

Espectro de Atividade NK em um Pequeno Grupo Populacional Brasileiro

LUCIA DE LA ROCQUE^{1,4}, MARIANO ZALIS¹, JOÃO GOULART², VIVIAN M. RUMJANEK³

Instituto Nacional de Câncer — Rio de Janeiro, RJ

Resumo

Um painel de atividade NK nos indivíduos normais de nossa população foi obtido através da realização de 221 ensaios em 40 indivíduos, sendo 26 do sexo masculino e 14 do sexo feminino; um padrão próprio de atividade NK para as pessoas testadas com maior frequência foi encontrado, apesar da grande variabilidade intra-individual. Não foi encontrada diferença significativa entre a atividade NK de homens e mulheres e entre as diversas faixas etárias, sendo a literatura controversa em relação a esses parâmetros. Apesar do pequeno número de indivíduos testados, nossos dados coincidem com os obtidos de populações norte-americanas. A semelhança dos resultados apresentados pode decorrer do fato de a maioria de nossa amostra ser extraída de um padrão sócio-econômico elevado, não apresentando problemas de desnutrição, embora envolvesse pessoas de diferentes origens étnicas.

Unitermos: atividade NK; população normal

Introdução

Há cerca de 15 anos, durante estudos de citotoxicidade celular específica mediada por linfócitos contra células tumorais, verificou-se que linfócitos de indivíduos normais eram capazes de destruir essas células tumorais, apresentando uma citotoxicidade igual ou até maior do que a de indivíduos dos quais as linhagens tumorais haviam sido extraídas¹. Esta citotoxicidade natural passou a ser chamada de atividade "natural killer" ou atividade NK².

A continuação dos estudos acerca dessa atividade demonstrou que ela não agia somente contra linhagens de células tumorais, mas também contra células modificadas por certas infecções; esta^{3,4} e outras evidências^{5,6} ligaram a citotoxicidade NK a um papel fundamental na vigilância imunológica. Além desse papel, foram associados a esta atividade os controles da formação de anticorpos^{7,8} e da hematopoiese^{9,10}, o que implicaria em um envolvimento da atividade NK no controle celular em geral.

Não são apenas evidências experimentais que apontam para uma relevância *in vivo* da atividade NK; a síndrome de Chediak-Higashi, doença cromossômica que determina, entre outros defeitos, a falta quase que absoluta de atividade NK¹¹ está associada a uma alta incidência de doenças linfoproliferativas. Há outras doen-

ças em que a atividade NK, apesar de não totalmente ausente, pode estar significativamente abaixo do normal. É o que parece ocorrer em algumas neoplasias e certas doenças parasitárias e infecto-contagiosas^{12,13,14,15}. Por outro lado não são detectadas somente patologias que tendem a diminuir a atividade. Há víruses que sabidamente elevam a mesma¹⁶ e, em relação a doenças parasitárias e infecto-contagiosas sabe-se que a atividade NK pode encontrar-se aumentada, diminuída ou mesmo inalterada dependendo do agente causador ou estágio da doença^{4,17,18,19}.

É possível que nos seres humanos normais a atividade NK seja modulada *in vivo* por uma série de parâmetros intrínsecos, tais como fatores genéticos e outras características como o sexo e a idade do indivíduo estudado. Já foram realizados estudos em populações norte-americanas^{20,21,22} com níveis sócio-econômicos elevados, condições nutricionais bem diferentes das nossas e exposições a antígenos também diversos. Alguns desses fatores, como por exemplo o nutricional, já foram estudados de forma experimental^{23,24}, e, nesses casos, a desnutrição diminuiu a atividade NK. Certos hábitos sociais, como o fumo e o consumo elevado de álcool, também parecem modular essa atividade no homem^{25,26,27}.

Como não existia um parâmetro de medida da atividade NK na população brasileira, investigamos os ní-

veis da mesma em um grupo de indivíduos, concentrando-nos em voluntários saudáveis, a maioria de nosso laboratório, na faixa etária entre 20 e 40 anos.

Materiais e métodos

Reagentes

Meio RPMI 1640 (SIGMA) foi suplementado com $5 \times 10^{-5}M$ de β -mercaptoetanol, 2mM de glutamina, 25mM de tampão hepes, 60mg/l de penicilina e 100mg/l de estreptomicina.

Soro fetal bovino (CUTILAB, Campinas) foi adicionado na concentração de 5% ao meio descrito acima, que foi então chamado de meio completo.

Ficoll-Hipaque foi preparado com 5,9g/100ml de Ficoll (SIGMA) e 9g/100ml de Hipaque (CEME) para a densidade de 1,077.

Salina tamponada com fosfato (PBS) foi utilizada para lavagem de células.

Fungizona (SQUIBB) foi diluída a 25mg/ml em meio de cultura, aliquotada, estocada a $-20^{\circ}C$ e diluída 100 vezes para ser adicionada ao meio completo quando este foi utilizado para a passagem de células.

^{51}Cr (IPEN), com atividade específica de aproximadamente 1500Bq/ml de Cr, diluído em salina sob a forma de $Na_2^{51}CrO_4$.

Células efetoras

Sangue heparinizado foi obtido através de punção venosa. A retirada do sangue, na maior parte das vezes, foi feita na manhã do experimento. Algumas vezes, no entanto, esta foi feita no dia anterior, tendo sido o sangue guardado a $4^{\circ}C$, não havendo diferença no resultado final. O sangue foi então diluído pela metade com PBS e colocado em cima de uma camada de Ficoll-Hipaque, na proporção de 4 de Ficoll-Hipaque para 5 de sangue diluído. Após centrifugação por 20 minutos a 400g, o anel de mononucleares totais foi coletado com uma pipeta Pasteur e lavado duas vezes em PBS. As células foram então novamente suspensas a 5×10^6 cels/ml em meio completo e empregadas como efetoras no ensaio NK. Este tipo de células, neste trabalho, será denominado células mononucleares totais.

Células-alvo

A linhagem eritroleucêmica K562 foi mantida em meio completo, ao qual era adicionado 0,25 μ g/ml de fungizona. O repique das mesmas foi feito duas vezes por semana, e, no dia anterior ao experimento, o volume destas células era dobrado com meio completo. Estas foram mantidas a $37^{\circ}C$, numa atmosfera com 5% de CO_2 .

Ensaio NK

A atividade NK foi determinada através da medida de liberação de ^{51}Cr das células-alvo marcadas. Células efetoras foram misturadas, em placas de 96 poços, de fundo chato ou em V, em diversas proporções (100:1, 50:1, 25:1, 12,5:1, 6,25:1, 3,12:1 e 1,06:1) com 5×10^3 células-alvo marcadas. A mistura foi feita sempre em meio completo e o volume final em cada poço foi 200 μ l. Esta foi deixada incubando por 4 horas, a $37^{\circ}C$, numa atmosfera de 5% de CO_2 ; ao final desse tempo 100 μ l do sobrenadante foram recolhidos e contados num contador gama.

A lise é proporcional às contagens, segundo a fórmula:

$$\% \text{ lise} = \frac{\text{c.p.m. experimental} - \text{c.p.m. liberação espontânea}}{\text{c.p.m. total} - \text{c.p.m. liberação espontânea}} \times 100$$

O total foi obtido pela medida de ^{51}Cr da mesma quantidade de células-alvo que foi colocada em cada poço. A liberação espontânea foi recolhida ao final dos experimentos, de poços aonde haviam sido colocadas células-alvo com meio completo ao invés de células efetoras, e geralmente não excedeu 15% do total.

Cada ponto experimental foi feito em duplicata, correspondendo os resultados apresentados à média das mesmas.

Resultados

Distribuição da atividade NK nos ensaios

A Figura 1 mostra a distribuição da atividade NK em

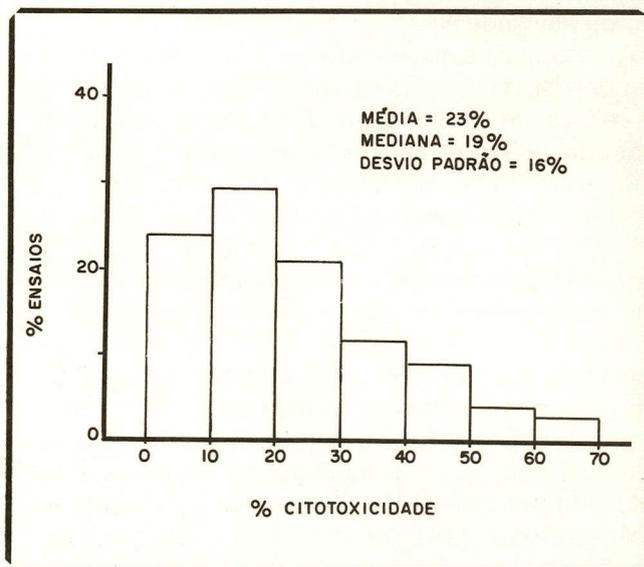


Figura 1 — Distribuição da atividade NK nos ensaios de 4 horas de duração.

Células mononucleares totais de 40 indivíduos foram testadas de 1 a 46 vezes contra a célula-alvo K562 na razão efetora: alvo de 50:1.

221 ensaios de indivíduos saudáveis, na razão efetora: alvo de 50:1. Esta razão foi escolhida porque, muitas vezes, os indivíduos na razão de 100:1 apresentavam uma queda de citotoxicidade, fato esse também encontrado por outros pesquisadores e não bem compreendido. De agora em diante, os dados de atividade NK serão sempre apresentados nesta razão, a menos que especificado de outra maneira.

A média destes ensaios foi de 23% e se aproxima bastante da mediana, que foi 19%. A distribuição destes ensaios, no entanto, não segue uma distribuição normal já que estes se concentram muito para a esquerda.

Estes ensaios representam 40 indivíduos, de ambos os sexos, testados de 1 a 46 vezes, cobrindo um período de testes de 3 anos.

Distribuição das atividades NK nos indivíduos

Para impedir que a distribuição acima, em vez de caracterizar a distribuição da atividade NK na população estudada, estivesse refletindo na realidade a atividade dos indivíduos testados um número maior de vezes, tomou-se a mediana dos ensaios de todos os indivíduos testados, de modo que cada indivíduo contribuisse apenas com um valor, e os resultados foram colocados em um gráfico (Figura 2).

A distribuição encontrada foi muito semelhante, com média de 23% e mediana de 18,5%, parecendo então

que a distribuição da atividade NK nos ensaios está refletindo realmente a distribuição encontrada na população estudada.

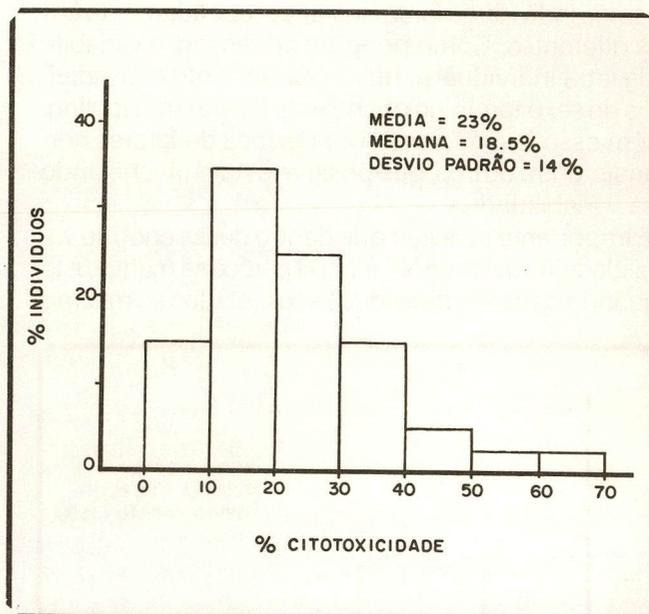


Figura 2 — Distribuição da atividade NK nos indivíduos normais em ensaios de 4 horas de duração.

Células mononucleares totais de 40 indivíduos foram testadas de 1 a 46 vezes contra a célula-alvo K562 na razão efetora: alvo de 50:1. A mediana desses dados foi calculada para cada indivíduo e utilizada como dado representativo de sua atividade NK.

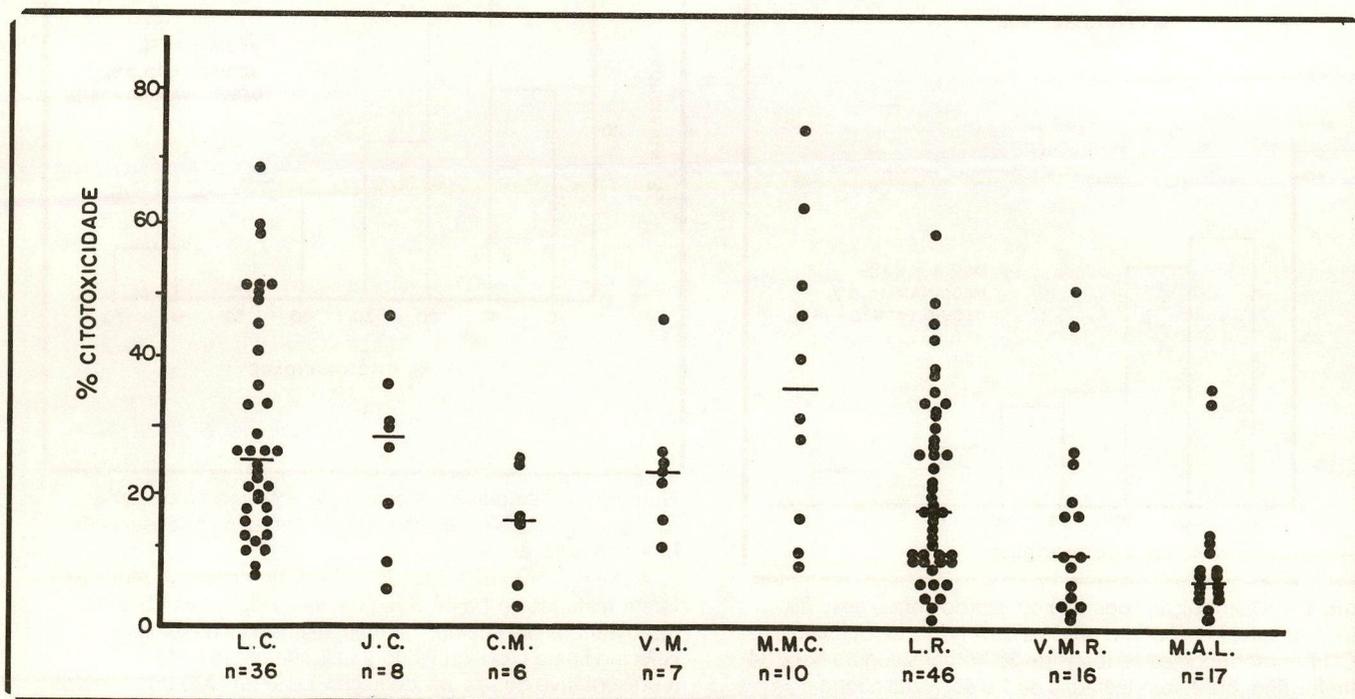


Figura 3 — Variação individual da atividade NK em ensaios de 4 horas de duração. Células mononucleares totais de 8 indivíduos diferentes foram testadas em vários ensaios contra a célula alvo K562, na razão efetora: alvo de 50:1. As letras representam iniciais dos vários doadores, os 5 primeiros sendo do sexo masculino e os 4 restantes do sexo feminino; *n* representa o número de ensaios e a mediana está indicada pela linha horizontal.

Varição individual

A Figura 3 mostra os resultados obtidos quando os mesmos indivíduos foram testados repetidamente em dias diferentes. Como pode ser verificado, a variabilidade intra-individual é muito grande, tanto nos indivíduos de sexo feminino quanto nos de sexo masculino. Porém esse fato não exclui a presença de fatores hormonais, entre outros, que possam estar influenciando essa variabilidade.

É importante ressaltar que dentro dessa enorme variabilidade, a atividade NK relativa parece se manter, isto é, quando os vários indivíduos são testados ao mesmo

tempo, alguns sempre tendem a apresentar uma citotoxicidade maior que outros e vice-versa.

Influência do sexo na atividade NK

As Figuras 4 e 5 mostram os resultados obtidos quando foi comparada a atividade NK em ensaios e indivi-

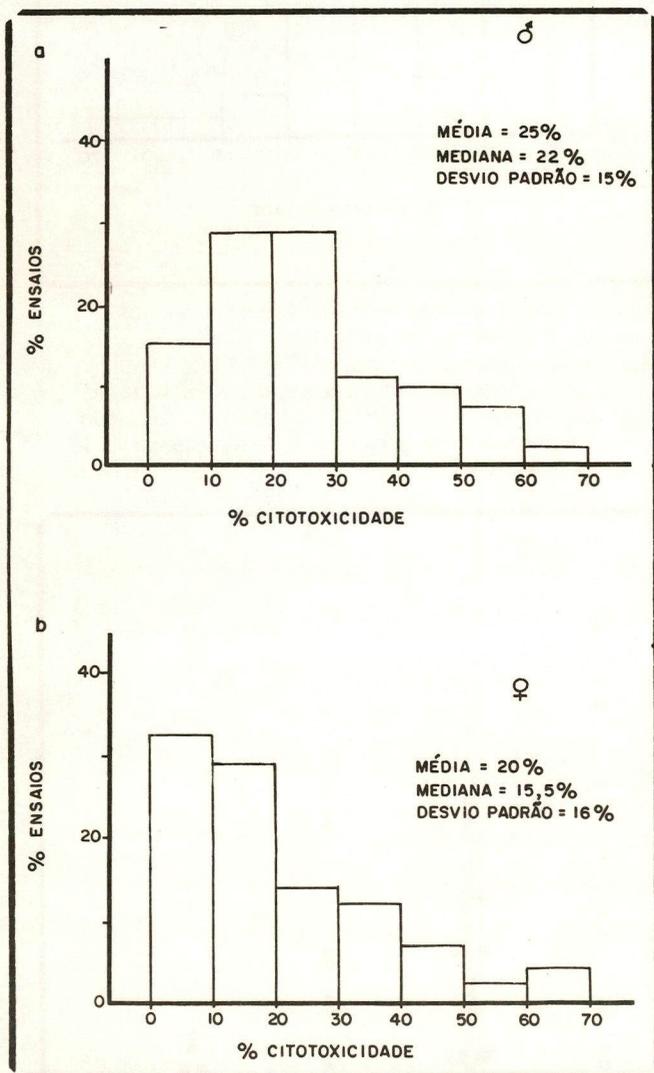


Figura 4 — Distribuição separada de acordo com o sexo do doador, da atividade NK em ensaios de 4 horas de duração.

Células mononucleares totais de 26 homens (Figura 8a) e 14 mulheres (Fig. 8b) foram testadas de 1 a 46 vezes contra a célula-alvo K562 na razão efetora: alvo de 50:1.

Comparando-se estes dados de atividade NK relativos aos ensaios dos homens e das mulheres, não há diferença significativa entre os mesmos, sendo $P > 0,05$ (teste da soma das ordens de Wilcoxon).

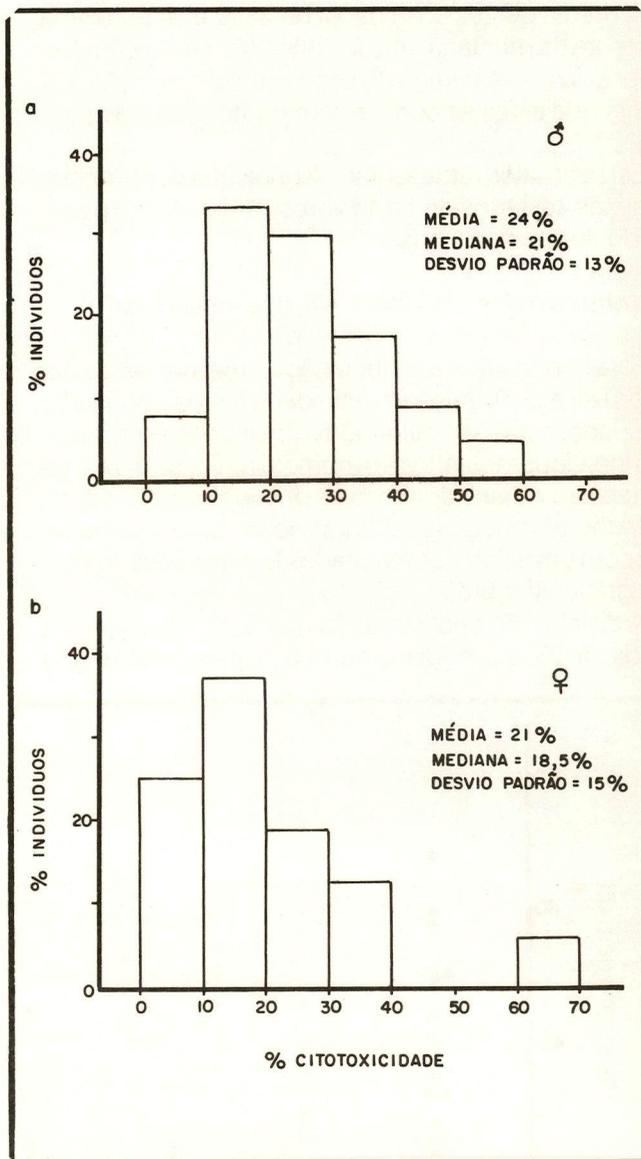


Figura 5 — Distribuição, separada de acordo com o sexo do doador, da atividade NK de vários indivíduos em ensaios de 4 horas de duração.

Células mononucleares totais de 26 homens e 14 mulheres foram testadas de 1 a 46 vezes contra a célula alvo K562 na razão efetora: alvo de 50:1. A mediana desses dados foi calculada para cada indivíduo e utilizada como dado representativo de sua atividade NK, tanto no caso dos homens (Fig. 9a) quanto das mulheres (Fig. 9b).

Comparando-se estes dados de atividade NK relativos às medianas dos ensaios dos homens e das mulheres, não há diferença significativa entre os mesmos, sendo $P > 0,05$ (teste da soma das ordens de Wilcoxon).

duos dos dois sexos. Foram feitos 114 ensaios em 24 indivíduos do sexo masculino, e 107 ensaios em 16 indivíduos do sexo feminino.

Comparando os gráficos de distribuição dessa atividade nos homens e nas mulheres, principalmente no dos ensaios e levando-se em consideração as diferentes medianas, pode parecer, à primeira vista, que os indivíduos de sexo masculino têm atividade NK mais alta que os de sexo feminino. Contudo, não existe diferença significativa entre os dois sexos.

Influência da idade na atividade NK

A Figura 6 mostra os resultados obtidos quando foram testados indivíduos na faixa etária de 21 a 30 anos, 31 a 40, 41 a 50, e de mais de 50 anos. Apesar do pequeno número de indivíduos mais idosos testados, não foi detectada nenhuma diferença significativa entre a atividade NK nas várias faixas etárias.

Discussão

Num dos maiores estudos realizados na literatura, cobrindo 539 indivíduos saudáveis²², Pross e Baines verificaram que a atividade NK não variava com grupo sanguíneo ABO ou Rh, ou com o HLA. No entanto, outros autores encontraram diferenças nesta atividade citotóxica em relação a estes dois últimos parâmetros^{28,29}. No nosso estudo, estes mesmos parâmetros não foram levados em consideração, mas nele incluímos indivíduos de diferentes origens étnicas, com diversos graus de miscigenação. O fator racial foi estudado por outros grupos^{30,31}. Hellstrom e col.³⁰ encontraram uma maior citotoxicidade em linfócitos de indivíduos saudáveis de raça negra em relação aos de raça branca contra uma linhagem de melanoma. No entanto, Oldham e col.³¹, testando a atividade citotóxica de linfócitos de indivíduos normais contra várias linhagens, incluindo uma de melanoma, não verificaram diferença de reatividade

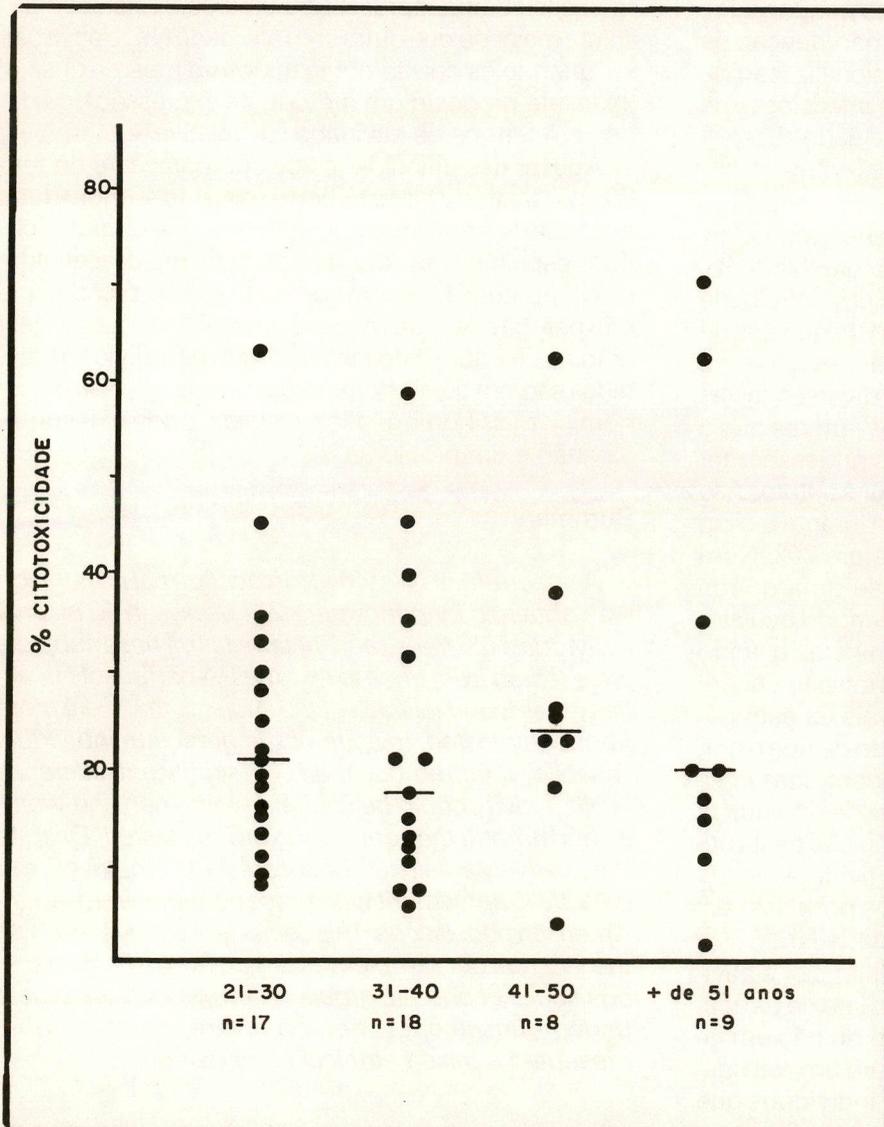


Figura 6 — Distribuição, separada de acordo com a idade do doador, da atividade NK de vários indivíduos em ensaios de 4 horas de duração.

Células mononucleares totais de 49 indivíduos foram testadas de 1 a 46 vezes contra a célula alvo K562 na razão efetora: alvo de 50:1. A mediana desses dados foi calculada para cada indivíduo e utilizada como dado representativo de sua atividade NK. *n* representa o número de indivíduos e a mediana de cada faixa etária está indicada pela linha horizontal.

Comparando-se estes dados de atividade NK relativos às medianas dos ensaios dos indivíduos das diversas faixas etárias, não há diferença significativa entre os mesmos, sendo $P > 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis).

de entre as diversas raças. A nossa mostra, por ser relativamente pequena, não nos permite qualquer afirmação a esse respeito.

Nos seres humanos a atividade NK já é detectável nos recém-nascidos, embora a maioria dos autores concorde que, nesses, a atividade NK é bem menor do que nos adultos^{21,22,32}. Esta citotoxicidade parece aumentar durante um período da vida que ainda não se encontra bem estabelecido, havendo discordância entre os diversos autores. No entanto, uma vez atingidos os níveis adultos, estes não tendem a cair permanecendo, segundo alguns autores, inalterados^{20,21,31}, e segundo outros^{22,32,33}, tendendo mesmo a sofrer com a idade um pequeno, mas significativo aumento. Nossos resultados³⁴ se encaixam bem com a literatura. Embora a atividade NK em crianças normais não tenha sido testada e a grande maioria da nossa amostra tenha se concentrado na faixa de 20 a 40 anos, não encontramos nenhuma diminuição com a idade, apesar de nossa amostra acima de 50 anos ter sido muito pequena. Parece, então, que nos seres humanos a manutenção da atividade NK com a idade destrói a racionalização de que o aumento de tumores e doenças infecciosas na velhice possa ser resultado de uma atividade citotóxica natural deficiente²².

Em nosso trabalho, não detectamos diferença significativa entre a atividade NK de homens e mulheres, o que está de acordo com parte da literatura^{20,28,35}. Porém certos autores^{22,29,32} detectaram uma atividade maior nos indivíduos de sexo masculino do que nos de sexo feminino. Embora essa diferença entre homens e mulheres tenha sido encontrada em diversas faixas etárias^{22,32}, foi sugerido por alguns dos autores que a encontraram³², que fatores hormonais pudessem ter alguma influência na atividade NK. Alguns autores não encontraram variação na atividade NK durante o ciclo menstrual³⁶, porém outros a encontraram^{37,38}. Num estudo mais detalhado³⁷, verificou-se uma queda abrupta nesta atividade por volta do período ovulatório, queda esta não encontrada em mulheres usando anticoncepcionais orais. A falta de correlação encontrada pelos mesmos autores entre níveis de estrogênio individuais e atividade NK e o achado de que o hormônio luteínico em concentrações encontradas *in vivo* durante o período ovulatório é capaz de diminuir *in vitro* esta citotoxicidade, além de diminuição desta atividade citotóxica relatada durante a gravidez³⁹, levou à sugestão³⁷ de que outros hormônios poderiam estar envolvidos na modulação da atividade NK.

Um outro fator que talvez possa influenciar a atividade NK em estudos de populações é o fato de os doadores das células efectoras trabalharem ou não em laboratórios. Há autores que demonstraram uma atividade citotóxica natural mais elevada em indivíduos que trabalham nestes ambientes¹, porém outros³¹ já não

encontraram tal correlação. O fato de a maioria de nossos controles normais trabalharem em laboratórios não nos possibilita qualquer afirmação a este respeito.

Em regra geral, os níveis de atividade NK encontrados variam muito de laboratório para laboratório. Isto pode ser explicado por diferenças em técnicas, sensibilidade da célula-alvo (uma mesma linhagem pode variar em sensibilidade de dia para dia) e pela própria maneira de expressar os dados, não se tendo ainda obtido um consenso sobre a maneira mais representativa de apresentação dos mesmos.

A variabilidade do ensaio chega a tal ponto que um mesmo indivíduo pode variar amplamente em sua atividade NK, quando testado em diferentes dias no mesmo laboratório^{22,40}, o que foi igualmente por nós encontrado, embora tal variação não tenha sido descrita por outros autores²⁰. No entanto, apesar de poder existir essa variação intra-individual, a atividade NK se mantém, isto é, um indivíduo com atividade NK relativa alta quase sempre apresentará uma citotoxicidade absoluta maior do que outro com atividade NK relativa baixa, quando os dois forem testados no mesmo ensaio. Já foi até proposto um método de expressão dos dados em termos de atividade NK relativa²².

Apesar das dificuldades de comparação e do fato de nosso estudo haver coberto somente 40 indivíduos testados de 1 a 46 vezes, acreditamos que os dados obtidos espelham razoavelmente o espectro da reatividade NK de indivíduos normais de nossa população, o que não parece diferir de maneira grosseira do que foi descrito na literatura. Isto talvez porque os indivíduos testados são, em geral, membros de uma classe sócio-econômica mais homogênea e elevada, onde a desnutrição não é um problema.

Summary

A spectrum of NK activity in our normal population was obtained by performing 221 essays in 40 normal individuals (26 males and 14 females). These subjects were tested from once to 46 times. A pattern of NK activity was found for each of the subjects that were more frequently tested, in spite of the great intraindividual variability found among them. No significant difference in NK activity could be seen between men and women and among the various age groups tested. Despite the relatively small number of subjects employed, our data are in agreement with those obtained from North-American populations. This coincidence may stem from the fact that our sample was drawn from a homogeneous social-economic group, relatively well-off, where undernourishment is not a problem, even though it presented a mixed ethnical composition.

Uniterms: natural killer activity; normal population.

Referências Bibliográficas

1. Takasugi M, Mickey MR, Terasaki TI — Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res.* 1973; 33: 3898-3902.
2. Kiesling R, Klein E, Wigzell H — 'Natural' killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol.* 1975; 5: 112-117.
3. Weish RM, Hallenbeck LA — Effect of virus infections on target cell susceptibility to natural killer cell-mediated lysis. *J Immunol.* 1980; 124: 2491-2497.
4. Kirkpatrick CE, Farrel JP — Splenic natural killer-cell activity in mice infected with *Leishmania donovani*. *Cell Immunol.* 1984; 85: 201-214.
5. Wiltrout RH, Herberman RB, Zhang S, Chirigos MA, Ortaldo JR, Green KM, Talmadge JE — Role of organ-associated NK cells in the decreased formation of experimental metastases in lung and liver. *J Immunol.* 1985; 134: 4267-4275.
6. Uchida A, Miskische M — Augmentation of NK cell activity in cancer patients by OK-432: activation of NK cells and reduction of suppressor cells. In: Herberman RB, ed. NK cells and other natural effector cells. New York: Academic Press. 1982; 1303-1308.
7. Abruzzo LY, Rowley DA — Homeostasis of the antibody response: immunoregulation by NK cells. *Science.* 1983; 222: 581-585.
8. Kimata H, Shanadan F, Brogan M, Targan S, Saxon A — Modulation of ongoing human immunoglobulin synthesis by natural killer cells. *Cell Immunol.* 1987; 107: 74-88.
9. Degliantoni G, Murphy M, Kobayashi M, Francis M, Perussia B, Trinchieri G — Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor. Relationship with tumor necrosis factor and synergism with immune interferon. *J Exp Med.* 1985; 162: 1512-1530.
10. Hansson M, Kiessling R, Bellin M — Natural killing of hematopoietic cells. In: Herberman RB, ed. NK cells and other natural effector cells. New York: Academic Press. 1982; 33: 1077-1084.
11. Roder JC, Haliotis T, Klein M, Korec S, Jett J, Ortaldo J, Herberman RB, Katz P, Fauci AS — A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells. *Nature* 1980; 284: 553-555.
12. Kirkpatrick CE, Farrel JP — Mechanism of depression of splenic natural killer cell function in C57BL-6 mice infected with *Leishmania donovani*. *Cell Immunol.* 1984; 87: 601-612.
13. Lotzová E — *C. parvum*-mediated suppression of the phenomenon of natural killing and its analysis. In: Herberman RB, ed. Natural cell-mediated immunity against tumors. New York: Academic Press. 1980; 735-752.
14. Son K, Kew M, Rabson AR — Depressed natural killer activity in patients with hepatocellular carcinoma. *In vitro* effects of interferon and levamisole. *Cancer.* 1982; 50: 2820-2825.
15. Tursz T, Dokhelar MC, Lipinski M, Amiel JL — Low natural killer cell activity in patients with malignant lymphoma. *Cancer.* 1982; 50: 2333-2335.
16. Welsh RM, Zinkernagel RM — Heterospecific cytotoxic cell activity induced during the first three days of acute lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice. *Nature.* 1977; 268: 646-648.
17. Abe T, Forbes JT, Colley DG — Natural killer cell activity during murine schistosomiasis mansonii. *J Parasitol.* 1983; 69: 1001-1005.
18. Hatcher FM, Kuhn RE — Modulation of natural killer cell activity during murine infection with *Trypanosoma cruzi*. In: Herberman RB, ed. NK cells and other natural effector cells. New York: Academic Press, 1982; 503-509.
19. Kearns RJ, Leu RW — Modulation of natural killer activity in mice following infection with *Listeria monocytogenes*. *Cell Immunol.* 1984; 361-371.
20. Nagel JE, Collins GD, Adler WH — Spontaneous or natural killer cytotoxicity of K562 erythroleukemic cells in normal patients. *Cancer Res.* 1981; 41: 2284-2288.
21. Noble RL, Warren RP — Age-related development of human natural killer cell activity. *New Eng J Med.* 1985; 313: 641-642.
22. Pross HF, Baines MG — Studies of human natural killer cells. I. *In vivo* parameters affecting normal cytotoxic function. *Int J Cancer.* 1982; 29: 383-390.
23. Saxena QB, Saxena RK, Adler WH — Effect of protein calorie malnutrition on levels of natural and inducible cytotoxic activities in mouse spleen cells. *Immunology.* 1984; 727-733.
24. Saxena QB, Saxena RK, Adler WH — Effect of feeding a diet with half of the recommended levels of all vitamins on the natural and inducible levels of cytotoxic activity in mouse spleen cells. *Immunology.* 1984; 52: 41-48.
25. Ferson M, Edwards A, Lind A, Milton FW, Hersey P — Low natural killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects. *Int J Cancer.* 1979; 23: 603-609.
26. Phillips B, Marshall ME, Brown S, Thompson JS — Effect of smoking on human natural killer cell activity. *Cancer.* 1985; 56: 2789-2792.
27. Saxena QB, Mezey E, Adler WH — Regulation of natural killer activity *in vivo*. II. The effect of alcohol consumption on human peripheral blood natural killer activity. *Int J Cancer.* 1980; 26: 413-417.
28. Hersey P, Edwards A, Trilivas C, Shaw H, Milton GW — Relationship of natural killer-cell activity to Rhesus antigens in man. *Br J Cancer.* 1979; 39: 234-240.
29. Santoli D, Trinchieri G, Zmijewski CM, Koprowski H — HLA-Related control of spontaneous and antibody-dependent cell-mediated cytotoxic activity in humans. *J Immunol.* 1976; 117: 765-770.
30. Hellstrom I, Hellstrom KE, Sjögren HO, Warner GA — Destruction of cultivated melanoma cells by lymphocytes from healthy black (north american negro) donors. *Int J Cancer.* 1973; 11: 116-122.
31. Oldham RK, Djieu JY, Cannon GB, Siwarski D, Herberman RB — Cellular mycrocytotoxicity in human tumor systems: analysis of results. *J Natl Cancer Inst.* 1975; 55: 1305-1318.
32. Abo T, Cooper MD, Balch CM. — Postnatal expansion of the natural killer and killer cell population in humans identified by the monoclonal HNK-1 antibody. *J Exp Med.* 1982; 155: 321-326.
33. Forbes JT, Greco FA, Oldham RK. — Natural cell-mediated cytotoxicity in human tumor patients. In: Herberman RB, ed. Natural cell-mediated immunity against tumors. New York: Academic Press. 1982; 33: 1031-1046.
34. Zalis MG, de La Rocque L, Goulart J, Rumjanek VM — Modulação da atividade "natural killer". Em: Meneghini R, ed. *Biologia de células em cultura.* São Paulo: Publicação ACIESP. 1985; 56-75.
35. Antonelli P, Stewart W, Dupont B — Distribution of natural killer cell activity in peripheral blood, cord blood, thymus, lymph nodes, and spleen and effect of *in vitro* treatment with interferon preparation. *Clin Immunol Immunopathol.* 1981; 19: 161-169.
36. Thvss A, Caldani C, Bourcier C, Benita G, Schneider M — Comparison of natural killer activity during the first and second halves of the menstrual cycle in women. Letter to the editor. *Br J Cancer.* 1984; 50: 127-128.
37. Sulke AN, Jones B, Wood TJ — Variation in natural killer activity in peripheral blood during the menstrual cycle. *Br Med J.* 1985; 290: 884-886.
38. White D, Jones DB, Cooke T, Kirkham N — Natural killer (NK) activity in peripheral blood lymphocytes of patients with benign and malignant breast disease. *Br J Cancer.* 1982; 46: 611-616.
39. Baley JD, Schacter BZ — Mechanism of diminished natural killer cell activity in pregnant women and neonates. *J Immunol.* 1985; 134: 3042-3047.
40. Rosenberg EB, Mc Coy JL, Green SS, Donnelly FC, Siwarski DF, Levine PH, Herberman RB — Destruction of human lymphoid tissue-culture cell lines by human peripheral lymphocytes in ⁵¹Cr-release Cellular cytotoxicity assays. *J Natl Cancer Inst.* 1974; 52: 345-352.