

# O papel das células Natural Killer na imunoterapia

## 1. Resumo

As células Natural Killer (NK) exercem um importante papel na imunidade inata sem sensibilização prévia do sistema imunológico, onde, combate células tumorais e doenças infecciosas, por meio da ativação de algumas citocinas e quimiocinas. Foi em meados da década de 1970, que as habilidades das células NK começaram a tomar notoriedades.

Com sua incrível capacidade de apresentarem diversos mecanismos para escape da vigilância imunológica, e possibilidades de intervenções imunológicas têm sido propostas. Contudo, o conhecimento sobre evasão tumoral da resposta imune continua sem muitas respostas, se tornando alvo de muitos estudos.

As células NK são fenotipicamente definidas com a expressão de superfície CD56, e a ausência da expressão do CD3. Considerada uma população heterogênea, as células NK humanas apresentam aproximadamente 90% de baixa expressão do CD56 (CD56<sup>dim</sup>) mas com altos níveis de CD16, enquanto os outros 10 % das células são de expressão alta do CD56 (CD56<sup>bright</sup>) e baixos níveis de CD16. Onde 90% das células NK circulantes são fenotipicamente caracterizadas CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> denominadas citotóxicas, os outros 10 % CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> como imunoreguladoras, secretando citocinas (1,51).

Recentemente, houve um grande progresso no entendimento da biologia das células NK, principalmente nos mecanismos de reconhecimento das células-alvo por meio de um repertório próprio de receptores. Esses avanços causaram impacto no estudo do papel imunológico das células NK. Os conceitos modernos, junto com progressos metodológicos, impulsionaram o estudo da imunoterapia com células NK que hoje se encontra mais próxima da prática clínica. Nesta revisão, serão abordadas estratégias

ênfatizando o enorme potencial das células NK para a imunoterapia contra o câncer e ilustrado por seu amplo reconhecimento de células tumorais, independentemente da apresentação de antígenos, e maior atividade contra tumores que perderam a expressão de MHC classe I devido a mecanismos de resistência adquiridos.

## **2. Introdução**

Um notável avanço foi observado ao longo das últimas décadas para melhor elucidar os papéis das células NK na imunidade contra tumores e vírus. Ao lisar células transformadas ou infectadas, eles limitam o crescimento do tumor e as infecções virais. Em humanos são encontradas na medula óssea (MO), corrente sanguínea, órgãos linfóides e tecidos.

Primeiramente foram identificadas como linfócitos não B e linfócitos não T, por desenvolver atividades não semelhantes aos linfócitos T e B (2), enquanto as células T reconhecem peptídeos apresentados por moléculas de moléculas de histocompatibilidade maior (MHC), as células NK exibem receptores que reconhecem proteínas autólogas induzidas por estresse em células tumorais, ao mesmo tempo, sua atividade funcional é inibida por moléculas de MHC exibidas em tais células.

Outro aspecto importante é o seu envolvimento na vigilância imunológica contra tumores que adquirem o potencial de contornar os mecanismos intrínsecos apoptóticos, adaptando assim o microambiente tumoral e na prevenção da disseminação de metástases. Na ativação, as células NK liberam quimiocinas e citocinas que auxiliam as respostas inflamatórias e contribuem para hematopoiese, crescimento e ativação de granulócitos e monócitos (3).

## **3. Objetivo**

Considerando o papel fundamental das células NK surgindo como um alvo prospectivo para a terapia do câncer, e cada vez mais observa-se o crescente leque de estudos e diversidade de terapias com os quimioterápicos na tentativa de utilizar os mecanismos de ação e citotoxicidade das células NK. Nesta revisão abordaremos as principais subpopulações, sítio de ação e uma possível abordagem na terapia do câncer utilizando células NK.

#### **4. Células NK**

Há mais de quatro décadas células NK são conhecidas por sua capacidade de causar danos em células infectadas por vírus ou tumorais auxiliando a vigilância imunológica do câncer. No sangue total, 5-10% dos linfócitos circulantes são representadas por células NK, as quais são caracterizadas por diferentes subgrupos, os principais fenótipos são caracterizados como regulatório  $CD56^{bright}CD16^{-}$ , encontrado com maior frequência nos linfonodos e o citotóxico  $CD56^{dim}CD16^{+}$ , encontrado com maior frequência na corrente sanguínea. O fenótipo  $CD16$  é o receptor chave mediador do *antibody-dependent cell cytotoxicity* (ADCC), o primeiro passo para a citotoxicidade mediada por células NK é a adesão. Integrinas e outras moléculas de adesão têm um importante papel na formação de conjugados entre a célula NK e a célula alvo. Uma das principais integrinas é a função linfóide associada ao antígeno-1 (LFA-1), que tem como papel induzir a polimerização de actina, rearranjos do citoesqueleto e aglomeração de vesículas lipídicas. Esses sinais mediados por LFA-1 sozinhos podem ser suficientes para ativar a citotoxicidade mediada por células NK (19). O processo de adesão à célula alvo induz alterações dinâmicas na morfologia das células NK, os grânulos líticos são movidos em direção ao sítio de interação com a célula alvo. Esse movimento é realizado através de estruturas de citoesqueleto que são coordenadas pelo centro de organização de microtúbulos. Os principais conteúdo desses grânulos são moléculas de perforina e granzima (19,20).

Outro mecanismo de morte celular mediado por células NK é através da ligação de receptores específicos presentes nas células alvo com ligantes na superfície das células NK pertencente à superfamília do tumor de necrose tumoral (do inglês - *tumour necrosis factor* TNF) e a sua ligação induz à apoptose da célula alvo. As células NK expressam dois membros dessa família, FasL (também conhecido como CD95L) e o ligante de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL). Muitas células tumorais não expressam Fas (receptor que se liga a FasL), mas as células NK podem diretamente induzir a expressão de Fas em células tumorais através da secreção de TNF. A atividade citotóxica mediada por TRAIL é relativamente seletiva, onde se observa a apoptose em linhagens tumorais humanas não causando efeito nas células normais (19). A citotoxicidade direta contra células tumorais ou infectadas por vírus é apenas um componente da resposta das células NK, outro componente é a produção de citocinas liberadas por essas células, como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), que também restringe a angiogênese tumoral e estimula a imunidade adaptativa (19). Células NK também interagem com células dendríticas, macrófagos e células T contribuindo para resposta imune adaptativa antitumoral (5,6).

Com a função fundamental de eliminar células com expressão diminuída ou ausente das moléculas de histocompatibilidade maior do tipo I (MHC I), o reconhecimento dessas moléculas é essencial para reconhecer células próprias ou não-próprias, ocorrendo tanto para moléculas de superfície de ativação quanto de inibição, apresentando no mínimo um receptor de inibição para MHC I próprio, agindo como um mecanismo de segurança para as células saudáveis, isso ocorre para que não haja a morte das células próprias, este processo é conhecido como "missing-self" onde as células NK reconhecem as moléculas de MHC-I com o uso dos receptores inibição (3,4).

O reconhecimento de células não próprias ocorre por meio à sua capacidade de reconhecer e eliminar diretamente as células neoplásicas por meio de suas moléculas

de superfície de ativação e inibição, assim como as células T as células NK expressam em sua superfície o receptor da família NKG2, que são compostas por sete tipos (A,B,C,D,E,F,G e H) nos quais os tipo A e B são os receptores de inibição e o principal ligante para o receptor NKG2 é o antígeno leucocitário humano HLA-E (expressa em todas as células nucleadas).

Os receptores de ativação expressos na superfície das células NK, tal como natural cytotoxicity receptors (NCRs), DNAM-1 e receptores da família 2B4. Os integrantes NCRs incluem NKp30, NKp44 e NKp46, são os principais receptores de ativação para antígenos tumorais (7).

## **5. Casuística e metodologia**

As células NK reconhecem as células tumorais por receptores de ativação como NCRs que detectam a expressão alteradas de seus ligantes na superfície dessas células, assim como a ausência ou a pouca expressão das moléculas de MHC- I, contudo, células tumorais apresentam um mecanismo de escape imunológico, onde não há ligação das células NK com a célula alvo, fazendo com que a célula consiga escapar dessa ação. Como exemplo do escape imunológico foram observados em pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) uma redução na expressão da NCRs comparada com o controle saudável (8). Em inúmeras neoplasias malignas, também foram encontradas anormalidades na população de células NK, como exemplo foram observadas expressões diminuídas nos receptores de ativação na LMA (9), mieloma múltiplo (13), melanoma metastático (10), leucemia linfóide crônica (LLC) (11) e carcinoma hepatocelular (12). Perceptivelmente, dados obtidos de tumores revelaram que a presença de células NK no infiltrado do microambiente tumoral correlaciona-se com um favorável prognóstico (14,15,16,17). Apesar dos achados e da eficiente atividade lítica contra células tumorais, ensaios *in vitro* para o tratamento com imunoterapia com células NK, não foram satisfatórios em benefício ao paciente (18). Já na terapia com anticorpos, as células NK são os principais efetores do ADCC e têm

sido usadas para aumentar a atividade de anticorpos imunoterapêuticos com resultados promissores (45,46,47). Também foi sugerido a utilização da terapia de células NK similares ou adotivas, onde várias abordagens estão sendo consideradas para o uso de células NK na terapia do câncer. Uma estratégia é a infusão de células NK autólogas ou alogênicas obtidas do sangue periférico. Este método de células NK derivadas de célula mononuclear do sangue periférico (PBMC, do inglês - peripheral blood mononuclear cell) tem seus prós e contras, onde o uso conveniente é uma grande vantagem em comparação com outras fontes e o número inadequado de células é um dos principais obstáculos na estratégia baseada em PBMC. Expansão de células NK derivadas de PBMC usando citocinas como IL-2 e IL-15 ou camadas de células alimentadoras da linhagem K562 (células linfoblasto isolada da medula óssea de leucemia mieloide crônica) melhoram perceptivelmente células NK na vigilância de tumores. Surpreendentemente, o enxerto autólogo tem alguma limitação do que halogênico devido ao efeito inibitório induzido por moléculas HLA próprias (49).

Células NK obtidas de sangue periférico com depleção de células T cultivadas com IL-2, OKT3 e células sanguíneas periféricas autólogas irradiadas por 10 dias foram infundidas em oito pacientes com melanoma metastático ou carcinoma de células renais após redução de linfócitos, mas nenhuma resposta clínica foi observada (48), como exemplo da combinação de células NK com células T antitumorais infundidas deve estender o ataque das células imunes às células tumorais que expressam baixos níveis de antígenos tumorais em pacientes com tumores sólidos (50).

Os estudos iniciais sobre o potencial tratamento de leucemias utilizando células NK foram realizados contra linhagens leucêmicas estabelecidas, como a K562. Mais tarde, foi relatado que células leucêmicas primárias obtidas de pacientes podiam ser lisadas por células NK halogênicas. Ensaios clínicos demonstraram que a adição de IFN ou IL-2 aumentava o potencial antileucêmico, inclusive fazendo com que as células NK passassem a atingir algumas células leucêmicas primárias resistentes à atividade

citotóxica de células NK não ativadas. Foi observado que as células NK halogênicas poderiam interagir tanto com células de leucemia linfóide aguda quanto mieloides (21,22). Também foi demonstrado que células NK autólogas ativadas poderiam eliminar células primárias de LMA e LLA (23,24). Existem evidências de que nem todos os tipos de leucemias são igualmente susceptíveis à atividade das células NK. Há mais de duas décadas foi estudado a susceptibilidade de diferentes tipos de leucemias, utilizando uma linhagem de células NK (NK-92), dependente de IL-2 e desempenhando o papel de uma célula NK ativada. A NK-92 tem ausência de expressão de todos os KIR inibitórios e alta expressão de receptores ativadores, como NKG2D, NKp46, NKp30 e NKp44, portanto, desenvolvendo um maior potencial citotóxico em comparação com as células NK obtidas a partir de doadores saudáveis. Por isso, a linhagem NK92 é utilizada em vários estudos de susceptibilidade/resistência à atividade NK (25,26).

Outro estudo clínico demonstrou que células NK alorreatividade podem eliminar com eficiência blastos em pacientes com LMA durante o transplante de células tronco hematopoiética haploidêntica (TCTH) (27,28,29). Partindo da teoria do *missing-self*, foi proposto que a ausência de ligantes de HLA nos pacientes para os receptores KIR inibidores do doador, ou seja, incompatibilidade KIR, poderia gerar alorreatividade e levar à lise de células leucêmicas do paciente. Clones de células NK do doador foram preparados *in vitro* através da seleção por alorreatividade contra epítomos de HLA específicos. A partir desses clones, ensaios de citotoxicidade foram realizados contra células leucêmicas dos respectivos pacientes em 4 casos de LMA e 5 de LLA. Todas as amostras de LMA foram sensíveis a esse ensaio, enquanto apenas duas amostras de LLA foram sensíveis. Análises de imunofluorescência mostraram que todos os casos de LLA resistentes à atividade NK exibiram baixa expressão de superfície de LFA-1 quando comparadas com as amostras de LLA e LMA susceptíveis. Outro estudo realizado por esse grupo demonstrou que a incompatibilidade KIR em

pacientes com LMA submetidos ao TCTH haploidêntico levava a uma melhora na sobrevida e diminuição no risco de recaída. No entanto a incompatibilidade KIR não causou nenhum impacto em LLA, sugerindo que as células de LLA exibissem outros mecanismos de resistência à atividade NK além do envolvimento do KIR. Esses estudos mostraram que, muitas vezes, as LLA apresentam forte resistência à atividade citotóxica das células NK, mas os mecanismos envolvidos ainda não estão bem compreendidos. Pesquisadores verificaram a atividade citotóxica da linhagem NK-92 contra 12 linhagens estabelecidas de LLA e 16 amostras primárias obtidas a partir de pacientes com LLA com objetivo de verificar quais mecanismos de resistência estariam envolvidos. Quase todas as células de LLA comprometidas com linhagem B se mostraram resistentes à atividade citotóxica, enquanto os casos de LLA-T apresentaram susceptibilidade moderada. Para todos os tipos de LLA estudados, as células leucêmicas primárias foram mais resistentes quando comparadas às linhagens. Esse estudo demonstrou que as moléculas de adesão, como LFA-1, contribuem apenas parcialmente para a susceptibilidade das células alvo (26).

Também foi observado que fatores solúveis derivados de blastos de LLA resistentes não são capazes de diminuir o potencial lítico contra células sensíveis. Foi analisado o papel do receptor ativador NKG2D que, conforme citado anteriormente, reconhece a expressão sequência A relacionada ao polipeptídeo do MHC classe I (MICA), MICB e ULBP. Foi observado que a expressão MICA e MICB em linhagens de LLA só ocorriam em linhagens susceptíveis à atividade NK (29).

A capacidade das células NK de matar células leucêmicas *in vitro* e os estudos recentes da influência dos seus receptores no TCTH sugerem que essas células têm um papel central no controle e eliminação das leucemias. Diferentes mecanismos são utilizados por células neoplásicas para escapar da vigilância imunológica das células NK. Ainda não existe um consenso de quais subtipos de LLA e LMA são mais susceptíveis à atividade das células NK e quais mecanismos de resistência estão



associados a cada subtipo de leucemia. A aquisição desse conhecimento é de extrema importância para o desenvolvimento de novas modalidades imunoterapêuticas no tratamento de leucemias agudas (30,31, 32).

O estudo da atividade antileucêmica das células NK e seus receptores está fazendo com que cada vez mais seja percebida a importância dessas células para a vigilância imunológica antitumoral e imunoterapia. Na década de 1980, foi demonstrado que células NK ativadas administradas em modelos animais poderiam resultar em resistência à metástase e regressão de tumores estabelecidos. Porém, durante muitos anos, a dificuldade de gerar um número suficiente de células *in vitro*, mantendo a sua capacidade antitumoral *in vivo*, foi um dos maiores obstáculos para a aplicação clínica da imunoterapia adotiva de células NK. Entretanto, com os avanços da última década do processo de reconhecimento das células alvo pelas células NK e metodologias mais modernas de purificação dessas células, surgiram possibilidades de novos progressos na imunoterapia adotiva de células NK para o tratamento de leucemias e outros tipos de tumor (25,33, 34). O estudo do papel das células NK no TCTH haploidêntico levou à sugestão de que a alorreatividade de células NK poderia ter um impacto no desenvolvimento de novos procedimentos clínicos. As células NK alorreativas poderiam ser infundidas para prevenir recaídas, favorecer o enxerto e modular a doença enxerto contra o hospedeiro (DECH) no TCTH. As células NK alorreativas, de origem do mesmo doador do transplante ou de um doador diferente, poderiam ser infundidas antes do TCTH como parte de um regime de condicionamento de intensidade reduzida ou a infusão dessas células poderia ocorrer depois do transplante, numa tentativa de tratar recaídas, semelhante à imunoterapia de infusão de linfócitos do doador (35).

Alguns grupos têm investigado a preparação e infusão de células NK de doador purificada e depletada de células T com o objetivo de consolidar o enxerto e induzir o efeito enxerto contra leucemia nos pacientes após TCTH haploidêntico ou com outros

tipos de doador. No entanto ainda não há dados clínicos ou experimentais para ajudar a definir uma dose adequada de células NK (36). Conquanto não existe nenhuma técnica disponível para mobilizar as células NK para o sangue periférico, uma estratégia que pode ser utilizada para imunoterapia de células NK consiste em fazer uma leucoférese e posteriormente separar as células NK.

Uma forma de purificar células NK em larga escala é através do método imunomagnético em duas etapas, em que a primeira consiste na depleção de CD3 e a segunda de enriquecimento de CD56. Esse método obtém pureza de 90% de células NK com depleção eficiente de células T. A citotoxicidade natural das células NK purificadas aumenta aproximadamente em cinco vezes em comparação com as células NK misturadas às células mononucleares. Pode ser feita uma expansão *ex vivo* com objetivo de ativar as células CD56 recém selecionadas (aumentando o potencial citotóxico dessas células) e amplificar o número total de células NK. Atualmente, tem sido possível a seleção, enriquecimento, ativação e expansão de células NK purificadas para aplicação clínica, porém o procedimento laboratorial é longo, caro e precisa de equipe capacitada (36,37,38).

Em um estudo prospectivo de mais de 3.500 indivíduos com acompanhamento de 11 anos, o ajuste por idade risco relativo de câncer foi significativamente maior naqueles indivíduos com baixa citotoxicidade do sangue periférico células mononucleares (PBMCs) versus células K562, que são alvos celulares comumente usados para medir a citotoxicidade das células NK (39).

Em pacientes com câncer, o grau de infiltração de células NK em tecidos tumorais foi prognóstico em alguns pacientes coortes (40,41) e uma função reduzida das células NK foi associada a pior desfecho. Em pacientes com tumores gastrointestinais, maior expressão do receptor ativador NKp30, que resulta em um receptor com menor capacidade estimulatória, foi associado a menor sobrevida (42), enquanto que em pacientes com neuroblastoma, a relação entre NKp30a, NKp30b e NKp30c foram

supostamente preditivas de sobrevida livre de progressão em uma análise retrospectiva (43). Em pacientes com câncer colorretal, deleção de IL15 e a redução na expressão de IL-15 foi associada a um maior risco de recidiva (44).

## **6. Conclusão**

Apesar de grandes avanços em técnicas para purificação e cultivo das células NK, ainda há muito a ser estudado e compreendido, principalmente com relação ao escape imunológico das células tumorais com vários mecanismos para escapar da ação das células NK.

Os conceitos modernos na área de imunologia do câncer associado ao progresso metodológico impulsionam o estudo da imunoterapia com células NK, motivando assim futuros projetos de pesquisa.

## **7. Bibliografia**

- 1- Zwirner NW, Domaica CI. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors*. 2010 Jul-Aug;36(4):274-88. doi: 10.1002/biof.107. PMID: 20623510.
- 2- Hellström I, Hellström KE, Pierce GE, Yang JP. Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasms. *Nature* (1968) 220:1352–4.  
doi:10.1038/2201352a0
- 3- Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011 Jan 7;331(6013):44-9. doi: 10.1126/science.1198687. PMID: 21212348; PMCID: PMC3089969.

- 4- Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol.* 2008 May;9(5):495-502. doi: 10.1038/ni1581. PMID: 18425106; PMCID: PMC2669298.
- 5- Rydzynski CE, Waggoner SN. Boosting vaccine efficacy the natural (killer) way. *Trends Immunol.* 2015 Sep;36(9):536-46. doi: 10.1016/j.it.2015.07.004. Epub 2015 Aug 10. PMID: 26272882; PMCID: PMC4567442.
- 6- Moretta L. Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood.* 2010 Nov 11;116(19):3689-91. doi: 10.1182/blood-2010-09-303057. PMID: 21071612.
- 7- Koch J, Steinle A, Watzl C, Mandelboim O. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol.* 2013 Apr;34(4):182-91. doi: 10.1016/j.it.2013.01.003. Epub 2013 Feb 13. PMID: 23414611.
- 8 Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Reviron D, Gastaut JA, Pende D, Olive D, Moretta A. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2002 May 15;99(10):3661-7. doi: 10.1182/blood.v99.10.3661. PMID: 11986221.
- 9- Romee R, Rosario M, Berrien-Elliott MM, Wagner JA, Jewell BA, Schappe T, Leong JW, Abdel-Latif S, Schneider SE, Willey S, Neal CC, Yu L, Oh ST, Lee YS, Mulder A, Claas F, Cooper MA, Fehniger TA. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci Transl Med.* 2016 Sep 21;8(357):357ra123. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf2341. PMID: 27655849; PMCID: PMC5436500.
- 10- Konjevic G, Mirjagic Martinovic K, Vuletic A, Jovic V, Jurisic V, Babovic N, et al. Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. *Clin Exp Metastasis* (2007) 24:1–11. doi:10.1007/s10585-006-9043-9

- 11- Veuillen C, Aurran-Schleinitz T, Castellano R, Rey J, Mallet F, Orlanducci F, et al. Primary B-CLL resistance to NK cell cytotoxicity can be overcome in vitro and in vivo by priming NK cells and monoclonal antibody therapy. *J Clin Immunol* (2012) 32:632–46. doi:10.1007/s10875-011-9624-5
- 12- Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Hiramatsu N, Sakamori R, Yamaguchi S, et al. Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* (2005) 43:1013–20. doi:10.1016/j.jhep.2005.05.02
- 13- Kusumi M, Yamashita T, Fujii T, Nagamatsu T, Kozuma S, Taketani Y. Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells. *J Reprod Immunol*. 2006 Jun;70(1-2):33-42. doi: 10.1016/j.jri.2005.12.008. Epub 2006 Feb 20. PMID: 16488482.
- 14- Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K: Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000; 356: 1795–1799.
- 15- Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, Martos JA, Moreno M: The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1997;79:2320–2328.
- 16- Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T: Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 2000;88:577–583.
- 17- Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jimenez R, Chillon MJ, Jareno J, Zuñiga M, Callol L: Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002;35:23–28.

- 18- Sutlu T, Alici E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J Intern Med.* 2009 Aug;266(2):154-81. doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02121.x. PMID: 19614820.
- 19- Tassi I, Klesney-Tait J, Colonna M. Dissecting natural killer cell activation pathways through analysis of genetic mutations in human and mouse. *Immunol Rev.* 2006 Dec;214:92-105. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00463.x. PMID: 17100878.
- 20- Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol.* 2005 Feb;42(4):501-10. doi: 10.1016/j.molimm.2004.07.034. PMID: 15607806.
- 21- Oshimi K, Oshimi Y, Motoji T, Kobayashi S, Mizoguchi H. Lysis of leukemia and lymphoma cells by autologous and allogeneic interferon-activated blood mononuclear cells. *Blood.* 1983 Apr;61(4):790-8. PMID: 6831042.
- 22- Pattengale PK, Sundstrom C, Yu AL, Levine A. Lysis of fresh leukemic blasts by interferon-activated human natural killer cells. *Nat Immun Cell Growth Regul.* 1983-1984;3(4):165-80. PMID: 6597341.
- 23- Carlsten M, Järås M. Natural Killer Cells in Myeloid Malignancies: Immune Surveillance, NK Cell Dysfunction, and Pharmacological Opportunities to Bolster the Endogenous NK Cells. *Front Immunol.* 2019 Oct 11;10:2357. doi: 10.3389/fimmu.2019.02357. PMID: 31681270; PMCID: PMC6797594.
- 24- Torelli GF, Guarini A, Maggio R, Alfieri C, Vitale A, Foa R. Expansion of natural killer cells with lytic activity against autologous blasts from adult and pediatric acute lymphoid leukemia patients in complete hematologic remission. *Haematologica.* 2005;90(6):785-92.

25- Yan Y, Steinherz P, Klingemann HG, Dennig D, Childs BH, McGuirk J, O'Reilly RJ. Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clin Cancer Res.* 1998 Nov;4(11):2859-68. PMID: 9829753.

26- Romanski A, Bug G, Becker S, Kampfmann M, Seifried E, Hoelzer D, et al. Mechanisms of resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol.* 2005;33(3):344-52.

27- Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 1999;94(1):333-9.

28- Suen WC, Lee WY, Leung KT, Pan XH, Li G. Natural Killer Cell-Based Cancer Immunotherapy: A Review on 10 Years Completed Clinical Trials. *Cancer Invest.* 2018; 36:431–57.

29- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002;295:2097–100.

30- Tanaka J. Recent advances in chimeric antigen receptor natural killer cell therapy for overcoming intractable hematological malignancies. *Hematol Oncol.* 2021 Feb;39(1):11-19. doi: 10.1002/hon.2802. Epub 2020 Sep 21. PMID: 32905618.

31- Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, Martini S, Rivera P, Capobianco A, Falco M, Lanino E, Pierri I, Zambello R, Bacigalupo A, Mingari MC, Moretta A, Moretta L. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood.* 2005 Mar 1;105(5):2066-73. doi: 10.1182/blood-2004-09-3548. Epub 2004 Nov 9. PMID: 15536144.

- 32- Stringaris K, Barrett AJ. The importance of natural killer cell killer immunoglobulin-like receptor-mismatch in transplant outcomes. *Curr Opin Hematol*. 2017 Nov;24(6):489-495. doi: 10.1097/MOH.0000000000000384. PMID: 28817402.
- 33- Beelen DW, Ottinger HD, Ferencik S, Elmaagacli AH, Peceny R, Trenscher R, Grosse-Wilde H. Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. *Blood*. 2005 Mar 15;105(6):2594-600. doi: 10.1182/blood-2004-04-1441. Epub 2004 Nov 9. PMID: 15536148.
- 34- Farag SS, VanDeusen JB, Fehniger TA, Caligiuri MA. Biology and clinical impact of human natural killer cells. *Int J Hematol*. 2003 Jul;78(1):7-17. doi: 10.1007/BF02983234. PMID: 12894845.
- 35- Moretta L, Locatelli F, Pende D, Mingari MC, Moretta A. Natural killer alloeffector responses in haploidentical hemopoietic stem cell transplantation to treat high-risk leukemias. *Tissue Antigens*. 2010 Feb;75(2):103-9. doi: 10.1111/j.1399-0039.2009.01404.x. Epub 2009 Dec 9. PMID: 20002610.
- 36- Chouaib S, Pittari G, Nanbakhsh A, El Ayoubi H, Amsellem S, Bourhis JH, Spanholtz J. Improving the outcome of leukemia by natural killer cell-based immunotherapeutic strategies. *Front Immunol*. 2014 Mar 17; 5:95. doi: 10.3389/fimmu.2014.00095. PMID: 24672522; PMCID: PMC3956082.
37. Xu J, Niu T. Natural killer cell-based immunotherapy for acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2020 Dec 7;13(1):167. doi: 10.1186/s13045-020-00996-x. PMID: 33287858; PMCID: PMC7720594.
- 38- Xu J, Niu T. Natural killer cell-based immunotherapy for acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2020 Dec 7;13(1):167. doi: 10.1186/s13045-020-00996-x. PMID: 33287858; PMCID: PMC7720594.



39- Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*. 2000 Nov 25;356(9244):1795-9. doi: 10.1016/S0140-6736(00)03231-1. PMID: 11117911.

40- Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U, Kuppen PJ. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol*. 2003 Nov;24(11):603-9. doi: 10.1016/j.it.2003.09.007. PMID: 14596885.

41- Mandal R, Şenbabaoğlu Y, Desrichard A, Havel JJ, Dalin MG, Riaz N, Lee KW, Ganly I, Hakimi AA, Chan TA, Morris LG. The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI Insight*. 2016 Oct 20;1(17):e89829. doi: 10.1172/jci.insight.89829. PMID: 27777979; PMCID: PMC5070962.

42- Delahaye NF, Rusakiewicz S, Martins I, Ménard C, Roux S, Lyonnet L, Paul P, Sarabi M, Chaput N, Semeraro M, Minard-Colin V, Poirier-Colame V, Chaba K, Flament C, Baud V, Authier H, Kerdine-Römer S, Pallardy M, Cremer I, Peaudecerf L, Rocha B, Valteau-Couanet D, Gutierrez JC, Nunès JA, Commo F, Bonvalot S, Ibrahim N, Terrier P, Opolon P, Bottino C, Moretta A, Tavernier J, Rihet P, Coindre JM, Blay JY, Isambert N, Emile JF, Vivier E, Lecesne A, Kroemer G, Zitvogel L. Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med*. 2011 Jun;17(6):700-7. doi: 10.1038/nm.2366. Epub 2011 May 8. PMID: 21552268.

43- Semeraro, M., Rusakiewicz, S., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Natural killer cell mediated immunosurveillance of pediatric neuroblastoma. *Oncoimmunology* 4, e1042202 (2015).

44- Mlecnik, B. et al. Functional network pipeline reveals genetic determinants associated with in situ lymphocyte proliferation and survival of cancer patients. *Sci. Transl Med.* 6, 228ra237 (2014).

45- Federico SM, McCarville MB, Shulkin BL, Sondel PM, Hank JA, Hutson P, Meagher M, Shafer A, Ng CY, Leung W, Janssen WE, Wu J, Mao S, Brennan RC, Santana VM, Pappo AS, Furman WL. A Pilot Trial of Humanized Anti-GD2 Monoclonal Antibody (hu14.18K322A) with Chemotherapy and Natural Killer Cells in Children with Recurrent/Refractory Neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2017 Nov 1;23(21):6441-6449. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0379. Epub 2017 Sep 22. PMID: 28939747; PMCID: PMC8725652.

46- Modak S, Le Ludec JB, Cheung IY, Goldman DA, Ostrovnaya I, Doubrovina E, Basu E, Kushner BH, Kramer K, Roberts SS, O'Reilly RJ, Cheung NV, Hsu KC. Adoptive immunotherapy with haploidentical natural killer cells and Anti-GD2 monoclonal antibody m3F8 for resistant neuroblastoma: Results of a phase I study. *Oncoimmunology.* 2018 May 10;7(8):e1461305. doi: 10.1080/2162402X.2018.1461305. PMID: 30221057; PMCID: PMC6136849.

47- Bachanova V, Sarhan D, DeFor TE, Cooley S, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Curtsinger JM, Burns L, Weisdorf DJ, Miller JS. Haploidentical natural killer cells induce remissions in non-Hodgkin lymphoma patients with low levels of immune-suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2018 Mar;67(3):483-494. doi: 10.1007/s00262-017-2100-1. Epub 2017 Dec 7. PMID: 29218366; PMCID: PMC6055922.

48- Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clin Cancer Res.* 2011 Oct 1;17(19):6287-97. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1347. Epub 2011 Aug 15. PMID: 21844012; PMCID: PMC3186830.

49- Geller MA, Cooley S, Judson PL, Ghebre R, Carson LF, Argenta PA, Jonson AL, Panoskaltsis-Mortari A, Curtsinger J, McKenna D, Dusenbery K, Bliss R, Downs LS, Miller JS. A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy*. 2011 Jan;13(1):98-107. doi: 10.3109/14653249.2010.515582. Epub 2010 Sep 20. PMID: 20849361; PMCID: PMC3760671.

50- Shimasaki N, Jain A, Campana D. NK cells for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2020 Mar;19(3):200-218. doi: 10.1038/s41573-019-0052-1. Epub 2020 Jan 6. PMID: 31907401.

51- Michel T, Poli A, Cuapio A, Briquemont B, Iserentant G, Ollert M, Zimmer J. Human CD56bright NK Cells: An Update. *J Immunol*. 2016 Apr 1;196(7):2923-31. doi: 10.4049/jimmunol.1502570. PMID: 26994304.