após depleção T. Parece lógico pensar em promoção de pega por uma célula que quando ativada (ANK/LAK), produz e libera GM-CSF e IL-3, citocinas ativas na hematopoese (166,167).

Existem diversos estudos discordantes sobre o efeito das células NK em culturas celulares de medula óssea autóloga e alogênica, provavelmente devido a condições particulares das culturas envolvidas e dos diferentes estágios de ativação das células NK analisadas (167).



Não se sabe até hoje, qual célula promove a pega no transplante. Alguns modelos murinos sugerem que as células NK do doador são críticas para a pega, enquanto outros estudos implicam a célula T CD8+ neste contexto. Não existem dados em humanos que impliquem diretamente as células NK com a pega ou mesmo com rejeição em transplantes de células-tronco (168,165,51).

É extremamente interessante retornar ao conceito de “**efeitos bidirecionais na hematopoese das células NK**”, à luz do nosso conhecimento atual sobre receptores NK. Em 1993, Murphy propôs que as células NK podem ser ambas, benéficas e deletérias no transplante de medula óssea, dependendo do seu genótipo e estado de ativação, conceito que é confirmado pelo atual conhecimento do mecanismo de ativação e inibição das células NK e de suas respostas efectoras (169).

Sabe-se que as células NK, produzem citocinas estimulatórias em termos de hematopoese tais como GM-CSF e IL-3, ou inibitórias como TGF- $\beta$  e TNFs, o que é compatível com o conceito de funcionalidade heterogênea dos diferentes subtipos de NK, que podem ser inibitórias ou estimulatórias para a hematopoese de acordo com a sua diversidade de receptores. Tendo em mãos o conhecimento sobre o funcionamento dos receptores de células NK e seus processos de ativação e inibição, tornam-se mais compreensíveis os resultados aparentemente contraditórios do efeito das células NK sobre a hematopoese *in vitro* (67,169).

Infiltrados de células NK podem ser encontrados em tecidos rejeitados de transplantes de órgãos sólidos em murinos, ao contrário dos modelos de transplante de medula em murinos, nos modelos de rejeição de xenoenxerto o envolvimento de células NK deve ser mais bem documentado (165). Em compensação, modelos murinos de destruição pelas NK de células tumorais circulantes e teciduais, são bem documentados (140).

### **NK no TMO (GVL X GVHD)**

A cura de leucemia refratária – e outras neoplasias hematológicas – após transplante de medula óssea tem sido grandemente atribuída à habilidade das células imunes do doador no enxerto, reconhecerem e eliminarem células neoplásicas que escaparam da destruição pela quimioterapia em altas doses. Mais recentemente, com os transplantes não-mieloablativos (mini-transplantes) e as infusões de linfócitos do doador (DLI), o efeito GVL é o único mecanismo pelo qual as células tumorais podem ser eliminadas. Células imunes infundidas no enxerto ou na DLI, exercem efeito GVL através de aloreações mediadas por células T dirigidas contra antígenos menores de histocompatibilidade dependendo da extensão do *mismatching*-MHC entre doador e receptor. Em humanos, tem sido difícil demonstrar um papel das células NK como mediadoras de efeito GVL em transplantes MHC-*matched*.

A depleção de células T nos enxertos de células-tronco na tentativa de reduzir o risco de GVHD tem sido associada com um risco significativamente aumentado de recaída, particularmente em pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC) (141,170).

Em compensação nos transplantes mismatched-haploidênticos, demonstrou-se que as células NK têm um importante efeito GVL, com um potencial efeito protetor em relação ao GVHD, bem como promoção de pega. Através desse conjunto de pesquisas em camundongos e humanos, nasceu o conceito do “Mismatch Perfeito” (11,96,171,172).

Transplantes mismatched haploidênticos são aqueles em que o doador e o receptor compartilham um alelo de HLA-C, mas diferem segundo alelo. Células NK aloreativas contribuem para efeito GVL em pacientes com leucemia mielóide; receptores de transplantes haploidênticos, com enxerto T depletado e com grande quantidade de CD34. Depois do transplante há três potenciais resultados para

a aloreatividade NK: A) não reatividade, pela compatibilização dos epítopos KIR. B) aloreatividade GVL e GVHD ou C) aloreatividade hospedeiro versus enxerto, levando à rejeição do enxerto (173,137, 174).



**Figura 11** – Padrões de aloreatividade NK em transplantes mismatched haploidenticos.

Com o *boom* do efeito GVL das células NK nos transplantes haplótipo-*mismatcheds*, estudos revisaram o efeito das disparidades KIR nos transplantes *matched*. É prática corrente que a compatibilidade (*match*) entre doadores e receptores alogênicos seja focada em polimorfismo HLA e não leve em consideração o polimorfismo KIR. Como HLA e KIR são segregados de maneira independente, e entre indivíduos não-relacionados existe quase sempre um genótipo KIR diferente, é

possível prever que aproximadamente 25% dos transplantes HLA idênticos aparentados apresentam identidade KIR e 75% vão apresentar disparidade KIR. Em transplantes compatíveis entre indivíduos não aparentados a frequência de incompatibilidade KIR é de praticamente 100% (67,157).

O transplante alogênico é um excelente modelo de sistema onde podemos examinar a reconstituição do repertório das células NK humanas sob condições de disparidade genética HLA e/ou KIR. Aparentemente parece haver relação entre a disparidade KIR e o resultado no pós-transplante, existem relatos de aumento de GVHD em transplantes não-relacionados quando o doador tem maior quantidade de receptores de ativação KIR que o receptor, bem como de um discreto aumento (sem significado estatístico aparente), de rejeição de enxerto em transplantados compatíveis HLA, quando são KIR incompatíveis. Em pacientes pediátricos submetidos a transplante alogênico não-relacionado, o grupo com incompatibilidade KIR teve menor taxa de recaída pós-transplante quando usada imunoglobulina anti-timócito no condicionamento. São necessários estudos com populações maiores para podermos valorizar estes resultados na prática clínica, mas a compatibilidade KIR aparentemente terá papel na escolha do doador HLA compatível no futuro (83,175,176,177).

Em relação aos transplantes HLA-idênticos, as células NK em recuperação expressam um fenótipo imaturo com baixos níveis de CD16 e moléculas KIR e alta expressão de receptores inibitórios CD94/gNKG2A. Após seis meses, as células NK, passam a expressar KIR como o repertório NK original do doador. Após transplante mismatching-haplótipo, clones de NK aloreativos aparecem precocemente após a pega, mas não são detectáveis em torno de 4 meses pós-transplante. Estes clones de NK expressam KIR e podem reconhecer e destruir alvos KIR-incompatíveis. A recuperação NK tem sido associada com um efeito GVL poderoso em transplantes HLA-mismatched, mas tem sido difícil identificar um papel para as células NK nos

transplantes HLA-idênticos, embora observações clínicas sugiram que a citotoxicidade NK correlaciona-se com menor risco de recaída em pacientes com LMC (83,141,171,178,179,180). Além da aloreatividade no contexto de transplantes haploidênticos, se a molécula MHC-*self* que se liga ao receptor inibitório está ausente, por exemplo, numa célula tumoral ou numa célula alvo infectada por vírus, a célula NK é ativada e a célula alvo é destruída (51). Geralmente aceito que a GVHD é iniciada por linfócitos T que reconhecem diferenças na expressão dos antígenos do MHC e/antígenos de histocompatibilidade menor. Diferentemente das células T, as células NK podem no máximo contribuir, mas não causar a GVHD. As células T podem recrutar células NK do doador, que por sua vez estimulam a resposta imune através da liberação de citocinas e possivelmente contribuem para o dano tissular através da produção de citocinas inflamatórias e óxido nítrico. A depleção de células T no enxerto com anticorpos monoclonais anti-CD3 ou a combinação de anti CD-6 e anti-CD8 pode prevenir o GVHD independente da presença das células NK no enxerto (165).

As células NK ativadas produzem citocinas como, por exemplo, o INF- $\gamma$  que pode manter a ativação dos monócitos e levar a liberação de TNF- $\alpha$  na circulação, que é uma das citocinas centrais na cascata de eventos que levam ao GVHD agudo por expansão da população de células Th1 (181,182).

Sabe-se que a célula NK, entre outras, pode prevenir o GVHD. Funcionalmente, as células NK são uma fonte de citocinas imunorregulatórias inatas(INF- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ ;GM-CSF), que tem um papel fundamental na resposta imune. Experimentos em transplantes mismatched haploidênticos em murinos sugerem que as células NK além de **facilitarem a pega**, previnem a GVHD aguda (11,96,153,171,183,184).

Em 1998, estudos de Assai et al demonstraram que a transferência de células NK do doador para o receptor, em um modelo de transplante em murinos de linhagem

específica, poderia inclusive prevenir GVHD (185), o que também foi observado por Martelli et al em 2002. Nos estudos em camundongos e pacientes com leucemia aguda Martelli demonstra que a célula NK ataca predominantemente tecido hematopoético do hospedeiro e poupa os demais tecidos, além disso demonstra que mesmo infundidas em grande quantidade, não causam GVHD. Também demonstra que as células NK aloreativas podem destruir células dendríticas do receptor e esta destruição previne a apresentação de antígenos do hospedeiro a células T do enxerto, que é passo crucial na formação do GVHD (174,186,141).

### **As células NKT**

Linfócitos T com atividade de células NK foram identificados em tecidos murinos e humanos. Células NKT murinas, tipicamente expressam marcadores fenotípicos encontrados em células T como CD3 e receptor celular  $\alpha\beta$ T (TCR), bem como os marcadores NK NK1.1 e DX5. Foram descritas duas populações de NKT em murinos. Uma das subpopulações não expressa CD4 e CD8 ou são CD4+, expressa um TCR invariável e foi encontrada no fígado, no timo, no baço e na medula óssea. Funcionalmente, as células NKT CD4+NK1.1 produzem grandes quantidades de interleucina 4 (IL-4), na sua ativação e tem um papel importante na regulação da resposta imune Th2. As células NKT CD4+ são selecionadas positivamente pela molécula de MHC classe I CD1d e então, associadas a  $\beta$ 2 microglobulina. Têm função importante na regulação de resposta imune, inibição do desenvolvimento tumoral e proteção contra o desenvolvimento de doenças auto-imunes. Foi observado que, em pacientes com esclerose sistêmica, lupus eritematoso, artrite reumatóide e diabetes tipo1, há redução seletiva deste tipo de célula. (64). Foi descrito supressão de GVHD em murinos por este subtipo específico de célula NKT (187,188,189).

Em 2004, Hyray et al. publicaram estudo em humanos sobre a recuperação deste subtipo de NKT , demonstrando que um mês pós transplante as células NKT estavam reconstituídas no sangue periférico em receptores de células progenitoras periféricas, enquanto que nos receptores de medula óssea, permaneceram com níveis baixos por mais de um ano. Em pacientes com GVHD agudo o número de células NKT CD4+ e CD4- era menor comparado a pacientes sem GVHD agudo. Em relação ao GVHD crônico, os receptores de medula óssea com GVHD crônico extenso tinham um número significativamente menor de células NKT (190).

A segunda população de células NKT, que expressa um repertório TCR variável e não é dependente de CD1d para sua maturação e desenvolvimento. Essas células NKT foram encontradas no baço e na medula óssea (1 a 3%) e expressam CD8, ou são duplo negativas para CD4 e CD8. Esta subpopulação celular tem ação citotóxica potente *in vitro*, tem ação antitumoral e não causa GVHDsignificativo entre doador-receptor haploidênticos em murinos (187,191).

O efeito GVL e de supressão de GVHD neste subtipo celular é controverso e obviamente são necessários outros estudos para determinar a importância desta população específica, inclusive como célula potencial para uso em imunoterapia em doença auto-imune, infecções e em transplante de medula na indução de resposta Th2, com potencial uso no tratamento e prevenção do GVHD (192,193,194,195,189).

## **NATURAL KILLER e IMUNOVIGILÂNCIA**

O conceito de vigilância imunológica foi proposto por Macfarlane Burnet nos anos cinquenta e postula que uma das funções fisiológicas do sistema imune é reconhecer e destruir clones de células transformadas antes que elas transformem-se em tumores e destruir tumores, após sua formação. A importância e até a existência

da vigilância imunológica tem sido questionada como resultado de alguns experimentos, mas sabe-se que o sistema imune reage contra muitos tumores e explorar estas reações para destruir células tumorais é um dos objetivos principais dos imunologistas especialistas em câncer e de especial interesse para todos os envolvidos no espectro desta terrível doença (65).

Existem vários mecanismos imunes efetores capazes de destruir tumores e um deles é a lise celular mediada pelas NK. Estas células destroem vários tipos de células tumorais, especialmente aquelas com expressão de MHC classe I reduzida e que podem escapar das CTLs. AS células NK têm papel crítico na citotoxicidade mediada por tumor (140,196,197).

*In vitro*, as NK podem destruir células virais infectadas e certas linhagens celulares tumorais, principalmente tumores hematopoéticos. Muitos tumores perdem expressão de MHC classe I e se tornam alvos perfeitos para a célula NK. A capacidade tumoricida destas células é aumentada pelas citocinas, incluindo IL-2 e IL-12. Estratégias prévias no tratamento de tumores envolvendo as células NK tem se restringido ao uso de células LAK (NK ativadas), geradas ex-vivo ou terapia com citocina in vivo, com o objetivo de expandir e ativar células NK contra células tumorais autólogas. Os ensaios clínicos falham, em sua maioria em demonstrar benefício clínico inequívoco, especialmente os ensaios clínicos fase I e II. A maior experiência é com ensaios clínicos envolvendo IL-2, que indicaram regressão de carcinomas renais, melanomas, sarcoma de Kaposi, vários tipos de linfomas e *Hairy cell leukemia*, mas com muitos paraefeitos para os pacientes (febre, edema pulmonar, *leak*-síndrome) (195,169,198,199,140).

Testemunhamos na última década uma virtual explosão de conhecimento sobre os receptores das células NK e agora sabemos que a resposta NK é o resultado da competição de sinais mediados por receptores de inibição e ativação. Embora não



se saiba em que extensão as citocinas como a IL-2 podem alterar o equilíbrio entre os receptores NK de ativação e inibição, o conhecimento sobre efeito do mismatch de receptores e ligantes em situação de transplante alogênico, bem como do funcionamento dos receptores como promotores de resposta efetora serão úteis no desenho de novos estudos sobre o uso das NK em imunoterapia (141,200,201,202).

Em abril de 2005, foi publicado estudo que demonstrou remissão completa em 5 pacientes de um grupo de 19 com leucemia mielóide aguda refratária de mau prognóstico, submetidos a quimioterapia em altas doses, seguidos de infusão de linfócitos de doador haploidêntico e injeções de IL-2 (202).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Urban, JL, Schreiber H. Tumor Antigens. Annual Review of Immunology, 1992;4,647-55.
- 2) Panelli, MC, Marincola FM. Immunotherapy Update; From interleukin – 2 to antigen – specific therapy. Educational Book of 34<sup>th</sup> Meeting of American Society of Clinical Oncology (ASCO), 1998; 463-66.
- 3) Martin PJ. Winning the battle of graft versus host. Nature Medicine, 2000;6(1):18-19.
- 4) Lazarus HM, Vogelsang GB, Rowe JM. Prevention and treatment of acute graft-versus-host disease: the old and the new. A report from The Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Bone Marrow Transplantation, 1997;19, 577-600.
- 5) Ferrara JLLM, Kenneth RC, Deeg J. Understanding the Alloresponse: New Approaches to Graft-Versus-Host Disease Prevention Seminars in Hematology, 2002; 139(1):15-22.
- 6) Goldman JM, Gale R, Horowitz M, Biggs J, Champlin R, Gluckman et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: increased risk of relapse with T-cell depletion. Ann Int Med, 1988;108:806-14.
- 7) Fischer A, Calvo CM, Schmutz IA, Abina SHB, Bensoussan D, Le Deist F. Improving Immune Reconstitution While Preventing Graft-Versus-Host Disease in Allogeneic Stem Cell Transplantation Seminars in Hematology, 2002;39(1);32-40.
- 8) Mavroudis, D, Barret J. The graft – versus – leukemia effect Curr opin hematol.,1996;3:423-9.
- 9) Radich J, Thomson B. Advances in detection of minimal residual disease. Curr Opin Hematol, 1997;4:242-7.

- 10) Mutis T, Goulmy E. Hematopoietic System-Specific Antigens as targets for cellular Immunotherapy of Hematological Malignances Seminars in Hematology, 2002;39(1)23-31.
- 11) Martelli MF, Aversa F, Lustig EB, Velardi A, Zelicher SR, Tabilio A et al. Transplants Across Human Leukocyte Antigen Barriers. Seminars in Hematology, 2002;39 (1)48-56.
- 12) Gee AP. Collection and processing of peripheral blood hematopoietic progenitor cells. In: Reiffers J, Goldman JM, Armitage JO. Blood Stem Cell Transplantation. London: ed. Martin Dunitz, 1998;55-72.
- 13) Guillaume T, Rubinstein DB, Symman M. Immune Reconstitution and Immunotherapy After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation Blood, 1998;92(5)1471-90.
- 14) Gabrilovich D. Detective Dendritic cell function in cancer patients – improving the efficacy of vaccine therapy. Educational Book of 34<sup>th</sup> Meeting of American Society of Clinical Oncology (ASCO), 1998;463-66.
- 15) Hernandez MD, del Canizo MC, Caballero MG, Lopez MC. Immune reconstitution after autologous hematopoietic cell transplantation. A study comparing autologous bone marrow and autologous peripheral blood. Méd Clin(Barc), 1998;110:768-73.
- 16) Silva, MR Ascensão, JL. Generation of human natural killer cells from pharmacologically purged bone marrow. Br J Haematol., 1995;89;34-40.
- 17) Roberts MM, Gillis D, Mundy J, Rawling C, Ng K, Juttner, C.A. Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant., 1993;12:469-75.
- 18) Leung AYH, Verfaillie CM, Stem Cell Model of Hematopoiesis "In": Hoffman R, Edward J. Benz Jr., Sanford, Shattil SJ, Cohen HJ, Bruce Furie, Harvey J. Cohen,

Silberstein LE, McGlave P. Hematology - Basic Principles and Practice. 4<sup>th</sup> ed. Printed in USA: ed. Elsevier Churchill Livingstone, 2005;200-1.

19) Smith C. Hematopoietic Stem Cells and Hematopoiesis Cancer Control 2003;10(1):9-16.

20) Metcalf, D. The molecular control of blood cells. London: Harvard University Press. 1988.

21) Abbas AK, Lichtman AH. Cells and Tissues of the Immune System. In: Cellular and Molecular Immunology. 5<sup>th</sup> ed. Printed in China: ed. Saunders, 2003;16-39.

22) Papayannopoulon T, D`Andréa AD, Abkowitz JL, Migliaccio AR, Biology of Erythropoiesis, Erytroid Differentiation, and Maturation. In: Hoffman R, Benz Jr., Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlav P. Hematology – Basic Principles and Practice. 4<sup>th</sup> ed. Printed in USA: ed. Elsevier Churchill Livingstone, 2005;267-88.

23) Hhanna-Gupta A, Berliner N. Granulocytopoiesis and Monocytopoiesis. In: Hoffman R, Bensch JR, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P. Hematology – Basic Principles and Practice. 4<sup>th</sup> ed. Printed in USA: ed. Elsevier Churchill Livingstone, 2005;286-301.

24) Long MW, Hoffman R. Thrombocytopoiesis. In: Hoffman R, Edward J. Benz Jr., Sanford, Shattil SJ, Cohen HJ, Bruce Furie, Harvey J. Cohen, Silberstein LE, McGlave P. Hematology – Basic Principles and Practice. 4<sup>th</sup> ed. Printed in USA: ed. Elsevier Churchill Livingstone, 2005;303-20.

25) Orkin SH, & Leonard I. Zon Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity Nature Immunology, 2002; 3:323-8.

26) Versaillie CM. Hematopoetic stem cells for transplantation. Nature Immunology, 2002;2:314-17.

27) Orlic D, Bordini D,.What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up! Blood, 1994;84:3991-94.

- 28) Minden M. Growth factor requirements for normal and leukemic cells. *Seminars in Hematology*, 1995;32:162-82.
- 29) Tabbara IA, Robinson BE Hematopoietic growth factors. *Anticancer Res.*, 199;11:81-90.
- 30) Kyba M, Daley GQ. Hematopoiesis from embryonic stem cells: Lessons from and for ontogeny *Experimental Hematology*, 2003;31:994-1006
- 31) Wineman J, Moore K, Lemischka I, Muller-Sieburg C. Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: rare stromal elements maintain long-term repopulating stem cells. *Blood*, 1996;87:5127-35.
- 32) Abbas AK, Lichtman AH. Cytokines. "In": *Cellular and Molecular Immunology*. 4<sup>th</sup> ed. Printed in China: ed. Saunders, 2000;268.
- 33) Rosenthal N. Prometheus's Vulture and the Stem-Cell Promise. *N Engl J Med* 2003;349:267-274.
- 34) Körbling M, and Zeev Estrov *N Engl J Med Adult Stem Cells for Tissue Repair – A New Therapeutic Concept?* 2003; 349: 570-582.
- 35) Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, 2003;102(10):3483-3493.
- 36) Lakshminpathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood reviews*,2005;(19):29-38.
- 37) Alison MR, Lovell MJ, Fang C, Poulos R. Adult Stem cell plasticity: Does it make the grade? "In": *Reviews in Clinical and Experimental Hematology – Cellular Therapy and Beyond*. The Third Fani Job Meeting in Hematology, September 8-10, 2003, Porto Alegre, Brazil. Ed. Academia Nazionale di Medicina, Suppl. 1-2004, 2004.2004;08-22.
- 38) Abbas AK, Lichtman AH. Transplantation Immunology. "In": *Cellular and Molecular Immunology*. 5<sup>th</sup> Printed in China; ed. Saunders, 2002;16,369-90.

- 39) Schmitz N, Barret J. Optimizing Engraftment – Source and Dose of Stem Cells  
Seminars in Hematology, 2002;39(1)03-14.
- 40) Broxmeyer HE, Phenotypic and Proliferative Characteristics of Cord Blood Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Gene Transfer. "In": Cellular Characteristics of Blood and Cord Blood Transplantation. Maryland AABB Press, Bethesda, 1998;11-43.
- 41) Hatzfeld J. control of G<sub>0</sub> phase of human bone marrow stem cells. Semin. Hematol., 1992;29-2-6.
- 42) Bernstein I, Milner L. Andrews R. Rowley S, Kopan Martin D. Stem cells in human hematopoiesis. Bone Marrow Transplant., 1995;15s3-s4.
- 43) Geier H, Van Zant G. The aging of hematopoietic stem cell. Nature Immunology 3, 2002;329-33.
- 44) Nash RA. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. "In": Greer JP, Foerster JP, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B. Wintrobe's Clinical Hematology 11<sup>th</sup> ed. Printed in USA: ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2004;1883-909.
- 45) Brahmansen IW, Sømme S, Heldal D, Egeland T, Kvale D, Tjønnfjord GL. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: the impact of stem cell source and graft-versus-host disease. Haematologica – the hematology journal, 2005;90(1):86-93.
- 46) Santos GW, History of Bone Marrow Transplantation "In": Burt R K, Deeg, Lothian ST – Bone Marrow Transplantation 1998;3-7.
- 47) Thomas ED, Bone Marrow Transplantation: Seminars in Hematology, 1999;36(4):supp17,95-103.
- 48) Bortin et al. 1993 Bortin MM et al 1993 progress report from the international bone marrow transplantation registry. Bone Marrow Transplant, 1993;12-97104.

- 49) Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR)  
[homepage da internet] Minneapolis: CIBMTR, 2006 [acesso em 2006 dez 17].  
Disponível em [www.ibmtr.org/](http://www.ibmtr.org/).
- 50) Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B.  
Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Wintrobe's Clinical Hematology. 11<sup>th</sup> edition.  
Printed in USA: ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2004;1883-909.
- 51) Martin PJ. Overview of Hematopoietic Cell Transplantation Immunology In: Blume  
KG, Forman SJ, Appelbaum FR, Thomas Hematopoietic Cell Transplantation 3<sup>th</sup> ed.  
Printed in USA. Ed Blackwell Publishing, 2004;16-30.
- 52) Hansen JA., T-Cell Alloreactivity in Hematopoietic Stem Cell Transplantation  
Hansen Biology of Blood and Marrow Transplantation II: 2005;2:24-27.
- 53) Scriber JR, Forman SJ. Autologous Transplantation for Hematologic Malignancies  
and Solid Tumors. "In": Hoffman R, Benz Jr. Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein  
LE, McGlave P, Hematology – Basic Principles and Practice. 4<sup>th</sup> ed. Printed in USA.  
ed. Elsevier Churchill Livingstone, 2005;1727-38.
- 54) Gahn B, Hunt G, Rooney CM. Heslop HE. Immunotherapy to Reconstitute to DNA  
Viruses. Seminars in Hematology, 2002;39(1)41-7.
- 55) Goldman JM, Schmitz N, Niethammer D, Gratwohl AI. For the Accreditation Sub-  
Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation Allogenic and  
autologous transplantation for haematological diseases, solid tumors and immune  
disorders: current practice in Europe in 1998. Bone Marrow Transplantation, 1998;21:1-7.
- 56) Ferrara JLM, Cooke KR, H. Teshima T. The Pathophysiology of Graft-vs.-Host  
Disease. In: Ferrara JLM. Deeg HJ. Graft-Vs.-Host Disease, 3<sup>th</sup> ed: New York: ed.  
Marcel Dekker 2005.
- 57) Forman SJ. Innovations in Autologous Transplantation for Hematologic  
Malignancy Biology of Blood and Marrow Transplantation II: 2005: 2:28-33.

- 58) Abbas AK, Lichtman AH. Chapter 4-The Major Histocompatibility Complex In: Cellular and Molecular Immunology. 5<sup>th</sup> ed. Printed in China: ed. Saunders, 2003;65-80.
- 59) Tiercy JM. Immunogenetics of allogeneic HSCT., 3: 3.1: The Role of HLA in HSCT. In: The EBMT Handbook – Haematopoietic Stem Cell Transplantation Ed. European School of Hematology. annual edition. 2004; 31-44.
- 60) Nardi NB, Moléculas que participam da resposta imune: o MHC. In: Caderno de Imunologia Dep. Genética, Inst. Biociências UFRGS. 2003;23-28.
- 61) Von Andrian and Charles R. Mackay T-Cell Function and Migration – two sides of the same coin Ulrich H. The New England Journal of Medicine, 2000;343(14):1020-34.
- 62) Mickelson E, Petersdorf BC, Histocompatibility In: Blume K G, Stephen J. Forman, Frederick R. Appelbaum Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation. 3<sup>th</sup> ed. Printed in USA: ed. Blackwell Publishing, 2004;31-42.
- 63) Friedman JM, McGillivray BC. Genetic Polymorphism. In: Friedman JM, Dill FJ, Hayden MR, McGillivray BC. In: National Medical Series for Independent Study – Genetics. 2<sup>th</sup> edition. Printed in USA: ed. Williams & Wilkins.1996:69-79.
- 64) Paraskevas F. T Lymphocytes and Natural Killer Cells In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B. Wintrobe's Clinical Hematology 11<sup>th</sup> ed. Printed in USA: ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2004:1 475-526.
- 65) Abbas AK, Andrew H. Lichtman. Immunity to Tumors. In: Cellular and Molecular Immunology. 5<sup>th</sup> ed. Printed in China: ed. Saunders, 2003;391-41.
- 66) Fowler DH, Gress RE, Graft-vs.-Host Disease as a Th1-Type Process: Regulation by Th2-Type Cells. In: Ferrara JLM, Kenneth RC, Deeg HJ. Graft-Vs.-Host Disease. 3<sup>th</sup> ed. New York: ed. Marcel Dekker. 2005;59-82.
- 67) Parham P, McQueen Alloreactive Killer Cells: hindrance and help for haematopoietic transplants Nature Reviews – Immunology. 2003;3:108-22.



68) Ferrara, LLM, Teschima T. Understanding the Alloresponse: New Approaches to Graft-Versus-Host Disease Prevention. *Seminars in Hematology*, 2002;39(1):15-22.

69) Devergie A. Graft vs. host disease. In: *The EBMT Handbook – Haematopoietic Stem Cell Transplantation*. Ed. European School of Hematology, annual edition. 2004;162-76.

70) Cutter C, Giri S, Jeyapalan S, Paniagua D, Viswanathan A, Antin JH. Acute and Chronic Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Peripheral-Blood Stem-Cell and Bone Marrow Transplantation: A Meta-Analysis Corey Cutler, *Journal of Clinical Oncology*, Vol19, N°16, 2001;3685-91.

71) Antin JH, Degg HJ. Clinical Spectrum of Acute Graft-vs.-Host Disease, In: Ferrara JLM, Deeg HJ. *Graft-Vs.-Host Disease*. 3<sup>th</sup> ed. New York: ed. Marcel Dekker, 2005;12:.369-381.

72) Iwasaki T. Recent Advances in the Treatment of Graft-Versus-Host Disease *Clinical Medicine & Research*. 2004;2(4) 243-52.

73) Biron CA. Current Activation and function of natural killer cell responses during viral infections *Opinion in Immunology*, 1997;9:24-34.

74) Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P et al. Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:825-28.

75) Akpek G, Via CS, Vogelsang GB. Clinical Spectrum and Therapeutic Approaches to Chronic Graft-vs.-Host Disease, "In": Ferrara J L M, Cooke KR, Deeg HJ. *Graft-Vs.-Host Disease* 3<sup>th</sup> ed, New York: ed. Marcel Dekker, 2005;555-608.

76) Filipovich, AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socié G, Wingard JR, Lee S, et al. National Institute of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-host-disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2005;11:945-55.

77) Horwitz ME, Sullivan KM. Chronic graft-versus-host-disease. *Blood Reviews*, 2006;20:15-27.

78) Iwasaki T. Recent Advances in the Treatment of Graft-Versus-Host Disease *Clinical Medicine & Research*. 2004;2(4) 243-52.

79) Schulmann H, Sullivan KM, Weiden PL et al. Chronic Graft-Versus-Host-Disease in man: A clinic pathologic study of 20 long term Seattle patients. *Am J Med* 1980;69::204-17.

80) Akpek G, Lee SJ, Flowers ME, Pavletic SZ, Arora M, Lee S, et al. Performance of a new clinical grading system for chronic graft versus host disease: a multicenter study. *Blood* 2003;102:802-9.

81) Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socié G, Wingard JR, Lee S, et al. National Institute of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-host-disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2005;11:945-55.

82) Lazarus HM, Vogelsang GB, Rowe JM. Prevention and treatment of acute graft-versus-host disease: the old and the new. A report from The Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Bone Marrow Transplantation 1997;19:577-600.

83) Molldrem JJ, Shlomchik WD. Graft-vs.-Leukemia Effects. In: Ferrara JLM, Cooke KR, H. Joachim Deeg Graft-Vs.-Host Disease. 3<sup>th</sup> ed. New York: ed. Marcel Dekker, 2005:155-94.

84) Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 11<sup>th</sup> ed. Printed in USA: ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2004;1:884.

85) Körholz D, Kunst D, Hempel L, Söhngen D, Heyll A, Mauz- Körholz C, et al. Humoral immunodeficiency in patients after bone marrow transplantation *Transplantation*, 1996;18:1123-30.

- 86) Wanko SO, Chao NJ. Non-pharmacologic approaches to graft-versus-host prevention *Sam O. Blood Reviews*. 2005;19:203-11.
- 87) Ringdén O. Introduction to Graft-versus-Host-Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation II*: 2005;2:17-20.
- 88) Sale GE. Pathogenesis of Graft-versus-Host-Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation II*: 2005;2:21-23.
- 89) Grewal SS, Barker JN, Davies SM, Eagner JE. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? *Blood*,2003;101(11).
- 90) Broxmeyer HE, Smith FO. Cord Blood Hematopoietic Cell Transplantation. "In": Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. 3<sup>th</sup> ed. Printed in USA: ed. Blackwell Publishing, 2004;550-64.
- 91) Chao NJ, Emerson NG, Kenneth IK. Stem Cell Transplantation (Cord Blood Transplants) In: Broudy VC, Berliner N, Larson RA, Leung LL. *Hematology 2004 – American Society of Hematology Education Program Book*. Annual edition. San Diego, California: ed. American Society of Hematology, 2004;354-71.
- 92) Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, et al. Allogeneic sibling umbilical cord blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet*, 1995;346:214-19.
- 93) Storb RF, Champlin R, Riddell SR, Murata M, Bryant S, Warren EH. Non-Myeloablative Transplant for Malignant Disease "In": Schecheter GP, Broudy VC, Williams ME. *Hematology, 2001– American Society of Hematology Education Program Book*. Annual edition. Orlando, Florida: ed. American Society of Hematology, 2001;375-91.
- 94) Bryant E, Martin PJ. Documentation of Engraftment and Characterization of Chimerism Following Hematopoietic Cell Transplantation. 3<sup>th</sup> ed. Printed in USA: ed. Blackwell Publishing, 2004;234-43.

- 95) Bachar-Lustig E, Li HW, Gur H, Krauthgamer R, Marcus H, Reisner Y. Induction of Donor-Type Chimerism and Transplantation Tolerance Across Major Histocompatibility Barriers in Sublethally Irradiated Mice by Sca-1+Lin- Bone Marrow Progenitor Cells: Synergism With Non-Alloreactive (Host x Donor) F1 T Cells Blood, 1999;94(9):3212-21.
- 96) Kärre K. A Perfect Mismatch. Science, 2002;295: 2029-31.
- 97) Pettengell R. Haematopoietic recovery following transplantation. "In": Reiffers J, Goldman JM, Armitage JO. Blood Stem Cell Transplantation. London: ed. Martin Dunitz, London, 1998;157-70.
- 98) Marin GH, Mendez MC, Menna ME, Malacalza J, Bergna MI, Klein G, et al. Immune Recovery After Bone Marrow and Peripheral Blood Stem Cells Transplantation Transplantation Proceedings, 1999;31:2582-84.
- 99) Antin JH. Immune Reconstitution: the major barrier to successful stem cell transplantation Biology of Blood and Marrow Transplantation II: 2005;43-45.
- 100) Abbas KA, Lichtman AH. Chapter 12 – Innate Immunity In Cellular and Molecular Immunology. 5<sup>th</sup> ed. Printed in China: ed. Saunders, 2003:275-297.
- 101) Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. Annu. Rev. Immunol. 2004;22:754-63.
- 102) Storek J, Witherspoon RP, Storb R. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life Bone Marrow Transplantation, 1995;16:413-25.
- 103) Brown JM, Weissman IL, Shizuru JA. Immunity to infections following hematopoietic cell transplantation Current Opinion in Immunology 2001;13:451-457.

104) Barret J, Rezvani K, Salomon, S. The Alloimmune response Hematology 2003. American Society of Hematology Education Program Book. Annual edition. San Diego, California: ed. American Society of Hematology, 2003:351-71.

105) Arber C, BitMansour A, Sparer TE, Higgins JP, Mocarski ES, Weissman IL et al. Common lymphoid progenitors rapidly engraft and protect against lethal murine cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation Blood, 2003;2:102.

106) Chan CY, Molrine DC, Antin JH, Wheeler C, Guinan EC, Weinstein WJ et al. Antibody responses to tetanus toxoid and Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines following autologous peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT) Transplantation, 1997;20, 33-38.

107) Koehne G, Zeller W, Stocksclaeder M, Zander AR. Bone Marrow Phenotype of lymphocyte subsets after autologous peripheral blood stem cell transplantation Transplantation 1997;19, 49-56.

108) Guillaume T, Rubinstein DB, Symman M. Immune Reconstitution and Immunotherapy After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation Blood, 1998;92(5)1471-90.

109) Talmadge JE, Reed E, Ino K, Kessinger A, Kuszynski C, Heimann D, et al. Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow Transplantation 1997;19, 161-72.

110) Small TN, Papadopoulos EB, Boulad F, Black P, Castro-Malaspina H, Childs BH, et al. Comparison of Immune Reconstitution After Unrelated and Related T-Cell-Depleted Bone Marrow Transplantation: Effect of Patient Age and Donor Leukocyte Infusions Blood, 1999;93(2)467-80.

111) Bomberger C, Singh-Jairam M, Rodey G, Guerreiro A, Yeager AM, Fleming WH, et al. Lymphoid Reconstitution After Autologous PBSC Transplantation with FACS-Sorted CD34+ Hematopoietic Progenitors Blood.1998;91(7)2588-600.

112) Castenskiold EC, Kelsey SM, Collins PE, Coldwell RD, Allen PD, Side LE, et al. Functional hyperactivity of monocytes after bone marrow transplantation: possible relevance for the development of post-transplant complications or relapse. *Bone Marrow Transplantation* 1995; 15:879-84.

113) Porrata LF, Gertz MA, David J. Inwards, Mark R. Litzow, Martha Q. Lacy, Ayalew Tefferi A, et al. Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma or non-Hodgkin lymphoma *Blood*, 2001;98(3).

114) Porrata LF, Ingle JN, Litzow MR, Geyer S, Markovic SN. Prolonged survival associated with early lymphocyte recovery after autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with metastatic breast cancer. *Bone Marrow Transplantation*, 2001;28:865-71.

115) Fegan IC, Thomas H, Bailey-Wood R, Coleman S, Phillips S, Hoy T, Whittaker JA. In vitro LAK (lymphokine activated killer) activity following autologous peripheral blood stem cell is significantly greater than that following autologous bone marrow and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 1995;16:277-81.

116) Talmadge JE, Reed EC, Kessinger A, Kuszynski CA, Perry GA, Gordy CL, et al. Immunologic attributes of cytokine mobilized peripheral blood stem cells and recovery following transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 1996;17:101-9.

117) Steingrimsdottir H, Gruber A, Björkholm M, Svensson A, Hansson M. Immune reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation in relation to underlying disease, type of high-dose therapy and infectious complications. *Haematologica*, August 2000;85(8):832-8.

118) Atkinson, K. Reconstruction of the haemopoietic and immune systems after marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1990;5:209.

119) Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, et al. Age thymopoiesis and CD4+ T-Lymphocyte Regeneration after intensive chemotherapy The New England Journal of Medicine, 1995;332(3);143-9.

120) Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. Annu. Rev. Immunol. 2004;22:754-63.

121) Roux E, Helg C, Dumont-Girard F, Chapuis B, Jeannet M, Roosnek E. Analysis of T-Cell Repopulation After Allogeneic Bone Marrow Transplantation: Significant Differences Between Recipients of T-Cell Depleted and Unmanipulated Grafts Blood, 1996;87(9)3984-92.

122) Ljungman P, Immune Reconstitution and viral infections after stem cell transplantation Bone Marrow Transplantation, 1998; 21 (Suppl.2): S72-S74.

123) Wils EJ, Jan J. Cornelissen Thymopoiesis following allogeneic stem cell transplantation: new possibilities for improvement Blood Reviews 2005;19:89-98.

124) Lamb Jr LS. Cytotherapy, Immunophenotypic and functional recovery following stem-cell transplantation 2002;4(1) 99-101.

125) Pavletic ZS, Joshi SS, Pirruccello SJ, Tarantolo SR, Kollath J, Reed EC, et al. Lymphocyte reconstitution after allogeneic blood stem cell transplantation for hematologic malignancies Transplantation, 1998;21:33-41.

126) Liu CC, Lucy HY, Young JDE. Lymphocyte-mediated cytolysis and disease Mechanism of Disease, 1996;335(22)1651-59.

127) Lamb Jr LS, Gee AP, Henslee-Downey PJ, Geier SS, Hazlett L, Pati AR et al. Phenotypic and functional reconstitution of peripheral blood lymphocytes following T cell-depleted bone marrow transplantation from partially mismatched related donors. Bone Marrow Transplantation, 1998;21:461-71.

128) Lowdell MW, Craston R, Ray N, Koh M, Galatowicz G, Prentice HG. The effect of T cell depletion with Campath-1M on immune reconstitution after chemotherapy and allogeneic bone marrow transplant as treatment for leukaemia. *Bone Marrow Transplantation* 1998;21:679-86.

129) Marris M, Boeckh M, Storer B, Dawson M, White K, Keng M, Brenda Sandmaier B. et al. Immunologic recovery after hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Experimental Hematology*, 2003;31:941-52.

130) Baron F, Little MT, Storb R. Kinetics of engraftment following allogeneic hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity or nonmyeloablative conditioning. *Blood Reviews* 2005;19:153-64.

131) Mavroudis, D, BarretJ. The graft – versus – leukemia effect *Curr opin hematol.*, 1996;3:423-9.

132) Negrin R, Blume K. Bone marrow and peripheral blood progenitor cell transplantation. In: Hendersen E, Lister T, Greaves M. *Leukemia*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1996;389-418.

133) Mackailm CL, Hakim FT, Velardi A. The Immune System in Graft-vs.-Host Disease: Target and Effector Organ. In: Ferrara JLM, Cooke KR, H. Deeg HJ. *Livro GVHD Graft-Vs.-Host Disease Deeg*. 3<sup>th</sup> ed. New York: ed. Marcel Dekker, 2005;195-227.

134) Robertson MJ, Ritz J. Biology and Clinical Relevance of Human Natural Killer Cells *Blood*, 1990;76(12)2421-38.

135) Miller JS. The Biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy. *Experimental Hematology*, 2001;29;1157-68.

136) Kärre K. How to recognize a foreign submarine. *Immunological Reviews – NK cells MHC class I antigens and missing self*, 1997, 155;5-9.



- 137) Opsahi M, Hansen K, Klein T, Cunningham D. Natural killer Cell Activity in Early human Pregnancy. *Gynecol Obstet Invest*, 1994;37:226-6.
- 138) Nakamura MC. Natural Killer Cells and Their Role in Disease *Laboratory Medicine*, 2002;33(4);278-82.
- 139) Yokoyama WM, Kim S, French AR. Annu The Dynamic Life of Natural Killer Cells. *Rev. Immunol.* 2004;22:405-29.
- 140) Whiteside TL, Vujanovic NL, Herberman RB. Natural Killer Cells and Tumor Therapy *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1998;230:221-24.
- 141) Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri A. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*, 2002;100(6);1935-47.
- 142) Cooper MA, Todd A, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaehri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56<sup>bright</sup> subset *Blood*, 2001;97(10);3146-51.
- 143) Jacobs R, Stoll M, Stratmann G, Leo R, Link H, Schimidt RE. CD16<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> Natural Killer Cells After Bone Marrow Transplantation *Roland Blood*, 1992;79(12)3239-44.
- 144) Farag SS, Caligiuri MA. Human Natural Killer cell development and biology. *Blood Reviews*(2006) 20,123-37.
- 145) Vujanovic N, Rabinowich H, Lee Y, Jost L, Herberman R, Whiteside T. .Distinct Phenotypic and Functional Characteristics of Human Natural Killer Cells Obtained by Rapid Interleukin 2-Induced Adherence to Plastic Whiteside *Cellular Immunology* 1993;151:133-57.
- 146) Haberman R, Vujanovic N, Rabinovich H, Whiteside T. Natural killer cells and interleukin-2-activated killer cells. In: Metelmann R, *Lymphohaematopoietic growth factors in cancer therapy II*. Berlin: Springer-Verlang.1992;11-27.

147) Baxter AG, Smyth MJ. The Role of NK Cells in Autoimmune Disease Autoimmunity, 2002;35(1):1-14.

148) Horwitz DA, Gray DJ, Ohtsuka K, Hirakata M, Takahashi T. The immunoregulatory effects of NK cells: the role of TGF- $\beta$  and implications for autoimmunity. Immunology Today, 1997;18(11):538-42.

149) Scott P, Trinchieri G, The role of natural killer cells in host-parasite interactions Current Opinion in Immunology, 1995,7:34-40.

150) Kos FJ, Engleman E G. Immune Regulation: a critical link between NK cells and CTLs Immunology Today, 1996;11:129-34.

151) Phillips JH, Hori T, Nagler A, Bhat N, Spits H, Lanier LL. Ontogeny of Human Natural Killer (NK) Cells: Fetal NK Cells Mediate Cytolytic Function and Express Cytoplasmic CD3 $\epsilon$ , $\delta$  Proteins . Exp. Med. 1992;185:1055-66.

152) Raulet DH, Development and tolerance of natural killer cells. Current Opinion in Immunology, 1999,11:129-34.

153) Manilay JO, Megan Sykes. Natural killer cells and their role in graft rejection. Current Opinion in Immunology, 1998;10(5):532-8.

154) Shibuya A, Nagayoshi K, Nakamura K, Nakauchi H. Lymphokine Requirement for the Generation of Natural Killer Cells From CD34<sup>+</sup> Hematopoietic Progenitor Cells Blood, 1995;85(12):3538-46.

155) Paraskevas F. T Lymphocytes and Natural Killer Cells In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glades B. Wintrobe's Clinical Hematology Frixos Paraskevas, Bertil Glader 11<sup>th</sup> edition. Printed in USA: ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2004;1:475-525.

156) Chong ASF. Receptors that Turn On and Turn Off Natural Killer Cells The Journal of Heart and Lung Transplantation, 1996;15(7):675-83.

- 157) Long EO, Wagtmann N. Natural killer cell receptors *Opinion in Immunology*, 1997, 9:344-50.
- 158) Soloski MJ. Recognition of tumor cells by the innate immune system *Current Opinion in Immunology*. 2001,13:154-162.
- 159) Yokohama WM. Natural Killer cell receptors *Current Opinion in Immunology*, 1995;7:110-20.
- 160) Raulet DH. Current Recognition events that inhibit and activate natural killer cells *Opinion in Immunology*, 1996; 8:372-7.
- 161) Timonen T, Helander TS. Natural killer cell-target cell interactions. *Current Opinion in Cell Biology*, 1997;9(5):667-73.
- 162) Aguila HL, Weissman IL. Hematopoietic Stem Cells Are Not Direct Cytotoxic Targets of Natural Killer Cells *Blood*, 1996 (4)1225-31.
- 163) Niemeyer CM, Sieff CA, Smith BR, Ault KA, Nathan DG. *Blood*, 1989;74(7)2376-82.
- 165) Klingemann HG, Relevance and Potential of Natural Killer Cells in Stem Cell Transplantation *Blood and Marrow Transplantation*, 2000;6(2) 90-9.
- 166) Bornhauser M, Thiede C, Brendel C, et al. Stable engraftment after mega dose blood stem cell transplantation across the HLA barrier. *Transplantation*, 1999;68:87-88.
- 167) Lanier LL. The role of natural killer cells in transplantation *Current Opinion in Immunology*, 1995,7: 626-31.
- 168) Murphy WJ, Reynolds CW, Tiberghien P, Longo DL. Natural Killer Cells and Bone Marrow Transplantation *William. Journal of the National Cancer Institute*, 1993;85(18)1475-82.

- 169) Silla L, Whiteside T, Ball E. The role of natural killer cells in the treatment of chronic myeloid leukemia. *J. Hematother*, 1995;4:269-79.
- 170) Sconocchia G, Lau M, Provenzano M, Rezvani K, Wongsena W, Fujiwara H, et al. The antileukemia effect of HLA-matched NK and NK-T cells in chronic myelogenous leukemia involves NKG2D-target-cell interactions *Blood*, 2005;106:3666-72.
- 171) Velardi A, Ruggeri L, Moretta A, Moretta L. NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation *Trends in Immunology*, 2002;23(9):438-44.
- 172) Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Katia Perruccio, Urbani E. Role of Natural Killer Cell Alloreactivity in HLA-Mismatched Hematopoietic Stem Cell Transplantation *Velardi Blood*, 1999;94(1):333-9.
- 173) Ruggeri L, Cappanni M, Urbani E, A. Mancusi, K. Perruccio, E. Burchielli, A. et al. Impact of natural killer cell alloreactivity on mismatched hematopoietic transplantation, 40-49. duplicado, mesma ref 184.
- 174) Martelli MF, Aversa F, Lustig EB, Velardi A, Zelicher SR, Tabilio A et al. *Seminars in Hematology*, 2002;39 (1):48-56.
- 175) Petersdorf EW, Sassazuki T, Advances in tissue typing and their potential Impacto in GVHD Incidence and Severity. "In": Ferrara JLM, Cooke KR, Deeg HJ. *Gravt-Vs.-Host Disease*. 3<sup>th</sup> ed. New York: ed. Marcel Dekker, 2005:401-26.
- 176) Van Rod JJ, *Blood* HLA-C alleles1 can no longer be ignored in bone marrow donor selection, 2004;104(7):1912-13.
- 177) Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors *Blood*, 2003;102(3):814-9.
- 178) Knuutila S, Larramendy ML, Ruutu T, Helande T. Involvement of Natural Killer Cells in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;79:21-24.

179) Soiffer RJ, Murray C, Gonin R, Ritz J. Effect of Low-Dose Interleukin-2 on Disease Relapse After T-Cell – Depleted Allogeneic Bone Marrow Transplantation Blood, 1994;84(3)964-71.

180) Hauch M, Gazzola MV, Small T, Bordignon T, Barnett L, Cunningham I et al. Marrow Transplantation for Chronic Myelogenous Leukemia Blood, 1990;75(11)2250-62.

181) Madelboin O, Kent S, Davis DM, Wilson SB, Okasi T, Jackson R et al. Natural Killer activating receptors trigger interferon  $\gamma$  secretion from T cells and natural killer cells Ofer Mandelboim, Strominger PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 1998;95(7) 3798-03.

182) Bluman EM, Bartynski KJ, Avalos BR, Caligiuri MA. Human Natural Killer Cells Produce Abundant Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  In: Response to Monocyte-derived Cytokines The Journal of Clinical Investigation, 1996;97(12);2722-7.

183) Chao NK, Holler E, Deeg HJ. Prophylaxis and Treatment of Acute Graft-vs.-Host Disease. In: James LM, Ferrara, Keneth R, Cooke, H. Joachim Deeg. Graft-Vs-Host Disease. 3<sup>th</sup> ed. New York: ed. Marcel Dekker, 2005; 459-79.

184) Ruggeri L, Cappanni M, Urbani E, Mancusi A, Perruccio K, Burchielli , et al. Impact of natural killer cell alloreactivity on mismatched hematopoietic transplantation. Reviews in Clinical and Experimental Hematology – 2004; Suppl 1:40-9.

185) Asai O, Longe DL, Tian ZG, Hornung RL, Taub DD, Ruscetti FW, Murphy WJ. Suppression of Graft-Versus-Host Disease and Amplification of Graft-Versus-Tumor Effects by Activated Natural Killer Cells after Allogeneic Bone Marrow Transplantation Murphy The Journal of Clinical Investigation, 1998;101(9):1835-42.

186) Caligiuri MA, Velardi A, Scheinberg DA, Borrello IM. Immunotherapeutic Approaches for Hematologic Malignancies In: Broudy VC, Berliner N, Larson RA, Leung LL, Hematology 2004 - American Society of Hematology Education Program Book. Annual edition. San Diego. California, 2004;337-53.

187) Baker J, Verneris MR, Ito M, Shizuru JA, Negrin RS. Expansion of cytolytic CD8<sup>+</sup> natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon  $\gamma$  production *Blood*, 2001;97(10):2923-31.

188) Biron CA, Brossay L, NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections *Current Opinion in Immunology*. 2001,13:458-64.

189) Dale IG, Hammond KJL, Poulton LD, Mark J. Smyth, and Alan G. Baxter NKT cells: facts, functions and fallacies Dale I. Godfrey, *Review Immunology Today*, 2000;21;(11):573-83.

190) Kronenberg M, Gapin L. The Unconventional Lifestyle of NKT Cells Mitchell Kronenberg and Laurent Gapin *Nature Reviews – Immunology*, 2002;2:557-68.

191) Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagómez D, Singh AK, Stanic AK, Wang CR et al. *PNAS*, 2003;100(19):10913-18.

192) Fujii S. *Int J Hematol* Application of natural killer T-cells to posttransplantation immunotherapy 2005;81(1):1-5.

193) Chiba S, Takahashi KT, Matsumoto A, Asai T, Kanda Y, et al. Host-residual invariant NK T cells attenuate graft-versus-host immunity. *Haraguchi* 2005;175(2):1320-8.

194) Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, Yamamura T, Van Kaer L, Liu C, Tanimoto M, Teshima T. Stimulation of host NKT cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducing Th2 polarization of donor T cells. *J Immunol*, 2005;174(1):551-6.

195) McMahon CW, Raulet DH, Expression and function of NK cell receptors in CD8<sup>+</sup> T cells *Current Opinion in Immunology*. 2001,13:465-70.

196) Herberman RB, Whiteside TL, The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer *Current Opinion in Immunology*, 2002;129(3):27-30.

- 197) Brittenden J, Heys SD, Ross J, Eremin O. Natural Killer Cells and Cancer Julie Brittenden, *Cancer*, 1996;177,1226-43.
- 198) Yamauchi A, Taga K, Mostowski HS, Bloom ET. Target Cell-Induced Apoptosis of Interleukin-2 – Activated Human Natural Killer Cells: Roles of Cell Surface Molecules and Intracellular Events *Blood*, 1996;87(12)5127-35.
- 199) DeBlaker-Hohe DF, Yamauchi A, Yu CR, Horvath-Arcidiacono JA, Bloom ET. IL-12 Synergizes with IL-2 to Induce Lymphokine-Activated Cytotoxicity and Perforin and Granzyme Gene Expression in Fresh Human NK Cells *Cellular Immunology* 1995;165:33-43.
- 200) Koh CY, Blazar BR, George T, Welniak LA, Capitini CM, Raziuddin A, William J. Murphy, and Michael Bennett Blood Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo *Blood*, 2001;97(10);3132-7.
- 201) Waldmann TA. Immunotherapy: Past, Present and Future *Med*, 2003;9(3);269-77.
- 202) Miller JS, Soignier Y, Mortari AP, McNeamey SA, Yun GH, Fautsch SK et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*, 2005;105(8):3051-7.

## ANEXO

### TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO EM PROJETO DE PESQUISA DO SERVIÇO DE HEMATOLOGIA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Senhores pacientes:

Gostaríamos de explicar a pesquisa que estamos fazendo e, então, perguntar se aceitam nos ajudar na sua realização.

Os pacientes que fazem transplante de medula óssea “ganham” um novo sistema de defesa que leva inicialmente em torno de trinta dias para “aparecer” em alguns exames de laboratório que fazemos.

Nós fazemos parte da equipe de profissionais de saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que faz transplantes de medula óssea e também pesquisas nesta área.

A sua participação consiste em fazer uma coleta de sangue por semana durante duas semanas com o objetivo de acompanharmos a recuperação de parte das defesas dos pacientes pós-transplante.

Estas coletas não oferecem nenhum tipo de risco adicional ao paciente transplantado.

Seus resultados não serão divulgados individualmente e seu nome não será mencionado.

Mesmo aceitando participar do estudo, você tem direito de se retirar dele no momento que desejar.

Se você se recusar a participar, este fato não irá interferir com o seu tratamento, que continuará o mesmo.

Caso aceite participar, assine o consentimento abaixo:

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente ou responsável: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_



## IMPACTO DA RECUPERAÇÃO PRECOCE DAS CÉLULAS NK NO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA ALOGÊNICO APARENTADO E SEU EFEITO NA PEGA E NO DESENVOLVIMENTO DE GVHD

CC Astigarraga<sup>1</sup>; AA Paz<sup>1</sup>, GAM Faulhaber<sup>2</sup>, L Sekine<sup>2</sup>, L Milost<sup>3</sup>, D Neto<sup>1</sup>, RL Canabarro<sup>4</sup>, H Sporleder<sup>4</sup>, R Bittencourt<sup>1</sup>, J Neumann<sup>4</sup>, LMR Silla<sup>1</sup>.

1. Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas

2. Serviço de Medicina Interna do Hospital de Clínicas.

3. Laboratório de Pesquisa em Hematologia Celular do Hospital de Clínicas.

4. Laboratório de Imunologia dos Transplantes da Santa Casa de Misericórdia.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Correspondência:** Claudia Caceres Astigarraga. Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do HCPA, Rua Ramiro Barcellos 2350/2<sup>o</sup> andar. Porto Alegre-RS 90035003 Brasil.

Endereço eletrônico: [ccaka@terra.com.br](mailto:ccaka@terra.com.br)

**Agradecimentos:** A Hemoamigos, pelo investimento em recursos humanos e pesquisa em transplante de medula óssea em um país em desenvolvimento.

### Resumo

A reconstituição imune NK no transplante MHC-mismatch está associada a um poderoso efeito enxerto-contra-leucemia (GVL), mas não há um papel definido das células NK no transplante MHC idêntico aparentado. Foram analisados 21 pacientes não consecutivos submetidos a transplante de células tronco hematopoéticas (10 autólogos e 11 alogênicos aparentados). No pós-transplante, a partir do momento em que o paciente atingisse  $0,45 \times 10^3/\mu\text{l}$  leucócitos foram realizadas duas coletas de sangue com intervalo de sete dias, com o intuito de avaliar a reconstituição imune inicial no período da pega. Em cada coleta foram quantificadas as populações de células NK e NKT e

verificada a variabilidade destas populações entre as coletas, bem como suas correlações com pega e diagnóstico de GVHD agudo e GVHD crônico. No grupo total de pacientes a correlação entre células NK com variação positiva no período das coletas e pega foi significativa ( $r=0,48$ ;  $p<0,05$ ), essa correlação não se manteve significativa na análise do grupo autólogo ( $r=0,27$ ;  $p=0,55$ ), mas se mostrou mais importante no grupo alogênico ( $r= 0,51$ ;  $p=0,11$ ). Não houve associação significativa das populações NK e NKT e GVHD agudo. A associação entre células NK com variação positiva no momento da pega e diagnóstico de GVHD crônico foi significativa ( $p<0,05$ ) o mesmo acontecendo com a correlação entre variação positiva de células NKT e GVHD crônico ( $p< 0,05$ ). Baseados nos nossos resultados, concluímos que o aumento quantitativo na população de células NK e NKT no período da pega pode ter relação com o desenvolvimento de GVHD crônico.

**Palavras-chave:** células natural killer; reconstituição imune; GVHD agudo; GVHD crônico; pega.

## Introdução

As células NK são linfócitos do sistema imune inato fundamentais na defesa contra patógenos infecciosos e transformações malignas, através da elaboração de citocinas e atividade citolítica<sup>1</sup>.

As células NK humanas correspondem a 10-15% dos linfócitos totais e são identificadas pela expressão do antígeno de superfície CD56 e a ausência do CD3. Funcionalmente as células NK são uma fonte importante de citocinas imunorregulatórias (interferon gama [INF- $\gamma$ ]; fator de necrose tumoral alfa [TNF $\alpha$ ]; fator estimulador de colônia granulocítica-macrofágica [GM-CSF]) e interagem com outras células do sistema imune para montar resposta imune adaptativa ou antígeno específica. Além disso, as células NK têm a habilidade de destruir células alvo diretamente, bem como de mediar citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC).<sup>2,3</sup>

As células NK foram descritas originalmente por sua capacidade de destruir tumor e células infectadas por vírus sem estimulação prévia.

Identificamos duas populações de células NK de acordo com a intensidade de expressão do CD56. As células CD56 que expressam intensamente CD56(CD56<sup>bright</sup>) correspondem a 10% destas células e são chamadas de NK imunorregulatórias, exibindo alta produção de citocinas, expansão *in vitro* e *in vivo* com pequenas doses de interleucina-2 (IL-2) e baixa atividade citotóxica sendo mediadores menos efetivos de ADCC e citotoxicidade natural. A população de NK com alta capacidade citotóxica se caracteriza por baixa expressão de CD56(CD56<sup>dim</sup>), corresponde a 90% da população NK, tem produção de citocinas negligenciável e pequena proliferação em resposta a altas concentrações de IL-2. Após tratamento com IL-2 *in vitro* e *in vivo* as duas subpopulações demonstram níveis similares de citotoxicidade<sup>4</sup>.

Não se sabe se estas duas populações são subtipos diferentes de células que compartilham um precursor comum ou se são estágios diferentes da maturação NK com funções adaptativas diferentes.

Recentemente a heterogeneidade das células NK adultas tem sido reconhecidas, mas o significado *in vivo* dessas populações bem como suas interações continuam indefinidos.<sup>2</sup>

Glicoproteínas classe I do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) são importantes em controlar as funções efectoras das células T citotóxicas e das NK. Entretanto, diferentemente dos linfócitos T, que reconhecem o antígeno como um fragmento de peptídeo ligado ao MHC, células NK permanecem funcionais na ausência de proteínas do MHC classe I nas células alvo. A imunidade de células T e NK são braços complementares da resposta imune celular, ou seja, as células T reconhecem e são ativadas por alvos que expressam complexos peptídeo-MHC, ao contrário, as células NK destroem alvos que perderam a expressão MHC classe I. Uma vez que a NK contate o seu ligante MHC classe I, são gerados sinais ativadores ou inibitórios dependendo do seu receptor, levando à lise ou inibição da lise da célula alvo<sup>5</sup>.

Estes sistemas de ativação e inibição constituem a base da hipótese do “missing-self<sup>6,7</sup>” que postula a função das células NK como reconhecedoras e destruidoras de células autólogas que tenham perdido ou alterado suas moléculas MHC classe I. Embora tolerantes com células normais autólogas as células NK podem reconhecer e atacar células infectadas por vírus e células transformadas (tumerais) que tenham reduzido sua expressão de MHC classe I<sup>3</sup>.

Os receptores de superfície que inibem e/ou ativam as células NK a destruírem células alvo são receptores *killer immunoglobulin like* (KIRs), lecitinas e receptores de citotoxicidade natural (*natural cytotoxic receptors* - NCRs). Os sinais inibitórios das células NK são mediados por KIRs e receptores C-lecitina-

like heterodiméricos CD94:NKG2A, que interagem com as moléculas MHC classe I nas células alvo. A ausência de ligação resulta na destruição da célula alvo<sup>8</sup>.

A aloreatividade das células NK poderia ser amplamente definida como qualquer efeito das células NK contra células baseado em alguma forma de aloreconhecimento<sup>9</sup>. De acordo com a tipificação MHC classe I do doador e do receptor, a aloreatividade NK pode ser esperada, ou seja, ausência de inibição das células NK do doador e conseqüente destruição celular, quando os KIRs respectivos não estão expressos nas células do receptor. As regiões cromossômicas que codificam KIR e HLA são independentes, e estudos sobre o efeito do padrão KIR doador-receptor no resultado do transplante baseado na presença ou ausência do ligante tem sido realizados.

Transplante haploidêntico de células tronco de doadores aparentados mismatch é opção terapêutica para pacientes que não tenham doador aparentado idêntico ou não aparentado compatível. A maioria dos pacientes terá um doador haploidêntico que é um doador (irmão, pais ou outro familiar) que compartilha um dos dois haplótipos MHC.

Estudos em humanos demonstram um efeito positivo da disparidade MHC/KIR em relação ao transplante haploidêntico de células tronco.

As células NK já foram implicadas na rejeição de enxerto em murinos (fenômeno da resistência híbrida)<sup>7</sup>, mas a relevância deste fenômeno em humanos é controversa<sup>10,11,12</sup>.

Por outro lado, alguns estudos reforçam a idéia de que as células NK poderiam promover a pega do enxerto em murinos<sup>13,14</sup>.

Nos transplantes haploidênticos com disparidade MHC/KIR em murinos sugeriu-se que as células NK além de facilitarem a pega, preveniam a GVHD aguda<sup>10,15</sup>.

Em 1993 Murphy<sup>16</sup> propôs o conceito "efeitos bidirecionais das células NK na hematopoese", onde as células NK podem ser benéficas ou deletérias no transplante de medula óssea, dependendo do seu genótipo e estado de ativação. Este conceito é confirmado pelo atual conhecimento do mecanismo de ativação e inibição das células NK e suas respostas efetoras.

As células NK podem no máximo contribuir, mas não causar a GVHD aguda, tendo a possibilidade teórica tanto de promover quanto de proteger do GVHD agudo através da regulação na produção de citocinas como INF- $\gamma$  e TNF $\alpha$ .<sup>15,17,18,19</sup>

De modo geral, após o transplante de células tronco hematopoéticas a contagem das células NK se recupera a níveis normais em um a dois meses, independente do tipo de transplante, fonte de célula-tronco, idade do doador e GVHD. O tipo de NK predominante na recuperação inicial pós-transplante é a NK com perfil imunoregulatório.<sup>2,20,21,22</sup>

A reconstituição concomitante da celularidade NK e de sua atividade citotóxica foi demonstrada em transplante haploidêntico. Atividade lítica precoce das NK foi também detectada um mês após transplante de células de cordão umbilical. No entanto, a capacidade de lise das células NK está atenuada em pacientes após o transplante de células progenitoras periféricas autólogo e alogênico.<sup>20</sup>

A reconstituição imune NK no transplante MHC-mismatch está associada a um poderoso efeito enxerto-contra-leucemia (GVL), mas não há um papel definido das células NK no transplante MHC idêntico aparentado<sup>23</sup>.

O objetivo desse estudo foi verificar a recuperação quantitativa precoce das células NK em transplantes autólogos e alogênicos aparentados no período peri-pega e sua relação ou não com a pega. Outro objetivo foi verificar se existe relação da recuperação quantitativa precoce das células NK com o desenvolvimento de GVHD agudo e/ou crônico nos transplantes alogênicos aparentados.

### **Pacientes e Métodos:**

**Pacientes:** De novembro de 2001 a outubro de 2004 foram analisados 21 pacientes não consecutivos submetidos a transplante autólogo ou alogênico aparentado de células tronco hematopoéticas no Centro de Transplante de Medula Óssea do Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

As características dos pacientes estão descritas na tabela 1 e 2. Todos os pacientes assinaram termos de consentimento para participar da pesquisa.

Todos os pacientes submetidos a transplante alogênico eram match 6/6 e receberam enxerto doado por irmãos. Todos os pacientes do grupo alogênico receberam profilaxia para GVHD com ciclosporina e metotrexate.

Os pacientes pós-transplante autólogo que na reavaliação de prontuários em dezembro de 2005, não se sabiam vivos ou mortos, foram pacientes encaminhados de outros serviços para transplante e haviam retornado aos seus serviços de origem para seguimento.

**Coletas de sangue:** Após o transplante, a partir do momento em que o paciente atingisse  $0,45 \times 10^3/\mu\text{l}$  leucócitos foram feitas duas coletas de 20 ml de sangue via catéter central com intervalo de sete dias. O gatilho para o início da coleta de  $0,45 \times 10^3/\mu\text{l}$  leucócitos foi determinado por dois motivos: esse foi o mínimo em termos de quantidade de leucócitos em que pudemos fazer separação de células mononucleares de maneira adequada e fazendo duas

coletas a partir deste momento, a chance de analisarmos o momento da pega aumentava consideravelmente. A maioria dos trabalhos analisa células NK a partir de trinta dias pós-transplante e não em um período de reconstituição imune tão inicial.

**Separação das células mononucleares:** Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas com Ficoll-Hypaque possibilitando a separação de mononucleares. A fração resultante foi lavada com solução de Hank, ressuspendida em uma concentração de  $1,5 \times 10^6$ /ml em meio IMD (Iscoves Modified Dulbeccos Medium), enriquecido com soro fetal bovino<sup>24</sup>.

**Determinação dos subtipos celulares:** A contagem total de leucócitos foi determinada por contador automático (Culter Counter, USA) e a contagem diferencial por exame microscópico. As células mononucleares separadas foram submetidas a imunofenotipagem por citometria de fluxo com duas cores com diversos anticorpos (BD) contra antígenos de superfície, conforme técnica já anteriormente descrita<sup>55</sup> em citômetro de fluxo FACScan. Os pares de anticorpos utilizados foram: CD56/CD57, CD56/CD33 para células NK; CD56/CD3 para célula NKT; CD34/CD7 para células-tronco e CD45/CD14 para monócitos. Foram utilizados IgG1/IgG2 murinos para subtração de fluorescência não específica.

Para calcular os números absolutos dos subgrupos celulares, a percentagem das células com marcação positiva foi multiplicada pelo número de linfomononucleares absolutos no sangue periférico, após subtração das células com marcação CD14<sup>+</sup>.

**Células NK:** Foram consideradas células NK, todas as células CD56<sup>+</sup>. Foi realizada média das populações de células NK levando em consideração as marcações positivas de CD56 nos pares CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>/CD57<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>/CD33<sup>-</sup> e marcação positiva CD56 nos pares com dupla marcação positiva CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>/CD57<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>.



**$\Delta$ NK,  $\Delta$ NKS,  $\Delta$ NKP:** Foi criada a variável  $\Delta$ NK que significa a variação quantitativa de células NK entre as duas coletas ( $\Delta$ NK= NK da coleta 2 - NK da coleta 1). Valores negativos a zero foram considerados como ausência de progressão quantitativa entre as duas coletas ( $\Delta$ NKS), valores positivos foram considerados como progressão quantitativa entre as duas coletas ( $\Delta$ NKP).

**Células NKT:** Foram consideradas células NKT a população com marcação CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>.

**$\Delta$ NKT,  $\Delta$ NKTS,  $\Delta$ NKTP:** Foi criada a variável  $\Delta$ NKT que significa a variação quantitativa de células NKT entre as duas coletas ( $\Delta$ NKT= NKT da coleta 2 - NKT da coleta 1). Valores negativos a zero foram considerados como ausência de progressão quantitativa entre as duas coletas ( $\Delta$ NKTS), valores positivos foram considerados como progressão quantitativa entre as duas coletas ( $\Delta$ NKTP).

**Determinação de pega do enxerto:** Foi definido como pega o que de hábito costuma-se considerar, ou seja, após o transplante, contagem de granulócitos > ou = a  $0,5 \times 10^3/\mu\text{l}$  durante três dias consecutivos.

**Determinação de GVHD agudo e crônico:** Em novembro de 2005 foram avaliados os prontuários dos 21 pacientes da pesquisa e levantados dados sobre diagnóstico de GVHD agudo e crônico. Os diagnósticos foram em sua grande maioria clínicos. No GVHD agudo foram usados os critérios da conferência de consenso da graduação de GVHD agudo<sup>25</sup> e para GVHD crônico foram usados os termos limitada ou extensa<sup>26</sup>, visto que no momento da análise deste estudo, ainda não havia sido lançada a sugestão do NIH para nova classificação de GVHD crônico<sup>27</sup>.

**Análise estatística:** Todos os dados foram analisados usando o programa SPSS para Windows versão 12.0 (SPSS,Chicago,IL). Os valores estão descritos como mediana e intervalo interquartilico (percentis 25-75).

Análise do chi-quadrado e teste exato de Fischer foram utilizados para determinar as relações entre variáveis nominais. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparação de variáveis contínuas e o coeficiente de correlação de Spearman (r) foi usado para verificar associação entre variáveis. O nível de significância foi determinado como  $p < 0,05$ .

**Resultados:** Foram estudados 21 pacientes. 10 pacientes foram submetidos a transplante autólogo e 11 a transplante alogênico. No grupo dos pacientes do transplante alogênico foram realizadas duas coletas em cada paciente, no grupo do autólogo em oito pacientes foram realizadas duas coletas e em dois pacientes foi realizada uma coleta em cada um. (Vide tabela 1 e 2)

A mediana de leucócitos totais e de dias pós-transplante nas coletas no grupo total, no grupo do autólogo e no grupo do alogênico, está descrita na tabela 3.

Na reavaliação dos prontuários em novembro de 2005, foram levantadas as taxas de óbito (as causas dos óbitos estão na tabela 2). No grupo dos 21 pacientes, cinco morreram. No grupo do alogênico quatro pacientes foram a óbito, dois por morte relacionada ao transplante e dois por recaída, no grupo de 10 pacientes do transplante autólogo, tivemos seguimento de cinco pacientes e destes, um morreu por recidiva de doença, não houveram mortes relacionadas ao transplante.

**Células NK:** A mediana das células CD56<sup>+</sup> de cada grupo nas duas coletas estão descritas na tabela 3. Não houve diferença estatisticamente significativa no número de células NK comparando os dois grupos tanto na primeira quanto segunda coleta (primeira coleta  $p=0,512$  e segunda coleta  $p=0,126$ ).

**Δ Células NK:** No grupo total a mediana de  $\Delta$ NK foi 5,3(-1,25 ;7,9), no grupo do autólogo a mediana do  $\Delta$ NK foi -0,1(-0,84;5,0) e no grupo do alogênico foi de 2,98(-2,49;16,93), a diferença entre os dois grupos não foi significativa ( $p= 0,425$ ) (tabela 3).

**Células NKT e  $\Delta$ NKT:** A mediana das NKT em cada grupo específico está descrita na tabela 3. A diferença entre os grupos de transplante autólogo e alogênico em relação à NKT não foram significativas nem na primeira coleta ( $p=0,089$ ), nem na segunda coleta ( $p= 0,750$ ).

Os valores de  $\Delta$ NKT em relação a cada grupo estão descritas na tabela 3. Em termos de  $\Delta$ NKT a diferença entre o grupo do autólogo e o grupo do alogênico não foi significativa ( $p= 0,375$ ).

**PEGA:** Do grupo total de vinte e um pacientes, 16 coincidiram a data de pega com o período da análise. No grupo de dez pacientes submetidos a transplante autólogo, quatro pacientes não coincidiram a pega com o período da análise e no grupo de onze pacientes submetidos a transplante alogênico, somente um paciente não coincidiu o momento da pega com o período da análise.

A mediana de pega dos grupos está na tabela 3. Em relação a todo o grupo (21 pacientes), a correlação entre pega e mediana total das células NK (mediana das NK na primeira e segunda coleta) foi não significativa ( $p= 0,187$ ), a correlação entre pega e mediana de NK na primeira coleta foi não significativa ( $p= 0,942$ ), a correlação entre pega e mediana de células NK na segunda coleta foi não significativa ( $p= 0,150$ ).

No grupo total, a correlação entre  $\Delta$ NK e pega foi significativa ( $r=0,48$ ;  $p<0,05$ ), ou seja, quanto maior a variabilidade dos valores quantitativos das células NK entre a primeira e a segunda coleta, mais tardia a pega.

No grupo do transplante autólogo e alogênico foram analisadas as mesmas correlações. No grupo do autólogo a correlação entre  $\Delta$ NK e pega, não foi importante ( $r=0,27$ ;  $p=0,55$ ), contudo no grupo do alogênico apesar do coeficiente de correlação não ser estatisticamente significativo ( $p=0,112$ ) o  $r$  foi de 0,51. A partir desta informação podemos inferir que o coeficiente de correlação estatisticamente significativo do grupo total, esteja relacionado aos valores do grupo alogênico e que aumentando o número de pacientes neste grupo talvez obtivéssemos a mesma magnitude de correlação observada no grupo total.

Verificou-se também a correlação de pega e células NKT, no grupo total não houve correlação significativa, tampouco no grupo do autólogo. No grupo do alogênico a correlação entre pega e  $\Delta$ NKT foi = 0,06 com uma significância limítrofe, mas sem atingi-la.

**Dose de CD34:** A mediana das doses de  $CD34 \times 10^6$ /quilo, infundidas em cada grupo estão descritas na tabela 3. No grupo dos 21 pacientes a correlação entre pega e dose de CD34 foi não significativa ( $p = 0,248$ ). Neste mesmo grupo a correlação entre dose de CD34 e mediana de células NK na primeira e segunda coleta não foi significativa ( $p= 0,480$  e  $p= 0,922$ , respectivamente) .

Não houve correlação significativa entre dose de CD34 e NKT na primeira ( $p= 0,989$ ) e segunda coleta ( $p= 0,480$ ), tampouco no relativo à correlação entre dose de CD34 e  $\Delta$ NKT ( $p= 0,357$ ).

No grupo do transplante autólogo também não foram observadas correlações significativas entre dose de CD34 e mediana de NK na primeira e segunda coleta ( $p= 0,374$  e  $p= 0,645$ ), o mesmo ocorreu na correlação com  $\Delta$ NK e  $\Delta$ NKT ( $p= 0,879$  e  $p= 0,760$ ).

No grupo do alogênico também não houve correlação significativa entre dose de CD34 e NK na primeira coleta ( $p= 0,631$ ), NK na segunda coleta ( $p=0,873$ ). A correlação neste grupo entre dose de CD34 e  $\Delta$ NK e entre dose de CD34 e  $\Delta$ NKT não foram significativas ( $p= 0,894$  e  $p= 0,284$  respectivamente).

Nos dados analisados não foi estatisticamente significativa a relação entre dose de CD34 infundida no enxerto e nenhum dos subtipos celulares estudados em todos os grupos de pacientes.

**GVHD Agudo (aGVHD):** Conforme o esperado, não foi observado nenhum caso de GVHD agudo no grupo dos pacientes com transplante autólogo.

Dos onze pacientes submetidos a transplante alogênico, quatro desenvolveram GVHD agudo graus I a II (36,36% dos casos) e um paciente desenvolveu GVHD grau III a IV (9,09% dos casos). 45,45% da população submetida a transplante alogênico desenvolveu algum grau de GVHD agudo. As associações entre GVHD agudo e pega e GVHD agudo e dose de CD34 não foram significativas,  $p=0,719$  e  $p=0,153$ , respectivamente.

Em relação a células NK, obtivemos os seguintes resultados nas associações: associação entre aGVHD e NK na primeira coleta  $p=0,069$ , aGVHD e NK na segunda coleta  $p=0,657$ , aGVHD agudo e mediana de NK entre primeira e segunda coleta  $p=0,215$ , aGVHD e  $\Delta$ NK  $p= 0,257$  nenhuma das associações alcançou significância estatística.

Também com a população de células NKT as correlações com aGVHD não se mostraram estatisticamente significativas: associação entre aGVHD e NKT na primeira coleta  $p=0,398$ , aGVHD e segunda coleta  $p=0,586$  e aGVHD e  $\Delta$ NKT  $p=0,961$ .

**GVHD Crônico (cGVHD):** De acordo com o esperado, não foi observado nenhum caso de GVHD crônico no grupo dos pacientes com transplante autólogo, todos os casos observados foram no grupo dos pacientes submetidos a transplante alogênico<sup>29</sup>.

Destes pacientes, sete desenvolveram GVHD crônico (63,63%), sendo seis pacientes com GVHD crônico limitado (54,54%) e um paciente com GVHD crônico extenso (9,09%).

A análise das associações no grupo dos pacientes com cGVHD foi extremamente interessante. A associação de cGVHD com dose de CD34 não foi significativa  $p=0,488$ , em compensação entre cGVHD e pega foi significativa com  $p<0,05$ , ou seja, pacientes com cGVHD tiveram pega mais tardia (Gráfico 1).

Em relação a células NK a associação entre cGVHD e NK na primeira coleta não foi significativa ( $p=0,85$ ), mas na segunda coleta a associação com NK teve  $p=0,056$ . A associação entre cGVHD e mediana de NK entre a primeira e a segunda coletas não foi significativa ( $p=0,255$ ). A associação entre cGVHD e  $\Delta$ NK foi significativa ( $p<0,05$ ).

Em relação a células NKT, obtivemos os seguintes resultados: a associação entre cGVHD e NKT na primeira e segunda coletas não foi significativa ( $p=0,36$  e  $p=0,37$ , respectivamente). A associação entre cGVHD e  $\Delta$ NKT apesar de não ser estatisticamente significativa teve um  $p=0,085$  (Vide tabela 4).

A associação entre cGVHD e  $\Delta$ NKP foi estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ), dos sete pacientes com cGVHD, todos aumentaram a quantidade de células NK(CD56<sup>+</sup>) da primeira para a segunda coleta (Gráfico 2).

A associação entre cGVHD e  $\Delta$ NKTP também foi estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ), dos sete pacientes com cGVHD, seis aumentaram a

quantidade de células NKT(CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>) da primeira para a segunda coleta (Gráfico 3).

## Discussão

Embora muito se tenha aprendido sobre a biologia das células NK nos últimos anos, ainda existem muitas lacunas na nossa compreensão sobre o desenvolvimento dos subtipos maduros de células NK a partir dos progenitores hematopoéticos, mecanismos de aquisição de auto-tolerância, modulação dos receptores de células NK e os mecanismos de interação entre as células NK com células-alvo e com outras células do sistema imune<sup>2</sup>.

No nosso estudo em pacientes submetidos a transplante alogênico aparentado encontramos uma tendência não estatisticamente significativa na correlação entre variabilidade quantitativa de células NK e NKT e pega mais tardia. Também encontramos neste grupo de pacientes associações estatisticamente significativas entre variabilidade das populações de células NK e células NKT com progressão no período da pega e diagnóstico de GVHD crônico. Todos os pacientes com GVHD crônico tiveram pega mais tardia ( $p < 0,05$ ).

Por causa da sabida citotoxicidade das células NK, seria lógico pensar que as células NK residentes na medula óssea, poderiam reconhecer e eliminar células-tronco hematopoéticas alogênicas, através de mecanismos citolíticos, mas se demonstrou em camundongos que a população de células tronco não é afetada diretamente pelas células NK, o mesmo ocorrendo em experiências *in vitro*<sup>29,30</sup>.

Não se sabe até hoje, qual célula promove a pega no transplante. Alguns modelos murinos sugerem que as células NK do doador são críticas para a pega, enquanto outros estudos implicam a célula T CD8<sup>+</sup> neste contexto. Não existem dados em humanos que impliquem diretamente as

células NK com a pega ou mesmo com rejeição em transplantes de células tronco<sup>11, 12, 16</sup>.

Evidência direta de envolvimento das células NK do receptor com rejeição do enxerto, ainda não foi encontrada, mas o fenômeno da resistência híbrida é frequentemente lembrado como evidência para rejeição mediada por NK. Acredita-se que seu papel neste contexto é de pouca importância, visto que a resistência híbrida só ocorre quando é infundido um número pequeno de células do doador, e que não ocorre usualmente em transplantes. A relevância do fenômeno da resistência híbrida em humanos é controversa<sup>10, 11, 12</sup>.

Não encontramos na literatura referência à correlação entre células NK e pega mais tardia.

Alguns estudos reforçam a idéia que as células NK podem promover a pega, em camundongos, a administração precoce de células NK ativadas (LAK), após o transplante de medula óssea alogênico, leva a pega mais rápida e menor rejeição, especialmente após depleção T.

Existem diversos estudos discordantes sobre o efeito das células NK em culturas celulares de medula óssea autóloga e alogênica, provavelmente devido a condições particulares das culturas envolvidas e dos diferentes estágios de ativação das células NK analisadas<sup>14</sup>.

As células NK podem ser inibitórias ou estimulatórias para a hematopoese de acordo com a sua diversidade de receptores. Tendo em mãos o conhecimento sobre o funcionamento dos receptores de células NK e seus processos de ativação e inibição, tornam-se mais compreensíveis os resultados



aparentemente contraditórios do efeito das células NK sobre a hematopoese in vitro<sup>7, 31</sup>.

Atualmente os mecanismos de ativação ou inibição dos receptores das células NK e seu papel nos diferentes tipos de transplantes têm sido extremamente discutidos. Estudos em humanos demonstram um efeito positivo da disparidade MHC/KIR em relação ao transplante haploidêntico de células tronco. Em pacientes com LMA foram notáveis menores taxas de recaída do que o esperado, menor taxa de rejeição do enxerto e redução de taxas de GVHD agudo, quando o enxerto haploidêntico possuía KIRs inibitórios para os quais o receptor não tinha ligante, as taxas de GVHD crônico neste grupo de pacientes não foram reportadas<sup>15</sup>.

Em transplantes não-relacionados com incompatibilidade de receptores KIR foram observadas melhora da sobrevida e taxas menores de GVHD agudo, com taxas comparáveis de GVHD crônico<sup>28, 32</sup>. Pacientes com LMA e SMD submetidos a transplantes HLA compatíveis aparentados com incompatibilidade KIR demonstraram resultados superiores, não foram descritos taxas de GVHD agudo e crônico neste grupo<sup>33,34</sup>.

Os resultados do nosso trabalho em pacientes submetidos a transplante HLA-compatível aparentado demonstram associação estatisticamente significativa entre aumento quantitativo das células NK no período da pega e desenvolvimento de GVHD crônico.

Seria sem dúvida interessante correlacionarmos este achado com o grau de incompatibilidade KIR receptor/doador neste grupo, para verificarmos se esta correlação com GVHD crônico está relacionada à interação dos receptores NK ou simplesmente a relação das células NK com outras células do sistema imune promotoras de GVHD. A partir destes resultados a tipificação de HLA-C tornou-se parte da rotina em nosso serviço.

Sabemos que o GVHD crônico está associado com células T aloreativas (helper e citotóxicas), células supressoras não específicas, macrófagos secretores de TNF- $\alpha$  e células T autoreativas. Em humanos, o GVHD crônico pode envolver alterações no equilíbrio entre células Thelper do tipo 1/Tcitotóxica do tipo 1(Th1/Tc1) e células T helper do tipo 2/T citotóxica do tipo 2 (Th2/Tc2), com resposta predominante Th1/Tc1 caracterizada por um padrão de produção aberrante de INF- $\gamma$ , sem produção de IL-2. A presença consistente de autoanticorpos contra proteínas do citoesqueleto (tubulina, actina, miosina) indiretamente dá suporte ao efeito de células Th2 no GVHD crônico. Aparentemente, o GVHD crônico em humanos pode apresentar-se com predominância Th1/Tc1 ou Th2/Tc2 e uma ou outra predominância podem produzir diferentes quadros clínicos<sup>35</sup>. De modo geral O GVHD crônico tem sido associado com aumento nas populações CD8+ e redução na proporção de células NK (CD3-/CD16-/CD56+) no sangue<sup>28</sup>.

Em relação aos transplantes HLA-idênticos, as células NK em recuperação expressam um fenótipo imaturo com baixos níveis de CD16 e moléculas KIR e alta expressão de receptores inibitórios CD94/gNKG2A. O perfil de recuperação inicial das células NK é de 90% de NK imunoregulatórias (CD56bright/CD16dim/neg) e 10% de NK citotóxicas (CD56dim/CD16bright) e após seis meses do transplante as populações se invertem e passam a representar as frequências normais de população NK com a mesma expressão KIR do doador (90% de células NK citotóxicas para 10% de células NK imunoregulatórias)<sup>2, 4</sup>.

Células NK com perfil imunoregulatório podem produzir citocinas tipo 1 ou tipo 2 em abundância após estimulação de monocinas *in vitro*. Por exemplo, co-estimulação com IL-15, levou a produção de citocinas tipo 2 pelas NK imunoregulatórias(IL-10 e IL-13) e co-estimulação com IL-12 otimizou a produção de citocina tipo 1(INF- $\gamma$ )<sup>4</sup>. Embora essas duas monocinas tenham a capacidade de induzir produção de citocina tipo 1 ou citocina tipo 2, a quantidade de cada uma e a presença de outras citocinas podem promover

uma resposta preponderante. As características das citocinas induzidas por infecção podem ditar a produção de citocinas tipo 1 ou tipo 2 pelas células NK imunoregulatórias, que podem, em parte, influenciar a produção de uma resposta T helper<sup>4</sup>. Poderíamos pensar o mesmo em termos de resposta NK imunoregulatória a citocinas induzidas por infecção ou mesmo GVHD agudo e propensão ao surgimento de GVHD crônico?

Sabemos que o subtipo de célula NK que primeiro se recupera e em abundância é a NK imunoregulatória e que seis meses pós-transplante ela passa a representar somente 10% da população de células NK<sup>2</sup>, mas nos indivíduos que desenvolveram GVHD crônico a dinâmica seria a mesma? Atualmente não existem respostas para estas perguntas.

A fisiopatogenia do GVHD crônico é desconhecida se comparada a do GVHD agudo e o entendimento atual da etiologia do GVHD crônico em humanos baseia-se no conhecimento que células T patogênicas do doador proliferam em resposta a aloantígenos ou autoantígenos não verificados pelo timo normal ou mecanismos de deleção periféricos. Células críticas na promoção de tolerância podem estar ausentes no doador ou receptor. Essas células T patológicas atacam diretamente tecidos alvo através de ataque citolítico, secreção de citocinas inflamatórias e fibrosantes, ou produção da ativação de células B e produção de autoanticorpos. O dano tecidual leva a fibrose e disfunção<sup>28,36</sup>.

O timo tem um papel crítico na prevenção da autoimunidade, via eliminação de células T autorreativas. Isso sugere que a GVHD crônica é causada por células T autorreativas que escapam da seleção negativa no timo, que está lesado pelos regimes de condicionamento, GVHD aguda e/ou atrofia relacionada à idade. O GVHD crônico que ocorre geralmente meses após o transplante, pode ser secundário a resposta imune Th2 a células T CD4+ do doador, que escaparam da seleção tímica negativa e que permanecem reconhecendo antígenos MHC apresentados pelas APC do receptor. Estas

células T CD4+ auxiliam as células B do receptor a sintetizar anticorpos contra vários antígenos teciduais do receptor<sup>37, 38, 39</sup>.

Diferentemente dos linfócitos T, as células NK no máximo contribuem e não causam GVHD. As células T podem recrutar células NK, estimulam resposta imune através de liberação de citocinas e possivelmente contribuem para o dano tecidual através da produção de citocinas inflamatórias e óxido nítrico<sup>11</sup>.

Em modelos murinos a infusão de células NK/ANK não causa GVHD comparadas à infusão de linfócitos citotóxicos e conforme a compatibilidade KIR receptor/doador a transferência de células NK pode ser um fator de proteção para GVHD agudo<sup>11,15</sup>.

Contudo, infecções virais podem estimular células NK a produzir INF- $\gamma$  e especula-se se esta reação poderia ser o fator principal da exacerbação de GVHD agudo que ocorre em vigência de infecções virais<sup>11</sup>.

Teoricamente as células NK podem regular os três processos efetores da célula T patológica que originam o dano tecidual no GVHD crônico: ataque citolítico, secreção de citocinas inflamatórias e fibrosantes e produção da ativação de células B com produção de autoanticorpos.

As células NK exercem um papel regulatório na produção de linfócitos T citotóxicos e na produção de anticorpos por linfócitos B.

Séries de experimentos com rigorosa depleção NK foram realizados para reavaliar o papel das células NK na geração de linfócitos T citotóxicos (CTLs). Em culturas mistas de linfócitos para a geração de CTLs humanas

aloantígeno-específicas CD8<sup>-</sup>, foi demonstrado que células NK CD3<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> eram requisito na indução de CTLs efetoras. O componente NK destas culturas parece determinar se as células TCD8<sup>+</sup> estimuladas por antígeno vão simplesmente proliferar, mas não se diferenciar (na ausência de células NK) ou proliferar e diferenciarem-se em CTLs efetoras citoliticamente ativas (na presença de NK)<sup>40</sup>.

Romagnani<sup>41</sup> propôs que a resposta imune inata, incluindo a atividade de células NK, determina o fenótipo da resposta imune subsequente das células TCD4<sup>+</sup>. Desafios antigênicos de células TCD4<sup>+</sup>, associados com ativação NK produzem uma cascata de eventos que levam ao desenvolvimento de resposta Th1 ou mudança de perfil Th2 para Th1. A remoção do sangue periférico de mononucleares que expressem CD16<sup>+</sup>, reduz a habilidade de fatores estimuladores de NK fazerem a mudança de células TCD4<sup>+</sup> alérgeno-específicas com perfil fenotípico Th2 para Th1. Um fenômeno similar ocorre em pacientes com dermatite atópica grave e deficiência funcional de células NK que demonstram uma diferenciação predominantemente Th2. Cabe aqui, lembrar que em GVHD crônico temos redução de células NK circulantes e freqüentemente apresentações clínicas que remontam a resposta imune Th2<sup>40</sup>.

As células NK têm a capacidade de regular produção de anticorpos positiva ou negativamente. A regulação positiva tem efeito direto nos linfócitos B, a regulação negativa é feita de maneira indireta e requer fator de crescimento conversor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) para co-estimulação de células TCD8<sup>+</sup> para realização de regulação negativa.

Células NK podem funcionar como células apresentadoras de antígeno e podem induzir linfócitos B em repouso a secretarem IgG e IgM (não precisam de ativação para esta indução). Existem evidências consideráveis de que células NK podem induzir e/ou promover a produção de anticorpos de uma maneira independente das células T<sup>42</sup>.

Do ponto de vista de regulação negativa de produção de anticorpos, as células NK embora por si só possam estimular a produção de anticorpos, quando colocadas em cultura com células TCD8<sup>+</sup>, aumentam a produção de TGF- $\beta$  que serve como um importante fator co-estimulador para células TCD8<sup>+</sup> desenvolverem atividade supressora. Em humanos, as células NK circulantes parecem ser a maior fonte de TGF- $\beta$  ativo.

Em doenças autoimunes a regulação negativa de produção de anticorpos das células T está prejudicada por razões pouco entendidas. As células T de indivíduos com LES sustentam ao invés de suprimirem a produção de anticorpos.

IL-2 e TNF- $\alpha$  podem aumentar a produção de TGF- $\beta$  derivada de linfócitos, o INF- $\gamma$  tem efeitos mínimos e a IL-10 é inibitória para produção de TGF- $\beta$ . O efeito negativo da IL-10 na produção de TGF- $\beta$ , pode ser secundário aos seus efeitos inibitórios na biossíntese de IL-2 e TNF- $\alpha$ .

No Lupus Eritematoso Sistêmico (LES), a produção de TGF- $\beta$  pelas células NK está diminuída, fato consistente com relatos de que nessa doença a função de célula NK está geralmente diminuída<sup>43</sup>. É possível que as células NK tenham um papel importante na infra-regulação da resposta imune *anti-self* e *non-self in vivo*, via produção de TGF- $\beta$ <sup>43</sup>.

Além de suas atividades citotóxicas, as células NK parecem ter um papel importante na regulação imune, limitando a resposta a antígenos estranhos e prevenindo a autoimunidade<sup>42</sup>.

Estudos com pequeno número de pacientes sugerem que os níveis de IL-10 circulantes em pacientes com GVHD crônico são baixos e TNF- $\alpha$  e TGF-

$\beta 1$  são altos, contrastando com os modelos murinos de GVHD (que remontam a fisiopatogenia do LES e apresentam características clínico-laboratoriais diferentes do GVHD crônico em humanos), onde produção aumentada de IL-10 está associada com GVHD crônico e anticorpos anti-IL-10 podem bloquear suas manifestações clínicas<sup>28</sup>.

No nosso estudo também encontramos correlação estatisticamente significativa entre aumento quantitativo das células NKT ( $CD56^+/CD3^+$ ) no período perihepa e desenvolvimento de GVHD crônico.

Células NKT são linfócitos T com atividade de células NK foram identificados em tecidos murinos e humanos. Células NKT murinas, tipicamente expressam marcadores fenotípicos encontrados em células T como CD3 e receptor celular  $\alpha\beta T$ (TCR), bem como os marcadores NK NK1.1 e DX5. Foram descritas duas populações de NKT em murinos. Uma das subpopulações não expressa CD4 e CD8 ou são  $CD4^+$ , expressa um TCR invariável e foi encontrada no fígado, timo, baço e medula óssea. Funcionalmente as células NKT  $CD4^+NK1.1$  produzem grandes quantidades de interleucina 4(IL-4), na sua ativação e tem um papel importante na regulação da resposta imune Th2. As células NKT  $CD4^+$  são selecionadas positivamente pela molécula de MHC classe I CD1d e então, associadas a  $\beta 2$  microglobulina. Têm função importante na regulação de resposta imune, inibição do desenvolvimento tumoral e proteção contra o desenvolvimento de doenças auto-imunes. Foi observado que em pacientes com esclerose sistêmica, lupus eritematoso, artrite reumatóide e diabetes tipo1 há redução seletiva deste tipo de célula<sup>44</sup>. Foi descrito supressão de GVHD em murinos por este subtipo específico de célula NKT<sup>45,46,47</sup>.

Em 2004 Hyray et al<sup>48</sup> publicaram estudo em humanos sobre a recuperação deste subtipo de NKT, demonstrando que um mês pós transplante as células NKT estavam reconstituídas no sangue periférico em receptores de

células progenitoras periféricas, enquanto que nos receptores de medula óssea, permaneceram com níveis baixos por mais de um ano. Em pacientes com GVHD agudo o número de células NKT CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup> era menor comparado a pacientes sem GVHD agudo. Em relação ao GVHD crônico os receptores de medula óssea com GVHD crônico extenso tinham um número significativamente menor de células NKT<sup>49</sup>.

Recentemente foi descrita uma segunda população de células NKT, que expressa um repertório TCR variável e não é dependente de CD1d para sua maturação e desenvolvimento. Essas células NKT foram encontradas no baço e na medula óssea (1 a 3%) e expressam CD8 ou são duplo negativas para CD4 e CD8. Esta subpopulação celular tem ação citotóxica potente *in vitro*, tem ação antitumoral e não causa GVHD significativo entre doador-receptor haploidênticos em murinos<sup>45,50</sup>. O efeito GVL e de supressão de GVHD neste subtipo celular é controverso e obviamente são necessários outros estudos para determinar a importância desta população específica, inclusive como célula potencial para uso em imunoterapia em doença autoimune, infecções e em transplante de medula na indução de resposta Th2, com potencial uso no tratamento e prevenção do GVHD<sup>47,51,52,53,54</sup>!

## **Conclusão**

Com os dados levantados neste trabalho não conseguimos estabelecer correlação significativa entre dosagem quantitativa de células NK, células NKT, ΔNK, ΔNKT e pega, mas os resultados próximos da significância, principalmente no grupo do alogênico, impõem a necessidade de mais pesquisas no sentido de correlacionar variação das células NK e NKT no período de recuperação imune inicial com pega, visto a controvérsia da ação destas células quanto à prevenção ou promoção da pega<sup>14</sup>.



Com os dados analisados neste trabalho, não conseguimos estabelecer associação significativa entre aGVHD e células NK, NKT bem como com  $\Delta$ NK e  $\Delta$ NKT. Contudo, em relação ao diagnóstico de cGVHD parece haver associação deste diagnóstico com aumento quantitativo de células NK e células NKT no período peri-pega.

As correlações entre todas as variáveis envolvendo células NK, aGVHD, cGVHD com a dose de CD34 infundida não foram significativas. As associações significativas encontradas aparentemente estão relacionadas com subtipos celulares estudados propriamente ditos e não à dose de células-tronco hematopoéticas recebida com o enxerto.

No nosso estudo apenas quantificamos as células NK e as células NKT, sem caracterizar células imunoregulatórias e citotóxicas na população NK e subtipos de NKT, mas com o achado de associação significativa entre progressão quantitativa de células NK e NKT no período da pega e desenvolvimento de GVHD crônico, torna-se importante diferenciarmos os tipos de NK e NKT quanto ao seu perfil quantitativo e qualitativo e se há diferença na dinâmica de recuperação NK e NKT que justifique ação destas populações celulares no conjunto de fatores que levam ao desenvolvimento do GVHD crônico, já que existe razoável base teórica a favor desta hipótese, mas nenhum estudo publicado questionando esta possibilidade.

A partir do nosso achado, é racional a realização de uma avaliação quantitativa, qualitativa e funcional das células NK e NKT pré-transplante no receptor e doador e no receptor na pega, trinta dias, três meses, seis meses e um ano pós-transplante e também avaliação prospectiva da associação destes dados com o diagnóstico de GVHD agudo e/ou crônico, em um grupo maior de pacientes submetidos a transplante alogênico aparentado.

Nós verificamos progressão quantitativa de NK e NKT no período próximo à pega, mas o que acontece com essas populações celulares deste

momento até o diagnóstico de GVHD crônico nos pacientes que desenvolvem esta doença? Aparentemente, se o nosso achado for confirmado em grupos com um maior número de pacientes, o estudo da dinâmica das populações de células NK e NKT do momento da pega até um ano pós-transplante nos permitirá, talvez, uma melhor compreensão da própria fisiopatogenia do GVHD crônico.

## REFERENCIAS

- 1- Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of Human Natural Killer Cells *Blood*, 1190; 176 (12): 2421-38.
- 2- Farag SS, Caligiuri MA. Human Natural killer cell development and biology *Blood Reviews* 2006; 20: 123-37.
- 3- Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*, 2002; 100(6):1935-47.
- 4- Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56<sup>bright</sup> subset. *Blood*, 2001; 97 (10):3146-51.
- 5- Middleton D, Curran M, Maxwell L. Natural Killer cells and their receptors *Transplant Immunology*. 2002;10:147-64.
- 6- Kärre K. How to recognize a foreign submarine? *Immunological Reviews – NK cells, MHC class I antigens and missing self*, 1997;155:5-9.
- 7- Parham P, McQueen KL. Alloreactive Killer Cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nature Reviews – Immunology*. 2003;3:108-122.
- 8- Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, Parham P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 2003;101(9):3730-40.
- 9- Passweg JR, Stern M, Koehl U, Uharek L, Tichelli A. Use of Natural Killer cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation Bone Marrow Transplantation 2005;35:637-3.
- 10- Manilay JO, Sykes M. Natural killer cells and their role in graft rejection. *Current Opinion in Immunology*, 1998;10(5):532-8.

11- Klingemann HG, Relevance and Potential of Natural Killer Cells in Stem Cell Transplantation. *Blood and Marrow Transplantation*, 2000;6(2)90-9.

12- Martin, PJ. Overview of Hematopoietic Cell Transplantation Immunology. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation 3<sup>th</sup> ed.*, printed in USA: Blackwell Publishing, 2004;16-30.

13- Bornhauser M, Thiede C, Brendel C, et al. Stable engraftment after mega dose blood stem cell transplantation across the HLA barrier. *Transplantation*, 1999. 68:87-88.

14- Lanier LL. The role of natural killer cells in transplantation. *Current Opinion in Immunology*, 1995;7:626-31.

15- Martelli MF, Aversa F, Lustig EB, Velardi A, Zelicher SR, Tabilio A et al. Transplants Across Human Leukocyte Antigen Barriers. *Seminars in Hematology*. 2002; 39(1);48:56.

16- Murphy EJ, Reynolds CW, Tiberghien P, Longo DL. Natural Killer Cells and Bone Marrow Transplantation. *Journal of the National Cancer Institute*, 1993;85(18):1475-82.

17- Bluman EM, Bartynski KJ, Avalos BR, and Caligiuri MA. Human Natural Killer Cells Produce Abundant Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  in Response to Monocyte-derived Cytokines *The Journal of Clinical Investigation*, 1996;97 (12): 2722-27.

18- Mandelboim O, Kent, S, David DM, Wilson SB, Okasaki T, Jackson R, et al Natural Killer activating receptors trigger interferon  $\gamma$  secretion from T cells and natural killer cells *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 1998; 95(7):3798-803.

19- Ferrara JLM, Cooke KR, H. Teshima T, Chapter 1: The Pathophysiology of Graft-vs.-Host Disease. In Ferrara, JLM, Cooke, KR, Deeg J. *Graft-Vs.-Host Disease 3<sup>th</sup> ed*: New York: Ed. Marcel Dekker: 2005;1-34.

20- Auletta JJ, Lazarus HM. Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. *Bon Marrow Transplantation*, 2005; 35:835-57.

21- Scholl S, Mügge LO, Issa MC, Kasper C, Pachmann K, Höffken K, Sayer HG. Impact of early NK cell recovery on development of GvHD and CMV reactivation in dose-reduced regimen prior to allogeneic PBSCT. *Bone Marrow Transplantation*, 2005; 35:183-90.

22- Fujimaki K, Maruta A, Yoshida M, Kodama F, Matsuzaki M, Fujisawa S, Kanamori H. Immune reconstitution assessed during five years after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 2001;27:1275-81.

23- Barret J, Rezvani K, Solomon S. New Developments in allotransplant immunology. The Alloimmune response. *American Society of Hematology. Education Program Book*, 2003;351-57.

24- Talmadge JE, Reed E, Ino K, Kessinger A, Kuszynski C, Heimann D et al. Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow. *Bone Marrow Transplantation* 1997;19:161-72.

25- Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P et al. Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:825-28.

26- Schulmann H, Sullivan KM, Weiden PL et al. Chronic Graft-Versus-Host-Disease in man: A clinic pathologic study of 20 long term Seattle patients. *Am J Med* 1980; 69: 204-17 ref GVHD crônico.

27- Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socié G, Wingard JR, Lee S, et al. National Institute of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-host-disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2005; 11:945-55.

28- SJ Lee. New approaches for preventing and treating chronic graft-versus-host-disease. *Blood*, 1 June 2005; 105 (11): 4200-06.

29- Niemeyer CM, Sieff CA, Smith BR, Ault KA, Nathan DG. Hematopoiesis In Vitro Coexists With Natural Killer Lymphocytes *Blood*, 1989; 74(7):2376-82.

30- Aguila HL, Weissman IL. Hematopoietic Stem Cells Are Not Direct Cytotoxic Targets of Natural Killer Cells. *Blood*, 1996; 87 (4):1225-31.

- 31- Silla LMR, Whiteside TL, Ball ED. The Role of Natural Killer Cells in the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia *Journal of Hematotherapy* 1995;4:269-79.
- 32- Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors *Blood*, 2003;102 (3):814-9.
- 33- Hsu HC, Keever-Taylor CA, Wilton A, Pinto C, G Heller, K Arkun, RJ O'Reilly, M Horowitz, B Dupont. Improved outcome in HLA- identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood*, 15 June 2005;105(12):4878-84.
- 34- Cook M, Milligan DW, Fegan CD, Darbyshire PG, Mahendra P, Craddock CF et al. The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. *Blood*, 15 February 2004; 103(4):1521-26.
- 35- Scultz KR, Miklos DB, Fowlwr D, Cooke K, Shizuru J, Zorn E, et al. Toward Biomarkers for Chronic Graft-versus-Host-Disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host-Disease: III. Biomarker Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2006; 12:126-37.
- 36- Horwitz ME, Sullivan KM. Chronic graft versus host disease. *Blood Reviews* 2006; 20:15-27.
- 37- Iwasaki T, Recent Advances in the Treatment of Graft-Versus-Host Disease *Clinical Medicine & Research*. 2004; 2(4):243-52.
- 38- Crooks GM, Weinberg K, Mackall C. Immune reconstitution: From stem cells to lymphocytes. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2006; 12: 42-6.
- 39- Evert Jan Wils, Jan J. Cornelissen Thymopoiesis following allogeneic stem cell transplantation: new possibilities for improvement *Blood Reviews* (2005) 19, 89-98.
- 40- Kos FJ, Engleman EG. Immune Regulation: a critical link between NK cells and CTLs *Immunology Today*, 1996; 17(4):174-6.

- 41- Romagnani S, Induction of Th1 and Th2 responses. A key role for the “natural” immune response? *Immunology Today*, 1992; 3, (10)379-81.
- 42- Horwitz DA, Gray GD, Ohtsuka K, Hirokawa M, Takahashi T. The immunoregulatory effects of NK cells: the role of TGF- $\beta$  and implications for autoimmunity *Immunology Today*, 1997; 18(11):538-42.
- 43- Baxter AG, Smyth MJ. The Role of NK Cells in Autoimmune Disease *Autoimmunity*, 2002; 35(1) 1-14.
- 44- Nash RA. Hematopoietic Stem Cell Transplantation In Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B. *Wintrobe’s Clinical Hematology* 11 ed. Printed in USA: ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2004;1:883-909.
- 45- Baker J, Verneris MR, Ito M, Shizuru JA, Negrin RS. Expansion of cytolytic CD8+ natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon  $\gamma$  production *Blood*, 2001;97(10):2923-31.
- 46- Biron CA, BrossayL. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections *Current Opinion in Immunology*. 2001;13:458-64.
- 47- Godfrey DI, Hammond KJL, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies *Review Immunology Today*, 2000; 21(11):573-83.
- 48- Hiray et al. Recovery of Valpha24+ NKT cells after hematopoietic stem cell transplantation Hiray et al *Bone Marrow Transplantation*. 2004; 34(7):595-602.
- 49- Kronenberg M, Gapin L. The Unconventional Lifestyle of NKT Cells *Nature Reviews – Immunology*. 2002;2:557-68.
- 50- Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagómez D, Singh AK, Stanic AK, Wang CR et al. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion *PNAS*, 2003;100(19)10913-8.
- 51-Fujiis. Application of natural killer T-cells to posttransplantation immunotherapy *Int J Hematol*, 2005; 81(1):1-5.

52- Chibas et al. Host-residual invariant NK T cells attenuate graft-versus-host immunity. *J Immunol*, 2005;175(2):1320-28.

53- Teshimat et al. Simulation of host NKT cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducing Th2 polarization of donor T cells. *J Immunol*, 2005;174(1):551-56.

54- McMahon CW, Raulet DH. Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells *Current Opinion in Immunology*. 2001; 3:465-470.

55- Talmadge JE, Reed E, Ino K, Kessinger A, Kuszynski C, Heimann D, M et al. Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow *Bone Marrow Transplantation*,1997;19:161-72.



**Tabela 1 – Características dos pacientes**

Paciente	Idade no TMO	Sexo	Tipo de transplante	Diagnóstico	Regime de Condicionamento	Nº de CD34x10 <sup>6</sup> /quilo infundidas	Pega D+	Fonte de HSC
1	47	M	ALO	LNH	BUCY+TBI	5	12	PBSC
2	46	F	AUTO	MM	MEL 200	2,5	15	PBSC
3	65	M	AUTO	MM	MEL 200	2,93	12	PBSC
4	66	F	AUTO	MM	MEL 200	2,5	12	PBSC
5	38	F	AUTO	LNH	BEAM	2,82	12	PBSC
6	53	F	AUTO	MM	MEL 200	12,8	15	PBSC
7	68	M	AUTO	MM	MEL 200	3,27	14	PBSC
8	36	M	ALO	LLA-T	CY+TBI	11,16	16	BM+PBSC
9	41	M	AUTO	LMA	BUCY	2,36	15	PBSC
10	46	M	AUTO	MM	MEL 200	6,8	11	PBSC
11	45	M	ALO	LLA-Ph <sup>+</sup>	MEL+ARAC+TBI	9,1	16	BM
12	35	M	AUTO	LNH	BEAM	14	15	PBSC
13	34	M	ALO	LMC	BUCY	5,7	22	BM
14	44	M	ALO	LNH	MEL+FLUDARA	18,1	16	PBSC
15	33	M	ALO	LMC	BUCY	3,53	22	BM
16	22	F	AUTO	LLA-T	MEL+ARAC+TBI	6,15	10	PBSC
17	36	F	ALO	LMC	BUCY	5,27	17	BM
18	36	M	ALO	LLA	CY+TBI	7,35	21	BM
19	46	F	ALO	LMC	BUCY	4,32	17	BM
20	35	F	ALO	LMA	BUCY	4,42	20	BM
21	47	M	ALO	LMC	BUCY	7,5	17	BM

ALO: alogênico; AUTO: autólogo; LNH: linfoma não-Hodgkin; MM: Mieloma Múltiplo; LLA-T: leucemia linfocítica aguda T; LMA: leucemia mielóide aguda; LLA-Ph<sup>+</sup>: leucemia linfocítica aguda Philadelphia positivo; LMC: leucemia mielóide crônica; LLA: leucemia linfocítica aguda; BUCY: Bussulfan e ciclofosfamida; TBI: irradiação corporal total; MEL: melfalan; BEAM: BCNU, etoposide, ara-c e melfalan; CY: ciclofosfamida; ARA-C: citarabina; FLUDARA: fludarabina; HSC: células tronco hematopoéticas; BM: medula óssea; PBSC: células progenitoras periféricas.

**Tabela 2 – Características dos pacientes**

Paciente	Tipo de transplante	aGVHD (I-IV)	cGVHD	Data diagnóstico cGVHD D+	Situação na análise em dezembro de 2005	Motivo do óbito
1	ALO	II	N	-	ÓBITO	Sepse
2	AUTO	N	N	-	VIVO	-
3	AUTO	N	N	-	N.S.	-
4	AUTO	N	N	-	N.S.	-
5	AUTO	N	N	-	VIVO	-
6	AUTO	N	N	-	VIVO	-
7	AUTO	N	N	-	N.S.	-
8	ALO	II	N	-	ÓBITO	recaída
9	AUTO	N	N		N.S.	-
10	AUTO	N	N		N.S.	-
11	ALO	N	LIMITADO	232	ÓBITO	recaída
12	AUTO	N	N	-	ÓBITO	recaída
13	ALO	N	LIMITADO	207	VIVO	-
14	ALO	I	N	-	VIVO	-
15	ALO	N	LIMITADO	116	VIVO	-
16	AUTO	N	N	-	VIVO	-
17	ALO	N	LIMITADO	180	VIVO	-
18	ALO	N	LIMITADO	294	VIVO	-
19	ALO	IV	-	-	ÓBITO	GVHD IV
20	ALO	N	LIMITADO	212	VIVO	-
21	ALO	II	EXTENSO	199	VIVO	-

ALO: alogênico; AUTO: autólogo; aGVHD: doença-do-enxerto-contra-o-hospedeiro aguda; cGVHD: doença-do-enxerto-contra-o-hospedeiro crônica; N:não; (I-IV):doença-do-enxerto-contra-o-hospedeiro aguda grau I a IV; N.S.: não sabido.

\*apesar de diagnóstico anterior a D+100 foi considerado GVHD crônico pela apresentação clínica e necessidade de tratamento imunoterápico por período longo.

**Tabela 3 – Tabela de medianas e intervalos interquartílicos (percentil 25;75)**

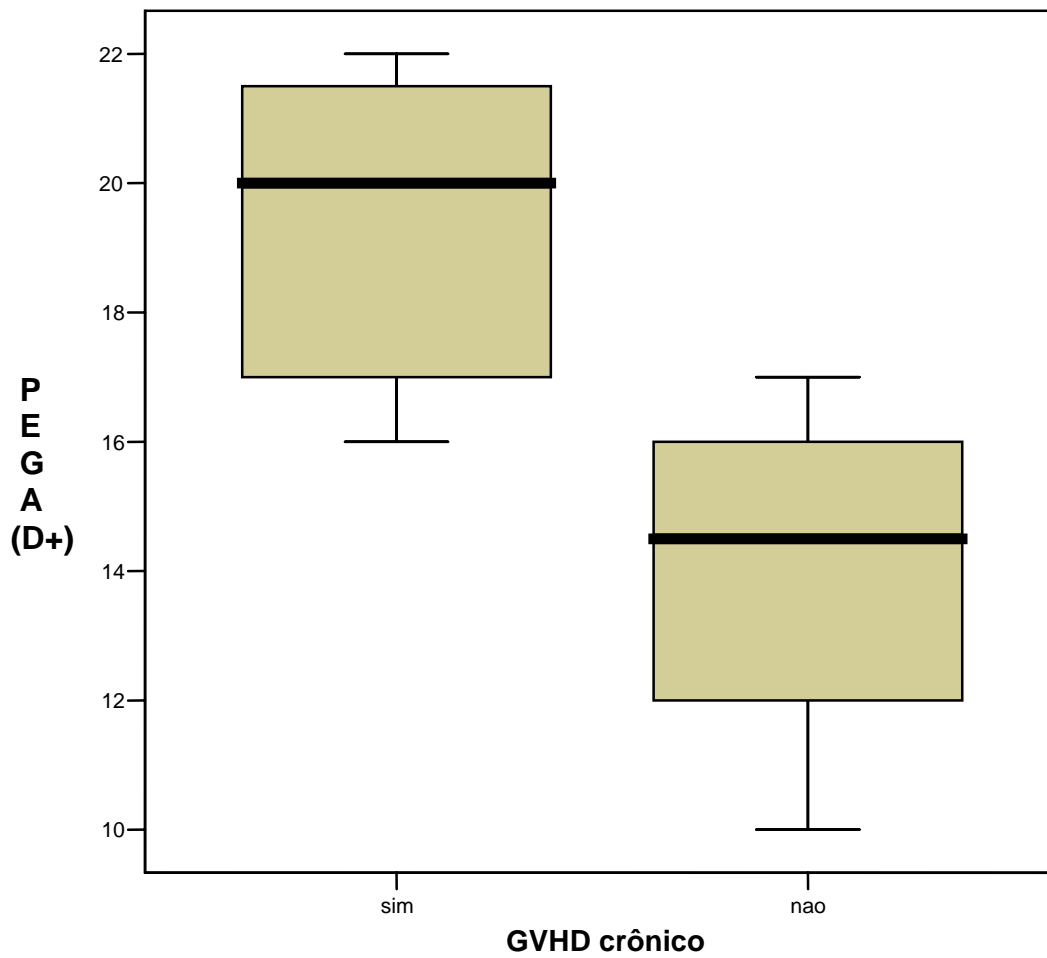
	<b>Total</b>		<b>Autólogo</b>		<b>Alogênico</b>	
<b>Pega (D+)</b>	16(12;17)		13(11,75;15)		17(16;21)	
<b>CD34 x10<sup>6</sup>/quilo</b>	5,2(3,10;8,25)		3,1(2,5;7,8)		5,7(4,42;9,01)	
<b>NK(CD56<sup>+</sup>)</b>	9,4(4,9;17,6)		6,1(3,3;14,8)		10,38(6,35;23,13)	
<b>ΔNK</b>	5,3(-1,25;7,9)		-0,1(-0,84;5)		2,98(-2,49;16,93)	
<b>ΔNK<sup>T</sup></b>	0,005(-0,55;-1,51)		-0,34(-0,89; 2,66)		0,17(0,00-1,47)	
	<b>Coleta 1</b>	<b>Coleta 2</b>	<b>Coleta 1</b>	<b>Coleta 2</b>	<b>Coleta 1</b>	<b>Coleta 2</b>
<b>Data da coleta(D+)</b>	15(14;17)	23(18,5;24,5)	14(13,5;15,25)	21(16,75;24,25)	16(15;18)	23(22;25)
<b>Leucócitos x10<sup>3</sup>/μl</b>	1,06 (0,74;2,29)	3,10 (1,30;4,99)	2,29 (1,54;3,30)	3,12 (0,97;6,15)	0,74 (0,57;1,06)	2,88 (1,3;3,4)
<b>NK(CD56<sup>+</sup>)</b>	6,2 (3,7;15,6)	7,6 (4,7;24,17)	6,2 (1,6;16,1)	5,6 (3,4;12,31)	6,2 (4,6;15,8)	9,1 (6,35;23,13)
<b>NK<sup>T</sup>(CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>)</b>	1,51 (0,10;2,78)	1,6 (0,27;3,44)	2,68 (0,6;5,2)	2,2 (0,0;3,8)	0,62 (0,0;2,11)	1,6 (0,36;2,74)

D+: dias pós transplante; NK: Natural Killer; NK<sup>T</sup>: Natural Killer<sup>T</sup>; ΔNK: (NK da Coleta 2 – NK da Coleta 1); ΔNK<sup>T</sup>: (NK<sup>T</sup> da Coleta 2 – NK<sup>T</sup> da Coleta 1).

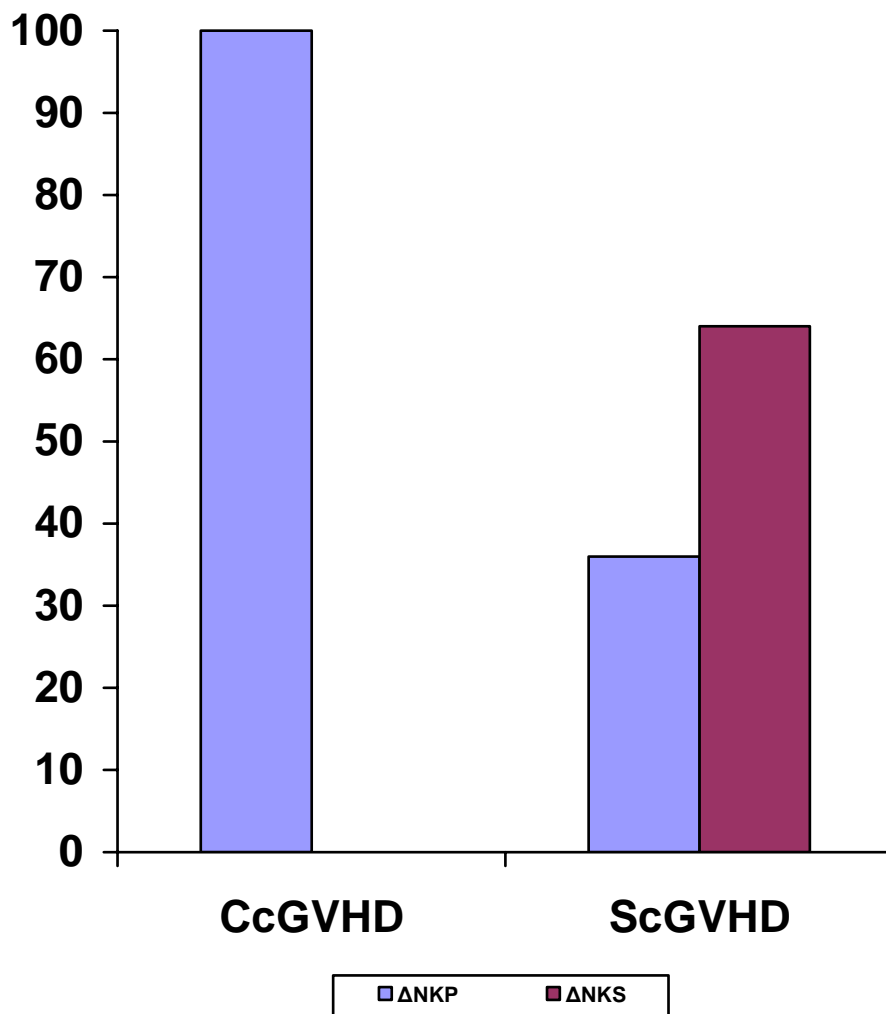
**Tabela 4 – Comparações de valores entre pacientes sem cGVHD e com cGVHD (valores de *p* pelo teste de Mann-Whitney)**

	Sem cGVHD	cGVHD	p
<b>Pega(D+)</b>	14,5(12;16)	<b>20(17;22)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Dose de CD34(x10<sup>6</sup>/quilo)</b>	4,6(2,74;11,5)	5,7(4,4;7,5)	0,488
<b>NK Coleta 1</b>	9,01(3,1;16,28)	5,6(4,6;14,6)	0,856
<b>NK Coleta 2</b>	6,9(3,4;12,3)	20,57(7,07;32,27)	0,056
<b>ΔNK</b>	-0,52(-3,13;2,98)	<b>15,94(2,96; 26,67)</b>	<b>0,006</b>
<b>NKT Coleta 1</b>	2,34(0,0;3,29)	0,62(0,21; 1,51)	0,360
<b>NKT Coleta 2</b>	1,11(0,0;3,31)	1,68(0,98;4,5)	0,375
<b>ΔNKT</b>	0,0(-0,89;0,17)	1,46(0,01;1,66)	0,085

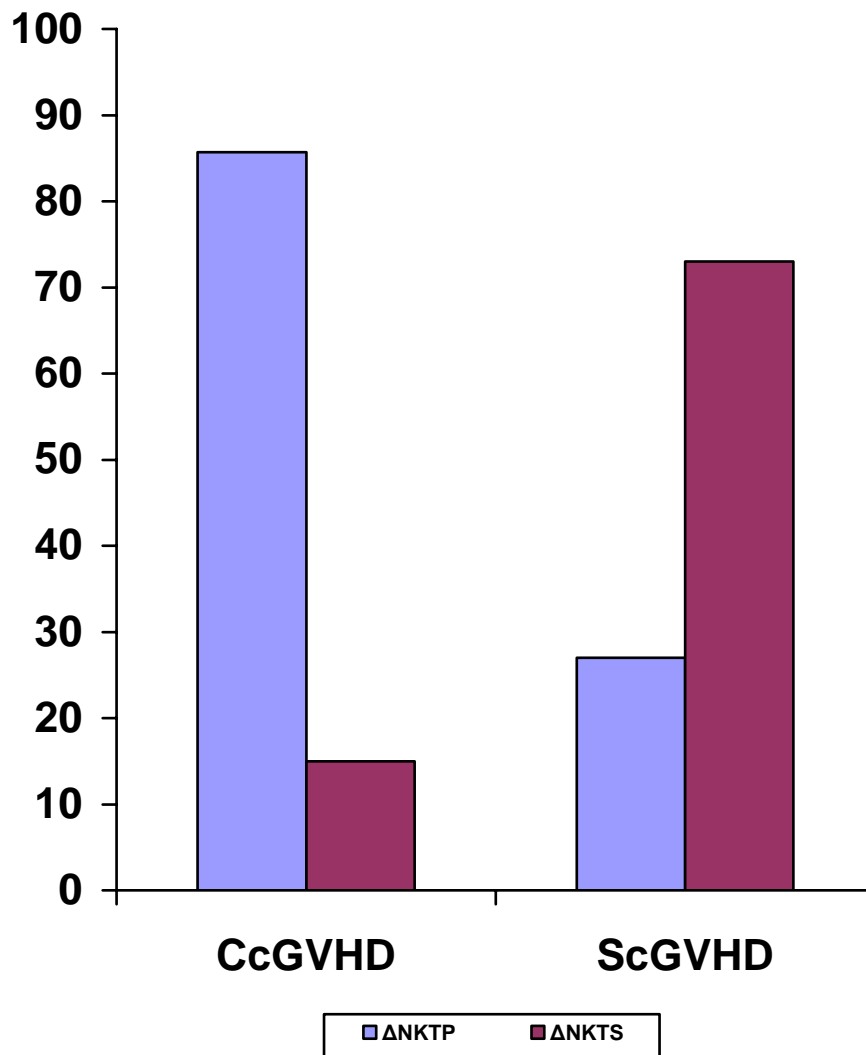
**cGVHD:** GVHD crônico; **NK Coleta 1:** Quantificação de células NK na coleta 1; **NK Coleta 2:** Quantificação de células NK na coleta 2; **ΔNK=** NK Coleta 2 - NK Coleta 1; **NKT Coleta1:** Quantificação de células NKT na coleta 1; **NKT Coleta 2:** Quantificação de células NKT na coleta 2; **ΔNKT:** NKT Coleta 2 - NKT Coleta 1.



**GRAFICO 1. Comparação entre pacientes com e sem cGVHD em relação à pega.** Pacientes com GVHD crônico tiveram mediana de pega no dia 20 pós-transplante, enquanto pacientes que não desenvolveram GVHD crônico tiveram mediana de pega de 14,3 dias pós-transplante. Há associação significativa entre pega mais tardia e cGVHD ( $p < 0,001$ ).



**GRÁFICO 2. Comparação entre pacientes com cGVHD e sem cGVHD em relação ao ΔNK.** ΔNK= NK da coleta 2 - NK da coleta 1 ; ΔNKS = ausência de progressão quantitativa entre as duas coletas (ΔNK com valores negativos a zero); ΔNKP = progressão quantitativa entre as duas coletas (ΔNK com valores positivos). Nos pacientes com cGVHD todos tiveram progressão quantitativa entre primeira e segunda coleta(7 pacientes=100%), nos pacientes sem cGVHD somente 4 pacientes tiveram progressão quantitativa entre primeira e segunda coleta(36%). Pacientes com cGVHD tem maior ΔNKP( $p=0,013$ ).



**GRÁFICO 3. Comparação entre pacientes com cGVHD e sem cGVHD em relação ao ΔNKT.**

ΔNKT = NKT da coleta 2 - NKT da coleta 1; **ΔNKTS** = ausência de progressão quantitativa entre as duas coletas (ΔNKT com valores negativos a zero); **ΔNKTP** = progressão quantitativa entre as duas coletas (ΔNKT com valores positivos). Nos pacientes com cGVHD 6 pacientes (85,7%) tiveram progressão quantitativa entre primeira e segunda coleta. Nos pacientes sem cGVHD somente 3 (27%) tiveram progressão quantitativa entre primeira e segunda coleta. Pacientes com cGVHD tem maior ΔNKTP ( $p=0,050$ ).

## **IMPACT OF EARLY RECOVERY OF NK CELLS ON RELATED DONOR ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANT AND ITS EFFECT ON ENGRAFTMENT AND GVHD DEVELOPMENT**

CC Astigarraga<sup>1</sup>; AA Paz<sup>1</sup>, GAM Faulhaber<sup>2</sup>, L Sekine<sup>2</sup>, L Milost<sup>3</sup>, D Neto<sup>1</sup>, RL Canabarro<sup>4</sup>, H Sporleder<sup>4</sup>, R Bittencourt<sup>1</sup>, J Neumann<sup>4</sup>, LMR Silla<sup>1</sup>.

1. Division of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Hospital de Clínicas

2. Division of Internal Medicine, Hospital de Clínicas .

3. Laboratory for Cell Hematology Research, Hospital de Clínicas.

4. Laboratory of Transplant Immunology, Santa Casa de Misericórdia.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

### **Correspondence:**

Claudia Caceres Astigarraga. Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do HCPA, Rua Ramiro Barcellos 2350/2<sup>o</sup> andar.

Porto Alegre-RS 90035003 Brasil.

E-mail: [ccaka@terra.com.br](mailto:ccaka@terra.com.br)

### **Acknowledgement:**

Hemoamigos for investing in human resources and in research on bone marrow transplantation in a developing country.

### **Abstract**

The immune NK reconstitution in the MHC-mismatch transplant is associated with a powerful graft-versus-leukemia (GVL) effect; however, there is not a



definite role for NK cells in the identical related MHC transplant. 21 nonconsecutive patients were analyzed that were subjected to hematopoietic stem cell transplantation (10 autologous and 11 related donor allogeneic). In the post-transplantation period, from the moment the patient achieved  $0.45 \times 10^3/\mu\text{l}$  leukocytes, two blood sample collections were performed – with a seven-day interval – in order to assess the initial immune reconstitution in the engraftment period. In each collection, the populations of NK and NKT cells were counted and the variability of these populations was verified between collections, as well as their correlations with engraftment and diagnosis of acute GVHD and chronic GVHD. In the total group of patients, the correlation between NK cells with positive variation in the collection and engraftment was significant ( $r=0.48$ ;  $p<0.05$ ); it did not remain significant in the assessment of the autologous group ( $r=0.27$ ;  $p=0.55$ ), but it was shown to be more important in the allogeneic group ( $r=0.51$ ;  $p=0.11$ ). There was no significant association of NK and NKT populations and acute GVHD. The association between NK cells, with positive variation during the engraftment and diagnosis of chronic GVHD, was significant ( $p<0.05$ ); the same occurred to the correlation between the positive variation of NKT cells and chronic GVHD ( $p<0.05$ ). Based on our results, we concluded that a quantitative increase in the population of NK and NKT cells – in the engraftment period – may be related to the development of chronic GVHD.

**Keywords:** natural killer cells; immune reconstitution; acute GVHD; chronic GVHD; engraftment.

## Introduction

NK cells are lymphocytes of the innate immune system that are key in the defense against infectious pathogens and malign alterations, through the development of cytokines and cytolytic activity (1).

The human NK cells correspond to 10-15% of total lymphocytes and are identified by the expression of the surface antigen CD56 and absence of CD3. Functionally, NK cells are an important source for immunoregulatory cytokines (interferon gamma [INF- $\gamma$ ]; tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ); and granulocyte macrophage colony stimulating factor [GM-CSF]). They interact with other cells of the immune system to provide an adaptive immune response or antigen-specific response; additionally, the NK cells are able to destroy target cells directly as well as to mediate the antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) (2, 3).

The NK cells were originally described for their ability to destroy tumors and virus-infected cells without previous stimulation.

We identified two populations of NK cells according to the intensity of CD56 expression. The CD56 cells that intensively express CD56(CD56<sup>bright</sup>) correspond to 10% of this population and are called immunoregulatory NK, exhibiting high cytokine production, *in vitro* and *in vivo* expansion with low doses of interleukine-2 (IL-2) and low cytotoxic activity, and are less effective mediators for ADCC and natural cytotoxicity. The NK population with high cytotoxic ability is characterized by a low CD56 (CD56<sup>dim</sup>) expression; it corresponds to 90% of the NK population, and has an unsubstantial production of cytokines and small proliferation in response to high IL-2 concentrations. After *in vitro* and *in vivo* treatment with IL-2, the two subpopulations demonstrated similar levels of cytotoxicity (4). We do not know if these two populations are different cell subtypes that share a common precursor, or if they are different stages of NK maturation with different adaptive functions.

Recently, the heterogeneity of adult NK cells have been recognized, but the *in vivo* meaning of these populations, as well as their interactions, remains undefined (2). Glycoproteins class I of the major histocompatibility complex (MHC) are important in controlling the effector functions of cytotoxic T cells and of NK cells. However, unlike the T lymphocytes, which recognize the antigen as a peptide fragment bound to the MHC, the NK cells remain functional in the absence of MHC class I proteins in the target cells. The immunity of T and NK cells are complementary arms of the immune-cell response, that is, the T cells recognize and are activated by targets that express peptide-MHC complexes; on the contrary, the NK cells destroy targets that lost the MHC class I expression. Once the NK cell has contacted its MHC class I ligand, activating – or inhibiting – signals are generated, depending on its receptor, which leads to lysis or inhibition of target cell lysis (5).

These activation and inhibition systems constitute the basis for the missing-self (6, 7) hypothesis that postulates the function of NK cells, which recognize and destroy autologous cells that have lost or changed its MHC class I molecules. Although tolerant with normal autologous cells, the NK cells can recognize – and attack – cells infected by virus and transformed cells (tumor cells) that reduced its MHC class I expression (3).

The surface receptors that inhibit and/or activate the NK cells to destroy target cells are killer immunoglobulin-like receptors (KIRs), lectins and natural cytotoxic receptors (NCRs). The inhibiting signals from the NK cells are mediated by KIRs and heterodimeric C-lectin-like receptors CD94: NKG2A, which interact with the MHC class I molecules in the target cells. The absence of binding results in the destruction of the target cell (8).

The alloreactivity of NK cells could be widely defined as any effect of NK cells against cells, based on some sort of allrecognition (9). According to the MHC class I typing of the donor and recipient, one can expect a NK cell alloreactivity; absence of inhibition in the donor's NK cells – and resulting cell

destruction – when the respective KIRs are not expressed in the cells of the recipient. The chromosomal regions that code KIR and HLA are independent; studies have been carried out about the effect of the donor-recipient KIR pattern on the result of the transplant based on the presence or absence of a ligand.

A mismatch related haploidentical transplant of stem cells is the therapeutic choice for patients who do not have an identical related donor or a compatible non-related donor. Most patients will have a haploidentical donor (sibling, parent or other relative) who shares one of the two MHC haplotypes.

Studies in humans have demonstrated a positive effect from MHC/KIR disparity in relation to the haploidentical transplant of stem cells. The NK cells were implied in graft rejection in murines (hybrid resistance phenomenon) (7), but the relevance of this phenomenon in humans is controversial (10, 11, 12). On the other hand, some studies underscore the idea that the NK cells may promote engraftment in murines(13, 14).

In haploidentical transplants with MHC/KIR disparity in murines, it was suggested that the NK cells – in addition to facilitating engraftment – prevented an acute GVHD (10, 15).

In 1993, Murphy (16) proposed that the NK cells may have bidirectional effects on hematopoiesis, that is, the NK cells may be beneficial or noxious for bone marrow transplant, depending on their genotype and activation status. This proposition is supported by the current knowledge about the mechanism of activation and inhibition of NK cells and their effector responses.

The NK cells can, at best, contribute to, but not cause acute GVHD. There is a theoretical possibility that the NK cells both promote and protect from acute GVHD via regulation of the production of cytokines such as INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (15, 17, 18, 19).

Generally, after the transplantation of hematopoietic stem cells, the count of NK cells resumes normal levels within one to two months, regardless of the transplant type, stem cell source, donor age, and GVHD. The NK cell type prevailing in the initial recovery post-transplantation is the NK cell with an immunoregulatory profile (2, 20, 21, 22).

The concomitant reconstitution of NK cellularity – and its cytotoxic activity – was demonstrated in a haploidentical transplant. A lytic activity of the NK cells was also detected one month after the transplantation of umbilical cord cells; however, the lysis ability of the NK cells is attenuated in patients following the autologous and allogeneic (20) transplantation of peripheral progenitor cells. The NK immune reconstitution in the MHC-mismatch transplant is associated with a powerful graft-versus-leukemia effect (GVL), but there is no definite role for NK cells in the MHC-identical related donor transplant (23).

The goal of this study was to verify the early quantitative recovery of NK cells in related donor allogeneic and autologous transplants in the peri-engraftment period and their relation – or lack thereof – with engraftment. Another goal was to verify whether there is a relationship between the early quantitative recovery of NK cells and the development of acute and/or chronic GVHD in related allogeneic transplants.

## **Patients and Methods**

**Patients:** From November 2001 through October 2004, 21 non-consecutive patients were evaluated that were subjected to related donor allogeneic or autologous transplantation of hematopoietic stem cells at the Center for Bone Marrow Transplant at the Division of Hematology and Bone Marrow Transplant, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

The characteristics of the patients are described in tables 1 and 2. All of them signed an informed consent term to participate in the study. All patients subjected to allogeneic transplantation were match 6/6 and received a graft donated by siblings. All in the allogeneic group received preventive treatment for GVHD with cyclosporine and methotrexate. The post-autologous transplant patients that in the reassessment of medical records in December 2005 were not known to be living or deceased were referred to other services for transplantation and returned to the original services for follow-up.

**Blood samples:** Following the transplantation, when the patient reached  $0.45 \times 10^3/\mu\text{l}$  leukocytes, two 20-mL collections of blood were done via central catheter, with a seven-day interval. The value for the beginning of the collection of  $0.45 \times 10^3/\mu\text{l}$  leukocytes was set for two reasons: one is related to the minimal amount of leukocytes in which we can separate mononuclear cells appropriately; the other is related to the greater chance for assessing engraftment by performing two collections after this count.

**Separation of mononuclear cells:** Shortly after the collections, blood samples were centrifuged using Ficoll-Hypaque, enabling the separation of mononuclear cells. The resulting fraction was washed with Hank solution and resuspended at a concentration of  $1.5 \times 10^6/\text{ml}$  in IMD medium (Iscoves Modified Dulbeccos Medium), enriched with fetal bovine serum (24).

**Determination of cell subtypes:** The total leukocyte count was determined by an automatic counter (Culter Counter, USA); the differential count was done by microscopic examination. The separated mononuclear cells were subjected to immunophenotyping via two-color flow cytometry with diverse antibodies (BD) against surface antigens, according to a previously described technique (55) in FACScan flow cytometer. The antibody pairs used were: CD56/CD57 and CD56/CD33 for NK cells; CD56/CD3 for NKT cells; CD34/CD7 for stem cells, and CD45/CD14 for monocytes. Murine IgG1/IgG2 was used for the subtraction of nonspecific fluorescence.

To calculate the absolute numbers of cell subsets, the percentage of positively marked cells was multiplied by the number of absolute lymphomononuclear cells in the peripheral blood, after the subtraction of cells marked for CD14<sup>+</sup>.

**NK cells:** All CD56<sup>+</sup> cells were considered NK cells. The populations of NK cells were averaged taking into account positive markings for CD56 in the pairs CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>/CD57<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>/CD33<sup>-</sup> and positive marking for CD56 in the pairs with double-positive marking for CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>/CD57<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>.

**ΔNK, ΔNKs, ΔNKP:** The variable ΔNK was created, meaning the quantitative variation of NK cells between the two collections (ΔNK = NK from sample 2 – NK from sample 1). Negative values to zero were considered as absence of quantitative progression between the two collections (ΔNKs), positive values were considered as a quantitative progression between the two collections (ΔNKP).

**NKT cells:** The population with marking for CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> was considered NKT cells.

**ΔNKT, ΔNKTS, ΔNKTP:** The variable ΔNKT was created which means the quantitative variation of NKT cells between the two collections (ΔNKT = NKT from sample 2 – NKT from sample 1). Negative values to zero were considered as absence of quantitative progression between the two collections (ΔNKTS); positive values were considered the quantitative progression between the two collections (ΔNKTP).

**Determination of engraftment:** The engraftment was defined, as usual, as a post-transplantation count of granulocytes > or = 0.5 x 10<sup>3</sup>/μl during three days in a row.

**Determination of acute and chronic GVHD:** In November 2005, the records of the 21 patients under study were evaluated and data were obtained about the diagnosis of acute and chronic GVHD. The diagnoses were mostly clinical. For acute GVHD, criteria from the consensus conference on acute GVHD grading (25) were used; for chronic GVHD, the terms limited or extensive (26) were used, as, at the time of this study analysis, the NIH's suggestion for a new classification for chronic GVHD (27) had not been put forward yet.

**Statistical analysis:** All data were analyzed using the SPSS software for Windows version 12.0 (SPSS, Chicago, IL). The values are described as a median and interquartile interval (percentiles 25-75). The chi-square test and Fischer's exact test were employed to determine the relations between nominal variables. The Mann-Whitney test was used for comparison of continuous variables, Spearman's correlation coefficient ( $r$ ) was used to check the association between variables. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

### **Results:**

21 patients were studied. Of these, 10 were subjected to autologous transplantation and 11 to allogeneic transplantation. In the group of patients with allogeneic transplant, two samples were collected from each patient; in the group of patients with autologous transplant, two samples were collected from 8 patients; and for two patients, one sample was collected from each. (See tables 1 and 2)

The median for total leukocytes and for days post-transplantation in the collections in the total group, in the autologous group and in the allogeneic group are described in table 3.

In the reevaluation of medical records, in November 2005, death rates were obtained (the causes of death are in table 2). In the group of 21 patients, five died. In the allogeneic group, four patients passed away; two by transplant-



related death, and another two due to relapse. In the group of 10 patients with autologous transplants, five patients were followed; of these, one died due to the relapse of the disease. No transplant-related death occurred.

**NK cells:** The median for CD56<sup>+</sup> cells from each group in the two collections is described in table 3. There was no statistically significant difference in the number of NK cells in comparing the two groups, both in the first and second collection (first collection  $p=0.512$  and second collection  $p=0.126$ ).

**$\Delta$  NK cells:** In the total group, the median for  $\Delta$ NK was 5.3 (-1.25; 7.9); in the autologous group, the median for  $\Delta$ NK was -0.1 (-0.84; 5.0), and in the allogeneic group, it was 2.98 (-2.49; 16.93). The difference between the two groups was not significant ( $p=0.425$ ) (table 3).

**NKT and  $\Delta$ NKT cells:** The median for NKT in each specific group is described in table 3. The difference between the autologous and allogeneic transplant groups for NKT was not significant, neither in the first collection ( $p=0.089$ ), nor in the second one ( $p=0.750$ ).

The  $\Delta$ NKT values for each group are described in table 3. As regards  $\Delta$ NKT, the difference between the autologous group and the allogeneic group was not significant ( $p=0.375$ ).

**Engraftment:** Of the total group of 21 patients, for 16 the engraftment date coincided with the analysis period. In the group of ten patients subjected to autologous transplantation, for four the engraftment did not coincide with the analysis period; in the group of eleven patients subjected to allogeneic transplantation, for only one the time of engraftment did not coincide with the analysis period.

The median for engraftment in the groups is in table 3. For the entire group (21 patients), the correlation between engraftment and total median for NK cells (median for NK cells in the first and second collections) was non-significant ( $p=0.187$ ), the correlation between engraftment and NK median in the first collection was not significant ( $p=0.942$ ), the correlation between engraftment and NK median in the second collection was not significant ( $p=0.150$ ).

In the total group, the correlation between  $\Delta$ NK and engraftment was significant ( $r=0.48$ ;  $p<.05$ ), that is, the greater the variability of quantitative values for NK cells between the first and second collections, the later the engraftment occurred.

In the groups of autologous and allogeneic transplant, the same correlations were analyzed. In the autologous group, the correlation between  $\Delta$ NK and engraftment was not important ( $r=0.27$ ;  $p=0.55$ ); however, in the allogeneic group, despite the correlation coefficient not being statistically significant ( $p=0.112$ ),  $r$  was 0.51. From this information we can infer that the statistically significant correlation coefficient of the total group is related with the values of the allogeneic group and that by increasing the number of patients in this group we might obtain the same magnitude of correlation observed in the total group.

A correlation between engraftment and NKT cells was also observed; neither in the total group nor in the autologous group there was a significant correlation. In the allogeneic group, the correlation between engraftment and  $\Delta$ NKT was 0.06, with a bordering significance that was not reached.

**CD34 dose:** The median for the dose of  $CD34 \times 10^6/kg$ , infused in every group, is described in table 3. In the group of 21 patients, the correlation between engraftment and CD34 dose was non-significant ( $p=0.248$ ). In this

same group, the correlation between CD34 dose and NK median in the first and second collections was not significant ( $p=0.480$  and  $p=0.922$ , respectively).

There was no significant correlation between the CD34 dose and NKT in the first ( $p=0.989$ ) and second collection ( $p=0.480$ ), nor between the CD34 dose and  $\Delta$ NKT ( $p= 0.357$ ).

In the autologous transplant group, no significant correlations were observed between the CD34 dose and the NK median in the first and second collections either ( $p= 0.374$  and  $p= 0.645$ ); the same occurred for the correlation with  $\Delta$ NK and  $\Delta$ NKT ( $p= 0.879$  and  $p= 0.760$ ).

In the allogeneic group, there was no significant correlation either between the CD34 dose and NK in the first collection ( $p=0.631$ ), and NK in the second collection ( $p=0.873$ ). The correlation in this group between the CD34 dose and  $\Delta$ NK and the CD34 dose and  $\Delta$ NKT was not significant ( $p= 0.894$  and  $p= 0.284$ , respectively).

In the analyzed data, there was no statistically significant relation between the CD34 dose infused in the graft and the cell subtypes studied in all groups of patients.

**Acute GVHD (aGVHD):** As expected, no case of acute GVHD was observed in the patient group with autologous graft. Of the eleven patients subjected to allogeneic transplantation, four developed acute GVHD grades I-II (36.36% of cases); one patient developed GVHD grade III-IV (9.09% of cases). 45.45% of the population subjected to allogeneic transplantation developed some degree of acute GVHD. The associations between acute GVHD and engraftment, and between acute GVHD and CD34 dose were not significant ( $p=0.719$  and  $p=0.153$ , respectively).

As regards NK cells, we achieved the following results in the associations: between aGVHD and NK in the first collection,  $p=0.069$ ; aGVHD and NK in the second collection,  $p=0.657$ ; aGVHD and NK median between the first and second collections,  $p=0.215$ ; and aGVHD and  $\Delta$ NK,  $p=0.257$ . No association achieved statistical significance.

Also with the population of NKT cells the correlations with aGVHD were not found to be statistically significant: association between aGVHD and NKT in the first collection,  $p=0.398$ , aGVHD and second collection,  $p=0.586$ ; and aGVHD and  $\Delta$ NKT  $p=0.961$ .

**Chronic GVHD (cGVHD):** As expected, no case of chronic GVHD was observed in the patient group with autologous graft, all cases observed were in the group of patients subjected to allogeneic transplantation (29). Of these patients, seven developed chronic GVHD (63.63%), six having limited chronic GVHD (54.54%), and one having extensive chronic GVHD (9.09%).

The analysis of these associations in the patient group with cGVHD was quite interesting. The association between cGVHD and CD34 dose was not significant,  $p=0.488$ ; on the other hand, the association between cGVHD and engraftment was significant with  $p<0.05$ , that is, the patients with cGVHD had a later engraftment (graphic 1).

As regards NK cells, the association between cGVHD and NK in the first collection was not significant ( $p=0.85$ ); in the second collection, however, the association with NK had  $p=0.056$ . The association between cGVHD and NK median between the first and second collection was not significant ( $p=0.255$ ). The association between cGVHD and  $\Delta$ NK was significant ( $p<0.05$ ).

For NKT cells, we achieved the following results: the association between cGVHD and NKT – in the first and second collection – was not

significant ( $p=0.36$  and  $p=0.37$ , respectively). The association between cGVHD and  $\Delta$ NKT, despite not being statistically significant, had  $p=0.085$  (see table 4).

The association between cGVHD and  $\Delta$ NKP was statistically significant ( $p<0.05$ ), of seven patients with cGVHD, all had an increase in the number of NK cells (CD56<sup>+</sup>) from the first to the second sample collection (graphic 2).

The association between cGVHD and  $\Delta$ NKTP was also statistically significant ( $p<0.05$ ): of seven patients with cGVHD, six had an increase in the number of NKT cells (CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>) from the first to the second sample collection (graphic 3).

## **Discussion**

Although much has been learned about the biology of NK cells in the last years, there remain many gaps in our understanding about the development of mature subtypes of NK cells from hematopoietic progenitors, mechanisms of self-tolerance acquisition, modulation of NK cell receptors, and mechanisms of interaction between NK cells and target cells and other cells in the immune system (2).

In our study on patients subjected to related allogeneic transplantation, we found a trend that was not statistically significant in the correlation between the quantitative variability of NK and NKT cells and later engraftment. We also found, in this group of patients, statistically significant associations between variability of NK and NKT cell populations with progression in the engraftment period and diagnosis of chronic GVHD. All patients with chronic GVHD had a later engraftment ( $p<0.05$ ).

Due to the known cytotoxicity of the NK cells, it would be logical to think that the NK cells existent in the bone marrow could recognize and eliminate allogeneic hematopoietic stem cells via cytolytic mechanisms, but it was

demonstrated in mice that the population of stem cells is not directly affected by NK cells, and the same occurs in *in vitro* experiences (29, 30).

Up to this date it is unknown what cells promote engraftment. Some murine models suggest that the NK cells from the donor are crucial for engraftment; other studies imply the CD8+ T cell in this context. There are no data on humans directly associating NK cells with engraftment, or even with a rejection of stem cell transplants (11, 12, 16).

No direct evidence has been found for the involvement of the recipient's NK cells with graft rejection, but the hybrid resistance phenomenon is often brought to mind as evidence for NK-mediated rejection. Its role in this context is believed to be of little importance, since hybrid resistance only occurs when a small number of the donor's cells are infused, which does not usually occur in transplantations. The relevance of the hybrid resistance phenomenon in humans is controversial (10, 11, 12). We did not find, in literature, a reference to a correlation between NK cells and later engraftment.

Some studies support the idea that the NK cells can promote engraftment. In mice, the early administration of activated NK cells (LAK), following the allogeneic transplantation of bone marrow, leads to a faster engraftment and lesser rejection, especially after T-cell depletion.

There are several studies disagreeing about the effect of NK cells on autologous and allogeneic bone marrow cell cultures; probably, it is associated with particular conditions of the cultures involved and the different activation stages of the NK cells analyzed (14).

NK cells can be inhibitory or stimulatory for hematopoiesis according to their diversity of receptors. Knowing about the functioning of NK cell receptors

and their activation and inhibition processes, the apparently contradictory results from the effect of NK cells on hematopoiesis *in vitro* (7, 31) become more understandable.

Currently, the activation or inhibition mechanisms of the NK cell receptors and their role in the different types of transplants have been largely discussed. Studies on humans have demonstrated a positive effect of the MHC/KIR disparity in relation to the haploidentical transplantation of stem cells. In patients with AML, lower relapse rates than expected, lower graft rejection rates and reduced rates of acute GVHD were noticed when the haploidentical graft had inhibitory KIRs for which the recipient had no ligand, the rates of chronic GVHD in this group of patients were not reported (15).

In non-related transplants with incompatibility of KIR receptors, there were two observations: survival improvement and lower rates of acute GVHD, with comparable rates of chronic GVHD (28, 32). Patients with AML and myelodysplastic syndrome subjected to HLA-compatible related donor transplantation with KIR incompatibility demonstrated better results, rates of acute and chronic GVHD were not described in this group (33, 34).

The results of our work on patients subjected to HLA-compatible related transplantation demonstrated a statistically significant association between the quantitative increase in NK cells in the engraftment period and development of chronic GVHD.

It would be undoubtedly interesting to correlate this finding with the degree of recipient/donor KIR incompatibility in this group. This would serve for us to check if this correlation with chronic GVHD is related with the interaction of NK receptors or merely with the relationship of NK cells with other cells in the immune system that promote GVHD. After these results, HLA-C typing became routine in our service.

Chronic GVHD is known to be associated with alloreactive T cells (helper and cytotoxic), nonspecific suppressor cells, TNF- $\alpha$ -secreting macrophages and autoreactive T cells. In humans, chronic GVHD may involve alterations in the balance between type 1 helper T cells / type 1 cytotoxic T cells (Th1/Tc1) and type 2 helper T cells/ type 2 cytotoxic T cells (Th2/Tc2), with prevailing Th1/Tc1 response characterized by an aberrant pattern of INF- $\gamma$  production, without IL-2 production. The consistent presence of autoantibodies against cytoskeleton proteins (tubulin, actin, myosin) indirectly provides support to the effect of Th2 cells on chronic GVHD. Apparently, chronic GVHD in humans can present with a Th1/Tc1 or Th2/Tc2 prevalence, and one prevalence or another may produce different clinical conditions (35). Generally, chronic GVHD has been associated with an increase in CD8+ populations and a reduction in the proportion of NK cells (CD3-/CD16-/CD56+) in the blood (28).

As regards HLA-identical transplants, the NK cells in recovery express an immature phenotype with low levels of CD16 and KIR molecules, and high expression of inhibitory CD94/gNKG2A receptors. The initial recovery profile of the NK cells comprises 90% of immunoregulatory NK (CD56bright/CD16dim/neg) and 10% of cytotoxic NK cells (CD56dim/CD16bright); after 6 months of the transplantation, the populations get inverted and start to correspond to the normal frequencies of NK populations with the same KIR expression of the donor (90% of cytotoxic NK cells to 10% of immunoregulatory NK cells) (2, 4).

NK cells with immunoregulatory profile can abundantly produce type 1 or type 2 cytokines following an *in vitro* stimulation of monokines. For example, the co-stimulation with IL-15 leads to the production of type 2 cytokines by immunoregulatory NK cells (IL-10 and IL-13); the co-stimulation with IL-12 optimizes the production of type 1 cytokine (INF- $\gamma$ ) (4). Although these two monokines have the ability to induce the production of type 1 cytokine or type 2 cytokine, the amount of each one, and the presence of other cytokines – may promote a prevailing response. The characteristics of infection-induced



cytokines can dictate the production of type 1 or type 2 cytokines by immunoregulatory NK cells, which can partially influence the production of a helper T cell response (4). Could we think the same about the immunoregulatory NK response to infection-induced cytokines or even acute GVHD and a trend towards the emergence of chronic GVHD?

We know that the NK cell subtype that first recovers abundantly is the immunoregulatory NK cell; six months post-transplantation, it begins to correspond to only 10% of the population of NK cells (2). Would the dynamics be the same in individuals who developed chronic GVHD? Currently the answer to this question is unknown.

The physiopathogeny of chronic GVHD is unknown if compared to that of acute GVHD; the current understanding of the chronic GVHD etiology in humans is based on the knowledge that the donor's pathogenic T cells proliferate in response to alloantigens or autoantigens that are not verified by the normal thymus or by peripheral mechanisms of deletion. Cells that are key for the promotion of tolerance may be absent both in the donor and in the recipient. These pathological T cells directly hit target tissues via cytolytic attack, secretion of inflammatory and fibrosing cytokines, or elicitation of B cell activation and autoantibody production. The tissue damage leads to necrosis and dysfunction (28, 36).

The thymus has a critical role in the prevention of autoimmunity via elimination of autoreactive T cells. This suggests that chronic GVHD is caused by autoreactive T cells that escape negative selection in the thymus, which is injured by the conditioning regimens, acute GVHD and/or age-related atrophy. The Chronic GVHD that usually occurs months after the transplantation may be secondary to the Th2 immune response to the donor's CD4+ T cells that escaped the negative selection by the thymus and keep on recognizing MHC antigens presented by the donor's APC. These CD4+ T cells help the

recipient's B cells synthesize antibodies against several tissue antigens of the recipient (37,38,39).

Unlike T lymphocytes, the NK cells at best contribute to GVHD, rather than cause it. T cells can recruit NK cells, stimulate an immune response through the release of cytokines and possibly contribute to tissue damage via production of inflammatory cytokines and nitric oxide (11).

In murine models, the infusion of NK/ANK cells does not cause GVHD as compared to the infusion of cytotoxic lymphocytes; according to the recipient/donor KIR compatibility, the transfer of NK cells may be a protective factor for acute GVHD (11, 15). However, viral infections may stimulate the NK cells to produce INF- $\gamma$  and it is speculated that this reaction may be the main factor for the exacerbation of acute GVHD that takes place during viral infections (11).

Theoretically, the NK cells can regulate the three effector processes of a pathological T cell that give rise to tissue damage in chronic GVHD: cytolytic attack, secretion of inflammatory and fibrosing cytokines and elicitation of B cell activation with production of autoantibodies. The NK cells exercise a regulatory role in the production of cytotoxic T lymphocytes and in the production of antibodies by B lymphocytes.

A number of experiments with rigorous NK depletion were carried out to evaluate the role of NK cells in the generation of cytotoxic T lymphocytes (CTLs). In mixed cultures of lymphocytes for the generation of alloantigen-specific human CD8<sup>-</sup> CTLs, the CD3<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NK cells were demonstrated to be a requirement in the induction of effector CTLs. The NK component of these cultures seem to determine if the TCD8<sup>+</sup> cells stimulated by an antigen will merely proliferate, but will not differentiate (in the absence of

NK cells), or will proliferate and differentiate into cytolytically active effector CTLs (in the presence of NK) (40).

Romagnani (41) proposed that the intact immune response, including the activity of NK cells, determines the phenotype of the subsequent immune response from TCD4+ cells. Antigenic challenges of TCD4+ cells, associated with the NK cell activation, produce a cascade of events that lead to the development of a Th1 response or to a profile shift from Th2 to Th1. The removal of peripheral blood mononuclear cells that express CD16+ reduces the ability of the factors that stimulate the NK cells to make allergenic-specific TCD4+ cells shift from their phenotypic profile Th2 to Th1. A similar phenomenon occurs to patients with severe atopic dermatitis and functional deficiency of NK cells which demonstrate a differentiation that is predominantly Th2. It must be remembered that with chronic GVHD there is a reduction in circulating NK cells and frequently clinical presentations occur that indicate a Th2 immune response (40).

The NK cells have an ability to regulate the production of antibodies positively or negatively. The positive regulation has a direct effect on B lymphocytes, the negative regulation is performed indirectly and requires a converting growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) for the co-stimulation of TCD8+ cells and for the performance of negative regulation.

The NK cells can work as antigen-presenting cells and may induce B lymphocytes at rest to secrete IgG and IgM (they need no activation for this induction). There is considerable evidence that the NK cells can induce and/or promote antibody production independently from T cells (42).

In terms of negative regulation of antibody production, the NK cells – though on their own can only stimulate antibody production – when placed in a

culture with TCD8+ cells, increase the production of TGF- $\beta$ , which serves as an important co-stimulating factor for TCD8+ cells to develop a suppressive activity. In humans, the circulating NK cells seem to be the greatest source for active TGF- $\beta$ . In autoimmune diseases, the negative regulation of the production of antibodies of T cells is impaired for poorly understood reasons. The T cells in individuals with SLE support antibody production, instead of suppressing it.

IL-2 and TNF- $\alpha$  can increase the production of TGF- $\beta$  derived from lymphocytes, INF- $\gamma$  has minimal effects and IL-10 is inhibitory for TGF- $\beta$  production. The negative effect of IL-10 on TGF- $\beta$  production may be secondary to its inhibitory effects on the biosynthesis of IL-2 and TNF- $\alpha$ .

In the systemic lupus erythematosus (SLE), the production of TGF- $\beta$  by NK cells is decreased, a fact that is consistent with reports that, in this disease, the function of the NK cell is usually decreased (43). It is possible that the NK cells have a key role in the down-regulation of the *in vivo* anti-self and non-self immune response via TGF- $\beta$  production (43). In addition to their cytotoxic activities, the NK cells seem to have an important role in immune regulation, restricting the response to foreign antigens and preventing autoimmunity (42).

Studies with a small number of patients suggest that the circulating levels of IL-10 in patients with chronic GVHD are low; TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 are high, in contrast to murine models of GVHD (which resemble the pathogenesis of SLE and present clinical and laboratory characteristics different from human chronic GVHD), in which the increased production of IL-10 is associated with chronic GVHD; anti-IL-10 antibodies can block its clinical manifestations (28).

In our study, we also found a statistically significant correlation between the quantitative increase in NKT cells (CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>) in the peri-engraftment period and development of chronic GVHD.

NKT cells – T lymphocytes with the activity of NK cells – were identified in murine and human tissues. Murine NKT cells typically express phenotypic markers found in T cells as CD3 and T cell receptor  $\alpha\beta$  (TCR), as well as NK, NK1.1 and DX5 markers. Two NKT cell populations were described for murines. One of the subpopulations does not express CD4 and CD8; the other one, CD4<sup>+</sup>, expresses an invariable TCR and was found in the liver, thymus, spleen and bone marrow. Functionally, the CD4<sup>+</sup>NK1.1 NKT cells produce large amounts of interleukin 4 (IL-4) upon their activation and play an important role in the regulation of the Th2 immune response. The CD4<sup>+</sup> NKT cells are positively selected by the MHC class I molecule CD1d, associated to  $\beta$ 2 microglobulin. They have an important function in the regulation of the immune response, in the inhibition of tumor development and protection against the development of autoimmune diseases. It was observed that in patients with systemic sclerosis, lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and type 1 diabetes, there is a selective reduction in this cell type (44). The suppression of GVHD was described in murines for this specific subtype of NKT cell (45, 46, 47).

In 2004, Hray et al. (48) published a study with humans on the recovery of this subtype of NKT cell, demonstrating that at one month post-transplantation the NKT cells were reconstituted in the peripheral blood in recipients of peripheral progenitor cells; in recipients of bone marrow, they remained at low levels for over a year. In patients with acute GVHD, the number of CD4<sup>+</sup> NKT and CD4<sup>-</sup> cells was lower as compared with that of patients without acute GVHD. As regards chronic GVHD, the recipients of bone marrow with extensive chronic GVHD had a significantly slower number of NKT cells (49).

Recently a second population of NKT cells has been described which expresses a variable set of TCR, and is not dependent on CD1d for its maturation and development. These NKT cells were found in the spleen and bone marrow (1 to 3%) and express CD8, or are double negative for CD4 and CD8. This cell subpopulation has a powerful *in vitro* cytotoxic action, antitumor action and does not cause significant GVHD between haploidentical donor-recipient in murines (45, 50). The GVL effect and the suppression of GVHD, in this cell subtype, is controversial; of course, further studies are needed to determine the importance of this specific population, even as a potential cell for use in immunotherapy, in autoimmune disease, infections and in marrow transplantation in the induction of a Th2 response, with potential use in the treatment and prevention of GVHD (47,51, 52, 53, 54).

## **Conclusion**

With the data obtained in this study, we could not establish a significant correlation between the quantitative dose of NK cells, NKT cells,  $\Delta$ NK,  $\Delta$ NKT, and engraftment. The results that are near significance, however, especially in the allogeneic group, warrant further research with the purpose to correlate the variation of NK and NKT cells in the initial immune recovery period with engraftment, due to the controversy over the action of these cells regarding the prevention or promotion of engraftment (14).

With the data analyzed in this paper, we could not establish a significant association of aGVHD with NK, NKT cells, as well as with  $\Delta$ NK,  $\Delta$ NKT. However, as regards the diagnosis of cGVHD, there seems to be an association of this diagnosis with a quantitative increase in the NK and NKT cells in the peri-engraftment period.

The correlations of all variables involving NK cells, aGVHD, cGVHD with the infused CD34 dose were not significant. The significant associations found

are apparently related with the studied cell subtypes themselves, rather than with the dose of hematopoietic stem cells received with the graft.

In our study, we only counted the NK and NKT cells without characterizing immunoregulatory and cytotoxic cells in the NK population and NKT subtypes, but with the finding of a significant association between the quantitative progression of NK and NKT cells in the engraftment period and in the development of chronic GVHD, it is important that we differentiate the types of NK and NKT cells as to their quantitative and qualitative profile, it is important as well to know if there is a difference in the recovery dynamics of NK and NKT cells that accounts for the action of these cell populations on the set of factors that lead to the development of chronic GVHD, as there is a reasonable theoretical basis in favor of this hypothesis. No published study calls into question this possibility.

From our finding, it is rational to carry out a quantitative, qualitative and functional evaluation of NK and NKT cells before transplantation in the recipient, in the donor and in the recipient during the engraftment, at thirty days, three months, six months and one year post-transplantation. It would also be convenient to perform a prospective evaluation of the association of these data with the diagnosis of acute or chronic GVHD in a larger group of patients subjected to a related allogeneic transplant.

We found a quantitative progression of NK and NKT cells in the period of engraftment. Yet, a doubt remains: what happens to these cell populations from this moment up to the diagnosis of chronic GVHD in the patients that developed this disease? Apparently, if our finding is to be confirmed in groups with a larger number of patients, the study on the dynamics of the NK and NKT cell populations from the time of engraftment up to one year post-transplantation will perhaps allow a better understanding of the physiopathogeny of chronic GVHD.

## REFERENCES

- 1- Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of Human Natural Killer Cells *Blood*, 1190; 176 (12): 2421-38.
- 2- Farag SS, Caligiuri MA. Human Natural killer cell development and biology *Blood Reviews* 2006; 20: 123-37.
- 3- Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*, 2002; 100(6):1935-47.
- 4- Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56<sup>bright</sup> subset. *Blood*, 2001; 97 (10):3146-51.
- 5- Middleton D, Curran M, Maxwell L. Natural Killer cells and their receptors *Transplant Immunology*. 2002;10:147-64.
- 6- Kärre K. How to recognize a foreign submarine? *Immunological Reviews – NK cells, MHC class I antigens and missing self*, 1997;155:5-9.
- 7- Parham P, McQueen KL. Alloreactive Killer Cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nature Reviews – Immunology*. 2003;3:108-122.
- 8- Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, Parham P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 2003;101(9):3730-40.
- 9- Passweg JR, Stern M, Koehl U, Uharek L, Tichelli A. Use of Natural Killer cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation Bone Marrow Transplantation 2005;35:637-3.
- 10- Manilay JO, Sykes M. Natural killer cells and their role in graft rejection. *Current Opinion in Immunology*, 1998;10(5):532-8.



11- Klingemann HG, Relevance and Potential of Natural Killer Cells in Stem Cell Transplantation. *Blood and Marrow Transplantation*, 2000;6(2)90-9.

12- Martin, PJ. Overview of Hematopoietic Cell Transplantation Immunology. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation 3<sup>th</sup> ed.*, printed in USA: Blackwell Publishing, 2004;16-30.

13- Bornhauser M, Thiede C, Brendel C, et al. Stable engraftment after mega dose blood stem cell transplantation across the HLA barrier. *Transplantation*, 1999. 68:87-88.

14- Lanier LL. The role of natural killer cells in transplantation. *Current Opinion in Immunology*, 1995;7:626-31.

15- Martelli MF, Aversa F, Lustig EB, Velardi A, Zelicher SR, Tabilio A et al. Transplants Across Human Leukocyte Antigen Barriers. *Seminars in Hematology*. 2002; 39(1);48:56.

16- Murphy EJ, Reynolds CW, Tiberghien P, Longo DL. Natural Killer Cells and Bone Marrow Transplantation. *Journal of the National Cancer Institute*, 1993;85(18):1475-82.

17- Bluman EM, Bartynski KJ, Avalos BR, and Caligiuri MA. Human Natural Killer Cells Produce Abundant Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  in Response to Monocyte-derived Cytokines *The Journal of Clinical Investigation*, 1996;97 (12): 2722-27.

18- Mandelboim O, Kent, S, David DM, Wilson SB, Okasaki T, Jackson R, et al Natural Killer activating receptors trigger interferon  $\gamma$  secretion from T cells and natural killer cells *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 1998; 95(7):3798-803.

19- Ferrara JLM, Cooke KR, H. Teshima T, Chapter 1: The Pathophysiology of Graft-vs.-Host Disease. In Ferrara, JLM, Cooke, KR, Deeg J. *Graft-Vs.-Host Disease 3<sup>th</sup> ed*: New York: Ed. Marcel Dekker: 2005;1-34.

20- Auletta JJ, Lazarus HM. Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. *Bon Marrow Transplantation*, 2005; 35:835-57.

21- Scholl S, Mügge LO, Issa MC, Kasper C, Pachmann K, Höffken K, Sayer HG. Impact of early NK cell recovery on development of GvHD and CMV reactivation in dose-reduced regimen prior to allogeneic PBSCT. *Bone Marrow Transplantation*, 2005; 35:183-90.

22- Fujimaki K, Maruta A, Yoshida M, Kodama F, Matsuzaki M, Fujisawa S, Kanamori H. Immune reconstitution assessed during five years after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 2001;27:1275-81.

23- Barret J, Rezvani K, Solomon S. New Developments in allotransplant immunology. The Alloimmune response. *American Society of Hematology. Education Program Book*, 2003;351-57.

24- Talmadge JE, Reed E, Ino K, Kessinger A, Kuszynski C, Heimann D et al. Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow. *Bone Marrow Transplantation* 1997;19:161-72.

25- Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P et al. Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:825-28.

26- Schulmann H, Sullivan KM, Weiden PL et al. Chronic Graft-Versus-Host-Disease in man: A clinic pathologic study of 20 long term Seattle patients. *Am J Med* 1980; 69: 204-17 ref GVHD crônico.

27- Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socié G, Wingard JR, Lee S, et al. National Institute of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-host-disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2005; 11:945-55.

28- SJ Lee. New approaches for preventing and treating chronic graft-versus-host-disease. *Blood*, 1 June 2005; 105 (11): 4200-06.

29- Niemeyer CM, Sieff CA, Smith BR, Ault KA, Nathan DG. Hematopoiesis In Vitro Coexists With Natural Killer Lymphocytes *Blood*, 1989; 74(7):2376-82.

30- Aguila HL, Weissman IL. Hematopoietic Stem Cells Are Not Direct Cytotoxic Targets of Natural Killer Cells. *Blood*, 1996; 87 (4):1225-31.

- 31- Silla LMR, Whiteside TL, Ball ED. The Role of Natural Killer Cells in the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia *Journal of Hematotherapy* 1995;4:269-79.
- 32- Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors *Blood*, 2003;102 (3):814-9.
- 33- Hsu HC, Keever-Taylor CA, Wilton A, Pinto C, G Heller, K Arkun, RJ O'Reilly, M Horowitz, B Dupont. Improved outcome in HLA- identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood*, 15 June 2005;105(12):4878-84.
- 34- Cook M, Milligan DW, Fegan CD, Darbyshire PG, Mahendra P, Craddock CF et al. The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. *Blood*, 15 February 2004; 103(4):1521-26.
- 35- Scultz KR, Miklos DB, Fowlwr D, Cooke K, Shizuru J, Zorn E, et al. Toward Biomarkers for Chronic Graft-versus-Host-Disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host-Disease: III. Biomarker Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2006; 12:126-37.
- 36- Horwitz ME, Sullivan KM. Chronic graft versus host disease. *Blood Reviews* 2006; 20:15-27.
- 37- Iwasaki T, Recent Advances in the Treatment of Graft-Versus-Host Disease *Clinical Medicine & Research*. 2004; 2(4):243-52.
- 38- Crooks GM, Weinberg K, Mackall C. Immune reconstitution: From stem cells to lymphocytes. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2006; 12: 42-6.
- 39- Evert Jan Wils, Jan J. Cornelissen Thymopoiesis following allogeneic stem cell transplantation: new possibilities for improvement *Blood Reviews* (2005) 19, 89-98.
- 40- Kos FJ, Engleman EG. Immune Regulation: a critical link between NK cells and CTLs *Immunology Today*, 1996; 17(4):174-6.

- 41- Romagnani S, Induction of Th1 and Th2 responses. A key role for the “natural” immune response? *Immunology Today*, 1992; 3, (10)379-81.
- 42- Horwitz DA, Gray GD, Ohtsuka K, Hirokawa M, Takahashi T. The immunoregulatory effects of NK cells: the role of TGF- $\beta$  and implications for autoimmunity *Immunology Today*, 1997; 18(11):538-42.
- 43- Baxter AG, Smyth MJ. The Role of NK Cells in Autoimmune Disease *Autoimmunity*, 2002; 35(1) 1-14.
- 44- Nash RA. Hematopoietic Stem Cell Transplantation In Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B. *Wintrobe’s Clinical Hematology* 11 ed. Printed in USA: ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2004;1:883-909.
- 45- Baker J, Verneris MR, Ito M, Shizuru JA, Negrin RS. Expansion of cytolytic CD8+ natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon  $\gamma$  production *Blood*, 2001;97(10):2923-31.
- 46- Biron CA, Brossay L. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections *Current Opinion in Immunology*. 2001;13:458-64.
- 47- Godfrey DI, Hammond KJL, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies *Review Immunology Today*, 2000; 21(11):573-83.
- 48- Hiray et al. Recovery of Valpha24+ NKT cells after hematopoietic stem cell transplantation Hiray et al *Bone Marrow Transplantation*. 2004; 34(7):595-602.
- 49- Kronenberg M, Gapin L. The Unconventional Lifestyle of NKT Cells *Nature Reviews – Immunology*. 2002;2:557-68.
- 50- Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagómez D, Singh AK, Stanic AK, Wang CR et al. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion *PNAS*, 2003;100(19)10913-8.
- 51- Fujiis. Application of natural killer T-cells to posttransplantation immunotherapy *Int J Hematol*, 2005; 81(1):1-5.

52- Chibas et al. Host-residual invariant NK T cells attenuate graft-versus-host immunity. *J Immunol*, 2005;175(2):1320-28.

53- Teshimat et al. Simulation of host NKT cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducing Th2 polarization of donor T cells. *J Immunol*, 2005;174(1):551-56.

54- McMahon CW, Raulet DH. Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells *Current Opinion in Immunology*. 2001; 3:465-470.

55- Talmadge JE, Reed E, Ino K, Kessinger A, Kuszynski C, Heimann D, M et al. Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow *Bone Marrow Transplantation*,1997;19:161-72.

**Table 1 – Patient characteristics**

Patient	Age at transplantation	Sex	Transplant type	Diagnosis	Conditioning Regimen	Number of infused CD34x10 <sup>6</sup> /kg	Engraftment D+	HSC Source
1	47	M	ALLO	NHL	BUCY+TBI	5	12	PBSC
2	46	F	AUTO	MM	MEL 200	2.5	15	PBSC
3	65	M	AUTO	MM	MEL 200	2.93	12	PBSC
4	66	F	AUTO	MM	MEL 200	2.5	12	PBSC
5	38	F	AUTO	NHL	BEAM	2.82	12	PBSC
6	53	F	AUTO	MM	MEL 200	12.8	15	PBSC
7	68	M	AUTO	MM	MEL 200	3.27	14	PBSC
8	36	M	ALLO	ATLL	CY+TBI	11.16	16	BM+PBSC
9	41	M	AUTO	AML	BUCY	2.36	15	PBSC
10	46	M	AUTO	MM	MEL 200	6.8	11	PBSC
11	45	M	ALLO	Ph <sup>+</sup> ALL	MEL+ARAC+TBI	9.1	16	BM
12	35	M	AUTO	NHL	BEAM	14	15	PBSC
13	34	M	ALLO	CML	BUCY	5.7	22	BM
14	44	M	ALLO	NHL	MEL+FLUDARA	18.1	16	PBSC
15	33	M	ALLO	CML	BUCY	3.53	22	BM
16	22	F	AUTO	ATLL	MEL+ARAC+TBI	6.15	10	PBSC
17	36	F	ALLO	CML	BUCY	5.27	17	BM
18	36	M	ALLO	ALL	CY+TBI	7.35	21	BM
19	46	F	ALLO	CML	BUCY	4.32	17	BM
20	35	F	ALLO	AML	BUCY	4.42	20	BM
21	47	M	ALLO	CML	BUCY	7.5	17	BM

ALLO: allogeneic; AUTO: autologous; NHL: non-Hodgkin lymphoma; MM: Multiple Myeloma; ATLL: acute T -lymphocytic leukemia; AML: acute myeloid leukemia; LLA-Ph<sup>+</sup> ALL: Philadelphia -positive acute lymphocytic leukemia ; CML: chronic myeloid leukemia; ALL: acute lymphocytic leukemia; BUCY: Busulfan and cyclophosphamide; TBI: total body irradiation; MEL: melphalan; BEAM:BCNU,etoposide, ara-c and melphalan; CY: cyclophosphamide; ARA-C: cytarabine; FLUDARA: fludarabine; HSC: hematopoietic stem cells; BM: bone marrow; PBSC: peripheral progenitor cells.

**Table 2 – Patient characteristics**

Patient	Transplant type	aGVHD (I-IV)	cGVHD	Diagnostic date cGVHD D+	Status in the December 2005 evaluation	Death cause
1	ALLO	II	N	-	DECEASED	Sepsis
2	AUTO	N	N	-	LIVING	-
3	AUTO	N	N	-	UNKNOWN	-
4	AUTO	N	N	-	UNKNOWN	-
5	AUTO	N	N	-	LIVING	-
6	AUTO	N	N	-	LIVING	-
7	AUTO	N	N	-	UNKNOWN	-
8	ALLO	II	N	-	DECEASED	relapse
9	AUTO	N	N		UNKNOWN	-
10	AUTO	N	N		UNKNOWN	-
11	ALLO	N	LIMITED	232	DECEASED	relapse
12	AUTO	N	N	-	DECEASED	relapse
13	ALLO	N	LIMITED	207	LIVING	-
14	ALLO	I	N	-	LIVING	-
15	ALLO	N	LIMITED	116	LIVING	-
16	AUTO	N	N	-	LIVING	-
17	ALLO	N	LIMITED	180	LIVING	-
18	ALLO	N	LIMITED	294	LIVING	-
19	ALLO	IV	-	-	DECEASED	GVHD IV
20	ALLO	N	LIMITED	212	LIVING	-
21	ALLO	II	EXTENSIVE	199	LIVING	-

ALLO: allogeneic; AUTO: autologous; aGVHD: acute graft-versus-host disease; cGVHD: chronic graft-versus-host disease; N: no; (I-IV): acute graft-versus-host disease grade I - IV.

\*Despite the diagnosis prior to D+100 being considered chronic GVHD by the clinical presentation and need for long-term immunotherapeutic treatment.

**Table 3 – Medians and interquartile intervals (percentile 25:75)**

	<b>Total</b>		<b>Autologous</b>		<b>Allogeneic</b>	
<b>Engraftment (D+)</b>	16(12;17)		13(11.75;15)		17(16;21)	
<b>CD34 x10<sup>6</sup>/kg</b>	5.2(3.10;8.25)		3,1(2.5;7.8)		5.7(4.42;9.01)	
<b>NK(CD56<sup>+</sup>)</b>	9.4(4.9;17.6)		6,1(3.3;14.8)		10.38(6.35;23.13)	
<b>ΔNK</b>	5.3(-1.25;7.9)		-0,1(-0.84;5)		2.98(-2.49;16.93)	
<b>ΔNK<sub>T</sub></b>	0.005(-0.55;-1.51)		-0,34(-0.89; 2.66)		0.17(0.00-1.47)	
	<b>Collection 1</b>	<b>Collection 2</b>	<b>Collection 1</b>	<b>Collection 2</b>	<b>Collection 1</b>	<b>Collection 2</b>
<b>Collection date (D+)</b>	15(14;17)	23(18.5;24.5)	14(13.5;15.25)	21(16.75;24.25)	16(15;18)	23(22;25)
<b>Leukocytes x10<sup>3</sup>/μl</b>	1.06 (0.74;2.29)	3.10 (1.30;4.99)	2.29 (1.54;3.30)	3.12 (0.97;6.15)	0.74 (0.57;1.06)	2.88 (1.3;3.4)
<b>NK(CD56<sup>+</sup>)</b>	6.2 (3.7;15.6)	7.6 (4.7;24.17)	6.2 (1.6;16.1)	5.6 (3.4;12.31)	6.2 (4.6;15.8)	9.1 (6.35;23.13)
<b>NK<sub>T</sub>(CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>)</b>	1.51 (0.10;2.78)	1.6 (0.27;3.44)	2.68 (0.6;5.2)	2.2 (0.0;3.8)	0.62 (0.0;2.11)	1.6 (0.36;2.74)

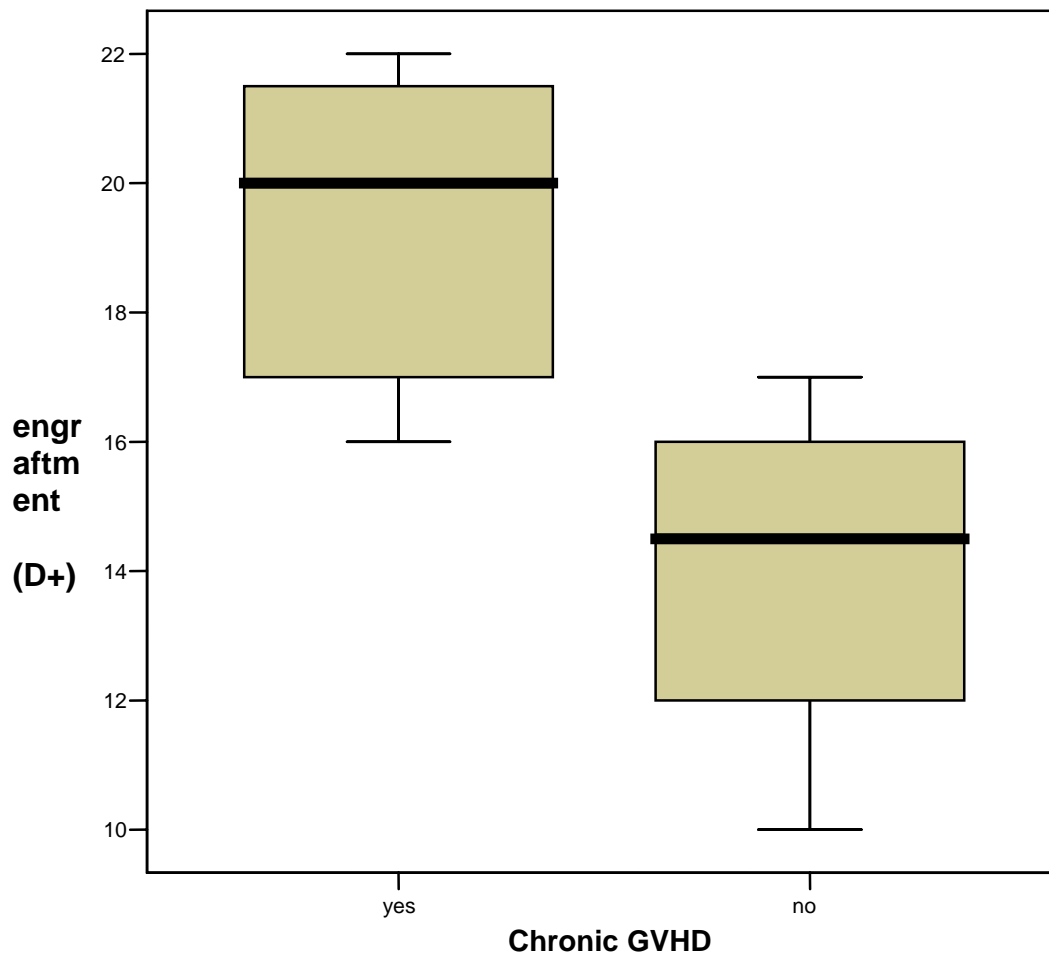
D+: days after transplantation; NK: Natural Killer; NK<sub>T</sub>: Natural Killer T; ΔNK: (NK Collection 2 – NK Collection 1); ΔNK<sub>T</sub>: (NK<sub>T</sub> Collection 2 – NK<sub>T</sub> Collection 1).



**Table 4 – Comparisons of values between patients without cGVHD and with cGVHD (p values by the Mann-Whitney test)**

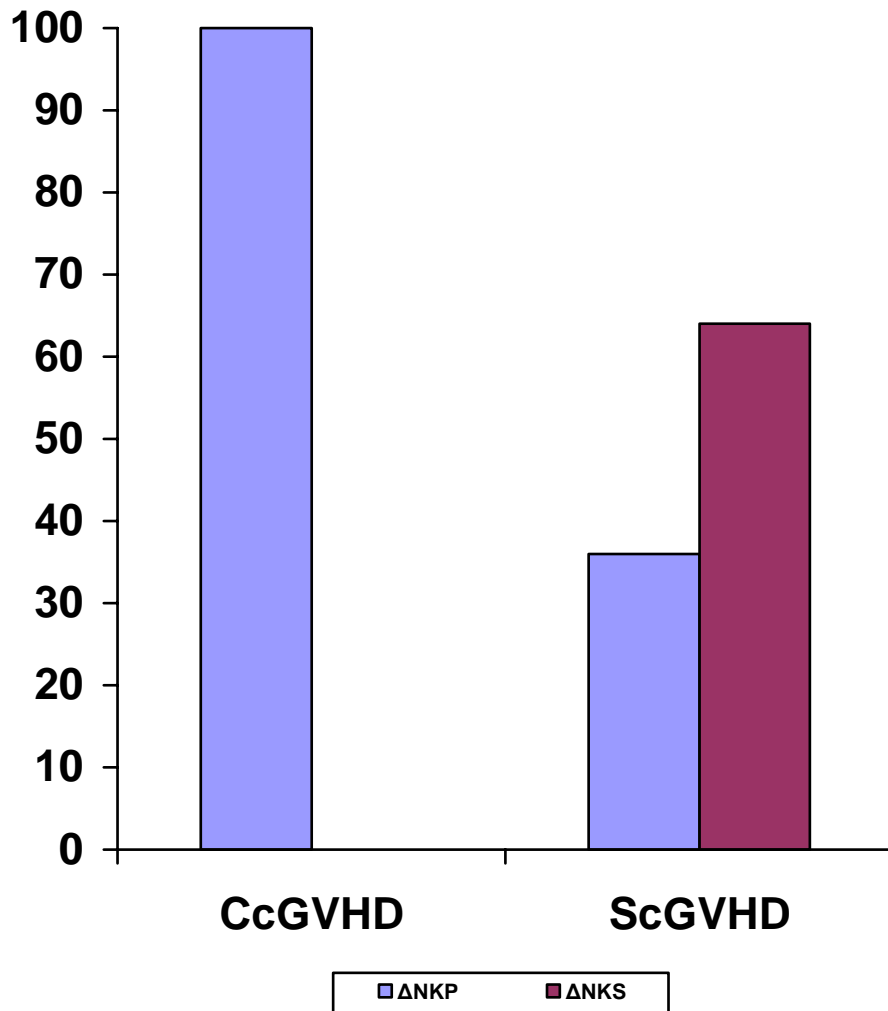
	Without <i>cGVHD</i>	<b>cGVHD</b>	<b>p</b>
<b>Engraftment(D+)</b>	14.5(12;16)	<b>20(17;22)</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>CD34(x10<sup>6</sup>/kg) dose</b>	4.6(2.74;11.5)	5.7(4.4;7.5)	0.488
<b>NK Collection 1</b>	9.01(3.1;16.28)	5.6(4.6;14.6)	0.856
<b>NK Collection 2</b>	6.9(3.4;12.3)	20.57(7.07;32.27)	0.056
<b>ΔNK</b>	-0.52(-3.13;2.98)	<b>15.94(2.96; 26.67)</b>	<b>0.006</b>
<b>NKT Collection 1</b>	2.34(0.0;3.29)	0.62(0.21; 1.51)	0.360
<b>NKT Collection 2</b>	1.11(0.0;3.31)	1.68(0.98;4.5)	0.375
<b>ΔNKT</b>	0.0(-0.89;0.17)	1.46(0.01;1.66)	0.085

**cGVHD**: chronic GVHD; **NK Collection 1**: NK cell count at collection 1; **NK Collection 2**: NK cell count at collection 2; **ΔNK**= NK Collection 2 - NK Collection 1; **NKT Collection 1**: NKT cell count at collection 1; **NKT Collection 2**: NKT cell count at collection 2; **ΔNKT**: NKT Collection 2 - NKT Collection 1.



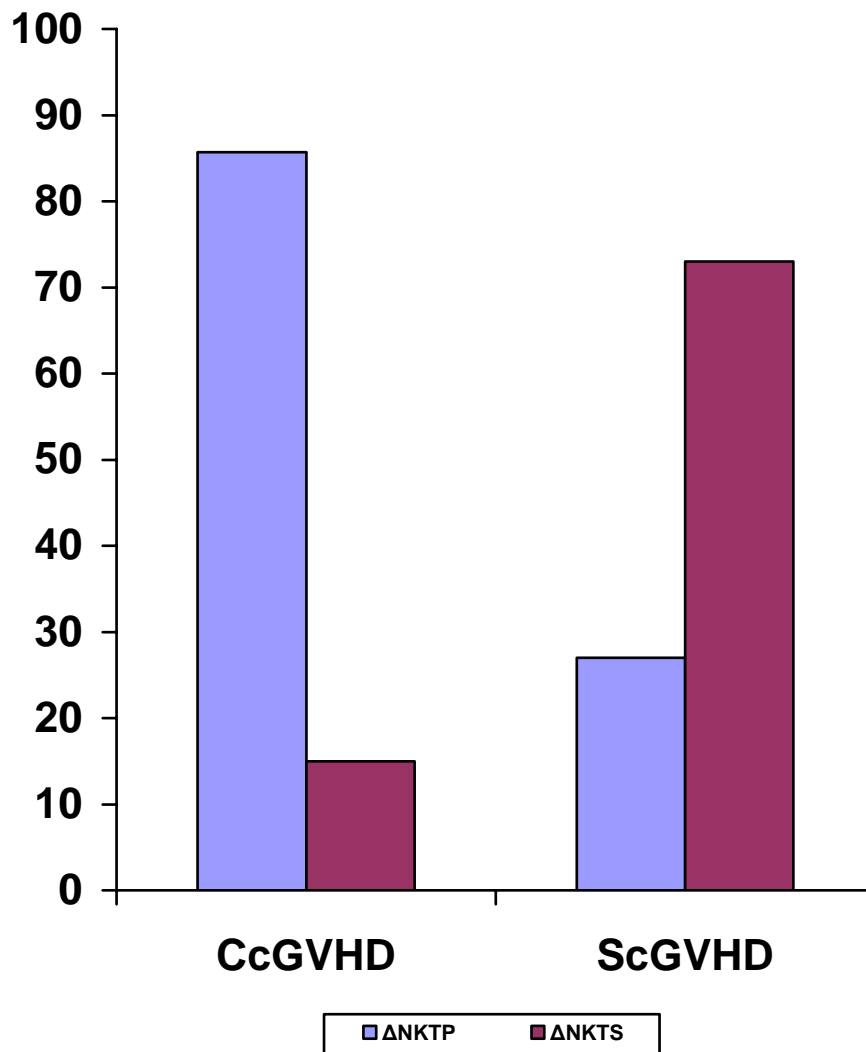
**Graphic 1. Comparison between patients with and without cGVHD in relation to engraftment**

Patients with chronic GVHD had a setting median at day 20 post-transplantation, while patients who did not develop chronic GVHD had an engraftment median of 14.3 days post-transplantation. There is a significant association between later engraftment and cGVHD ( $p < .001$ ).



**Graphic 2. Comparison between patients with cGVHD and without cGVHD in relation to  $\Delta$ NK.**

$\Delta$ NK = NK collection 2 – NK collection 1;  $\Delta$ NKS = absence of quantitative progression between the two collections ( $\Delta$ NK with negative values to zero);  $\Delta$ NKP = quantitative progression between the two collections ( $\Delta$ NK with positive values). Of the patients with cGVHD, all had a quantitative progression between the first and the second collection (7 patients = 100%); of the patients without cGVHD, only 4 had a quantitative progression between the first and the second collection (36%). Patients with cGVHD have a greater  $\Delta$ NKP ( $p=.013$ ).



**Graphic 3. Comparison between patients with cGVHD and without cGVHD in relation to ΔNKT**

ΔNK<sub>T</sub> = NK collection 2 – NK collection 1; **ΔNK<sub>TS</sub>** = absence of quantitative progression between the two collections (ΔNK<sub>T</sub> with negative values to zero); **ΔNK<sub>TP</sub>** = quantitative progression between the two collections (ΔNK<sub>T</sub> with positive values). Of the patients with cGVHD, 6 (85.7%) had a quantitative progression between the first and second collection. Of the patients without cGVHD, only 3 (27%) had a quantitative progression between the first and the second collection. Patients with cGVHD have greater ΔNK<sub>TP</sub> ( $p=.050$ ).