

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:  
CIÊNCIAS MÉDICAS

**CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER* (NK) CIRCULANTES  
NO SANGUE PERIFÉRICO PRECOCEMENTE APÓS O TRANSPLANTE DE  
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS (TCTH)**

ALICE DAHMER GONÇALVES

Porto Alegre

2017

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:  
CIÊNCIAS MÉDICAS

**CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER* (NK) CIRCULANTES  
NO SANGUE PERIFÉRICO PRECOCEMENTE APÓS O TRANSPLANTE DE  
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS (TCTH)**

ALICE DAHMER GONÇALVES

Dissertação apresentada  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Medicina: Ciências  
Médicas do Hospital de Clínicas de Porto  
Alegre, na Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, sob orientação da Prof<sup>a</sup>  
Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla.

Porto Alegre

2017

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

...À Dra. Lúcia pela orientação, confiança, apoio e amizade nesses dois anos de trabalho e convivência;

À Daniele Corleto, que, apesar de todas as restrições, confiou no meu trabalho e me integrou a sua equipe durante este período;

À Fabiane Spagnol, pela paciência e apoio em me auxiliar durante as análises de citometria de fluxo;

Ao Felipe Klein, que me ensinou o caminho com carinho, amor e persistência para eu poder chegar onde hoje estou;

...À Bruna Zambonato, por toda a dedicação que foi fundamental para o acontecimento desse estudo;

...À Vanessa Valim, além da amizade, ser meu exemplo de persistência pelo amor que ela tem ao trabalho;

...À Bruna Amorin, pelo apoio nos momentos difíceis dessa trajetória;

...À Annelise Pezzi, pela imensa amizade, cafés e risadas;

Ao Filipe Sehn, por toda sua paciência e boa vontade;

À Michelle Deber, por sempre achar uma maneira de alegrar minha vida nos momentos de maior dificuldade;

...À equipe técnica e iniciação científica do CTTC, que sempre ajudaram nas tarefas do laboratório, facilitando muito a execução do trabalho;

...Aos meus pais que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em meus projetos;

...Aos meus irmãos, pelo incondicional amor de família;

...Ao Stelyus Silveira, por acreditar na mágica assim com eu acredito.

## RESUMO

O transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico (alo-TCTH) é uma opção de tratamento para uma variedade de doenças neoplásicas e não neoplásicas, principalmente de origem hematológica sendo doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH) a sua principal complicação. As células *Natural Killer* (NK) são os primeiros linfócitos a se recuperarem após o TCTH. Além da capacidade de promover o efeito enxerto-versus-leucemia (EVL), as células NK do doador parecem capazes de promover a pega do enxerto e de prevenir o desenvolvimento da DECH. As células NK compreendem aproximadamente 10% dos linfócitos do sangue periférico e são caracterizadas fenotipicamente pela expressão do antígeno de superfície CD56 (CD, *cluster of differentiation*) e pela ausência de CD3 (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>). O subtipo de células NK CD56<sup>dim</sup> (baixa densidade do antígeno) é naturalmente mais citotóxico que o subtipo CD56<sup>bright</sup> (alta densidade do antígeno) o qual é caracterizado pela capacidade de produção de citocinas. Com base nisso, o objetivo do trabalho é avaliar a presença de células NK nos dias 7, 14, 21 e 28 após o TCTH alogênico e autólogo, caracterizando sua frequência, seu imunofenótipo e a sua capacidade de produzir fatores de crescimento hematopoético e citocinas relacionadas.

**Palavras-chave:** Células *Natural Killer*, DECH, efeito EVL, TCTH, citocinas, recuperação imune.

## **ABSTRACT**

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is an option of treatment for a variety of neoplastic and non-neoplastic diseases and graft-versus-host disease (GVHD) is its main complication. Natural Killer cells (NK) are the first lymphocytes to recover after HSCT. In addition to the ability to promote graft versus leukemia effect (GVL), donor NK cells appear to be capable of promoting engraftment and preventing the development of GVHD. NK cells comprise approximately 10% of peripheral blood lymphocytes and are characterized phenotypically by the expression of the CD56 surface antigen and absence of CD3 (CD56 + CD3-). The CD56dim (low density of antigen) NK cell subtype is naturally more cytotoxic than the CD56bright (high density of antigen) subtype which is characterized by the ability to produce cytokines. Based on this, the objective of the study is to evaluate the presence of NK cells on days 7, 14, 21 and 28 after allogeneic and autologous HSCT, characterizing their frequency, their immunophenotype and their capacity to produce hematopoietic growth factors and related cytokines.

**Key words:** Natural Killer cells, GVHD, GVL effect, HSCT, immune reconstitution, cytokines.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	14
<b>Figura 2.</b> Divisão didática da cavidade medular. ....	16
<b>Figura 3.</b> Esquema do desenvolvimento da hematopoese e da linfopoese .....	21
<b>Figura 4.</b> Morfologia e imunofenótipos dos estágios da maturação das células NK nos tecidos linfóides secundários .....	33
<b>Figura 5.</b> Células-alvo cobertas por anticorpos podem ser mortas por células NK na citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo .....	35
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática das funções dos subtipos de células NK..... .....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Receptores e Ligantes KIR humano.....	39
--	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADCC	citotoxicidade celular dependente de anticorpos ( <i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> )
Alo-TCTH	transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico
APC	célula apresentadora de antígenos ( <i>antigen presenting cell</i> )
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLP	célula progenitora comum da linhagem linfóide ( <i>common lymphoid progenitor</i> )
CMP	célula progenitora comum da linhagem mielóide (CMP, <i>common myeloid progenitor</i> )
CT	célula-tronco
CTA	célula-tronco adulta
CTE	célula-tronco embrionária
CTH-CP	células-tronco hematopoéticas de curto prazo
CTH-LP	células-tronco hematopoéticas de longo prazo
CTH	célula-tronco hematopoética
CTM	célula-tronco mesenquimal
DC	célula dendrítica ( <i>dendritic cell</i> )
DECHa	doença do enxerto-contra-hospedeiro aguda
DLA	antígeno leucocitário canino ( <i>dog leucocyte antigen</i> )
EVL	efeito enxerto- <i>versus</i> -leucemia
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>



G-CSF	fator de estimulação de colônia de granulócito ( <i>granulocyte-colony stimulating factor</i> )
GM-CSF	fator de estimulação de colônia de macrófago e granulócito ( <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> )
HLA	antígeno leucocitário humano ( <i>human leukocyte antigen</i> )
IFN- $\gamma$	interferon gama
IL-3	interleucina 3
IL-6	interleucina 6
IL-1 $\beta$	interleucina 1 beta
ITAM	imunoreceptor de ativação baseado em tirosina ( <i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> )
ITIM	imunoreceptor de inibição baseado em tirosina ( <i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i> )
KIR	receptor KIR ( <i>killer immunoglobulin-like receptor</i> )
LMA	leuCemia mielóide aguda
MHC	complexo de histocompatibilidade principal ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MICA	ligante MHC <i>class I chain- related proteins A</i>
MICB	ligante MHC <i>class I chain- related proteins B</i>
MHC-I	complexo de histocompatibilidade principal classe I
MTX	metotrexato
MO	medula óssea
NK	células <i>Natural Killer</i>

NCR	receptor de citotoxicidade natural ( <i>natural cytotoxicity receptors</i> )
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
STR	<i>short tandem repeat</i>
TCTH	transplante de célula-tronco hematopoética
TGF $\beta$	fator de transformação de crescimento beta ( <i>transforming growth factor beta</i> )
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa ( <i>tumor necrosis factor alpha</i> )

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DA LIETRATURA</b> .....	14
<b>2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações</b> .....	14
<b>2.2 Medula Óssea</b> .....	15
<b>2.3 Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas</b> ....	17
2.3.1 Células-Tronco Hematopoéticas .....	18
<b>2.4 Hematopoese</b> .....	19
<b>2.5 Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas</b> .....	22
<b>2.6 Imunologia Do Transplante De Células-Tronco Hematopoéticas</b> .....	25
2.6.1 Enxertia e Rejeição .....	25
2.6.2 Doença do Enxerto-Contra-Hospedeiro .....	26
2.6.3 Efeito Enxerto-versus-Leucemia.....	27
2.6.4 Reconstituição Imunológica Pós-Transplante de Células-Tronco-Hematopéticas .....	29
2.6.4.1 <i>Reconstituição dos Componentes da resposta Imune Inata pós-TCTH.</i>	
.....	29
2.6.4.2 <i>Reconstituição dos Componentes da resposta Imune Adquirida pós-TCTH.</i> .....	31
<b>3 CÉLULAS NATURAL KILLER</b> .....	32
<b>3.1 Maturação de Células NK</b> .....	32
<b>3.2 Função e Mecanismo de Acção de Células NK</b> .....	34

<b>3.3</b>	<b>Receptores de Células NK.....</b>	<b>38</b>
3.3.1	Receptore KIR .....	38
3.3.2	Receptores de Lectina Tipo C.....	39
3.3.3	Receptores NCR.....	40
<b>3.4</b>	<b>Células NK na Imunoterapia Adotiva.....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
5.1	Objetivo Primário .....	42
5.2	Objetivos Secundários.....	42
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>ARTIGO .....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>70</b>
<b>10</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico (alo-TCTH) é uma opção de tratamento para uma variedade de doenças neoplásicas e não neoplásicas, principalmente de origem hematológica. No entanto, obstáculos significativos ainda limitam a eficácia deste procedimento. Estes incluem a ocorrência da doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH), a susceptibilidade dos pacientes a infecções oportunistas durante o período de imunodeficiência após o transplante e a recorrência da doença de base. <sup>1</sup>

As células *Natural Killer* (NK) são os primeiros linfócitos a se recuperarem após o TCTH independente da fonte do enxerto, possivelmente capazes de mediar a resposta imune inicial, já que a recuperação das células T é mais tardia. <sup>2-6</sup> Além da capacidade de promover o efeito enxerto-*versus*-leucemia (EVL), as células NK do doador parecem capazes de promover a pega do enxerto e de prevenir o desenvolvimento da DECH, possivelmente por lise de células T aloreativas e de células apresentadoras de antígenos (APCs, *antigen presenting cell*) do receptor. <sup>7-10</sup>

É aceito que o efeito EVL após o TCTH HLA-idêntico resulta, principalmente, da ação de células T. <sup>11-13</sup> No entanto, as observações de Ruggeri e col. mostraram que, após o TCTH HLA-haploidêntico, a reatividade NK enxerto-*versus*-hospedeiro foi associada não apenas com menor recaída em pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA), mas também com menor índice rejeição do enxerto e menor incidência de DECH. <sup>8</sup> Baron e col. encontraram uma forte sugestão de que o rápido estabelecimento de altos níveis de quimerismo das células NK do doador entre os dias 14 e 100 após o TCTH indica uma melhor progressão de sobrevida livre de doença. <sup>14</sup>

As células NK compreendem aproximadamente 10% dos linfócitos do sangue periférico e são caracterizadas fenotipicamente pela expressão do antígeno de superfície CD56 (CD, *cluster of differentiation*) e pela ausência de CD3 (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>)<sup>15</sup>. Existem dois subtipos de células NK identificadas pela densidade de CD56. As células CD56<sup>dim</sup> (baixa densidade do antígeno) são aproximadamente 90% das células NK circulantes e expressam altos níveis de FcγRIII (CD16), enquanto a

minoria (aproximadamente 10%) são CD56<sup>bright</sup> (alta densidade do antígeno) e CD16<sup>dim/neg</sup>.<sup>16</sup> O subtipo CD56<sup>dim</sup> é naturalmente mais citotóxico enquanto o subtipo CD56<sup>bright</sup> possui a capacidade de produção de citocinas e baixa citotoxicidade natural.<sup>17</sup>

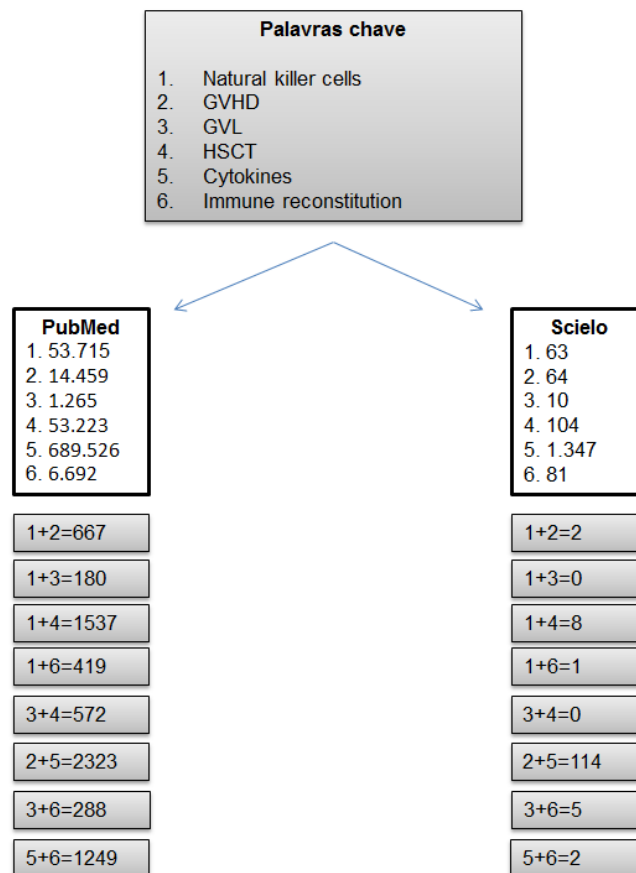
As principais citocinas imunomodulatórias produzidas por estas células incluem fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ , *transforming growth factor beta*), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , *tumor necrosis factor alpha*) e interleucina1 beta (IL-1 $\beta$ ). Além destas, fator de estimulação de colônia de granulócito e macrófago (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), fator de estimulação de colônia de granulócito (G-CSF, *granulocyte-colony stimulating factor*) e interleucina3 (IL-3) são outras citocinas produzidas por células NK as quais são reguladoras da hematopoese.<sup>18-20</sup>

Com base nisso, foi examinado a presença de células NK nos dias 7, 14, 21 e 28 após o TCTH alogênico e autólogo, caracterizando sua frequência, seu imunofenótipo e a sua capacidade de produzir fatores de crescimento hematopoético e citocinas relacionadas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura está focada no processo de reconstituição precoce das células NK pós-TCTH bem como sua capacidade de produção de citocinas neste período. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: Library of Medicine (PubMed) e Scientific Electronic Library Online (SciELO). Foram realizadas buscas utilizando os termos “*Natural Killer cells*”, “*GVHD*”, “*GVL*”, “*HSCT*”, “*Cytokines*” e “*Immune reconstitution*” e suas combinações sendo utilizados 139 artigos para a composição da revisão da literatura. Os resultados destas buscas estão apresentados na figura abaixo (figura 1).



**Figura 1:** Estratégia de busca de referências bibliográficas. Fonte: Elaborado pela autora (2017).

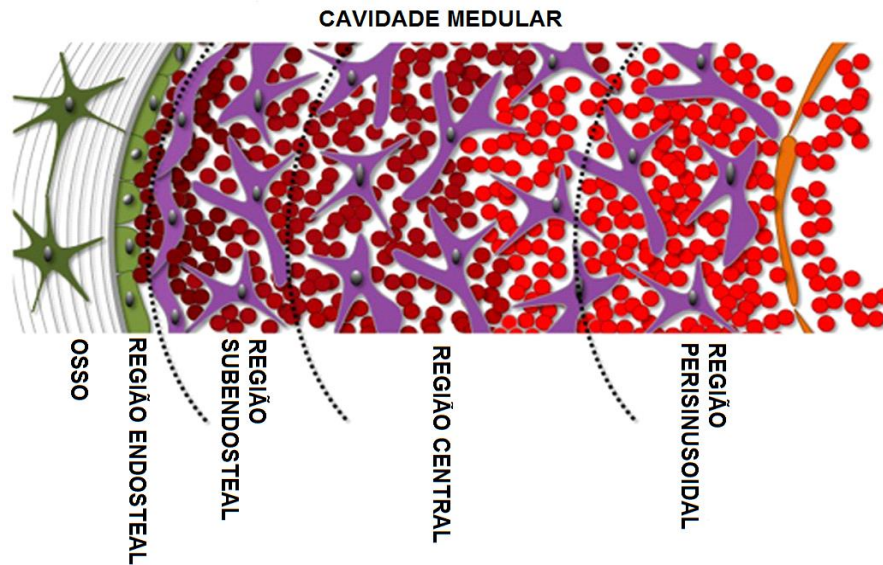
## 2.2 Medula Óssea

Em mamíferos, a hematopoese é um processo gradual que inicia no saco vitelino entre a terceira e quarta semana da gestação. Nesse período, os progenitores mielóide desenvolvem-se a partir do ectoderma primitivo do saco vitelino e dão origem a macrófagos embrionários. Em torno da quinta semana de gestação, o fígado é o principal sítio hematopoético fetal. No fígado fetal, as CTHs se expandem, amadurecem e, pela primeira vez, dão origem a células eritróides, linfóides e mielóides maduras. O fígado permanece o sítio hematopoético predominante durante as semanas 20 a 24 de gestação. A partir do fígado, as CTHs começam a colonizar também o timo e o baço fetal. Já no segundo trimestre de gestação, é a MO que passa a ser a responsável pela hematopoese mediada por auto-renovação das CTHs como o precursor final da hierarquia hematopoética do adulto.<sup>21</sup>

Além de CTHs e sua progênie, a MO é composta de uma matriz diversificada de células como células-tronco mesenquimais (CTMs) ou pericitos, células endoteliais vasculares, osteoblastos, adipócitos, macrófagos e muitos subconjuntos de células estromais. Elas são contribuintes funcionais durante a homeostase, fornecendo sinais reguladores positivos e negativos para as CTHs.<sup>22</sup>

Na MO, as CTHs residem em microambientes especializados constituídos por células de suporte que promovem a manutenção das CTH por meio da produção de fatores que regulam a auto-renovação e a diferenciação celulares. Esses microambientes têm sido denominados “nichos de CTH”.<sup>23</sup> A medula óssea é dividida em pelo menos quatro diferentes nichos que compõem o seu microambiente: endosteal, subendosteal, central e perissinusoidal (figura 2).<sup>24</sup>





**Figura 2: Divisão didática da cavidade medular.** Fonte: adaptado de Matsumoto A. e col.<sup>24</sup>

Diversos estudos localizam o nicho hematopoético no endóstio, que é a camada celular interna dos ossos que interage com os constituintes da MO. Esta região é recoberta por osteoblastos e osteoclastos que secretam ou ativam fatores que estão diretamente envolvidos na função das CTHs. Os osteoblastos expressam angiopoetina, trombopoetina e a quimiocina CXCL12 (também conhecida como *stromal cell-derived factor [SDF]-1*), que são fatores intimamente relacionados com a regulação da hematopoese. A angiopoetina e a trombopoetina estão envolvidas na manutenção e quiescência das CTHs. O CXCL12 regula a migração e a localização das CTH na MO.<sup>25</sup> No entanto, outros fatores pelos quais o endóstio pode contribuir no nicho hematopoético compreendem o contato direto célula-célula, a liberação de fatores solúveis ou a regulação por meio de uma célula intermediária. Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea e geram elevada concentração de cálcio em seu entorno que, por sua vez, atua na regulação e localização das CTHs nas proximidades do endóstio.<sup>21,26</sup>

Além do endóstio, o sítio perivascular é outro nicho hematopoético importante da MO. Esses sítios têm em comum as *CAR cells* (*CXCL12 abundant reticular cells*) as quais expressam elevados níveis da quimiocina CXCL12. As CTHs expressam CXCR4 (*CXC-chemokine receptor 4*) que é receptor de CXCL12 e, através dessa interação, são fixadas no nicho. A sinalização CXCL12-CXCR4 é essencial para a localização e manutenção de CTHs e para o desenvolvimento de

células imunes, incluindo células B, células dendríticas e células NK na medula óssea. O endóstio é altamente vascularizado, o que permite a suposição de que os nichos endosteal e perivascular interagem entre si para regular a hematopoese e a formação do osso.<sup>27,28</sup>

As CTMs constituem uma pequena população celular da MO, correspondendo de 0,001 a 0,01% de todas as células nucleadas medulares. Podem ser isoladas, expandidas e diferenciadas *in vitro* em linhagens de origem mesodérmicas como, osteogênica, condrogênica e adipogênica. Elas expressarem os marcadores de superfície celular CD105, CD73 e CD90 e não expressarem os marcadores hematopoéticos CD14, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR.<sup>29</sup> Elas podem ser isoladas da MO e de praticamente todos os tecidos corporais. Na MO, localizam-se no espaço perisinusoidal, já nos demais tecidos, localizam-se na parede vascular dos mesmos. As CTMs compõem o estroma medular e participam do nicho para as CTHs, fornecendo um microambiente que protege a manutenção e auto-renovação das CTHs evitando estímulos apoptóticos e que elas sofram diferenciação para, dessa forma, manter a reserva de CTHs.<sup>30</sup>

O nicho medular é tão importante para a hematopoese que não se consegue expandir CTHs *in vitro*. Porém, quando foram co-cultivadas CTHs de primatas com um nicho formado por células endoteliais, obteve-se a expansão e dessas células, e, ao serem infundidas, apresentaram a capacidade de reconstituir a hematopoese, revelando a importância das células endoteliais e perivasculares para a preservação da CTHs.<sup>31</sup>

### **2.3 Células-Tronco**

As células-tronco (CTs) são células não diferenciadas que possuem a capacidade de auto-renovação e diferenciação em diferentes tecidos. De acordo com a sua origem, as CTs são classificadas como CT embrionárias (CTEs) e CT adultas (CTAs). De acordo com o seu potencial de diferenciação, se classificam como totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes.<sup>32,33</sup>

As CTEs têm origem no mesoderma e são consideradas pluripotentes, pois apresentam a capacidade de se diferenciar em todas as linhagens, com exceção dos anexos embrionários. Cinco dias após a fecundação, essas células são obtidas do embrião no estágio de blastocisto.<sup>34</sup> O blastocisto origina-se do zigoto totipotente, que possui a capacidade de diferenciação em todas as linhagens, incluindo os anexos embrionários.<sup>32</sup>

As CTAs também apresentam a capacidade de auto-renovação e diferenciação em linhagens específicas e podem ser classificadas como multipotentes ou unipotentes. As CTAs multipotentes possuem a capacidade de diferenciação em linhagens dependentes do tecido de origem dessas células. Elas foram descritas pela primeira vez em órgãos caracterizados por alto *turnover* celular como sangue, pele, intestino e testículos. Relatos recentes mostraram que as células-tronco também podem ser encontradas em órgãos adultos que não exibem alto *turnover* celular, como o miocárdio e o sistema nervoso central. A CT mesenquimal, a CT hepática e a CT hematopoética são exemplos de CTA multipotente.<sup>33,35,36</sup>

As CT unipotentes apresentam a capacidade de diferenciação em apenas um tipo celular maduro. As células de mio satélite do músculo, células progenitoras endoteliais e células epiteliais da córnea são exemplos de células progenitoras unipotentes.<sup>36</sup>

### 2.3.1 Células-Tronco Hematopoéticas

Em mamíferos, as CTH localizam-se no interior da MO dos ossos chatos, epífises dos ossos longos e no sangue periférico, constituindo uma rara população celular (0,01 a 0,001% das células mononucleares da MO). A CTH tem capacidade de auto-renovação sendo considerada uma célula multipotente, ou seja, capaz de se diferenciar em linhagens linfóide, mielóide, eritrocitária e megacariocítica, devendo, obrigatoriamente, expressar em sua membrana o antígeno CD34. Elas constituem as CT adultas mais bem caracterizadas até hoje.<sup>24</sup>

Alguns estudos revelam a possibilidade da existir dois tipos de CTH: células-tronco hematopoéticas de longo prazo (CTH-LP) e células-tronco hematopoéticas de curto prazo (CTH-CP). As CTH-LP apresentam a capacidade de se auto-renovarem,

regenerando todos os tipos de células do sangue mantendo a sua proliferação ao longo da vida do organismo. As CTH-LP diferenciam-se das CTH-CP, cuja capacidade de se auto-renovar é limitada, levando-as a ter uma meia-vida de somente poucos meses. As CTH-CP, por sua vez, geram os progenitores multipotentes, que vão dar origem aos progenitores comuns das linhagens mielóide e linfóide.<sup>34,37</sup> As células da linhagem mielóide são eritrócitos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos; já as células da linhagem linfóide são os linfócitos B e T e as células NK. As células dendríticas (DC, *dendritic cells*) podem ser tanto da linhagem mielóide como da linfóide.<sup>38</sup>

Ter a capacidade de auto-renovação implica que a CTH seja capaz de se dividir de forma assimétrica, pois, ao se dividir, origina uma CTH que repõe o estoque inicial e uma outra CT que progride pela hierarquia hematopoética. A CT que progride pela hierarquia sofre uma série de divisões simétricas com o objetivo de amplificar o conjunto de CTs e progenitoras destinadas à diferenciação. À medida que essas células progredem na hierarquia, vão se restringindo em termos de potência, tornando-se células progenitoras bi ou monopotentes em relação às diversas linhagens celulares que constituem o sangue até, finalmente, pela influenciado nicho celular e de sinais químicos provenientes de outros locais, se diferenciarem nas células maduras do sangue e do sistema linfóide.<sup>26</sup>

## 2.4 Hematopoese

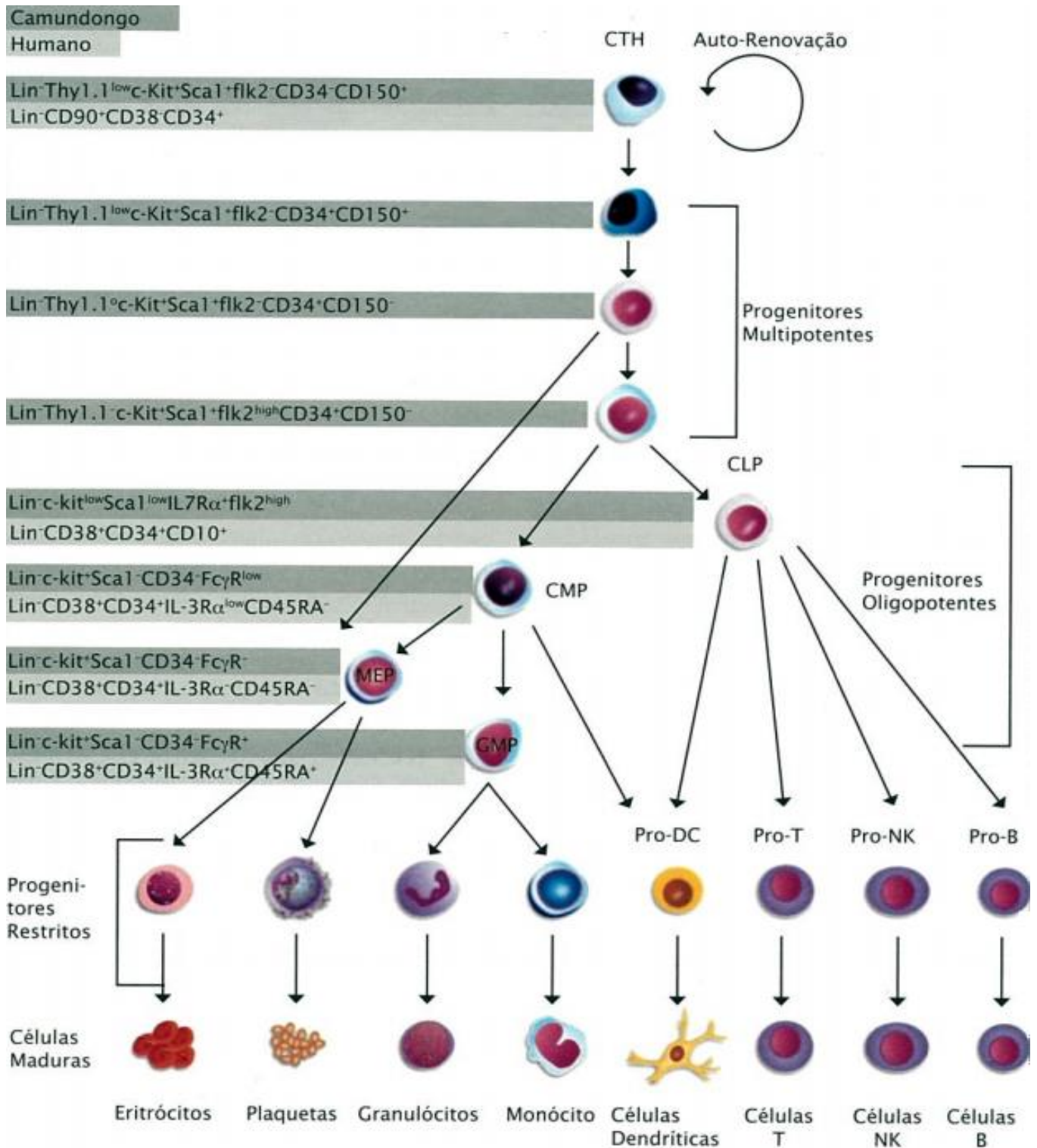
As CTHs são capazes de originar uma progênie celular que é responsável pela produção diária, em humanos, de 200 bilhões de hemácias, 10 bilhões de leucócitos e 400 bilhões de plaquetas. Esta capacidade de produção celular é somente possível porque a CTH possui a capacidade de auto-renovação e é uma célula multipotente, isto é, capaz de se diferenciar em linhagens linfóide e mielóide, eritrocitária e megacariocítica. A capacidade de auto-renovação implica que a CTH seja capaz de se dividir de forma assimétrica: ao se dividir, origina uma CTH que repõe o estoque inicial e outra célula-tronco que progride pela hierarquia hematopoética. A CT que progride pela hierarquia sofre uma série de divisões

simétricas com o objetivo de ampliar o conjunto de células-tronco e progenitoras destinadas à diferenciação.<sup>39,40</sup>

No processo de progressão pela hierarquia as CTH, após algumas divisões celulares simétricas para amplificação do estoque inicial, iniciam-se ciclos de divisão assimétrica em que são geradas células progenitoras multipotentes (MPP, *multipotent progenitor*), com menor capacidade de auto-renovação. Na sequência da hierarquia hematopoética, os modelos mais aceitos propõem que ocorra um primeiro processo de especialização o qual origina dois tipos de células progenitoras: a célula progenitora comum da linhagem mielóide (CMP, *common myeloid progenitor*) e a célula progenitora comum da linhagem linfóide (CLP, *common lymphoid progenitor*).

41

As CMPs originam uma célula progenitora de granulócitos e macrófagos e uma célula progenitora dos megacariócitos e eritrócitos. Por sua vez, as CLPs dão origem aos linfócitos T, B, NK e todas as classes de células DC. Os progenitores destas últimas podem ser derivados tanto de CMPs quanto de CLPs (figura 3).<sup>42</sup>



**Figura 3: Esquema do desenvolvimento da hematopoese e da linfopoese.** CTH – célula-tronco hematopoética. CMP – progenitor mielóide comum. CLP – progenitor linfóide comum. MEP – progenitor megacariocítico-eritróide. GMP – progenitor granulocítico mielóide. Pro-T – progenitor T. Pro-DC – progenitor de células dendríticas. Pro-NK - progenitor de células NK. Pro-B – progenitor de células B. Fonte: Adaptado de Covas, D.T.<sup>40</sup>

## 2.5 Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas

O transplante de células-tronco hematopoéticas é uma terapia utilizada para tratar transtornos malignos hematológicos de alto risco entre outras doenças de origem hematológica e genética. A principal complicação do TCTH é a doença do enxerto-contra-hospedeiro, um transtorno imunológico que afeta diversos sistemas e órgãos, incluindo o trato gastrointestinal, fígado, pele e pulmões, causando morbidade e mortalidade significativas. O tratamento exige o uso continuado de drogas imunossupressoras que aumentam os riscos de desenvolver infecções graves e outras complicações.<sup>43</sup>

A história do TCTH teve início em 1949 com os estudos de Jacobs e col. os quais demonstraram que efeito protetor do baço permitia a sobrevivência de camundongos letalmente irradiados.<sup>44</sup> Por sua vez, Lorenz e col., relataram o efeito protetor de células do baço ou da MO infundidas em camundongos irradiados.<sup>45</sup> Em 1955, os estudos de Main & Prehn<sup>46</sup> relataram fortes evidências do fenômeno de “proteção contra a irradiação” ocorrer devido à “hipótese celular”, onde camundongos irradiados e protegidos pela infusão de MO alogênica subsequentemente desenvolviam tolerância ao enxerto de pele do doador. Em seguida, Ford e col.<sup>47</sup> mostraram que camundongos letalmente irradiados e protegidos por uma infusão subsequente de MO possuíam características citogenéticas do doador.

Na década de 50, observações fundamentais foram realizadas em murinos, revelando a descoberta de que células de MO enxertadas com sucesso 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 DECH.<sup>48</sup>

Técnicas para determinar antígenos tissulares em humanos foram fundamentais para o desenvolvimento do TCTH. Em 1954, Miescher & Fauconnet<sup>49</sup> reconheceram anticorpos induzidos por transfusões ou gravidez, os quais reagiam com antígenos leucocitários. Dausset<sup>50</sup> e van Rood e col.<sup>51</sup>, usaram esse anticorpos para descrever grupos de antígenos leucocitários humanos (HLA, *human leukocyte*

*antigen*). A caracterização imunogenética desses antígenos teve contínuo progresso nos anos subsequentes.<sup>52</sup>

Em 1956, Barnes e col.<sup>53</sup>, relataram o tratamento de camundongos leucêmicos com irradiação supraletal seguida da infusão de MO de camundongo normal. Em 1958, Uphoff<sup>54</sup> relatou que, em transplantes alogênicos, a severidade da reação imune das células do doador contra os tecidos do receptor era controlada por fatores genéticos. Além disso, também foi demonstrado que o metotrexato (MTX) poderia prevenir ou melhorar a reação enxerto-contra-hospedeiro.<sup>52,54</sup>

Donald Thomas, em 1957, descreveu a primeira experiência com transplante alogênico de medula óssea em humanos quando foram tratados seis pacientes com radioterapia e quimioterapia e, em seguida, infusão intravenosa de medula de um doador normal. A infusão não foi acompanhada de efeitos adversos graves, mas nenhum paciente sobreviveu além de 100 dias.<sup>55</sup>

Na década de 60, estudos em cães forneceram informações importantes a respeito do TCTH. A prova da importância de grupos antigênicos leucocitários no TCTH proveio de estudos do sistema DLA (*dog leucocyte antigens*). A enxertia de medula óssea (MO) entre pares de cães compatíveis para antígenos leucocitários caninos frequentemente era bem sucedido e os receptores se tornavam quimeras saudáveis.<sup>56,57</sup>

Em 1969 o grupo de Seattle deu início a uma série de transplantes alogênicos usando familiares HLA compatíveis para estágios avançados de leucemia e anemia aplástica.<sup>58,59</sup> O mesmo grupo<sup>60,61</sup> relatou sua experiência com 100 pacientes com leucemia em estágio avançado infundidos com MO de irmão-HLA idêntico: um ano após a publicação do artigo, 17 dos 100 pacientes estavam vivos 1 a 3 anos após o transplante; destes, 8 pacientes estavam vivos e saudáveis 23 anos após o TCTH.<sup>62</sup>

Do início da sua história até a atualidade, desde os primeiros experimentos em camundongos que conduziram à sua aplicação em seres humanos, o TCTH evoluiu de uma atividade laboratorial altamente experimental para uma modalidade terapêutica curativa e bem estabelecida para diferentes transtornos malignos



hematológicos de alto risco entre outras doenças de origem hematológica e genética.<sup>43</sup>

O TCTH é classificado de acordo com o tipo de doador. Quando o doador é o próprio receptor, o transplante é denominado autólogo; quando o doador é um irmão gêmeo univitelino o, transplante é considerado singênico; já quando o doador é outro indivíduo o transplante é alogênico. O transplante alogênico é dividido em aparentado ou relacionado (quando é da mesma família) e não aparentado ou não relacionado (quando o doador não é familiar).<sup>63</sup> O TCTH alogênico é o único tratamento curativo para diversas doenças hematológicas maligna se não malignas, como por exemplo, hemoglobinopatias, imunodeficiências, doenças autoimunes e inflamatórias crônicas. As fontes de CTHs podem ser a MO, o sangue periférico ou o sangue do cordão umbilical.<sup>41,64,65</sup>

Para a compatibilidade entre o doador e receptor são avaliadas as moléculas de HLA classe I (HLA-A, -B, -C) e classe II (HLA-DRB1). O candidato a ser considerado um bom doador “*matched*” não relacionado é aquele que 10 dos 10 alelos HLA são idênticos. Um TCTH é considerado “*mismatched*” quando há disparidade em algum desses alelos. Chama-se de transplante haploidêntico quando ele é realizado entre indivíduos com disparidade no HLA, porém com identidade de haplótipos (quando o doador é o pai, a mãe ou irmão).<sup>63</sup>

Após o TCTH, as CTHs migram para a MO (*homing*), ou seja, a partir da periferia, circulam pelo organismo até, finalmente, encontrar um leito endotelial com moléculas afins e adentrar no microambiente hematopoético. Essas células reconstituem o sistema hematopoético após a re-colonização da MO que foi suprimida pelo regime condicionamento do paciente.<sup>36</sup>

O fenômeno de “pega” do enxerto está associado ao sucesso do transplante. Em um estudo com 120 pacientes acometidos por neoplasias malignas hematológicas que receberam regime de condicionamento não mieloablativo (irradiação total de 2Gy com ou sem adição de fludarabina) e submetidos ao TCTH, foi avaliada a cinética do enxerto do doador entre as diversas subpopulações de células sanguíneas periféricas e sua relação com os possíveis desfechos. O rápido estabelecimento do quimerismo (14 dias após o TCTH) de granulócitos, células NK e

monócitos do doador foram associados como aumento da sobrevida desses pacientes.<sup>14</sup>

No TCTH, a DECH aguda é a complicação mais frequente e, ocasionalmente, a mais grave desse tipo de transplante. Mesmo quando o doador e receptor possuem 100% de compatibilidade do sistema HLA, a DECH pode ocorrer, pois há evidências de que esta condição também aconteça em virtude da disparidade de antígenos secundários de histocompatibilidade (miH, *minor histocompatibility antigens*). Estes antígenos são pequenos peptídeos endógenos que se expressam no contexto de HLA classe I ou II e acredita-se que representam disparidades genéticas fora da região do gene do complexo HLA o qual é localizada no braço curto do cromossomo 6.<sup>66,67</sup>

## **2.6 Imunologia Do Transplante De Células-Tronco Hematopoéticas**

As reações imunológicas têm um papel central no alo-TCTH, e com menor influência, no TCTH autólogo. A compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na enxertia/rejeição, na DECH, no efeito EVL, no desenvolvimento da tolerância imunológica e na reconstituição do sistema imune após o TCTH requer o conhecimento de mecanismos imunológicos e imunogenéticos envolvidos nas respostas imunes geradas pelo transplante alogênico de células ou tecidos e no funcionamento do sistema imune após o TCTH autólogo.<sup>68</sup>

### **2.6.1 Enxertia e Rejeição**

Após o TCTH alogênico, a falha na enxertia é um evento raro em transplantes aparentados HLA-idênticos, mas mais frequente em TCTH não-aparentados, nos HLA-incompatíveis, em TCTH para doenças benignas com condicionamento de intensidade reduzida, com enxerto depletado de linfócitos T ou com doses reduzidas de CTH. Ela pode se manifestar como ausência de enxertia primária de células do doador ou perda do enxerto previamente estabelecido. Em último caso, a recuperação autóloga pode aparecer ou, alternativamente, aplasia da medula e pancitopenia podem se desenvolver. Na grande maioria das vezes, a rejeição no alo-TCTH associa-se a mecanismos imunológicos, sendo considerada a principal

causa de falha de enxertia, seguida de infecções virais, sepse ou medicamentos mielotóxicos. Ela ocorre principalmente em virtude da presença de células T remanescentes no receptor ou anticorpos.<sup>69,70</sup>

Após o alo-TCTH, as células do doador e do receptor convivem na MO e em outros tecidos. Ocorrem agressões recíprocas entre estas células, de intensidade controlada, permitindo a instalação lenta e progressiva de uma quimera completa de células do doador a qual acarreta em tolerância imunológica bidirecional doador-receptor. Quando ocorre o desequilíbrio destas reações e células aloreativas do doador reagem contra células do receptor, surge a DECH, enquanto, que no outro extremo, se o sistema imunológico do receptor for exageradamente estimulado ou pouco suprimido, resulta a falha do enxerto.<sup>68</sup>

Acredita-se que as células T do receptor resistentes ao regime de condicionamento reconheçam antígenos de superfície das CTH do doador e as destruam, por meio de um processo chamado reação hospedeiro-*versus*-enxerto. Por outro lado, linfócitos T do doador podem também reagir contra linfócitos T residuais do hospedeiro, o que constitui a principal defesa contra a rejeição do enxerto no alo-TCTH.<sup>70</sup>

### 2.6.2 Doença do Enxerto-Contra-Hospedeiro

A doença do enxerto-contra-hospedeiro aguda (DECHa) é uma importante causa de morbidade e mortalidade na área dos transplantes alogênicos de células-tronco hematopoiéticas, mesmo quando há completa compatibilidade HLA entre doador e receptor. Ela é uma doença progressiva e sistêmica, caracterizada por imunossupressão com envolvimento, principalmente, da pele, intestino e fígado. Na DECHa, células aloreativas do doador reagem contra complexos HLA-peptídeos presentes na superfície das APCs ou de tecidos alvos do doador, o que induz uma resposta imunológica citotóxica e inflamatória.<sup>66</sup>

A fisiopatologia de DECH envolve cinco etapas descritas a seguir: (1) regime de condicionamento com quimioterapia e/ou irradiação total do corpo, o que resulta na liberação de citocinas pró-inflamatórias que afetam células apresentadoras de antígeno do hospedeiro, aumentando sua maturação e a expressão de moléculas co-estimulatórias de citocinas, que por sua vez fornecem o estímulo para células T

alloreativas do dador.<sup>71</sup> (2) O reconhecimento de células T seguido pela ligação do receptor de células T (TCR) com o envolvimento de moléculas estimulatórias são os sinais necessários para a ativação completa de células T e posterior expansão clonal.<sup>72</sup> (3) Proliferação e diferenciação de células T alloreativas do dador, seguido por (4) tráfico de células T alloreativas para órgãos-alvo da DECH (mais frequentemente pele, intestino, fígado, pulmões), um processo que é controlado por quimiocinas e moléculas de adesão. Tecidos danificados e inflamados produzem quimiocinas, o que também resulta no recrutamento de neutrófilos, células NK e monócitos para os órgãos-alvo contribuindo para a fisiopatologia da DECH.<sup>73</sup> (5) A fase efetora é marcada pela destruição do tecido do hospedeiro por moléculas efetoras como Fas-ligante (FasL), perforina, granzimas, IFN- $\gamma$ , TNF, que induzem uma tempestade de citocinas que impulsiona todo o processo da DECH.<sup>74</sup>

Clinicamente, A DECHa pode se manifestar de forma benigna, como um *rash* cutâneo leve e alterações discretas da função hepática ou formas graves e fatais com o aparecimento de lesões bolhosas na pele, diarreia volumosa, náuseas, vômitos, dor abdominal intensa e acometimento hepático com colestase; atingindo com maior frequência a pele, progredindo para o sistema gastrointestinal e hepático.

43

Apesar da complexa fisiopatologia desta doença, a DECHa pode ser prevenida pela remoção das células T maduras do enxerto. Entretanto, o benefício gerado pela diminuição do risco de DECHa é, em grande parte, invalidado pelo risco aumentando de rejeição ao enxerto, recaída da doença de base e retardamento da reconstituição imunológica o que aumenta os riscos de infecção.<sup>75</sup>

### 2.6.3 Efeito Enxerto-versus-Leucemia

A DECH e o efeito EVL são as principais reações aloimunes que ocorrem após o alo-TCTH. Considerando que os enxertos provenientes de medula óssea e CT de sangue periférico mobilizadas por G-CSF são ambos enriquecidos de progenitores hematopoiéticos, eles também contêm células T CD4+e T CD8+ maduras.<sup>76</sup> As células T promovem o enxerto hematopoético, reconstituem a imunidade das células T e medeiam o efeito EVL<sup>77</sup>, mas, além disto, estas células também causam a DECH.<sup>78</sup> Este fato levou a um impasse terapêutico e um dos

principais desafios do alo-TCTH é reduzir a incidência de DECH enquanto se estimula o efeito EVL.<sup>79,80</sup>

No efeito EVL, os linfócitos T alogênicos são ativados após o reconhecimento de antígenos HLA presentes nas células do paciente, sofrem expansão clonal e liberam citocinas recrutando células efetoras, como células NK e linfócitos T CD8+ citotóxicos, para uma resposta imune integrada.<sup>13,81</sup> As células B, dendríticas e macrófagos podem ter um papel acessório no efeito EVL, por facilitarem a apresentação de antígenos e a secreção de citocinas.<sup>82-84</sup>

As células NK se tornaram um dos principais focos dos pesquisadores do TCTH após o estudo de Ruggeri e col.<sup>8</sup> demonstrar que, no TCTH haploidêntico de pacientes com leucemias agudas, o efeito EVL pode ser ampliado pela ação de células NK. Além disso, foi observada a presença de clones de células NK alorreativas se houvesse disparidade entre antígenos HLA do paciente e do doador reconhecida pelos receptores KIR, o que ficou conhecido com “incompatibilidade KIR”. Estes clones alorreativos foram capazes de lisar células leucêmicas dos pacientes *in vitro*. As células NK também afetaram o resultado clínico do transplante, reduzindo o risco de recaída e aumento da sobrevida livre de doença nos pacientes com LMA avançada. Além disso, a diminuição de rejeição do enxerto e a prevenção da DECH foram outros efeitos observados.

Estas observações levaram o estabelecimento de que as células NK alorreativas eram capazes de promover o efeito EVL por lise das células leucêmicas do receptor e possivelmente por melhorar a enxertia por destruir os linfócitos T residuais do paciente, sem agredir outros tecidos. Também foi observado que as células NK são capazes de prevenir a DECH provavelmente através da lise de células apresentadoras de antígeno do receptor, que têm um papel preponderante na indução dessa condição.<sup>8,10</sup>

Neste cenário, as células NK lisam diretamente as células malignas, de forma independente dos linfócitos T, pois possuem um repertório de receptores próprios que reconhecem diretamente células tumorais e ativam a citotoxicidade natural. No TCTH, os receptores considerados mais importantes são os receptores KIR (*killer immunoglobulin-like receptor*) que reconhecem moléculas HLA-específicas. Células-

alvo que não expressam as moléculas HLA que se ligam especificamente aos KIR são reconhecidas e destruídas por citotoxicidade mediada por células NK.<sup>8,85,86</sup>

#### 2.6.4 Reconstituição Imunológica Pós-Transplante de Células-Tronco-Hematopéticas

Pequenos *clusters* de células hematopoéticas podem ser observados em material de biópsia de MO obtido num período compreendido entre 10-14 dias após a realização de um transplante de CTH.<sup>87</sup> A celularidade da MO aumenta rapidamente depois de duas a quatro semanas e mostra evidências morfológicas de todos os componentes mielóides. Entretanto, pode ser necessário um período de seis a 12 meses antes que a celularidade atinja a densidade normal.<sup>88</sup>

Após o transplante, a reconstituição da MO consiste em dois fenômenos diferentes: a recuperação numérica dos elementos celulares da medula óssea e a recuperação funcional destas células. Embora o reaparecimento dos neutrófilos e de plaquetas seja considerado o sinal de recuperação hematológica pós-quimioterapia e TCTH, este fato não leva em consideração a recuperação funcional do sistema imunológico. A recuperação das células que participam da resposta imune humoral e celular pode levar anos no período pós-transplante.<sup>89,90</sup>

##### 2.6.4.1 Reconstituição dos Componentes da resposta Imune Inata pós-TCTH

A “pega” do enxerto leva em consideração a recuperação numérica dos elementos da MO que são indicadas pelo hemograma. No TCTH, o sinal de pega é indicado pelo número de neutrófilos em sangue periférico maior ou igual a 500/uL por três dias consecutivos. A recuperação de neutrófilos ocorre de 8 a 30 dias após a infusão.<sup>91</sup> Já a recuperação plaquetária ocorre, em média, 21 dias após o TCTH com índices maiores ou iguais a 20.000/uL por três dias consecutivos.<sup>92</sup> No TCTH autólogo, a pega de neutrófilos se dá, em média, doze dias após o transplante e a pega plaquetária, em torno de treze dias após a infusão.<sup>88</sup>

Após o transplante é importante definir se o novo sistema hematopoético é de origem do receptor ou do doador. A investigação da origem genotípica da hematopoese pós-transplante é denominada análise de quimerismo.<sup>93</sup> Inicialmente, acreditou-se que uma hematopoese completa do doador era essencial para manter

a enxertia após um TCTH alogênico.<sup>94</sup> Nas últimas décadas, entretanto, tornou-se evidente que a hematopoese do doador e receptor poderia coexistir no receptor após um TCTH alogênico, particularmente nas doenças benignas. Este estado é denominado de quimerismo misto, que pode terminar em uma recuperação autóloga.<sup>93</sup> Se todas as células hematopoéticas pós-transplante são de origem do doador, isto é denominado quimerismo completo. Foi demonstrado, entretanto, que a evolução do quimerismo pós-transplante é um processo dinâmico.<sup>95</sup> Um dos métodos utilizados para verificar o quimerismo é o estudo das regiões polimórficas (STR, *short tandem repeat*) através da técnica de PCR (PCR, *polymerase chain reaction*). Os STRs ou microssatélites são sequências repetidas de 3 a 7 pares de base que designam alelos diferenciados e nomeados pelo número de cópias de sequência repetidas contidas nas regiões de DNA em estudo. Desta maneira, é possível diferenciar se o DNA presente é do doador ou do receptor.<sup>95</sup>

Além dos neutrófilos, as células *Natural Killer* são um outro componente celular importante do sistema imune inato. Elas são os primeiros linfócitos a se recuperarem após o TCTH independente da fonte do enxerto, sendo capazes de mediar a resposta imune inicial, já que a recuperação das células T é mais tardia.<sup>2-6</sup> Elas têm a capacidade de lisar células-alvo, além de produzirem citocinas que estimulam o desenvolvimento de células do sistema imune adquirido. As principais citocinas imunomodulatórias produzidas por estas células incluem TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e, além destas, GM-CSF, G-CSF, IL-3, as quais regulam a hematopoese, são outras citocinas importantes produzidas por células NK no contexto pós-TCTH.<sup>18-20</sup>

As células de Langerhans são células apresentadoras de antígenos encontradas na pele. Após o TCTH, a sua recuperação ocorre num tempo médio de 40 dias, porém, na presença de DECH, ocorre um retardo desse tempo para pelo menos 100 dias.<sup>96</sup>

As células dendríticas são um outro tipo de células apresentadoras de antígenos. Em sangue periférico, a recuperação das células mielóides DC, as quais expressam CD11c, ocorre nos três primeiros meses após o TCTH. Já as células DC de origem plasmocitóide, as quais expressam CD123, a contagem se restabelece somente a partir de um ano após a realização do TCTH. As células DC foliculares,

aquelas que dão suporte para a formação das imunoglobulinas, estão com suas contagens diminuídas até o primeiro ano após o TCTH, contribuindo para a lenta regeneração das células B de memória.<sup>97</sup>

Ainda no contexto das células apresentadoras de antígeno, os monócitos, em geral, atingem suas contagens normais em torno de 30 dias após o TCTH, tanto quanto se o TCTH for de sangue periférico ou medula óssea.<sup>97,98</sup>

#### 2.6.4.2 Reconstituição dos Componentes da resposta Imune Adquirida pós-TCTH

Tem sido descrito que a reconstituição imunológica dos componentes da resposta imune adaptativa não obedece ao padrão de ontogenia fisiológica após o TCTH.<sup>99</sup> Alguns autores sugerem que existem dois caminhos a seguir na linfopoese em adultos após TCTH que são distintos daqueles encontrados no período fetal e após os primeiros dias do nascimento. Esta reconstituição ocorre diretamente no timo, gerando células T *naive* (CD45RA<sup>+</sup>) ou através da expansão de células CD45RO<sup>+</sup> preexistentes no enxerto do receptor.<sup>97,99,100</sup>

O processo de reconstituição dos componentes do sistema imune adquirido caracteriza-se pelo rápido surgimento de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Diversos estudos sugerem que a rápida recuperação destas células ocorre através de um caminho alternativo de imunoreconstituição, denominado expansão homeostática periférica, resultando em uma expansão clonal das células do doador infundidas no momento do TCTH, ou através de células residuais do hospedeiro que respondem a citocinas ou a antígenos.<sup>97,101</sup>

Em contrapartida, a função das células T auxiliares com fenótipo CD4<sup>+</sup> não atinge níveis normais até um ano após o TCTH.<sup>97</sup> O estudo da reconstituição imunológica em pacientes com doenças autoimunes ou neoplásicas submetidos ao transplante autólogo mostrou o mesmo comportamento que ocorre no TCTH alogênico, onde há intensa linfopenia nos primeiros anos após o transplante. Este tipo de transplante demonstrou que a recuperação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> se prolongava por até dois anos após o TCTH em adultos jovens tratados para esclerose múltipla e artrite reumatoide. Já as crianças que foram tratadas para artrite idiopática juvenil, esta recuperação foi observada após um ano de transplante.<sup>101</sup>



As células T regulatórias, cujo fenótipo é  $CD4^+CD127^-CD25^{high}$ , apresentam o fator de transcrição FOXP3 e são células muito estudadas neste contexto. De acordo com alguns autores, sua função fisiológica seria a de prevenir o surgimento de doenças autoimunes e também poderiam apresentar o mesmo efeito sobre doenças aloimunes como a DECH. Após o TCTH, seus níveis estão baixos, mas aumentam rapidamente no primeiro mês.<sup>99</sup>

Alguns autores observaram que, quando é feita a depleção de células T do enxerto, a recuperação dos linfócitos B ocorre mais rapidamente (entre o segundo e o terceiro mês após o TCTH) do que nos TCTH não depletados. Estes resultados podem estar relacionados ao desenvolvimento de linfócitos B independente dos linfócitos T.<sup>91</sup>

A capacidade funcional dos linfócitos B está comprometida de 1 a 2 anos pós-TCTH. Esta deficiência é, em parte, atribuída à deficiência em número e função dos linfócitos  $CD4^+$ . Além disso, outros fatores que colaboram para esta deficiência são a baixa contagem de linfócitos B circulantes e a reduzida diversidade de rearranjo gênico das imunoglobulinas nestas células, em virtude de uma anormalidade das taxas de mutação somática, durante o desenvolvimento destes linfócitos. A diminuição da função de células B, após o TCTH, tem resultado na diminuição de respostas a vacinas e a agentes infecciosos, independente dos valores normais que os linfócitos B tenham atingido.<sup>99</sup>

### **3 CÉLULAS NATURAL KILLER**

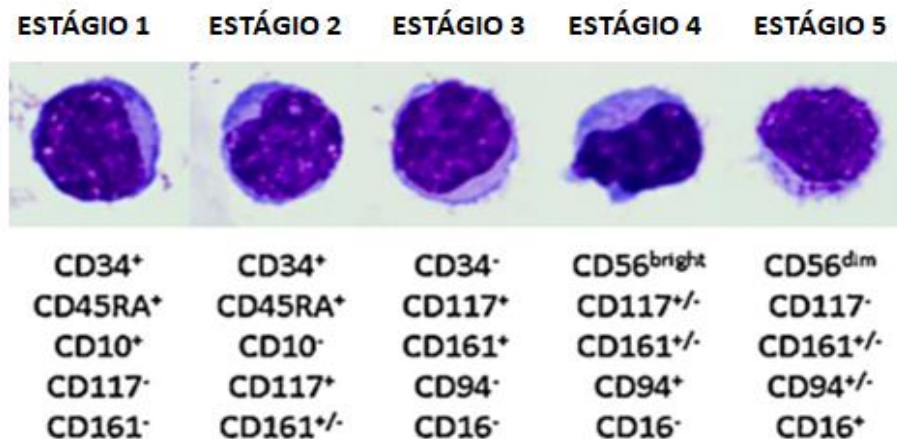
#### **3.1 Maturação de Células NK**

As células NK são células efectoras do sistema imune inato. A sua derivação de linhagem linfóide ou mielóide foi debatida no início da sua descoberta.<sup>102</sup> Pesquisas mostraram que as células NK podem ser derivadas de progenitores linfóides comuns (CLPs) e, portanto, foram consideradas separadas da linhagem mielóide.<sup>103,104</sup> No entanto, alguns estudos questionam e demonstraram que os progenitores que expressam antígenos mielóides podem se desenvolver em células NK.<sup>105,106</sup> A diferenciação de células NK a partir de células progenitoras

hematopoéticas pode ser estudada *in vitro*<sup>107</sup>, sendo um processo dependente de citocinas como a IL -2 ou IL-15, por exemplo.

Em um estudo recente, o grupo de Chen e col. desenvolveu um modelo de camundongos humanizados com citocinas com ótima reconstituição funcional de células NK humanas. Eles relataram a presença de uma população de células na MO dos camundongos que expressavam o marcador de células NK CD56 e marcadores mielóides, como CD33 e CD36. As células CD56<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD36<sup>+</sup> também são encontradas no sangue humano do cordão umbilical, na MO fetal e adulta. Embora estas células não terem expressado os receptores funcionais de células NK comuns e exibirem baixa atividade citotóxica e produção de citocinas, elas parecem se diferenciar facilmente em células NK maduras, adquirindo a expressão de receptores de células NK e perdendo a expressão dos marcadores mielóides.<sup>108</sup>

Com base na expressão dos marcadores CD34, CD94 e CD117, a maturação das células NK humanas nos órgãos linfóides secundários pode ser dividida em cinco estágios (figura 4).<sup>109</sup>



**Figura 4:** Morfologia e imunofenótipos dos estágios da maturação das células NK nos tecidos linfóides secundários. Fonte: Adaptado de Freud e col.<sup>110</sup>

À medida que as células NK passam do estágio 1 para o estágio 3, elas se tornam comprometidas com a linhagem celular NK e perdem a capacidade do desenvolvimento em células T ou células dendríticas. Nos estágios 3 a 5, propõe-se a maturação funcional de células NK, de modo que, *in vivo*, as células NK imaturas

(iNK) em estágio 3 podem produzir GM-CSF enquanto no estágio 4, as células NK CD56<sup>bright</sup> podem preferencialmente produzir IFN- $\gamma$ . No estágio 5, as células NK CD56<sup>dim</sup> podem preferencialmente mediar a citotoxicidade celular. A aquisição dos receptores KIR provavelmente ocorre nos estágios 4 e / ou 5.<sup>109</sup>

Acredita-se que a célula NK CD56<sup>bright</sup> seja o precursor da CD56<sup>dim</sup>. Tal desenvolvimento foi sugerido porque as células CD56<sup>bright</sup> possuem telômeros mais longos que as CD56<sup>dim</sup>. Embora inicialmente as células CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup> tenham sido considerados como diferentes estágios de maturação da célula NK, atualmente também sugere-se que elas são um subconjunto de células que, embora funcionalmente distintas, podem transitar entre os fenótipos.<sup>111</sup> Além disso, as células NK CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup> apresentam diferenças no seu perfil citotóxico e na capacidade para a produção de citocinas.<sup>112</sup>

### 3.2 Função e Mecanismo de Ação de Células NK

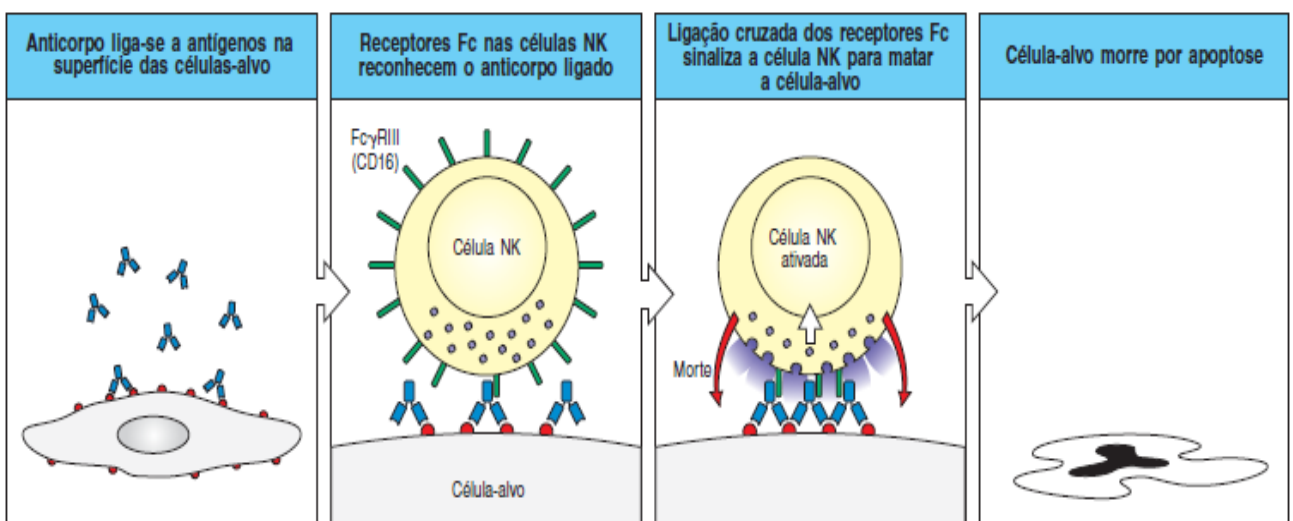
As células NK, podem lisar rapidamente as células-alvo sem sensibilização prévia. Funcionalmente, eles exibem atividade citolítica contra células tumorais e infectadas por vírus<sup>113</sup>, bem como bactérias intracelulares<sup>114</sup> através de um processo não fagocítico e dependente de contato. As células NK expressam uma variedade de receptores que servem para ativar ou suprimir sua atividade citolítica. Estes receptores se ligam a diversos ligantes nas células-alvo, e têm um papel importante na regulação da resposta das células NK<sup>115</sup>. Elas também possuem um papel regulador no sistema imunológico através da liberação de citocinas, que, por sua vez, estimulam outras funções imunes<sup>116</sup>. Células NK são uma fonte importante de citocinas imunomodulatórias como TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Além destas, GM-CSF, G-CSF e IL-3, reguladores da hematopoese, são também produzidas por células NK.<sup>18-20</sup>

As células NK e as células T expressam de forma semelhante CD2 e utilizam o antígeno de superfície LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*) para melhorar a adesão das células efectoras às células-alvo.<sup>117</sup> Além de suas propriedades de adesão, o CD2 também atua como uma molécula co-estimulatória

em células NK.<sup>118</sup> Acredita-se que o antígeno LFA-1 desempenha um papel dominante no processo de lise da célula-alvo.<sup>119</sup>

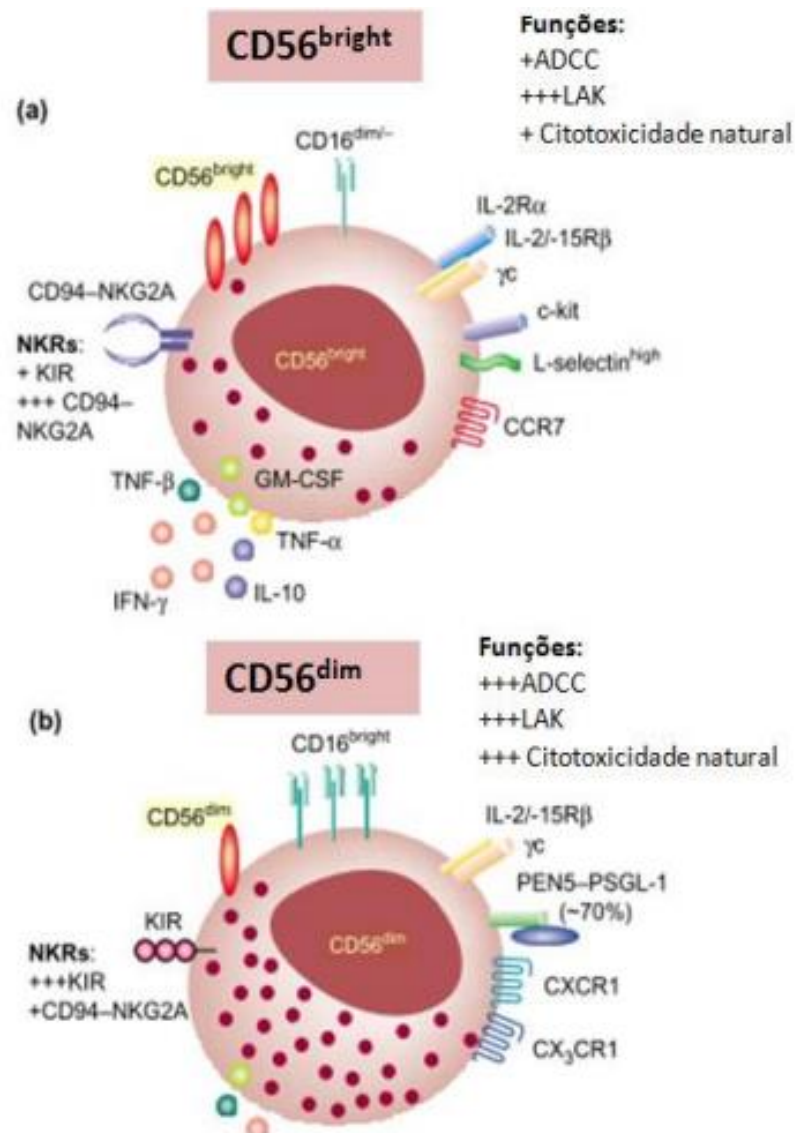
A ativação das células NK ocorre por uma combinação de reconhecimento direto de mudanças nas glicoproteínas da superfície celular. Essas mudanças são induzidas por estresse metabólico, tais como transformações malignas, virais ou infecções bacterianas, juntamente com o reconhecimento do “self” alterado ou com expressão diminuída<sup>120</sup>, teoria conhecida como “*missing-self recognition*”<sup>121</sup>, onde células NK reconhecem células-alvo com alterações na expressão de moléculas do MHC classe I.

A destruição de células-alvo recobertas por anticorpo pelas células NK é denominada **citotoxicidade celular dependente de anticorpos** (ADCC, *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*) e é desencadeada quando o anticorpo ligado à superfície de uma célula interage com receptores Fc na célula NK. As células NK expressam o receptor FcγRIII (CD16), o qual reconhece as subclasses IgG1 e IgG3. O mecanismo de ataque é exatamente análogo ao das células T citotóxicas, envolvendo a liberação de grânulos citoplasmáticos contendo perforina e granzimas (figura 5). A ADCC representa outro mecanismo pelo qual, por meio do engajamento de um receptor Fc, os anticorpos podem dirigir um ataque antígeno-específico por uma célula efetora que não possui especificidade pelo antígeno.<sup>122</sup>



**Figura 5:** Células-alvo cobertas por anticorpos podem ser mortas por células NK na citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo. Fonte: Adaptada de Murphy e col.<sup>123</sup>

A ação das células NK decorre do balanço entre sinais de receptores ativadores e inibitórios.<sup>123</sup> Como já citado, a célula CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup>, possui uma importante função imunorregulatória através da produção de citocinas, porém, são mediadores pouco eficientes na citotoxicidade e ADCC. Por outro lado, as células CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup> produzem baixos níveis de citocinas e são potentes mediadores da ADCC e perfil morfológico mais granular que a CD56<sup>bright</sup> (figura 6)<sup>124</sup>. Quando essas células são estimuladas com altas concentrações de interleucinas, diferenciam-se em células citotóxicas ativadas por linfocinas (células LAK, *lymphokine-activated killer cell*).<sup>125</sup> O processo de maturação da célula NK também é caracterizado por aumento da capacidade citolítica e uma diminuição do potencial proliferativo, quando comparado com células mais imaturas.<sup>126,127</sup>



A) Representação esquemática das funções da célula NK CD56<sup>bright</sup>

B) Representação esquemática das funções da célula NK CD56<sup>dim</sup>

**Figura 6:** Representação esquemática das funções dos subtipos de células NK. Fonte: Adaptado de Cooper M. e col.<sup>17</sup>

### 3.3 Receptores de Células NK

Em seres humanos, três famílias de receptores de células NK foram identificadas: a primeira família descrita é a dos receptores KIR (*killer immunoglobulin Ig-like receptor*), a qual reconhece, principalmente, HLA-A, HLA-B e HLA-C, moléculas clássicas de MHC I; a segunda família é a de receptores de lectina tipo C (*C-type lectin receptor*) que reconhece HLA-E, molécula não clássica de MHC I<sup>128</sup>; e a terceira família é a dos receptores de citotoxicidade natural (NCR), cujos ligantes ainda são pouco conhecidos.<sup>129</sup>

#### 3.3.1 Receptores KIR

Os receptores KIR pertencem à superfamília multigênica de imunoglobulinas e subdividem-se em dois ou três domínios *Ig-like* extracelulares, respectivamente KIR2D e KIR3D, os quais podem ter um domínio citoplasmático de ativação, denominado curto = *short* (S) ou de inibição, denominado longo = *long* (L). Eles são codificados por 15 genes e 2 pseudogenes, localizados no cromossomo 19q13.4. A expressão dos genes KIR ocorre de forma aleatória, podendo as células NK expressar o produto da combinação de dois ou mais genes.<sup>130</sup>

Os receptores KIR de ativação (ex: KIR2DS, KIR3DS) possuem imunoreceptor baseado em tirosina (ITAM, *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), bem como os receptores de inibição (ITIM, *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*). A ligação do receptor KIR com o seu ligante acarreta fosforilação dos resíduos de tirosina ITAM ou ITIM, ativando ou inibindo célula NK<sup>131</sup>. Os principais ligantes para os receptores KIR são alelos de moléculas de MHC classe I, como HLA-C1, HLA-C2 e HLA-Bw4. Os receptores KIR inibidores (ex: KIR2DL, KIR3DL) possuem o repertório de ligantes bem estabelecidos, enquanto que os KIR ativadores ainda não foram completamente identificados (tabela 1).<sup>132</sup> As células NK que possuem KIR inibitório e realizam interação com o HLA expresso em tecido autólogo, tornam-se "licenciadas" durante o seu desenvolvimento, enquanto que nas células NK não licenciadas, este receptor está inativo. Após o licenciamento, a célula NK aumenta a sua capacidade citotóxica contra alvos tumorais, onde a expressão HLA é muito reduzida ou ausente.<sup>133</sup>

**Tabela 1.** Receptores e ligantes KIR humano.

Receptores	Ligantes	Sinal
KIR2DL1	HLA-C do grupo 2 (Cw2, 4, 5, 6 e outros)	Inibidor
KIR2DL2	HLA-C do grupo 1 (Cw1, 3, 7, 8 e outros)	Inibidor
KIR2DL3	HLA-C do grupo 1	Inibidor
KIR2DL5	Ainda não identificado	Inibidor
KIR3DL1	HLA-Bw4	Inibidor
KIR3DL2	HLA-3, A11 e outros ainda não identificados	Inibidor
KIR3DL3	Ainda não identificado	Inibidor
KIR2DS1	HLA - C do grupo 2	Ativador
KIR2DS2	HLA - C do grupo 1	Ativador
KIR2DS3	Ainda não identificado	Ativador
KIR2DL4	HLA-G	Ativador
KIR2DS4	Ainda não identificado	Ativador
KIR2DS5	Ainda não identificado	Ativador
KIR3DS1	Ainda não identificado	Ativador

**Fonte:** Adaptado de Moretta L. e col.<sup>132</sup>

### 3.3.2 Receptores de Lectina tipo C

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.<sup>134,135</sup>



Os ligantes para o receptor NKG2D são as moléculas relacionadas ao MHC classe I, MICA e MICB (MHC *class I chain- related proteins A and B*) 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. <sup>128</sup>

### 3.3.3 Receptores NCR

Existem três receptores de citotoxicidade natural expressos em células NK humanas: NKp46 (NCR1; CD335), NKp44 (NCR2; CD336) e NKp30 (NCR3; CD337). Os NCRs são proteínas transmembrana tipo I pertencentes à superfamília das imunoglobulinas e são constituídas por um ou dois domínios extracelulares imunoglobulina-*like*. Além disso, eles contêm um domínio transmembrana com um aminoácido com carga positiva que pode interagir com a proteína adaptadora de sinalização contendo imunoreceptor de ativação baseada em tirosina (ITAM). <sup>129</sup> Embora tenha sido demonstrado originalmente que os NCRs são importantes para a morte de células tumorais, os primeiros ligantes identificados para os NCRs foram proteínas virais. <sup>136</sup> Infecções bacterianas também podem ativar diretamente células NK através da interação com NCRs, como o microorganismo *Mycobacterium bovis*, por exemplo. <sup>137</sup>

## 3.4 Células NK na Imunoterapia Adotiva

A experiência clínica no cenário do transplante de células-tronco hematopoéticas ao longo dos anos contribuiu com o conhecimento da biologia celular da célula NK. A imunoterapia celular como alternativa terapêutica cresceu significativamente ao longo das últimas décadas. <sup>125</sup> Atualmente, as células NK estão sendo empregadas como uma das principais alternativas para pacientes refratários ou não responsivos à terapia padrão na LMA, LMC ou Síndrome Mielodisplásica. <sup>138</sup> As células NK também estão sendo utilizadas como adjuvante ao uso de anticorpos monoclonais para direcionar a ação destas células na transferência adotiva autóloga ou alogênica de células NK. <sup>125,139</sup> No entanto, ainda existem muitos desafios para que a aplicação de células NK se torne uma modalidade de tratamento de primeira linha para pacientes com câncer

#### 4 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a capacidade das células *Natural Killer* em promover o efeito EVL, auxiliar na pega do enxerto e prevenir o desenvolvimento da DECH é necessário a melhor caracterização destas células no processo de recuperação imune no período pós TCTH, já que não existem estudos que avaliaram tão precoce e seriadamente a recuperação das células NK, tão pouco avaliaram o papel secretor de citocinas pelas mesmas neste período.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo Geral**

Avaliar a recuperação imune das células *Natural Killer* em pacientes submetidos ao transplante alogênico e autólogo de células-tronco hematopoiéticas (TCTH).

### **5.2 Objetivos Específicos**

a) Avaliar a recuperação dos subtipos de células NK durante o processo de recuperação imune dos pacientes nos dias: 7, 14, 21 e 28 após a realização do TCTH.

b) Avaliar o perfil de citocinas produzidas pelas células NK durante o processo de recuperação imune dos pacientes nos: 7, 14, 21 e 28 após a realização do TCTH.

## 6 REFERÊNCIAS

1. Copelan, E. A. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1813–1826 (2006).
2. Ottinger, H. D., Beelen, D. W., Scheulen, B., *et al.* Immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood.* **88**, 2775–9 (1996).
3. Shenoy, S., Mohanakumar, T. , Todd, G. *et al.* Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant.* **23**, 335–346 (1999).
4. Brahmi, Z., Hommel-Berrey, G., Smith, F. & Thomson, B. NK cells recover early and mediate cytotoxicity via perforin/granzyme and Fas/FasL pathways in umbilical cord blood recipients. *Hum. Immunol.* **62**, 782–90 (2001).
5. Moretta, A., Maccario, R., Fagioli, F. *et al.* Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp. Hematol.* **29**, 371–9 (2001).
6. Seggewiss, R. & Einsele, H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood.* **115**, 3861–8 (2010).
7. Asai, O., Longo, D.L., Tian, Z.G., *et al.* Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* **101**, 1835–42 (1998).
8. Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., *et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Scienc).* **295**, 2097–100 (2002).
9. Yamasaki, S., Henzan, H., Ohno, Y., *et al.* Influence of transplanted dose of CD56+ cells on development of graft-versus-host disease in patients receiving G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells from HLA-identical sibling donors. *Bone Marrow Transplant.* **32**, 505–510 (2003).
10. Olson, J. A. Leveson-Gower, D., Gill, S., *et al.* NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood.* **115**, 4293–301 (2010).
11. Livnat, S., Seigneuret, M., Storb, R. & Prentice, R. L. Analysis of cytotoxic effector cell function in patients with leukemia or aplastic anemia before and after marrow transplantation. *J. Immunol.* **124**, 481–90 (1980).
12. Goldman, J. M., Gale, R.P., Horowitz, M.M., *et al.* Bone marrow transplantation

- for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann. Intern. Med.* **108**, 806–14 (1988).
13. Kolb, H.J., Schmid, C., Barrett, A. J. & Schendel, D. J. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood.* **103**, 767–776 (2004).
  14. Baron, F., Baker, J., Storb, R., *et al.* Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood.* **104**, 2254–2262 (2004).
  15. Robertson, M. & Ritz, J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood.* **76**, 2421–2438 (1990).
  16. Lefkovits, I., Kuhn, L., Valiron, O., *et al.* Natural Killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J. Immunol.* **137**, 2735–2739 (1986).
  17. Cooper, M., Fehniger, T. & Caligiuri, M. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* **22**, 633–640 (2001).
  18. Allavena, P., Scala, G., Djeu, J.Y., *et al.* Production of multiple cytokines by clones of human large granular lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* **19**, 121–6 (1985).
  19. Cuturi, M. C., Anegón, I., Sherman, F., *et al.* Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **169**, 569–83 (1989).
  20. Murphy, B. W. J., Keller, J. R., Harrison, C. L., *et al.* Interleukin-2-activated natural killer cells can support hematopoiesis *in vitro* and promote marrow engraftment *in vivo*. *Blood.* **80**, 670–677 (1992).
  21. De Kleer, I., Willems, F., Lambrecht, B. & Goriely, S. Ontogeny of myeloid cells. *Front. Immunol.* **5**, 423 (2014).
  22. Sasine, J. P., Yeo, K. T. & Chute, J. P. Concise review: paracrine functions of vascular niche cells in regulating hematopoietic stem cell fate. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 482–489 (2017).
  23. Zhao, M. & Li, L. Regulation of hematopoietic stem cells in the niche. *Sci. China Life Sci.* **58**, 1209–1215 (2015).
  24. Matsumoto, A. & Nakayama, K. I. Role of key regulators of the cell cycle in maintenance of hematopoietic stem cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 2335–2344 (2013).
  25. Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W. *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* **425**, 841–846 (2003).
  26. Wilson, A. & Trumpp, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 93–106 (2006).

27. Sugiyama, T. & Nagasawa, T. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. *Inflamm. Allergy Drug Targets*. **11**, 201–6 (2012).
28. Oh, M. & Nör, J. E. The perivascular niche and self-renewal of stem cells. *Front. Physiol.* **6**, 367 (2015).
29. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. **8**, 315–317 (2006).
30. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 726–736 (2008).
31. Gori, J. L., Butler, J.M., Kunar, B., *et al.* Endothelial cells promote expansion of long-term engrafting marrow hematopoietic stem and progenitor cells in primates. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 864–876 (2017).
32. Zipori, D. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells* **23**, 719–726 (2005).
33. Sobhani, A., Khanlarkhani, N., Baazm, M., *et al.* Multipotent stem cell and current application. *Acta Med. Iran.* **55**, 6–23 (2017).
34. Weissman, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. **100**, 157–68 (2000).
35. Chen, J., Chen, L., Zern, M., *et al.* The diversity and plasticity of adult hepatic progenitor cells and their niche. *Liver Int.* **37**, 1260–1271 (2017).
36. Serafini, M. & Verfaillie, C. Pluripotency in adult stem cells: state of the art. *Semin. Reprod. Med.* **24**, 379–388 (2006).
37. Challen, G.A., Boles, N., Lin, K.K.Y. & Goodell, M. A. Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry. A* **75**, 14–24 (2009).
38. Silva Junior, F. C. da, Odongo, F. C. A. & Dulley, F. L. Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **31**, 53–58 (2009).
39. Orkin, S. H. & Zon, L. I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**, 631–644 (2008).
40. Dimas Tadeu Covas. in *Transplante de células-tronco hematopoéticas* (eds. Voltarelli, J. C., Pasquini, R. & Ortega, E. T. .) 43–55 (Atheneu, 2009).
41. Mosaad, Y. M. Hematopoietic stem cells: An overview. *Transfus. Apher. Sci.* **51**, 68–82 (2014).
42. Moore, A. J. & Anderson, M. K. Dendritic cell development: a choose-your-own-adventure story. *Adv. Hematol.* **2013**, 949513 (2013).
43. Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P. & Holler, E. Graft-versus-host disease.

- Lancet*. **373**, 1550–1561 (2009).
44. Jacobsen L.O., Marks E.K., Robson M.J. & Mortality, Z. R. The effect of spleen protection on mortality following X-irradiation. *J Lab Clin Med*. **34**, 1538–43 (1949).
  45. Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T. R. & Shelton, E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J. Natl. Cancer Inst.* **12**, 197–201 (1951).
  46. Main, J. M. & Prehn, R. T. Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow. *J. Natl. Cancer Inst.* **15**, 1023–9 (1955).
  47. Ford, C. E., Hamerton, J. L., Barnes, D. W. & Loutit, J. F. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*. **177**, 452–4 (1956).
  48. Van Bekkum, D. W. & Vries, M. J.. *Radiation Chimaeras*. (Academic Press, 1967).
  49. Miescher, P. & Fauconnet, M. Evidence of different leukocytic groups in man. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **84**, 597–9 (1954).
  50. Dausset, J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol.* **20**, 156–166 (1958).
  51. Van rood, J. J., Eernisse, J. G. & Van Leeuwen, A. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature*. **181**, 1735–1736 (1958).
  52. Lochte, H. L., Levy, A. S., Guenther, D. M., *et al.* Prevention of delayed foreign marrow reaction in lethally irradiated mice by early administration of methotrexate. *Nature*. **196**, 1110–1111 (1962).
  53. Barnes, D. W., Corp, M. J., Loutit, J. F. & Neal, F. E. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow. Preliminary communication. *Br. Med. J.* **2**, 626–7 (1956).
  54. Uphoff, D. Genetic factors influencing irradiation protection by bone marrow. I. The F1 hybrid effect. *J. Natl. Cancer Inst.* **19**, 123–30 (1957).
  55. Thomas, E. D., Lochte, H. L., Lu, W. C. & Ferrebee, J. W. Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **257**, 491–496 (1957).
  56. Epstein, R. B., Storb, R., Ragde, H. & Thomas, E. D. Cytotoxic typing antisera for marrow grafting in littermate dogs. *Transplantation* **6**, 45–58 (1968).
  57. Epstein, R. B., Storb, R., Clift, R. A. & Thomas, E. D. Transplantation of stored allogeneic bone marrow in dogs selected by histocompatibility typing. *Transplantation* **8**, 496–501 (1969).
  58. Buckner, C. D., Epstein, R., Rudolph, R., *et al.* Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation in a patient with leukemia. *Blood*. **35**, (1970).

59. Thomas, E. D., Storb, R., Fefer, A., *et al.* Aplastic anaemia treated by marrow transplantation. *Lancet*. **1**, 284–9 (1972).
60. Thomas, E. D., Buckner, C.D., Banaji, M., *et al.* One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood*. **49**, 511–33 (1977).
61. Thomas, E. D., Flournoy, N., Buckner, C. D. & Clift, R. A. Cure of leukemia by marrow transplantation. *Leuk. Res.* **1**, 67–70 (1977).
62. Thomas, E. D. Bone marrow transplantation: a review. *Semin. Hematol.* **36**, 95–103 (1999).
63. Ljungman, P., Bregni, M., Brune, M., *et al.* Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant.* **45**, 219–234 (2010).
64. Sisler, I. Y., Koehler, E., Koyama, T., *et al.* Impact of conditioning regimen in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for children with acute myelogenous leukemia beyond first complete remission: a pediatric blood and marrow transplant consortium (pbmtc) study. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **15**, 1620–1627 (2009).
65. Yesilipek, M. A., Karasu, G., Kazik, M., *et al.* Posttransplant oral iron-chelating therapy in patients with beta-thalassemia major. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **27**, 374–379 (2010).
66. Palmer, J., Azevedo, W., Voltarelli, J. C. & Chao, N. in *Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas* (eds. Voltarelli, J. C., Pasquini, R. & Ortega, E. T. T.) 677–692 (Atheneu, 2009).
67. Van der Zouwen, B., Kruisselbrink, A., Jordanova, E., *et al.* Alloreactive effector t cells require the local formation of a proinflammatory environment to allow crosstalk and high avidity interaction with nonhematopoietic tissues to induce GVHD reactivity. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **18**, 1353–1367 (2012).
68. Voltarelli, J. C., Pasquini, R. & Ortega, E. T. T. in *Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas*. 57–92 (Atheneu, 2009).
69. Murphy, W. J., Kumar, V. & Bennett, M. Acute rejection of murine bone marrow allografts by natural killer cells and T cells. Differences in kinetics and target antigens recognized. *J. Exp. Med.* **166**, 1499–509 (1987).
70. Mattsson, J., Ringdén, O. & Storb, R. Graft failure after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **14**, 165–70 (2008).
71. Welniak, L. A., Blazar, B. R. & Murphy, W. J. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 139–170 (2007).



72. Socie, G. & Blazar, B. R. Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside. *Blood*. **114**, 4327–4336 (2009).
73. Wysocki, C. A., Panoskaltsis-Mortari, A., Blazar, B. R. & Serody, J. S. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*. **105**, 4191–9 (2005).
74. Braun, M. Y., Lowin, B., French, L., *et al.* Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* **183**, 657–61 (1996).
75. Nassereddine, S., Rafei, H., Elbahesh, E. & Tabbara, I. Acute graft versus host disease: a comprehensive review. *Anticancer Res.* **37**, 1547–1555 (2017).
76. Shlomchik, W. D. Graft-versus-host disease. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 340–352 (2007).
77. Bleakley, M. & Riddell, S. R. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat. Rev. Cancer.* **4**, 371–380 (2004).
78. Korngold, R. & Sprent, J. Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. *J. Exp. Med.* **148**, 1687–98 (1978).
79. Zhang, P., Chen, B. J. & Chao, N. J. Prevention of GVHD without losing GVL effect: windows of opportunity. *Immunol. Res.* **49**, 49–55 (2011).
80. Negrin, R. S. Graft-versus-host disease versus graft-versus-leukemia. *Hematology*. **2015**, 225–230 (2015).
81. Horowitz, M. M., Gale, R., Sondel, P., *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. **75**, 555–562 (1990).
82. Cho, B.S. & Chung, N.G. The role of B cells in acute graft-versus-host disease. *Korean J. Hematol.* **46**, 287–8 (2011).
83. Stenger, E. O., Turnquist, H. R., Mapara, M. Y. & Thomson, A. W. Dendritic cells and regulation of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia activity. *Blood*. **119**, 5088–103 (2012).
84. Henden, A. S. & Hill, G. R. Cytokines in graft-versus-host disease. *J. Immunol.* **194**, 4604–12 (2015).
85. Hsu, K. C., Gooley, T., Malkki, M., *et al.* KIR ligands and prediction of relapse after unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **12**, 828–36 (2006).
86. Ruggeri, L., Mancusi, A., Burchielli, E., *et al.* NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells, Mol. Dis.* **40**, 84–90 (2008).
87. Van den Berg, H., Kluin, P. M. & Vossen, J. M. Early reconstitution of

- haematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective histopathological study of bone marrow biopsy specimens. *J. Clin. Pathol.* **43**, 365–9 (1990).
88. Vigorito, A. C. & De Souza, C. A. Transplante de células-tronco hematopoéticas e a regeneração da hematopoese. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **31**, 280–284 (2009).
  89. Marin, G. H., Mendez, M.C., Menna, M.E., *et al.* Immune recovery after bone marrow and peripheral blood stem cells transplantation. *Transplant. Proc.* **31**, 2582–4 (1999).
  90. Antin, J. H. Immune reconstitution: the major barrier to successful stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **11**, 43–5 (2005).
  91. Keever, C. A., Small, T.N., Flomenberg, N., *et al.* Immune reconstitution following bone marrow transplantation: comparison of recipients of T-cell depleted marrow with recipients of conventional marrow grafts. *Blood.* **73**, 1340–50 (1989).
  92. Bernstein, S. H., Nademanee, A.P., Vose, J.M., *et al.* A multicenter study of platelet recovery and utilization in patients after myeloablative therapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* **91**, 3509–17 (1998).
  93. Bader, P., Niethammer, D., Willasch, A., *et al.* How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant.* **35**, 107–119 (2005).
  94. McCann, S. R. & Lawler, M. Mixed chimaerism; detection and significance following BMT. *Bone Marrow Transplant.* **11**, 91–4 (1993).
  95. Alizadeh, M., Bernard, M., Danic, B., *et al.* Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood.* **99**, 4618–25 (2002).
  96. Collin, M. P., Hart, D., Jackson, G.H., *et al.* The fate of human Langerhans cells in hematopoietic stem cell transplantation. *J. Exp. Med.* **203**, 27–33 (2006).
  97. Geddes, M. & Storek, J. Immune reconstitution following hematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **20**, 329–348 (2007).
  98. Fry, T. J. & Mackall, C. L. Immune reconstitution following hematopoietic progenitor cell transplantation: challenges for the future. *Bone Marrow Transplant.* **35**, S53–S57 (2005).
  99. Williams, K. M. & Gress, R. E. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **21**, 579–596 (2008).
  100. Mir, M. A. & Battiwalla, M. Immune deficits in allogeneic hematopoietic stem cell transplant (HSCT) Recipients. *Mycopathologia.* **168**, 271–282 (2009).

101. Abrahamsson, S. & Muraro, P. A. Immune re-education following autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Autoimmunity*. **41**, 577–584 (2008).
102. Ortaldo, J. R. & Herberman, R. B. Heterogeneity of Natural Killer Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2**, 359–394 (1984).
103. Kondo, M., Weissman, I. L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. **91**, 661–72 (1997).
104. Colucci, F., Caligiuri, M. A. & Di Santo, J. P. What does it take to make a natural killer? *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 413–425 (2003).
105. Márquez, C., Trigueros, C., Franco, J.M., *et al.* Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood*. **91**, 2760–71 (1998).
106. Perez, S. A., Sotiropoulou, P.A., Gkika, D.G., *et al.* A novel myeloid-like NK cell progenitor in human umbilical cord blood. *Blood* **101**, 3444–3450 (2003).
107. Miller, J. S., Alley, K. A. & McGlave, P. Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34+7+ NK progenitor. *Blood*. **83**, 2594–601 (1994).
108. Chen, Q., Ye, W., Jian Tan, W., *et al.* Delineation of natural killer cell differentiation from myeloid progenitors in human. *Sci. Rep.* **5**, 1–12 (2015).
109. Freud, A. G. & Caligiuri, M. A. Human natural killer cell development. *Immunol. Rev.* **214**, 56–72 (2006).
110. Freud, A. G., Yu, J. & Caligiuri, M. a. Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Semin. Immunol.* **26**, 132–7 (2014).
111. Yu, J., Freud, A. G. & Caligiuri, M. A. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol.* **34**, 573–82 (2013).
112. Campbell, K. S. & Hasegawa, J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 536–44 (2013).
113. Moretta, L., Bottino, C., Pen, D., *et al.* Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunol. Lett.* **100**, 7–13 (2005).
114. Newman, K. C. & Riley, E. M. Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 279–291 (2007).
115. Ritz, J., Schmidt, R. E., Michon, J., *et al.* Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv. Immunol.* **42**, 181–211 (1988).
116. Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., *et al.* Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.*

- 19**, 197–223 (2001).
117. McQueen, K. L. & Parham, P. Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 615–21 (2002).
  118. Yang, J. J., Ye, Y., Carroll, A., *et al.* W. Structural biology of the cell adhesion protein CD2: alternatively folded states and structure-function relation. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2**, 1–17 (2001).
  119. Carman, C. V & Springer, T. A. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 547–56 (2003).
  120. Raulet, D. H. Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Semin. Immunol.* **18**, 145–50 (2006).
  121. Bix, M. *et al.* Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature.* **349**, 329–331 (1991).
  122. Guillerey, C., Huntington, N. D. & Smyth, M. J. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat. Immunol.* **17**, 1025–1036 (2016).
  123. Kenneth Murphy, Travers, P. & Walport, M. *Imunobiologia de Janeway.* (2010).
  123. Becker, P. S. A., Suck, G., Nowakowska, P., *et al.* Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **65**, 477–484 (2016).
  124. Montaldo, E., Zotto, G., Chiesa, M., *et al.* Human NK cell receptors/markers: A tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytom. Part A* **83A**, 702–713 (2013).
  125. Knorr, D. A., Bachanova, V., Verneris, M. R. & Miller, J. S. Clinical utility of natural killer cells in cancer therapy and transplantation. *Semin. Immunol.* **26**, 161–172 (2014).
  126. Moretta, L. Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood.* **116**, 3689–91 (2010).
  127. Lopez-Vergès, S., Milush, J.M., Pandey, S., *et al.* CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood.* **116**, 3865–74 (2010).
  128. Deng, L. & Mariuzza, R. a. Structural basis for recognition of MHC and MHC-like ligands by natural killer cell receptors. *Semin. Immunol.* **18**, 159–66 (2006).
  129. Kruse, P. H., Matta, J., Ugolini, S. & Vivier, E. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol. Cell Biol.* **92**, 221–9 (2014).
  130. Velardi, A. Role of KIRs and KIR ligands in hematopoietic transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 581–7 (2008).
  131. Long, E. O., Sik Kim, H., Liu, D., *et al.* Controlling natural killer cell responses:

- integration of signals for activation and inhibition. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 227–258 (2013).
132. Moretta, L., Locatelli, F., Pende, D., *et al.* Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* **117**, 764–71 (2011).
  133. Velardi, A., Ruggeri, L., Mancusi, A., *et al.* Natural killer cell allorecognition of missing self in allogeneic hematopoietic transplantation: a tool for immunotherapy of leukemia. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 525–30 (2009).
  134. Hoving, J. C., Wilson, G. J. & Brown, G. D. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell. Microbiol.* **16**, 185–94 (2014).
  135. Farag, S. S., Fehniger, T. A., Ruggeri, L., *et al.* Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood.* **100**, 1935–1948 (2002).
  136. Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., *et al.* Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature.* **409**, 1055–1060 (2001).
  137. Esin, S., Batoni, G., Pardini, M., *et al.* Functional characterization of human natural killer cells responding to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *Immunology.* **112**, 143–52 (2004).
  138. Lee, D. A., Denman, C.J., Rondon, G., *et al.* Haploidentical natural killer cells infused before allogeneic stem cell transplantation for myeloid malignancies: a phase I trial. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **22**, 1290–1298 (2016).
  139. Spanholtz, J., Tordoir, M., Eissens, D., *et al.* High Log-Scale Expansion of Functional Human Natural Killer Cells from Umbilical Cord Blood CD34-Positive Cells for Adoptive Cancer Immunotherapy. *PLoS One* **5**, e9221 (2010).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, foi possível detectar a presença de células *Natural Killer* precocemente, 7 dias após a realização do transplante alogênico e autólogo de células tronco-hematopoéticas, achado ainda não descrito na literatura. Além disso, a produção das citocinas IL-3, GM-CSF e TGF- $\beta$ 1 também foram encontradas pela primeira no período precoce de recuperação imunológica pós TCTH.

Esses dados sugerem que as células NK têm a capacidade de produzir fatores de crescimento hematopoiético e citocinas relacionadas, o que pode contribuir para o restabelecimento da hematopoese após o TCTH, prevenir a DECH e melhorar a pega do enxerto.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo foi pioneiro na análise precoce das células *Natural Killer* pós-TCTH. A partir desses resultados, para se avaliar a possível correlação da presença das células NK com a prevenção da DECH, com aumento do efeito enxerto-versus-leucemia, bem como a melhora da pega do enxerto, é necessário a continuidade do estudo com um número maior de participantes. Além disso, métodos complementares de análise devem ser implementados para corroborar com os resultados já encontrados. É importante ser identificado se as células NK encontradas em D7 são provenientes do enxerto ou se são remanescentes do receptor. Uma vez que as células NK são os primeiros linfócitos a se recuperarem após o TCTH, essa análise demonstra a influência do quimerismo entre doador e receptor na reconstituição da hematopoese e da recuperação do sistema imune.

## ANEXO 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (GRUPO DOADOR DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS)

Prezado participante,

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa: “**CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS NATURAL KILLER NO PROCESSO DE RECONSTITUIÇÃO IMUNE PÓS-TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS E SUA INFLUÊNCIA NA PEGA DO ENXERTO**” realizado pelo Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Você está sendo convidado a participar deste estudo porque você já é um doador voluntário de medula óssea que irá realizar o procedimento nesta Instituição.

Uma das complicações mais comuns do Transplante de Medula Óssea é a reação dos glóbulos brancos do doador contra o receptor, a chamada Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH).

Nos últimos anos, pesquisas revelam que um determinado tipo de glóbulo branco, as células *Natural killer* (NK), são capazes de promover a pega da medula no receptor e prevenir contra o desenvolvimento da DECH.

Este projeto de pesquisa pretende analisar e caracterizar essas células tanto do doador como do receptor de medula óssea, correlacionando essas características com o processo de recuperação imune e com a pega da medula no receptor, analisando a capacidade das células *NK* de prevenir o desenvolvimento da DECH.

Os dados necessários para realização do projeto serão obtidos através de análise de prontuários e uma coleta de 4 ml de sangue que serão colhidos da sua veia. Este procedimento pode provocar um leve desconforto no momento da coleta, no local onde a agulha for introduzida surgir uma área vermelha ou até mesmo roxa (hematoma) na pele, mas que desaparecerá com o decorrer do tempo.

O material coletado será utilizado para análise da expressão genética para fins de pesquisa no entendimento do mecanismo de recuperação imune do receptor após a realização do transplante de medula óssea.

A participação no estudo não trará benefício direto ao participante, porém contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado e os resultados poderão auxiliar a realização de estudos futuros.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante também não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

As informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do participante a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, garantido assim o anonimato das informações obtidas, reservando apenas ao participante ou familiar o acesso às mesmas.

Ressaltando que sua participação é voluntária, você tem a liberdade de recusar ou retirar o consentimento em qualquer fase do estudo sem nenhum prejuízo para você.



Ressaltando que sua participação é voluntária, você tem a liberdade de recusar ou retirar o consentimento em qualquer fase do estudo sem nenhum prejuízo para você.

Todas as dúvidas poderão ser esclarecidas antes e durante o curso da pesquisa, através do contato com o pesquisador(a) responsável: Dra. Lucia Silla – (51) 33598317 e Pesquisador (a) executor: Alice Dahmer Gonçalves – (51) 33598850, de segunda a sexta no serviço de Hematologia Clínica do HCPA.

Em caso de dúvida em relação ao conteúdo ético desta pesquisa, não hesite em contatar o Comitê de Ética e Pesquisa do HCPA – (51) 33597640, de segunda à sexta, das 08h às 17h.

Este documento é fornecido em duas vias, sendo uma do participante e outra do pesquisador.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Fui igualmente informado de receber esclarecimentos sobre a pesquisa a ser realizada, da liberdade de não participar do estudo, do anonimato e caráter confidencial das informações.

Data:    /    /    .

Nome do paciente ou responsável:

Assinatura do paciente ou responsável:

Documento de identificação:

Grau de parentesco do responsável:

Assinatura do médico:

Nº de registro:



TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Serviço de Hematologia Clínica

TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

## ANEXO 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (GRUPO DOADOR DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS)

Prezado participante,

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa: “**CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS NATURAL KILLER NO PROCESSO DE RECONSTITUIÇÃO IMUNE PÓS-TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS E SUA INFLUÊNCIA NA PEGA DOENXERTO**” realizado pelo Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Você está sendo convidado a participar deste estudo porque você já é um doador voluntário de medula óssea que irá realizar o procedimento nesta Instituição.

Uma das complicações mais comuns do Transplante de Medula Óssea é a reação dos glóbulos brancos do doador contra o receptor, a chamada Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH).

Nos últimos anos, pesquisas revelam que um determinado tipo de glóbulo branco, as células *Natural killer* (NK), são capazes de promover a pega da medula no receptor e prevenir contra o desenvolvimento da DECH.

Este projeto de pesquisa pretende analisar e caracterizar essas células tanto do doador como do receptor de medula óssea, correlacionando essas características com o processo de recuperação imune e com a pega da medula no receptor, analisando a capacidade das células *NK* de prevenir o desenvolvimento da DECH.

Os dados necessários para realização do projeto serão obtidos através de análise de prontuários e uma coleta de 4 ml de sangue que serão colhidos da sua veia. Este procedimento pode provocar um leve desconforto no momento da coleta, no local onde a agulha for introduzida e poderá surgir uma área vermelha ou até mesmo roxa (hematoma) na pele, mas que desaparecerá com o decorrer do tempo.

O material coletado será utilizado para análise da expressão genética para fins de pesquisa no entendimento do mecanismo de recuperação imune do receptor após a realização do transplante de medula óssea.

A participação no estudo não trará benefício direto ao participante, porém contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado e os resultados poderão auxiliar a realização de estudos futuros.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante também não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

As informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do participante a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, garantido assim o anonimato das informações obtidas, reservando apenas ao participante ou familiar o acesso às mesmas.

Ressaltando que sua participação é voluntária, você tem a liberdade de recusar ou retirar o consentimento em qualquer fase do estudo sem nenhum prejuízo para você.

Todas as dúvidas poderão ser esclarecidas antes e durante o curso da pesquisa, através do contato com o pesquisador(a) responsável: Dra. Lucia Silla – (51) 33598317 e Pesquisador (a) executor: Alice Dahmer Gonçalves – (51) 33598850, de segunda a sexta no serviço de Hematologia Clínica do HCPA.

Em caso de dúvida em relação ao conteúdo ético desta pesquisa, não hesite em contatar o Comitê de Ética e Pesquisa do HCPA – (51) 33597640, de segunda à sexta das 08h às 17h.

Este documento é fornecido em duas vias, sendo uma do participante e outra do pesquisador.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Fui igualmente informado de receber esclarecimentos sobre a pesquisa a ser realizada, da liberdade de não participar do estudo, do anonimato e caráter confidencial das informações.

Data:    /    /    .

Nome do paciente ou responsável:

Assinatura do paciente ou responsável:

Documento de identificação:

Grau de parentesco do responsável:

Assinatura do médico:

Nº de registro:



TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Serviço de Hematologia Clínica

TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

## ANEXO 3



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

## COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

**Projeto:** 150509

**Data da Versão do Projeto:** 26/10/2015

**Pesquisadores:**

ALICE DAHMER GONÇALVES

LUCIA MARIANO DA ROCHA SILLA

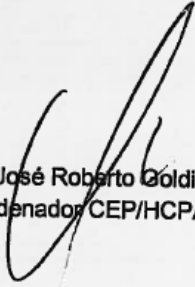
**Título:** CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS NATURAL KILLER NO PROCESSO DE RECONSTITUIÇÃO IMUNE PÓS-TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS E SUA INFLUÊNCIA NA PEGA DO ENXERTO.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.  
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 15 de abril de 2016.

  
Prof. José Roberto Goldim  
Coordenador CEP/HCPA