

Academia de Ciência e Tecnologia
Pós-Graduação em Imunologia Hematológica e Hemoterápica
Letícia Queluz Batista

Imunoterapia Contra o Câncer: Perspectivas no Uso de
Células Natural Killer

Uberaba
2015

RESUMO

Nosso organismo é capaz de se defender contra diferentes agressões, inclusive contra as próprias células que estão em transformação através de vários mecanismos. Mas para que isso ocorra, diversos fatores devem estar íntegros em perfeito funcionamento. Sabe-se que as células tumorais desenvolvem várias maneiras de escape frente ao sistema imunológico. Portanto, estudos vêm sendo desenvolvidos para que células Natural Killer (NK), responsáveis pela eliminação tumoral, possam estar ativas e driblar ações que mascarem a presença dessas células tumorais. Para isso, as células NK provenientes de doadores haploidênticos devem passar por expansão a fim de se tornarem ativas e em quantidades adequadas para ação contra essas células tumorais. O desafio está em obter quantidades suficientes para tal ação e as manterem ativas *in vivo*.

Palavras-chave: Células *Natural killers*, Imunoterapia, Células mononucleares de sangue periférico.

ABSTRACT:

Our body is able to defend against different attacks, including against its own cells that are undergoing transformation through various mechanisms. But for this to occur, several factors must be honest in perfect working order. It is known that tumor cells develop various ways to escape across the immune system. Therefore, studies have been developed so that natural killer cells (NK), responsible for tumor removal, may be active and dribble actions that mask the presence of these tumor cells. For this, haploidentical NK cells from donors must undergo expansion in order to become active and in amounts suitable for action against such tumor cells. The challenge is to obtain sufficient quantities for such action and remain active *in vivo*.

Key words: *Natural killers cells*, Immunotherapy, Peripheral blood mononuclear cells.

INTRODUÇÃO

O câncer pode ser denominado o mal do século, sendo uma doença ainda cercada de muito mistério e superstições em nossa sociedade. (INCA, 2014). Cientificamente é conhecido como neoplasia (Almeida *et al.*, 2004) que é o crescimento desordenado e rápido de células anormais sendo que, o acúmulo dessas células cancerosas é chamado tumor e as causas são variadas: genética, interferência do meio ambiente ou hábitos próprios. Essas células podem invadir outros tecidos; quando isso ocorre, é denominado metástase. A formação do tumor, carcinogênese, é um processo lento que leva anos para formar o tumor visível e ocorre em três estágios: iniciação, promoção e progressão. Na iniciação, ocorre a modificação dos genes pelos agentes cancerígenos, mas não há detecção de tumor clinicamente; já na promoção, as células iniciadas sofrem efeitos desses agentes, e o longo e continuado contato leva à formação de células malignas; a progressão ocorre quando há multiplicação descontrolada e irreversível dessas células, ocorrendo as primeiras manifestações clínicas. (INCA, 2014).

Nosso organismo constantemente se defende de agressões que podem levar a alterações celulares, porém, para que isso ocorra é necessário que estejam íntegros o sistema imunológico, os mecanismos de reparo do DNA danificado e enzimas responsáveis pela transformação e eliminação de agentes cancerígenos. Nesse contexto, o sistema imune produz diversas citocinas, dentre elas pode-se destacar uma com ação anti-viral e anti-tumoral, que é chamada interferon gama (IFN- γ). Segundo Onuchic e Chammas (2010), nos experimentos em animais, a produção de IFN- γ mostrou-se capaz de protegê-los contra tumores quimicamente induzidos bem como transplantados.

Muitos estudos têm demonstrado a importância do sistema imune para o combate ao câncer. Ocorre que as células tumorais driblam esse sistema, já que estimulam a imunossupressão através da ativação de vários mecanismos, como: crescimento rápido do tumor, tamanho; local inacessível às células de defesa; resistências às perforinas e expressão do FasL, que induz apoptose de células alvo. (Sutlu e Alici, 2009).

As células *Natural Killer* (NK) correspondem de 10-20% dos linfócitos circulantes, (Jobim e Jobim, 2008), e são as principais células de defesa contra tumores do sistema imunológico. São conhecidas pela expressão de CD56 e CD16 como marcadores de superfície e ausência do CD3 encontrado em

linfócitos T (Jobim e Jobim, 2008; Miller *et al.*,2005). No sangue periférico, é comum que as NK apresentem baixos níveis de expressão de CD56 e altos níveis de CD16, por isso, são conhecidas como CD56^{dim} e são mais citotóxicas. Porém, cerca de 10% dessas NK podem apresentar uma inversão, ou seja, altos níveis de expressão de CD56 e baixos de CD16, chamadas então de NK CD56^{bright}, e possuem um papel imunorregulador de secreção de citocinas e quimiocinas. (Shook e Campana, 2011).

A citotoxicidade das células NK é mediada através das integrinas e outras moléculas de adesão e assim liberam seus grânulos que contêm perforinas e granzinas, proteínas que alteram a permeabilidade celular e também através de receptores específicos que estão nas células alvo. (Oliveira e Diamond, 2008). Os principais receptores encontrados nas células NK são: os receptores de citotoxicidade natural (NCR); *killer immunoglobulin-like receptor* (KIR) e receptores semelhantes à lectina tipo C. (Oliveira e Diamond, 2008). O balanço entre seus receptores de ativação e inibição levam ao reconhecimento e reação delas frente às células infectadas e tumorais (Oliveira e Diamond, 2008; Spanholtz *et al.*, 2010; Besser *et al.*, 2013), sendo que os principais receptores para defesa tumoral são os receptores NKG2D e os NCRs. (Miller *et al.*,2005). Já a família dos receptores KIR possuem como ligantes as moléculas HLA de classe I (A, B e C) presentes nas células e dessa forma detectam aquelas que fazem parte do “próprio” e assim não atacam as próprias células do indivíduo. (Jobim e Jobim, 2008).

De acordo com Onuchic e Chammas (2010), as perforinas presentes em células NK têm grande contribuição para a morte de tumores, visto que estudos demonstram que há formação de tumores epiteliais espontâneos quando da sua ausência. A complexidade do tumor consiste em ele mudar a homeostasia, fazendo com que células normais possam trabalhar a favor de seu desenvolvimento; além da proliferação celular, essas células normais participam da angiogênese e metástase de forma significativa. (Quiroga *et al.*, 2012). Segundo Reiners *et al.* (2013), NKG2D é um receptor de ativação das células NK que reconhece moléculas MICA/MICB e proteínas ULBP, que são induzidas nas células em transformação. Porém, as células tumorais de pacientes com Linfoma de Hodgkin desenvolvem mecanismos que bloqueiam esse receptor. Dessa forma, o conhecimento de tal influência abre caminhos

para que novos tratamentos possam impedir a disfunção das células NK. Além disso, células tumorais são capazes de diminuir a expressão de HLA-I para impedir que linfócitos T CD8 as elimine e, por mecanismos desconhecidos as células NK tornam-se anérgicas, não destruindo essas células com diminuição de HLA-I. (Quiroga et al., 2012).

A imunoterapia do câncer é a estimulação do sistema imunológico para o combate de células tumorais que pode ser ativa, quando usa substâncias estimuladoras ou vacinas, ou passiva (adotiva), que é a administração de anticorpos antitumorais ou células mononucleares exógenas. (INCA, 2014). A IL-2 tem um papel importante nas células NK porque estas são capazes de expressar três receptores: alfa (CD25), beta (CD122) e gama (CD132), que juntos formam um complexo de alta afinidade para a IL-2. Assim, mesmo sozinha, ela pode ter um efeito positivo no tratamento de vários cânceres, entretanto apresenta como obstáculo o importante fato de que células tumorais possuem diversos mecanismos para escapar da ação de células de defesa, mesmo havendo células NK bem ativadas. (Sutlu e Alici, 2009).

A vantagem da imunoterapia com células NK em relação ao tratamento com células T e vacinas, está no fato de que não são necessários antígenos tumorais como alvo. (Lim *et al.*, 2013). O conhecimento do funcionamento das células NK é de suma importância para o desenvolvimento de mecanismos que possibilitem o uso delas na imunoterapia e, conforme aumenta esse conhecimento, novas estratégias vão sendo desenvolvidas e aprimoradas. (Besser *et al.*, 2013). Atualmente, diversas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de encontrar meios para que essas células NK saiam da anergia frente ao tumor, ou, se tornem mais citotóxicas, podendo essas serem expandidas por meio de culturas de células mononucleares de doadores haploidênticos. Por exemplo, células NK de pacientes com Linfoma de Hodgkin são inativas, tornando o objetivo da imunoterapia a restauração delas *in vitro*. (Reiners *et al.*, 2013). Células mononucleares haploidênticas de sangue periférico (PBMC) podem ser obtidas para transferência adotiva onde células NK expandem *in vitro* sob regime de altas doses de imunossupressores para evitar contaminação de células T CD3. (Miller *et al.*, 2005). Porém, segundo Lim *et al.* (2013) o desafio é enriquecer e ampliar essas PBMC's em cultura para a transferência adotiva.

Mesmo as células NK sendo isoladas do sangue periférico, a quantidade delas é pouca, correspondendo, em média, a 20% dos linfócitos, tornando-se um obstáculo para serem isoladas, (Shook e Campana, 2011; Lim *et al.*, 2013), assim, faz-se necessário o uso de células tumorais como estimuladoras da expansão de células NK *in vitro*. (Lim *et al.*, 2013). Após serem separadas, as células NK encontram-se em repouso e são necessários diferentes mecanismos para ativá-las. As principais citocinas usadas na expansão de células NK são a IL-2 e IL-15, mas elas não mantêm a expansão por um período suficiente. (Shook e Campana, 2011). Por tudo isso os principais fatores a serem considerados para o uso da imunoterapia por transferência adotiva são: a quantidade de PBMC, pureza e proliferação/ativação. (Sutlu e Alici, 2009). Muitos estudos confirmam a segurança de métodos para a aplicação de transferência de células NK adotivas, onde o mais importante a ser notado é a expansão das células NK e a infusão de grandes quantidades de células. (Besser *et al.*, 2013).

Besser *et al.* (2013) analisaram várias estratégias para o uso da transferência de células NK adotivas, como a expansão de células NK, a estimulação de receptores de lises NK (NKLR), o reconhecimento de anticorpos por CD16 que induz a citotoxicidade celular anticorpo dependente (ADCC) e a compatibilidade HLA-C. Neste estudo, dentre as estratégias desenvolvidas, percebeu-se que a melhor é a ativação de células NK juntamente com a otimização da expressão de NKLRs, depois segue-se a indução de ADCC e por fim HLA-C incompatíveis. Afirmam ainda, que quando o HLA-C é incompatível pode haver melhora na ação de células NK contra células do melanoma, já que os receptores KIRs automaticamente serão incompatíveis. Há uma complexidade para promover expansão de células NK e por isso foram feitas várias combinações de meios e substâncias utilizados nas culturas que incluem diferentes meios, diferentes concentrações de IL-2, adição de células alimentadoras irradiadas e uso do anti CD3 anticorpo OKT3. No estudo, o protocolo de escolha nas culturas está no uso do meio X-VIVO com duas rodadas de células alimentadoras e adição de OKT-3 pré- incubado com células alimentadoras. Tudo isso leva à alta atividade assassina após 21 dias de cultura promovida pela alta expressão dos receptores NKG2D e NKp30 (que

é um NCR), ou seja, a atividade citotóxica das células NK contra melanoma pode ser aumentada se promover a seletiva expressão desses receptores.

Já Lim *et al.* (2013) identificaram algumas linhagens de células tumorais como alimentadoras que foram cultivadas e irradiadas, depois foram co-cultivadas com PBMC de doadores voluntários saudáveis e recombinante humano de IL-2. Dentre as linhagens testadas, U937, KL-1 e K562 foram as únicas capazes de promover expansão das células NK, inclusive a combinação de PBMC+IL-2+KL-1 que promoveu expansão de até 96,7% e diminuição de células T.

Para estimular a expansão de células NK, Shook e Campana 2011 utilizaram células K562, linha de células de leucemia mielóide. As células K562 foram transduzidas com um gene da IL-15 e gene da molécula estimulatória 4-1BB (CD137), que envia sinais de ativação, juntamente com conjunto formado de mais doses de IL-2 na cultura, resultando na expansão de células NK em 21,6 vezes, em uma semana. Aumentando a concentração de IL-2 essa mesma cultura chegou a um aumento de até 1000 vezes na expansão de células NK, em três semanas. Esse preparado de células NK só é infundido nos pacientes, após receberem ciclofosfamida e fludarabina em regime de condicionamento, sendo que a IL-2 muitas vezes é usada em pacientes que receberam infusão de células NK, mas pode ser um risco à saúde; por isso, sua utilização deve ser realizada com rigorosos critérios, inclusive, sugere-se o uso de citocinas autócrinas evitando a administração sistêmica de IL-2.

Apesar do número escasso de pacientes em estudo realizado por Quiroga *et al.* (2012) eles concluíram que as células NK podem encontrar disfunções frente a alguns tumores e que o uso da IL-15, citocina fundamental para maturação e expansão de células linfóides, pode levar à reversão da disfunção. As células NK foram isoladas de controles saudáveis e em 22 pacientes pediátricos com tumores sólidos refratários no Hospital Universitario Niño Jesús, que, após citometria de fluxo, a proporção de NK^{dim}/NK^{bright} era 40%/60% e 91%/9% em pacientes e controles, respectivamente. Isso mostra que nos pacientes, por excesso de NK^{bright}, a atividade citotóxica está diminuída pelo fato de carecerem de receptores KIR. Essas NK foram então incubadas *overnight* em meio de cultura contendo IL-15 e co-cultivadas com a linha celular K562, que carecem de HLA-I, mostrando uma citotoxicidade diminuída

naquelas NK provenientes dos pacientes com tumores sólidos pois eram disfuncionais. Quanto à citotoxicidade das NK *in vivo*, utilizaram-se ratos que, primeiramente, foram irradiados e depois receberam injeções de neuroblastoma começando terapia após 7 dias com células NK/IL-15 cultivadas anteriormente; já no grupo controle receberam infusões de PBS (tampão fosfato-salino). Em conclusão, os ratos tratados com NK/IL-15 apresentaram a carga tumoral menor significativamente 32, 41 e 669 vezes menos nos dias 28, 35 e 42, respectivamente.

Alguns testes foram feitos com injeções subcutâneas diárias de IL-2 e transplantação de células hematopoéticas autólogas, sem retirar, é claro, o tratamento quimioterápico. Mesmo havendo expansão das células NK, elas não eram funcionais como em testes *in vitro*. Então foram injetadas as células hematopoéticas de doadores haploidênticos em pacientes com câncer avançado e altas doses de imunossupressor Hi-Cy/Flu e assim obtiveram expansão de células NK *in vivo*. Após essa terapia, 5 dos 19 pacientes tratados alcançaram remissão completa, de acordo com Miller *et al.* (2005).

Spanholtz *et al.* (2010) desenvolveram um método para a expansão de células NK que fossem funcionais usando células estaminais e progenitoras hematopoéticas. A expansão proposta é que fosse em larga escala, ou seja, suficiente para a imunoterapia. Usando um meio livre de soro e adequado para aplicações clínicas, chamado Glycostem Basal Meio de Crescimento (GBGM), houve significativa expansão de células CD34+ e, em seguida, adicionou-se IL-15. A expansão total teve aumento de até 15.000 vezes, além de 99% de pureza. A maioria das novas células geradas possuía receptores de ativação e inibição e, a minoria que não possuía, acredita-se na maturação das mesmas *in vivo*.

Para Parkhurst *et al.* (2011), a transferência adotiva de células NK não medeia a regressão tumoral clinicamente. Os pacientes selecionados para o estudo foram aqueles com melanoma e câncer de células renais (RCC) responsivos à imunoterapia com IL-2. Essas NK transferidas foram primeiramente ativadas *in vitro* e após expansão delas, foram introduzidas nos pacientes após passarem por depleção de linfócitos CD3+. *In vitro*, essas células NK apresentaram marcadores consistentes com células NK ativadas e foram capazes de lisar células de melanoma. Sendo assim, o protocolo foi

adaptado para que essas células NK autólogas fossem transferidas para 8 pacientes em estudo observando então a resposta *in vivo*. Porém, em nenhum destes pacientes houve resposta clínica, mesmo que em alguns pacientes essas células NK persistiram na circulação meses após o tratamento. As células criopreservadas dos dias 7 e 48 pós-tratamento de um dos pacientes foram descongeladas e cultivadas com intuito de entender o porquê de não obterem resposta *in vivo*. Somente quando reativadas com IL-2 é que elas foram capazes de lisar células de melanoma. Acredita-se que essa incapacidade pode ser explicada devido à diminuição de receptores estimulatórios como NKG2D após uma semana de tratamento.

CONCLUSÃO

Sem dúvida, o tratamento imunoterápico pode ser a melhor escolha para o tratamento dos cânceres já que nos quimioterápicos convencionais o corpo sofre as consequências como um todo. Mas ainda não há certezas quanto a sua efetividade *in vivo*. Nota-se que o caminho para isso está em estudos mais focados nos receptores dessas células NK, o conhecimento das diferentes formas de ação dos tipos de tumores e desenvolvimento de citocinas possíveis para aplicação clínica. Portanto, é de suma importância a adequação desses tratamentos de acordo com o tipo de câncer e a fisiologia de cada paciente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Vera Lúcia; LEITÃO, Andrei; REINA, Luisa del Carmen Barrett; MONTANARI, Carlos Alberto; DONICCI, Claudio Luis. **Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução**. Quim. Nova, v.28, n. 1, p.118-129, 2005.

BESSER, Michal J.; et al. **Development of allogeneic NK cell adoptive therapy in metastatic melanoma patients: in vitro preclinical optimization studies.** PLOS ONE, v.8, mar, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em:
<http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em 04.11.2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em:
<http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=104>. Acesso em 04.11.2014.

JOBIM, Mariana; JOBIM, Luiz F.J. **Células natural killer e vigilância imunológica.** Jornal de Pediatria, v.284, n. 4, 2011.

LIM, Seon.A; et al. **Ex vivo expansion of highly cytotoxic human NK cells by cocultivation with irradiated tumor cells for adoptive immunotherapy.** Cancer Research, 73(8), p. 2598-2607, abr, 2013.

MILLER, Jeffrey.S. et al. **Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK Cell in patients with cancer.** Blood, v.108. n.8, p.3051-3057, jan, 2005.

OLIVEIRA, Aline Almeida; DIAMOND, Hilda Rachel. **Atividade antileucêmica das células natural killer (NK).** Revista Brasileira de Cancerologia, 54(3), p.297-305, 2008.

ONUCHIC, Ana Claudia; CHAMMAS, Roger. **Câncer e o microambiente tumoral.** Rev Med, 89(1), p. 21-31, jan-mar, 2010.

PARKHURST, Maria R.; RILEY, John P.; DUDLEY, Mark E.; ROSENBERG, Steven A. **Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating but does not mediate tumor regression.** Clin Cancer Res, 17(19), out, 2011.

QUIROGA, J. Valentin; CASANOVA, L. Fernández; MARTÍN, I. Génesis; MARTÍN, F. Nuñez; MARTÍNEZ, A. Pérez. **Kill the killers: terapia con células Natural Killer en pacientes pediátricos con cancer refractario.** Sanid. mil., 68(3), p. 141-146, julho, 2012.

REINERS, Katrin.S. et al. **Rescue of impaired NK cell activity in hodgkin lymphoma with bioespecific antibodies *In Vitro* and in patients.** Molecular Therapy, v.21. n.5, p.895-903, 2013.

SPANHOLTZ, Jan. 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, v.5, fev, 2010.

SHOOK, David R.; CAMPANA, Dario. **Natural killer cells engineering for cellular therapy of cancer.** National Institutes of Health, 78(6) v.45, n.6, p. 409-415, nov/dez, 2011.

SUTLU, Tolga; ALICI, Evren. **Natural Killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects.** Journal of Internal Medicine , v.266, p.154-181, 2009.

