



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Transferência adotiva de células para
imunoterapia em tumores sólidos: ativação e
expansão de células *Natural Killer* para
erradicação de células malignas.

Dissertação apresentada à Universidade de
Coimbra para cumprimento dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica, realizada sob a orientação científica
do Professor Doutor Paulo Rodrigues Santos
(Faculdade de Medicina da Universidade de
Coimbra) e da Professora Doutora Maria Carmen
Alpoim (Faculdade de Ciências da Universidade
de Coimbra)

Marco António Carvalho Oliveira

2015

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador Dr. Paulo Rodrigues Santos, pela oportunidade de integrar o grupo de investigação do Instituto de Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Por todo o apoio ao longo deste tempo, esclarecimentos, disponibilidade demonstrada e confiança depositada. Queria agradecer por tudo o que fez por mim e que continua a fazer, estarei para sempre grato. Nunca esquecerei, muito obrigado.

Queria agradecer à Professora Doutora Carmen Alpoim por ter aceitado o papel de co-orientação.

Ao Professor Doutor Manuel Santos Rosa, Diretor do Instituto de Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, por ter possibilitado a realização desta dissertação no seu laboratório.

À Dra. Vera Alves por toda a simpatia e companhia durante estes dois últimos anos e por toda a ajuda disponibilizada nos momentos mais complicados.

Um agradecimento especial à Dra. Patrícia Couceiro, por toda a ajuda nestes dois anos, pelos seus ensinamentos, pela companhia, pelos seus conselhos nas horas de maior aflição, pelas suas palavras de conforto e por estar sempre disponível para o que precisasse, mesmo quando não era sua obrigação. Muito obrigado.

Ao futuro Mestre José Rui Simplício, um muito obrigado pela companhia nesta luta contra o tempo, pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, pela partilha de conhecimentos, pela amizade e pelo companheirismo.

Queria também agradecer aos restantes membros do laboratório pela companhia e ajuda durante este período.

Queria fazer um agradecimento especial à Doutoranda Débora Queirós por todo o conhecimento transmitido, por todo o apoio, por ter sido o meu braço direito nesta fase da minha vida e por todas as palavras de conforto.

Queria agradecer também a todos os meus amigos que direta ou indiretamente me apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Por último queria agradecer do fundo do meu coração aos meus pais e irmãos. Não é possível descrever toda a minha gratidão por tudo o que fizeram por mim. Aos meus pais, que fizeram o possível e o impossível para que conseguisse vir para Coimbra prosseguir o meu percurso académico, pelos sacrifícios que fizeram para que nada me faltasse, por acreditarem em mim e nas minhas capacidades desde o início, por me incentivarem a seguir o meu percurso mesmo que longe de casa. Muito obrigado.

Índice

Resumo	1
Introdução	6
Imunidade	8
Imunidade Inata	10
Imunidade Adquirida	11
Células <i>Natural Killer</i>	13
<i>Desenvolvimento e Maturação</i>	13
<i>Propriedades Funcionais</i>	14
<i>Subpopulações</i>	15
<i>Recetores</i>	17
Tumores Sólidos	19
Cancro do Pâncreas	22
Cancro Colo-retal	23
Imunidade e Cancro	25
Células <i>Natural Killer</i> e Cancro	26
Ambiente Tumoral	30
Transferência adotiva de células	34
Objetivos	37
Materiais e Métodos	41
População em estudo	43
Cultura Celular	43
Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs)	44
Contagem de células	45
Viabilidade Celular	45
Enriquecimento de células <i>Natural Killer</i> – Separação celular magnética	46
Ensaio de Desgranulação - CD107a	47
Ensaio de citotoxicidade - LDH	47
Genotipagem HLA – PCR-SSP	47
Expressão Génica – qPCR em tempo real	48
Marcação extracelular e Intracelular para Citometria de Fluxo	48
Análise Citometria de Fluxo	49
Compostos	49
Análise estatística	50

Resultados	52
Caracterização das linhas celulares do Cancro do Pâncreas e do Cancro Colo-retal	54
Expressão Génica	58
<i>Ciclo Celular</i>	59
<i>Resposta Imunoinflamatória</i>	61
<i>Outros</i>	63
Genotipagem HLA	64
Ensaio de desgranulação: CD107a	65
<i>Não estimulado</i>	66
<i>Estimulação com Interleucina-2</i>	68
Ensaio de citotoxicidade - LDH	71
<i>LDH vs CD107a</i>	72
<i>Ensaios com anti-CD16 - LDH</i>	73
Discussão	76
Expressão elevada dos recetores HLA-ABC e PVR nas linhas celulares tumorais	79
Quantificação da expressão génica de constituintes promotores ao desenvolvimento tumoral	80
Expressão genotípica dos alelos HLA classe I reconhecidos pelos recetores KIR das células <i>Natural Killer</i>	83
Atividade citotóxica das células NK na interação com as células tumorais alvo	85
Conclusões e perspectivas futuras	90
Referências	95

Índice de abreviaturas

ACT	<i>Adoptive Cell Transfer</i>
ADCC	<i>Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity</i>
Ang	<i>Angiopoietin</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCR	Cancro Colo-retal
CP	Cancro do Pâncreas
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle's Medium</i>
DNAM-1	<i>DNAX Accessory Molecule-1</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GrzB	Granzima B
HIF	<i>Hypoxia-inducible Factor</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IFN- γ	Interferão gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
KIR	<i>Killer Immunoglobulin-like Receptors</i>
LCR	<i>Lectin-C Receptor</i>
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i>
MHC class I	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MICA	<i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i>
MICB	<i>MHC class I polypeptide-related sequence B</i>
NCR	<i>Natural Cytotoxicity Receptor</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>

PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
PD-L 1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PVR	<i>Poliovirus Receptor</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TCR	<i>T-Cell Receptor</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TNF	<i>Tumour Necrosis Factor</i>
TRAIL	<i>Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
VEGF	<i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação dos constituintes celulares de ambos os ramos do sistema imune (inato e adquirido).	9
Figura 2 – Tempo da resposta imunitária inata e adquirida a infeções ou tecidos danificado ...	12
Figura 3 - Representação dos diferentes recetores celulares expressos à superfície de células NK.	16
Figura 4 - Reconhecimento de células tumorais pelas células NK..	18
Figura 5 - Características adquiridas pelas células tumorais.	21
Figura 6 – Mecanismos pelo qual o sistema imune reconhece e controla o crescimento tumoral	26
Figura 7 - Resposta anti tumoral mediada por células NK.	27
Figura 8 - Diferentes estratégias de tratamento com imunoterapia baseada em células NK.....	29
Figura 9 - Origem e influência da heterogeneidade tumoral.	31
Figura 10 – Imagens com ampliação de 200X das linhas celulares do Cancro do Pâncreas Panc-1 (A) e MiaPaca-2 (B).	54
Figura 11 – Imagens com ampliação de 200X das linhas celulares do Cancro Colo-retal LS1034 (A), C2BBel (B) e WiDr (C).	55
Figura 12 – Caracterização da expressão de recetores de superfície das linhas celulares do tumor do Pâncreas (A; B), Colo-retal (C; D; E) e de Leucemia (F).	56
Figura 13 - Caracterização da expressão de recetores de superfície das linhas celulares do tumor do Pâncreas, Colo-retal e de Leucemia Mieloide Crónica	57
Figura 14 - Quantificação da expressão de constituintes importantes no ciclo celular.....	59
Figura 15 - Quantificação da expressão de genes importantes na resposta imunoinflamatória.	61
Figura 16 - Quantificação da expressão de genes com diferentes funções (A) NF-K β ; (B) VEGF;	63
Figura 17 - Comparação entre a libertação de CD107a pelas células NK de dadores saudáveis na interação com a linha celular K562 e com as diversas linhas celulares do CP e do CCR.....	66
Figura 18 - Comparação entre a libertação de IFN- γ pelas células NK de dadores saudáveis na interação com a linha celular K562 e entre as diversas linhas celulares do CP e do CCR.	67
Figura 19 - Libertação de CD107a pelas células NK de dadores saudáveis após estimulação com IL2	68
Figura 20 - Libertação de IFN- γ pelas células NK de dadores saudáveis após estimulação com IL-2.....	69
Figura 21 – Comparação entre a expressão de CD107a da linha celular Panc-1 e da MiaPaca-2 sem estímulo e estimuladas com IL-2.	70
Figura 22 - Comparação entre a expressão de CD107a da linha celular LS1034, da C2BBel e da WiDr sem estimulação e estimuladas com IL-2.	71
Figura 23 – Comparação da quantificação da morte celular entre o ensaio de citotoxicidade CD107a e o ensaio de LDH quando em contacto com as células NK sem estimulação prévia e após estimulação com IL-2.	72
Figura 24 – Comparação entre a libertação de LDH pelas linhas celulares tumorais na interação com as células NK de dadores saudáveis.	73

Índice de tabelas

Tabela I - Resumo das reatividades dos anticorpos monoclonais, conjugados e respectivos clones.....	49
Tabela II - Genotipagem HLA das diversas linhas celulares de CP, de CCR e Leucemia Mieloide Crónica.....	65

Resumo

O cancro do Pâncreas (CP) e o Colo-retal (CCR) são dois dos carcinomas com uma malignidade devastadora onde o prognóstico de sobrevivência é extremamente fraco. Esta malignidade está relacionada com o facto de os tumores evoluírem rapidamente e com poucos sintomas específicos levando a que o diagnóstico seja feito apenas num estadio avançado na maioria dos pacientes. Estes tumores possuem elevadas taxas de recorrência e de metastização, diminuindo assim ainda mais a taxa de sobrevivência.

As células *Natural Killer* (NK) foram definidas inicialmente como linfócitos efetores da imunidade inata dotados com funções citolíticas. Mais recentemente, uma nova visão sobre as NK tem emergido. As células NK são agora reconhecidas por expressarem um repertório vasto e complexo de recetores ativadores e inibidores que estão calibrados para garantir a tolerância do próprio enquanto permite uma grande eficácia contra ataques, como infeções virais ou desenvolvimento tumoral.

Neste estudo pretendeu-se fazer uma caracterização fenotípica e funcional de linhas celulares tumorais de Cancro do Pâncreas, de Cancro Colo-retal e de Leucemia Mieloide Crónica. O principal objetivo deste trabalho foi fazer uma ativação e expansão *in vitro* de células NK de dadores saudáveis seguido de co-cultura com as células tumorais de modo a medir o efeito de citocinas, de agonistas dos TLRs e do uso de anticorpos não-depletantes na atividade citotóxica das NK.

Foi demonstrado que as linhas celulares tumorais possuem uma maior expressão de recetores inibidores de superfície (ligandos HLA-ABC e PVR) comparativamente com os recetores ativadores. Estes recetores inibidores são reconhecidos pelas células NK emitindo um sinal inibidor e dificultando a atividade citotóxica das mesmas.

Foi demonstrado que a estimulação com Interleucina-2 (IL-2) promove a ativação das células NK aumentando significativamente a sua atividade citotóxica contra as células tumorais em estudo. Ficou ainda demonstrado que esta mesma estimulação com IL-2 contraria o efeito de anergização das células NK provocada pela libertação de citocinas pelas células tumorais.

Com este estudo foi demonstrado que as células NK podem-se tornar uma ferramenta imunoterapêutica importante no tratamento destas patologias.

Palavras-chave: Células *Natural Killer*, imunidade inata, cancro, imunoterapia, transferência adotiva de células.

Pancreatic cancer (PC) and Colo-rectal cancer (CRC) are two type of carcinoma with devastating malignancy where survival prognosis is extremely low. The high malignancy is related to the rapid evolution of the tumours as well as the few specific symptoms associated with these conditions, which typically lead to a late diagnosis. Moreover, these tumours are also characterized by a high rate of recurrence and metastasization, further decreasing the survival rate.

Natural Killer cells (NK) were initially defined as effector lymphocytes of innate immunity endowed with catalytic capabilities. More recently, a new vision concerning NK has emerged. NK cells are now recognized for expressing a vast and complex array of activator and inhibitor receptors which are calibrated as so to ensure self-tolerance while allowing great efficacy against attacks like viral infections or tumoral development.

The intentional of this study was the functional and phenotypic characterization of tumoral cell lines of Pancreatic Cancer, Colorectal Cancer and Chronic Myelogenous Leukemia. The principal objective of this work was to achieve *in vitro* activation and expansion of NK cells from healthy donors followed by co-culture with tumoral cells in order to evaluate the effect of cytokines and non-depletant antibodies in cytotoxic activity of NK cells.

It was demonstrated that tumor cell lines from PC and CRC have greater expression of surface inhibitor receptors (ligands HLA-ABC and PVR) when compared to activator receptors. Such inhibitor receptors are recognized by NK cells and send an inhibitor signal that hinders their cytotoxic activity.

It was demonstrated that stimulation with Interleukin-2 (IL-2) promotes NK cells activation which significantly increases their cytotoxic activity against tumor cells under study. It was also demonstrated that such IL-2 stimulation counteracts the effect of “split-energy” of NK cells that is caused by the release of cytokines by tumor cells. With this, NK cells can become an important immunotherapeutic tool in the treatment of these pathologies.

Key words: Natural Killer cells, innate immunity, cancer, immunotherapy, adoptive cell transfer.

Introdução

Imunidade

O sistema imune é um sistema de defesa extremamente versátil que evoluiu para proteger organismos multicelulares de patogénicos e de células tumorais. Este sistema é extremamente adaptável, defendendo o corpo de invasores. O sistema imune é composto por uma variedade de células e de moléculas, trabalhando todos em conjunto como uma rede dinâmica para reconhecer e eliminar substâncias que podem causar dano ao organismo (Figura 1). Para além de ser capaz de distinguir entre moléculas estranhas ao organismo e moléculas do próprio, (descriminação do próprio/não próprio) (Finlay and McFadden 2006; L. Moretta and Moretta 2004; Zitvogel et al. 2011).

O sistema imune também é capaz de reconhecer células do próprio alteradas que podem levar ao desenvolvimento de cancro. Uma definição mais recente do sistema imune é baseada na ideia da discriminação entre o que é e o que não é perigoso para o organismo (Zitvogel et al. 2011).

Introdução

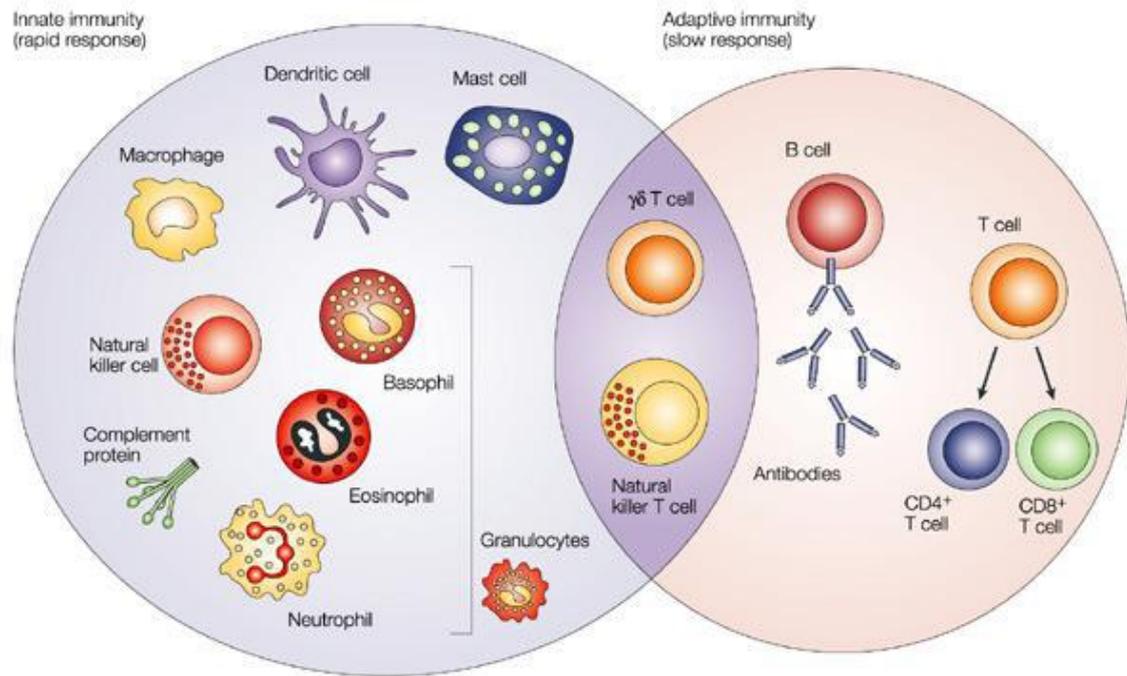


Figura 1 - Representação dos constituintes celulares de ambos os ramos do sistema imune (inato e adquirido) e as células que poderão fazer a interface entre estes dois ramos do sistema imune (Dranoff 2004).

Os vários componentes do Sistema imune são capazes de converter o evento de reconhecimento inicial numa variedade de respostas efetoras; sendo cada resposta específica para remover um determinado tipo de patógeno. Para além de ser referido simplesmente como sistema imune, deveremos ter a noção que existem dois tipos de resposta imune, a inata e a adquirida, cada um com células com características específicas. Segundo a literatura, hoje em dia sabe-se que existe um terceiro grupo de células que fazem a ponte entre os dois ramos, exibindo características tanto de células inatas como de células adquiridas, destas células destacam-se as *Natural Killer T* (Figura 1) (Finlay and McFadden 2006).

Imunidade Inata

O sistema imune inato compreende mecanismos celulares e moleculares que ajudam a prevenir e conter as infecções (Caligiuri 2008; Finlay and McFadden 2006; A. Moretta, Locatelli, and Moretta 2008).

Esta é a primeira linha de defesa do organismo, é extremamente eficaz, e tem a capacidade de prevenir a maioria das infecções no seu início ou então eliminá-las poucas horas após o contacto inicial com o sistema imune inato. O sistema imune consegue distinguir entre os constituintes do próprio organismo e agentes patogénicos, no entanto é incapaz de distinguir pequenas diferenças entre os patogénios (Bewick, Yang, and Zhang 2009).

Nos vertebrados, a imunidade inata é largamente dependente das células mieloides (imunócitos que eliminam os patogénios). No geral, estas células são capazes de desempenhar as suas funções se estiverem sozinhas, mas para um efeito de maior magnitude, evoluíram de maneira a serem mais eficazes se actuarem em conjunto com células e proteínas do sistema imune adquirido.

As células mieloides incluem fagócitos mononucleares e fagócitos polimorfonucleares. Os fagócitos mononucleares estão divididos em três tipos de células: os monócitos, macrófagos (derivados dos monócitos) e células dendríticas. Cada uma destas células têm elevada capacidade de fagocitose e desempenham um papel importante na apresentação de antígenos às células do sistema imune adquirido. Os fagócitos polimorfonucleares incluem os granulócitos: neutrófilos, basófilos e eosinófilos (Chaplin 2010).

Outro componente celular da imunidade inata que é de extrema importância são as células *Natural Killer* (NK). Estas células são as únicas células linfocíticas pertencentes ao sistema imune inato. Elas são geradas na medula óssea e estão sob a influência de IL-2 e de interleucina-15 (IL-15) assim como outras células da medula óssea. Embora sejam classificadas como linfócitos, estas células não possuem receptores para antígenos específicos (Beutler 2004; Chaplin 2010).

Imunidade Adquirida

A principal característica deste tipo de imunidade está focada na sua habilidade de depois de uma estimulação apropriada e de fornecer capacidade efetora contra antígenos específicos e não contra células, consegue iniciar simultaneamente mecanismos que permitem uma melhor resposta efetora em futuras infecções, mesmo se essas infecções ocorrerem décadas mais tarde (Chaplin 2010).

A imunidade adaptativa apresenta uma resposta específica a um patógeno particular e tem capacidade de memória; esta memória desenvolve-se em resposta a uma infecção e adapta-se para reconhecer, eliminar e lembrar o patógeno invasor no caso de futuros encontros com o mesmo agente.

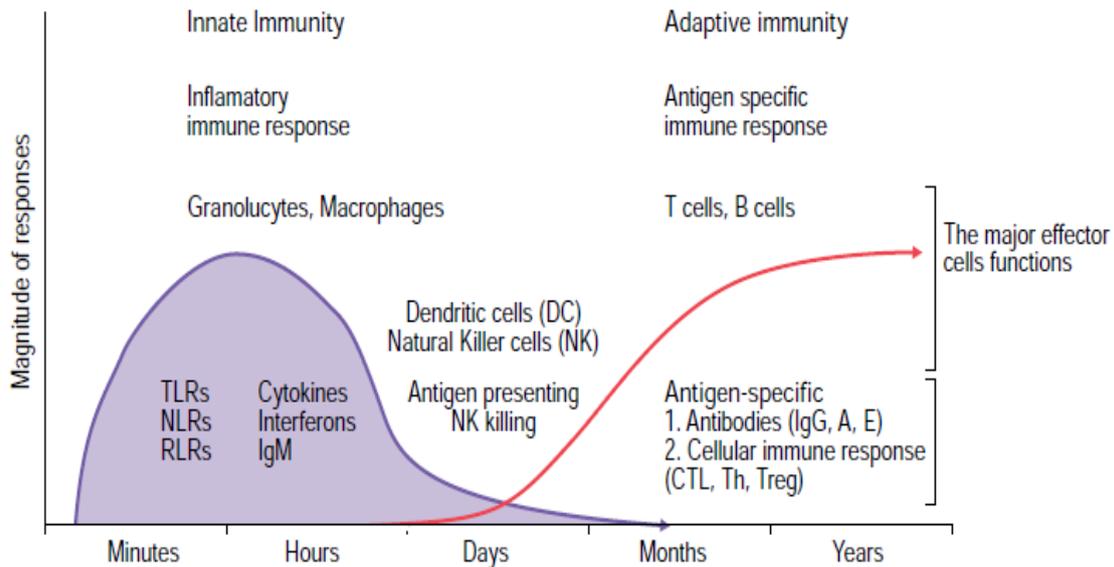


Figura 2 – Tempo da resposta imunitária inata e adquirida a infeções ou tecidos danificados e os tipos celulares envolvidos.

A imunidade adaptativa sucede a imunidade inata, iniciando-se alguns dias após a infeção inicial (Figura 2). Fornece uma segunda e completa linha de defesa do organismo, que elimina os agentes patogénicos que escaparam à resposta inata ou que persistem apesar dela. Uma consequência importante da resposta adaptativa é a memória. Num segundo encontro com o mesmo patógeno, ou um outro intimamente relacionado, as células de memória fornecem os mecanismos para o sistema imune adaptativo fazer um ataque rápido e frequentemente efetivo contra esses agentes invasores (Moretta and Moretta 2004; Finlay and McFadden 2006; Caligiuri 2008).

Os linfócitos B e T pertencem à resposta imune adaptativa e expressam uma quase ilimitada variedade de recetores recombinantes Ig e recetores de células T (TCR), respetivamente, que são capazes de reconhecer qualquer antígeno e que quando ativado mantém uma memória específica de longo prazo (Cooper and Alder 2006).

As principais características das células B e T, e consequentemente do sistema imune adquirido, são a especificidade e a memória. Esta especificidade permite que o sistema imune reconheça diferenças subtis entre os antígenos. Após um primeiro contacto com o antígeno, células B efectoras e células T de memória são as únicas capazes de responder alguns dias depois. Assim tornou-se claro que o sistema imune inato é essencial para limitar ou erradicar patógenos durante a primeira fase de infeção, isto é, antes de as células B e T serem capazes de efetuarem resposta eficiente (Moretta and Moretta 2004; Finlay and McFadden 2006; David, Morvan et al. 2009; Chaplin 2010).

Células *Natural Killer*

Desenvolvimento e Maturação

As células NK são produzidas na medula óssea e transportadas para órgãos linfoides periféricos durante os seus últimos estádios de maturação. Embora possam ser encontradas células NK imaturas no fígado, no timo, no baço e nos gânglios linfáticos, a medula óssea é considerada como o órgão principal para o desenvolvimento das células NK. Na medula óssea, precursores das células NK passam por vários estádios de diferenciação que podem ser rastreados através da expressão coordenada de marcadores da superfície da célula (Beli et al. 2013).

Estudos recentes demonstram que o CD27 (recetor da família do TNF) é um importante marcador que divide as NK em diferentes subpopulações. Com a expressão de CD27 combinada com CD11b é possível identificar e distinguir distintas subpopulações de células NK consoante a sua maturação. As células NK imaturas são caracterizadas por serem duplas negativas na expressão de CD11⁻CD27⁻ e estão

caracterizadas como células mais efectoras. As células duplas negativas apresentam um fenótipo imaturo e possuem um grande potencial de diferenciação. As células NK $CD11b^-CD27^+$ e as duplas positivas $CD11b^+CD27^+$ representam os próximos estádios de maturação e possuem a capacidade de excretarem citocinas. A subpopulação de células NK mais maduras são as $CD11b^+CD27^-$ e demonstram uma maior capacidade citolítica. Esta variedade de características demonstra que as células NK de humanos em estádios diferentes de desenvolvimento possuem funções especiais (Desbois et al. 2012; Fu et al. 2011).

Propriedades Funcionais

As células NK são caracterizadas morfológicamente como linfócitos granulares grandes e são células efectoras críticas na resposta inicial da imunidade inata contra patógenos ou células tumorais. Estas células efectoras são capazes de entrar e defender tecidos imediatamente após a infecção ter ocorrido (Vivier et al. 2011). As NK conseguem lisar diretamente células infetadas por vírus ou células tumorais sem necessidade de sensibilização prévia e fornece citocinas imuno-reguladoras que irão adaptar a resposta adaptativa subsequente (Stewart, Laugier-Anfossi et al. 2005).

Segundo dados recentes, estas células podem servir de ponte entre o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo uma vez que devido a uma rede extensa e complexa de comunicação com outros tipos celulares, tanto do sistema imune inato como do sistema imune adquirido (como as células dendríticas, células B e células T), conseguem influenciar a magnitude e a qualidade da resposta imune adaptativa (Moretta and Moretta 2004; Stewart, Laugier-Anfossi et al. 2005).

Introdução

Ao contrário dos linfócitos T, as NK não expressam recetores de antígenos específicos, em vez disso, as funções das células NK dependem de um balanço complexo de sinais ativadores e inibidores através de uma variedade de diferentes recetores de superfície.

Estas células correspondem a 10-15% dos linfócitos presentes no sangue periférico, sendo também encontradas nos gânglios linfáticos, no baço ou em tecidos periféricos e são fenotipicamente caracterizados pela sua expressão de CD56 e a ausência de CD3 (Lopez-Verges, Milush et al. 2011).

Subpopulações

Em humanos, as células NK podem ser divididas em duas subpopulações de acordo com a densidade de CD56 expresso à sua superfície. Podem ser divididos em CD56^{bright}CD16⁻, que possuem uma atividade reguladora por produzirem maior quantidade de citocinas, ou CD56^{dim}CD16⁺, que possuem maior atividade citotóxica (Montaldo et al. 2013). Cada uma destas subpopulações possuem propriedades fenotípicas distintas, com características distintas e, portanto, tendo papéis distintos na resposta imune.

O antígeno CD56 é uma isoforma da molécula de adesão neuronal humana, com uma função ainda desconhecida nas células NK apesar de se pensar que possa estar envolvida na adesão deste tipo celular a células alvo (Lopez-Vergès et al., 2011).

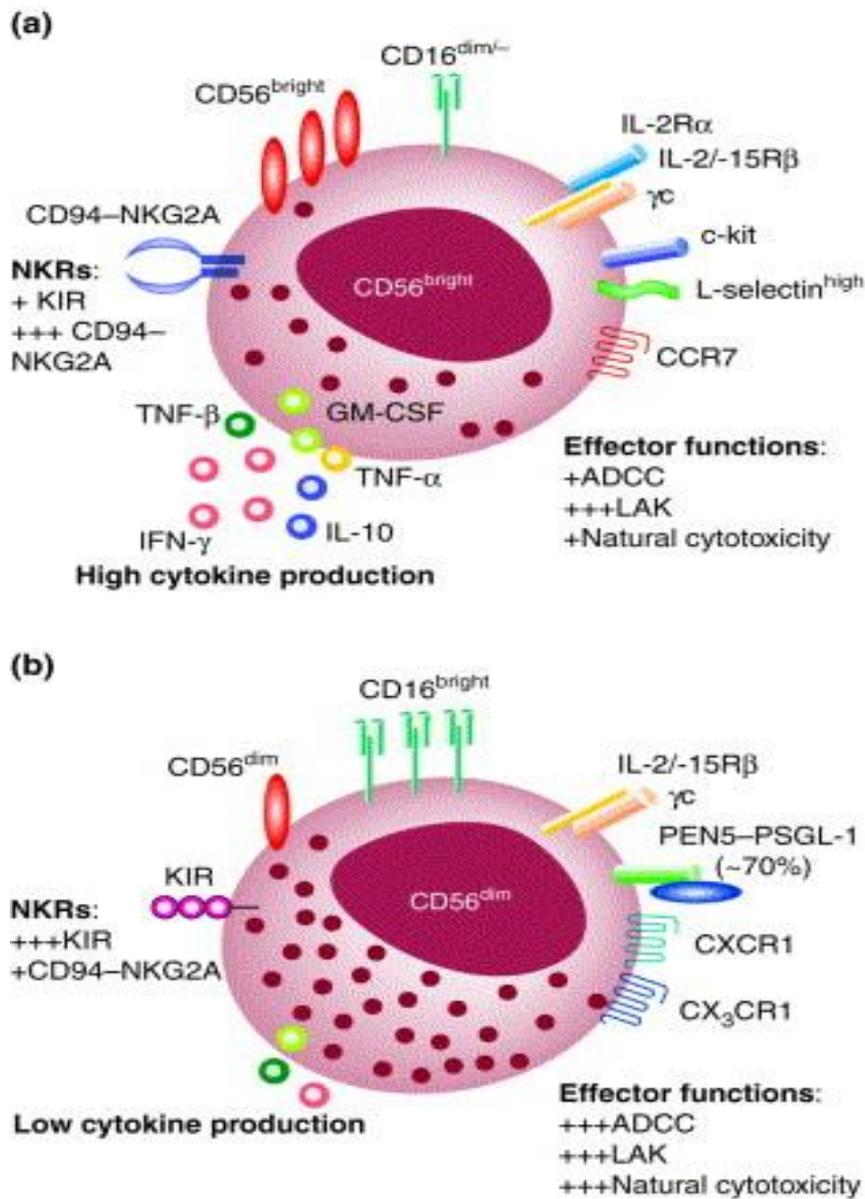


Figura 3 - Representação dos diferentes receptores celulares expressos à superfície de células NK. Verifica-se que existe uma expressão diferencial destes receptores nas duas subpopulações de células (NK CD56^{bright}CD16⁻ e CD56^{dim}CD16⁺) (Maria et al. 2011).

As células CD56^{dim}CD16⁺ representam 90% das células NK nos humanos enquanto as CD56^{bright}CD16⁻ apenas representam 10% (Figura 3). Atualmente, sabe-se que existe uma expressão diferente de receptores nas duas subpopulações de células NK. É devido a esta expressão diferente de receptores (inibidores), que fornece a capacidade de

regulação da citotoxicidade por parte destas células (Cooper, Fehniger, & Caligiuri, 2001).

Recetores

As células NK possuem à sua superfície determinados recetores que reconhecem antígenos, de maneira a reconhecer células alvo. Existem recetores ativadores e inibidores. Alguns dos recetores de superfície são os chamados *Killer Immunoglobulin like receptors* (KIRs), que são expressos por células *Natural Killer* e uma subpopulação de células T. Inicialmente, pensava-se que os KIR representavam recetores específicos de inibição mas agora sabe-se que também representam recetores ativadores. Para além dos recetores KIR, as células NK possuem os recetores inibidores já bem caracterizados como as lectinas do tipo C (LCR) e os *Natural Cytotoxicity Receptors* (NCRs).

A ativação ou não ativação das células NK está dependente do balanço entre os sinais inibidores e os sinais ativadores onde se houver uma predominância dos sinais ativadores as células NK vão provocar lise celular às células alvo. Se houver uma predominância dos sinais inibidores as células NK não vão ser ativadas e assim as células alvo não vão ser lisadas.

Assim, foram propostos três mecanismos de reconhecimento por parte das células NK. O “reconhecimento do não próprio”, a “ausência de reconhecimento do próprio” e o “reconhecimento induzido por *stress*” (figura 4).

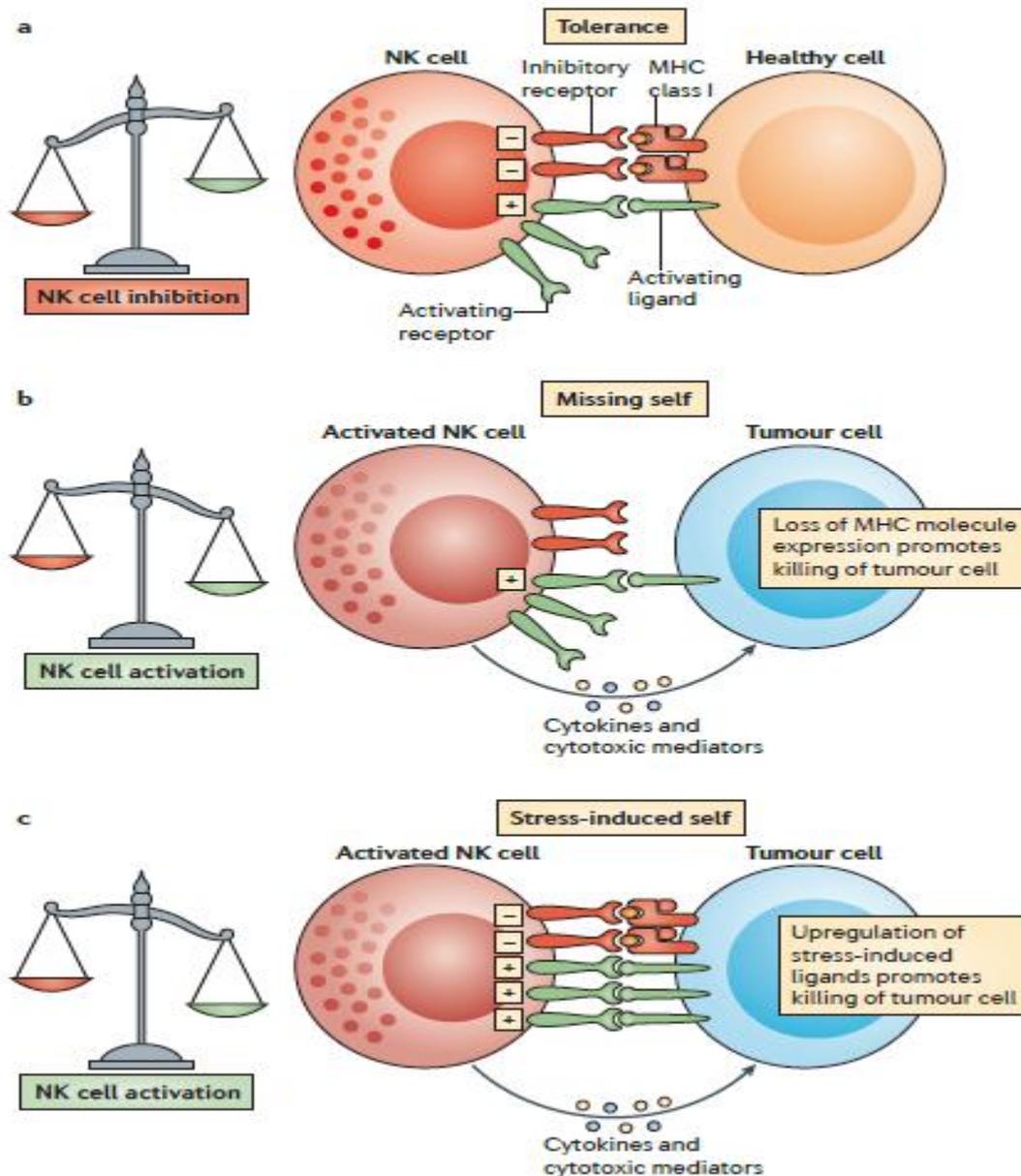


Figura 4 - Reconhecimento de células tumorais pelas células NK. (a) As células *Natural Killer* (NK) são tolerantes às células hospedeiras saudáveis, como a força dos sinais de ativação recebidos ao encontrar essas células é atenuada pela presença de receptores inibidores (Tolerância). (b) As células tumorais podem perder expressão de moléculas MHC classe I. As células NK tornam-se ativadas em resposta a essas células, uma vez que já não está presente o sinal inibidor da molécula MHC classe I. Isto é conhecido como 'Missing-self' desencadeando a ativação das células NK. (c) As células NK são seletivamente ativadas por células "stressadas", que regulam positivamente ligandos ativadores para as células NK levando a um desequilíbrio, ativando as células NK. Este mecanismo é conhecido como "reconhecimento induzido por stress" (Vivier et al. 2012).

As células NK conseguem reconhecer o Complexo Major de Histocompatibilidade de classe I (MHC classe I) através de recetores de superfície que transmitem sinais inibidores. Alguns dos recetores de superfície envolvidos no processo de reconhecimento do MHC I por parte das células NK são os chamados KIR. Se houver um maior número de sinais inibidores, as células NK não são ativadas (figura 4a). Este reconhecimento do MHC I demonstra mais uma intercomunicação entre o sistema imune inato e adaptativo. Durante a transformação tumoral das células, pode ocorrer uma de duas coisas. As células tumorais podem perder a expressão dos ligandos MHC classe I, levando a que haja uma predominância dos sinais ativadores. Assim, as células NK vão ser ativadas e vão lisar as células transformadas (figura 4b) (David et al., 2009; Moretta & Moretta, 2004).

Quando as células são transformadas (no processo de transformação tumoral) também podem sofrer *stress* induzido levando a que haja um aumento dos ligandos ativadores. Este stress vai fazer com que haja uma predominância dos sinais ativadores, levando a que haja uma ativação das células NK, levando à libertação de citocinas e mediadores citotóxicos provocando a lise das células alteradas (figura 4c) (David et al., 2009; Moretta & Moretta, 2004).

Tumores Sólidos

As células tumorais são caracterizadas por uma taxa proliferativa elevada, ou seja, são células que crescem e se dividem de uma forma muito rápida, por comparação com o observado nas células normais. Os tumores não são apenas massas de células cancerígenas em proliferação, em vez disso, são tecidos complexos compostos por múltiplos tipos de células distintas interagindo entre si. Têm a capacidade de invadir e

Introdução

destruir tecidos adjacentes, são insensíveis a sinais anti-crescimento e são auto-suficientes na produção de fatores de crescimento (Hanahan, Weinberg, and Francisco 2000).

Como causas conhecidas para o aparecimento/formação de células tumorais destacam-se as mutações génicas, os agentes químicos (como, por exemplo, o monóxido de carbono, o tabaco e o alcatrão), as radiações, a hereditariedade genética, entre outros (Hanahan and Weinberg 2011).

Esta proliferação excessiva advém de vários aspetos, entre os quais o efeito da matriz extracelular. A matriz extracelular é muito importante no desenvolvimento celular, não só na manutenção da homeostasia do tecido e da sua estrutura, mas também atua na regulação da sinalização para a proliferação e sobrevivência celulares. Além disso, a matriz extracelular também serve de suporte às interações entre o tumor e os diversos tipos celulares (Wong and Rustgi 2013).

Introdução

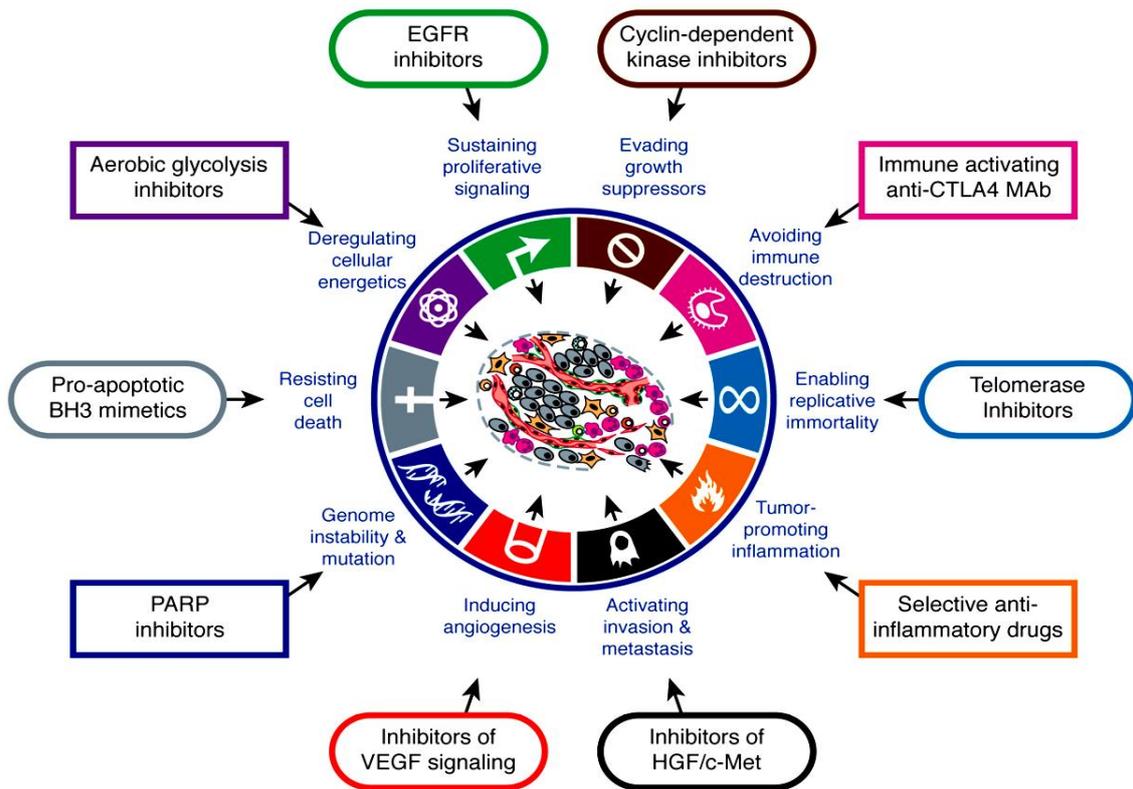


Figura 5 - Características adquiridas pelas células tumorais. (Hanahan, Weinberg, and Francisco 2000).

A transformação de células saudáveis a células tumorais consiste num processo longo, onde ocorre um grande número de mutações genéticas ao qual irão conferir às células tumorais certas características próprias (figura 5).

Os tumores malignos têm a particularidade de conseguirem disseminar por outros tecidos do corpo, processo biológico este denominado de metastização (Hanahan and Weinberg 2011). Esta característica de malignidade permite diferenciar as células tumorais malignas das células tumorais benignas, sendo as últimas auto-limitadas no seu crescimento e na invasão dos tecidos adjacentes.

Durante o crescimento tumoral é observado um transporte deficiente de nutrientes e de oxigénio para as células distantes dos vasos sanguíneos, comprometendo o desenvolvimento do tumor. Assim, as células tumorais desenvolveram a capacidade de criar a sua própria rede vascular a partir da do tecido normal adjacente, fenómeno biológico designado de angiogénese (Correa de Sampaio et al. 2012). Esta angiogénese tumoral é induzida pela libertação de fatores de crescimento pró-angiogénicos (Watnick 2012), de entre os quais se destacam o VEGF (*Vascular Endotelial Growth Factor*), o HIF (*Hypoxia-inducible Factor*), o FGF (*Fibroblast Growth Factor*), as Angiopoietinas (i.e. Ang1 e Ang2), etc. (Szot et al. 2011).

Como normalmente as células tumorais se encontram em situação de hipoxia, a respiração anaeróbia é favorecida, levando a um aumento da produção de lactato. Além disso, a capacidade proliferativa descontrolada das células tumorais requer grandes quantidades de glucose (Marie and Shinjo 2011).

Cancro do Pâncreas

O cancro do pâncreas é uma preocupação séria que tem aumentado em países desenvolvidos. É um dos tumores mais agressivos e mais letais apesar da acentuada melhoria na assistência médica e no combate ao cancro nos últimos anos. O número de doentes diagnosticados logo no início do tumor tem aumentado significativamente.

O mais comum subtipo histológico de cancro do pâncreas é o adenocarcinoma, que compreende 87% do cancro do pâncreas (Chang et al. 2013a). Este tumor está associado a um prognóstico extremamente fraco, com uma taxa de sobrevivência de 18%

para 1 ano de vida para todos os estágios do tumor, caindo para menos de 4% a esperança de vida para 5 anos e de 1%-2% para os doentes com metástases distantes.

A baixa taxa de sobrevivência associada reflete o facto de o tumor evoluir rapidamente com poucos sintomas específicos e assim se conseguir fazer um diagnóstico apenas nos estadios mais avançados, onde apenas 10% podem ser sujeitos a cirurgia. Assim sendo, é impossível sobreviver ao adenocarcinoma pancreático da mesma maneira que os tumores colo-rectal ou do pulmão conseguem sobreviver. A maioria dos doentes são diagnosticados como indisponíveis para cirurgia e a quimioterapia é o tratamento padrão para controlar o tumor incurável (Deer et al. 2010).

Na maioria dos casos, o tumor progride antes de uma manifestação clínica, o que impede um diagnóstico precoce, levando a um aumento da taxa de mortalidade. Mais de 80% dos doentes são diagnosticados apenas em estadios avançados. Numa grande parte dos doentes, inicialmente pensa-se que o tumor é local e ressecável mas mais tarde descobre-se que se torna recorrente e metastático. O cancro do pâncreas mantém-se como um dos mais difíceis de tratar devido à resistência intrínseca aos tratamentos convencionais. Dos tratamentos existentes, a cirurgia e os tratamentos quimioterapêuticos são os mais eficazes mas os resultados não são satisfatórios (Ghosn et al. 2014).

Cancro Colo-retal

Em cada ano, aproximadamente 1.2 milhões de indivíduos são diagnosticados com cancro colo-retal (cerca de 9.8% de todos os novos casos de cancro) (Zhu et al. 2014). O CCR é o terceiro cancro mais comum nos homens e o segundo mais comum nas mulheres com a maioria dos casos a ocorrerem nos países desenvolvidos, com a

industrialização e urbanização, indicando que os fatores ambientais podem representar fatores de risco (Sostres, Gargallo, and Lanas 2014; Stella Tsai et al. 2010).

O estilo de vida e a dieta têm um grande impacto no risco do aparecimento do CCR. As populações em que a sua dieta se baseia em grandes quantidades de calorias, gorduras, álcool e carne, mas com baixas quantidades de cálcio estão mais sujeitas ao aparecimento deste tipo de tumor. Para além destes fatores, o tabaco também têm um grande impacto na predisposição para o aparecimento do tumor (de la Chapelle 2004).

Num tumor maligno está presente uma comunidade celular complexa. Esta comunidade é constituída por células oncogeneticamente transformadas, células não neoplásicas como células do estroma, células imunes, e micróbios tais como bactérias e vírus em alguns casos (Maciejewski et al., 2013). Muitos tipos de cancro estão associados com agentes infecciosos e este tipo de cancro tendem a ocorrer em tecidos da mucosa que têm grandes níveis de exposição a micróbios, como é o caso do CCR que pode ser causado pela bactéria *Helicobacter pylori* (Zhu et al. 2014).

A grande malignidade do cancro colo-retal deve-se ao facto de metastizar, levando ao espalhamento do tumor para outras zonas do corpo. Dos poucos tratamentos disponíveis, o mais eficaz é a remoção do tumor recorrendo a cirurgia de ressecção se detetado em estadios precoces. Se for detetado num estadio mais tardio, a cirurgia deverá ser associada com quimioterapia neo-adjuvante ou adjuvante. Aproximadamente 60% dos doentes que foram sujeitos à remoção do tumor vão experimentar recorrência do tumor localmente ou o aparecimento de metástases distantes ao local inicial (Migliore et al. 2011).

Imunidade e Cancro

O processo pelo qual o sistema imune inato e adquirido controlam o crescimento tumoral e modulam a imunogenicidade das células tumorais é chamado de imunoeedição tumoral (*Cancer Immunoediting*). Este processo consiste em três fases distintas: eliminação, equilíbrio e evasão (Figura 6).

A eliminação, ou imunovigilância tumoral, é o processo pelo qual as células do sistema imune inato e adquirido trabalham em conjunto para detetar e destruir células transformadas muito antes de se tornarem clinicamente visíveis. No entanto, às vezes variantes de células tumorais podem não ser completamente eliminadas mas em vez disso entram numa fase de equilíbrio em que o sistema imune controla o crescimento tumoral, esta fase, mais longa, é chamada de equilíbrio. Nesta fase, a imunidade adquirida restringe o crescimento de células tumorais indetetáveis clinicamente e edita a imunogenicidade das células tumorais. Finalmente, a dormência funcional da população de células tumorais pode ser terminada, levando à progressão das células para a fase de evasão, durante o qual as células tumorais com reduzida imunogenicidade começam a crescer progressivamente sem restrição imunológica, estabelecendo um microambiente tumoral imunossupressor, e eventualmente tornando-se visivelmente clinicamente. A evasão ao controlo imune é agora reconhecido como uma das características das células tumorais (Dunn, Koebel, and Schreiber 2006; Vesely and Schreiber 2013).

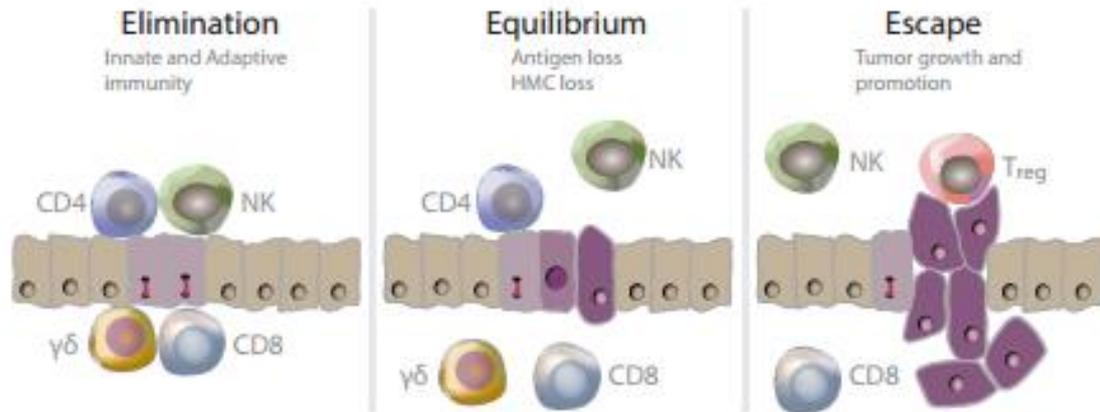


Figura 6 – Mecanismos pelo qual o sistema imune reconhece e controla o crescimento tumoral. A imunoeedição protege o organismo contra células tumorais como também promove o crescimento tumoral. A fase de eliminação compreende o processo pelo qual o sistema imune e inato reconhece e elimina as células tumorais quando surgem. A fase de equilíbrio compreende a fase onde há o balanço entre a prevenção do crescimento tumoral e a seleção das células neoplásicas resistentes à morte pelo sistema imune. A fase de evasão refere-se ao processo onde as células tumorais escapam aos mecanismos de erradicação do sistema imune e/ou recrutam células reguladoras para se protegerem (Smith 1994).

Células *Natural Killer* e Cancro

As células NK possuem a capacidade de eliminar células tumorais, esta capacidade pode ser desempenhada por 3 diferentes mecanismos: citotoxicidade mediada por Perforina/Granzima B, apoptose mediada por recetores de morte e funções efetoras do Interferão- γ (Figura 7).

A liberação de grânulos citotóxicos de Perforina e Granzima B pelas células NK são a forma mais rápida e a mais eficaz de eliminar células tumorais. A Perforina libertada vai destabilizar a membrana da célula tumoral facilitando assim a entrada de Granzima B levando à morte das células alvo (Bryceson et al. 2005).

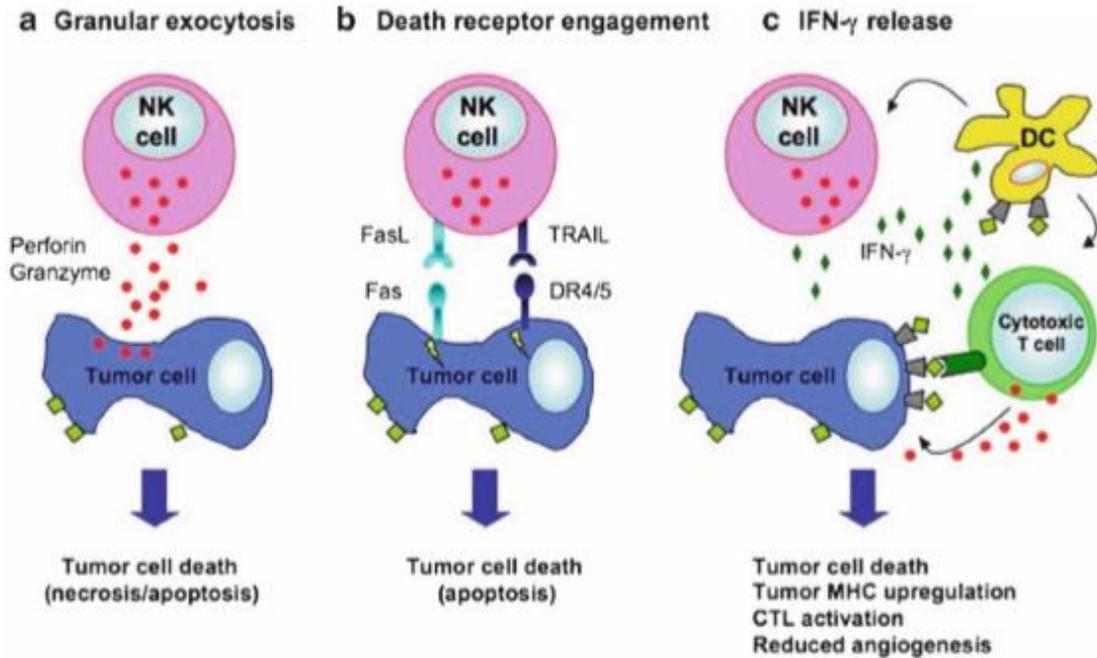


Figura 7 - Resposta anti tumoral mediada por células NK. (a) Desgranulação de células NK depois de ativadas com liberação de Perforina e Granzima que irão lisar as células alvo. (b) Expressão de TNF, ligando Faz e TRAIL pelas células NK após o reconhecimento dos receptores com as células alvo, induzindo a apoptose. (c) Secreção de IFN- γ pelas células NK não tendo apenas efeito nas células tumorais mas também recruta e ativa outras células efetoras imunes como as Dendríticas e os linfócitos T citotóxicos.

No segundo mecanismo, a morte das células alvo é induzida por apoptose através de ligandos da família *Tumour Necrosis Factor* (TNF), ligandos Fas e pelo *Tumour Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand* (TRAIL), sendo uma maneira alternativa de liberação de grânulos. Este mecanismo é mais lento, com duração de algumas horas, e geralmente é menos efetivo que o mecanismo mencionado anteriormente (Takeda et al. 2001).

Introdução

Por último, depois da ativação das células NK ocorre a libertação de várias citocinas como o IFN- γ , TNF- α , *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*, IL-10 ou IL-13. A atividade anti tumoral das células NK pode ser mediada pelo IFN- γ , esta citocina tem a capacidade de inibir a proliferação das células tumorais *in vitro* e de inibir indiretamente essa proliferação através da indução de fatores anti-angiogénicos *in vivo*. Segundo a literatura, o IFN- γ tem a capacidade de aumentar a atividade citotóxica das células NK tanto pelo aumento da expressão de moléculas de adesão como pelo aumento da sensibilidade das células tumorais à citotoxicidade mediada por grânulos ou através do envolvimento de recetores de morte (Trinchieri 1995).

A imunoterapia baseada em células NK, atualmente em desenvolvimento, visam superar a quiescência destas células nos pacientes. Existem várias abordagens de tratamento com base em células NK das quais se destacam 3 (Figura 8) (Vivier et al., 2012).

Uma das abordagens consiste na recolha de células estaminais de um dador saudável compatível e posterior transplantação para o doente com cancro. Estas células vão desenvolver-se no doente o que irá prevenir auto reatividade por parte do doente. As células NK vão desenvolver uma maior atividade anti tumoral para as células transformadas (tumorais/infetadas) enquanto se tornam tolerantes para as células normais do hospedeiro (Figura 8a).

Uma segunda abordagem poderá partir de uma leucoferese. Esta abordagem consiste na extração de glóbulos brancos de um dador saudável, seguido do isolamento das células NK e a sua ativação, por último procede-se à administração ao doente. Assim, tal como na primeira abordagem, as células vão desenvolver atividade anti tumoral para as células transformadas e vão ser toleradas pelo hospedeiro (Figura 8b).

Introdução

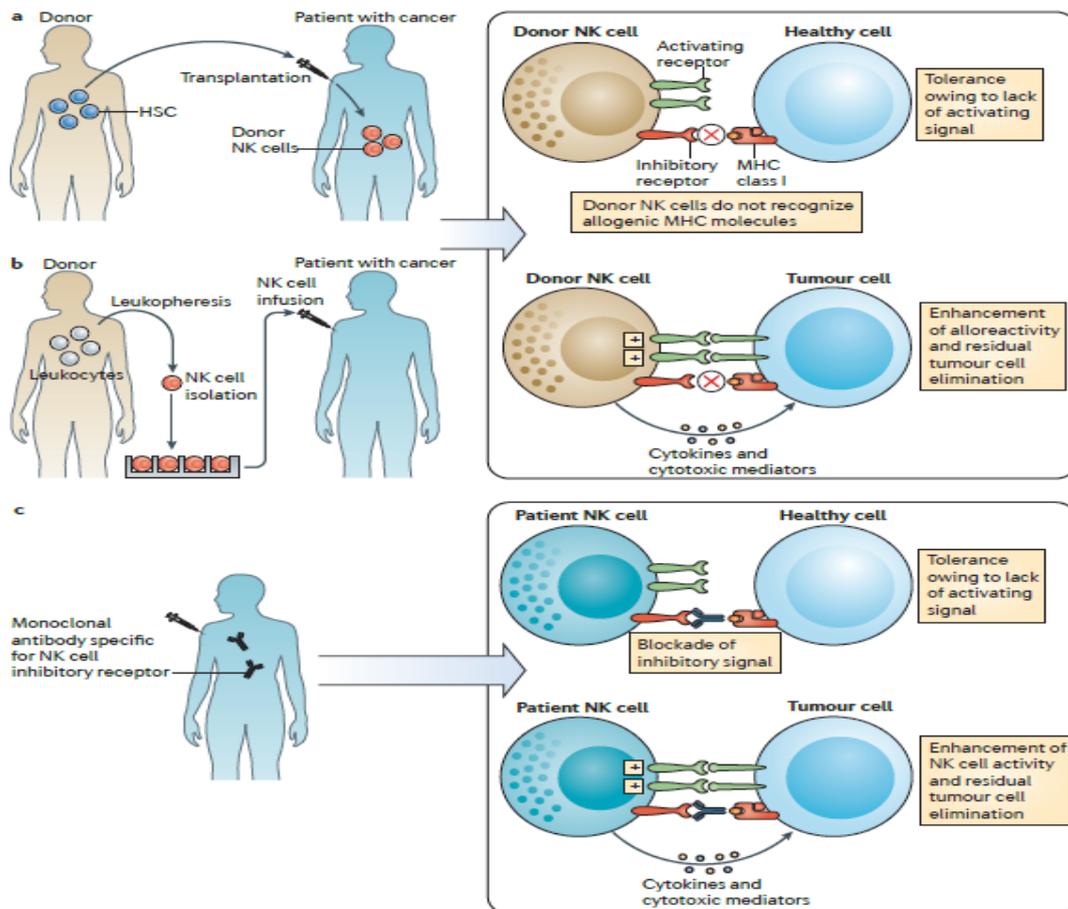


Figura 8 - Diferentes estratégias de tratamento com imunoterapia baseada em células NK (Vivier et al. 2012).

Uma outra estratégia está relacionada com a administração de anticorpos de recetores inibidores. Os anticorpos inibidores ao ligarem-se às células tumorais vão levar a uma prevalência dos sinais ativadores enquanto as células não alteradas (normais) não vão sofrer nenhum ataque por parte das células NK uma vez que não possuem recetores ativadores e, portanto, apesar dos recetores inibidores estarem inibidos, não existem sinais ativadores que possam desencadear uma resposta por parte das células NK (Figura 8c) (Vivier et al., 2012).

Ambiente Tumoral

Hoje em dia, a compreensão do tumor como um ambiente tumoral, onde há a interação de células geneticamente alteradas (células tumorais) com células normais (como fibroblastos, células imunes ou células endoteliais), com vasos sanguíneos e com substâncias produzidas no próprio local ou provenientes de outros locais mais distantes transportados pela corrente sanguínea, tem sido melhor aceita pela comunidade científica para a compreensão do desenvolvimento tumoral (Figura 9).

De fato, segundo estudos recentes, as células não tumorais têm uma participação muito importante numa variedade de processos de progressão tumoral, de entre os quais a metastização, a proliferação celular ou até a angiogénese. Com isto, o tumor pode ser definido como um tecido complexo, com um desequilíbrio da homeostasia tecidual de origem, onde as células “normais” são direcionadas a funcionar de acordo com esta nova dinâmica tecidual, devido principalmente à presença das células tumorais (Chammas 2010; Junttila and de Sauvage 2013).

Em tecidos saudáveis, a função do estroma é a de formar uma barreira contra o aparecimento de tumores. No entanto, a presença de células tumorais alteradas inicia alterações cruciais que podem converter este ambiente num que suporta a progressão tumoral. Para estas mudanças ocorrerem é necessário haver o recrutamento de fibroblastos, a migração de células imunes, a remodelação da matriz extracelular e eventualmente o desenvolvimento da rede vascular.

A identificação de variabilidade genética dentro do mesmo tumor sugere eventos complexos de evolução ramificada. A presença de diferentes pressões seletivas como a hipoxia, a acidez e a presença de fatores de crescimento existente no tumor pode moldar ativamente o seu desenvolvimento. É sugerido que diferentes paisagens ambientais dentro de um determinado tumor pode levar a mutações que geram sobrevivência e expansão, criando assim uma heterogeneidade das células tumorais (Quail and Joyce 2013; Sounni and Noel 2013).

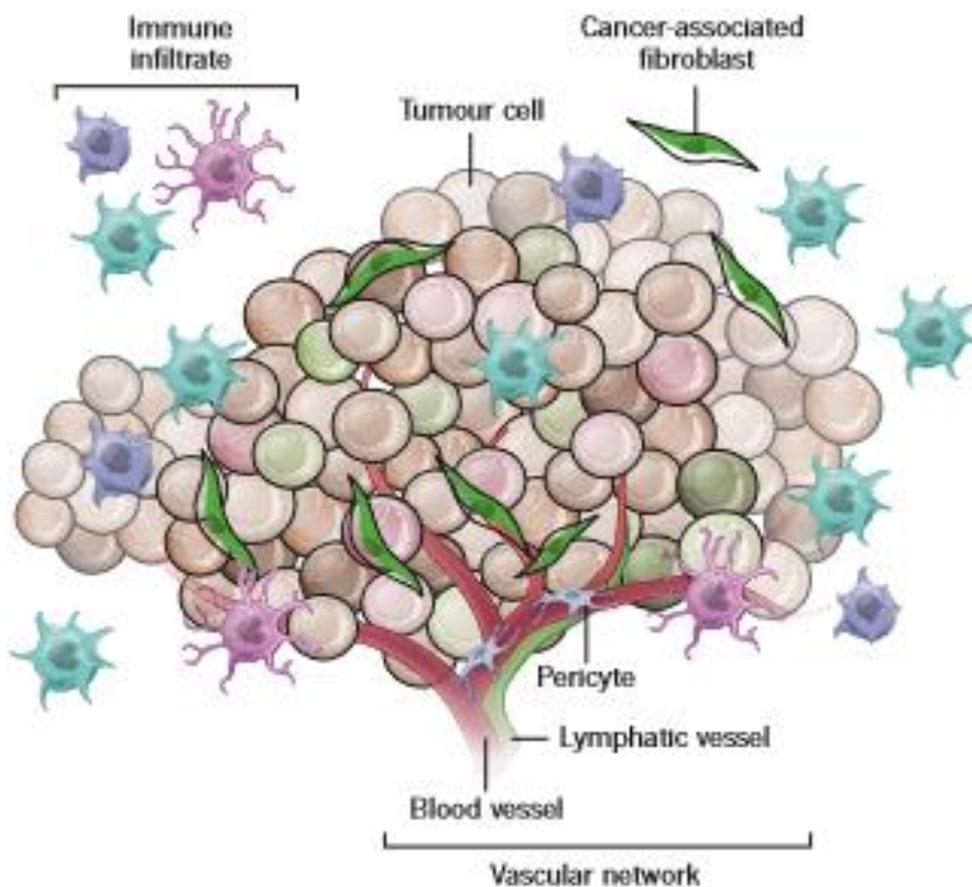


Figura 9 - Origem e influência da heterogeneidade tumoral. A formação tumoral envolve a coevolução de células neoplásicas juntamente com a matriz extracelular e células endoteliais vasculares, do estroma e imunes. O nicho tumoral é uma topografia físico-dinâmico em que o apoio estrutural, o acesso de fatores de crescimento, suprimento vascular e interações das células imunes podem variar drasticamente até mesmo dentro do mesmo tumor (Junttila and de Sauvage 2013).

Introdução

As características malignas das células cancerígenas não se podem manifestar sem uma interação importante entre as células cancerígenas e o seu ambiente local. O infiltrado tumoral composto por células do sistema imune, células vasculares angiogénicas, células endoteliais linfáticas e células fibroblásticas associadas ao tumor contribuem ativamente para a progressão do tumor. A capacidade para modificar este ambiente é uma propriedade importante através da qual as células tumorais são capazes de adquirir algumas das funções necessárias para o crescimento tumoral e metastização.

Assim, em situação clínica, o direcionamento do microambiente do tumor para encapsular ou destruir as células cancerígenas no seu ambiente local tornou-se obrigatória. A variedade de células do estroma, a complexidade dos componentes moleculares do estroma tumoral, e a semelhança com tecidos normais apresenta enormes desafios para as terapias orientadas para o microambiente do tumor (Balkwill, Capasso, and Hagemann 2012; Sounni and Noel 2013).

Imunossupressão

O sistema imune interage intimamente com as células tumorais durante todo o processo do desenvolvimento da doença até à progressão de metástases. Esta complexa interação entre sistema imune e as células tumorais podem inibir ou desenvolver o crescimento tumoral, nos casos clínicos onde surge o desenvolvimento de um tumor é devido à evasão das células tumorais aos elementos destrutivos da resposta imune. A estes processos chama-se Imunossupressão.

Introdução

O microambiente tumoral é extremamente complexo com a interação de uma diversidade de células, desde células tumorais, células do estroma e até células do sistema imune. Um dos mecanismos que promove a imunossupressão é a libertação de citocinas imunossupressoras, tanto pelas células tumorais como pelas células não-tumorais presentes no microambiente tumoral, especialmente pelas células imunes e células epiteliais. Das citocinas libertadas a TGF- β tem um impacto mais acentuado. Para além desta, também tem um grande impacto o TNF- α , a IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IFNs do tipo I. Para além destas citocinas imunossupressoras, outros fatores como o VEGF produzido pelos tumores inibe a diferenciação e maturação de células Dendríticas (Vinay et al. 2015).

Outro mecanismo pelo qual as células tumorais conseguem fugir ao sistema imune é a anergização das células NK pela libertação de anti-CD16. Os tumores conseguem libertar substâncias capazes de bloquear os recetores CD16, impedindo assim que ocorra citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (Tseng, Cacalano, and Jewett 2015). Se os recetores CD16 fossem ativados, iria levar à libertação de grânulos contendo moléculas líticas como a Perforina e a GrzB para a área onde houve a ativação dos recetores CD16, induzindo assim a morte celular. Com a anergização das células NK, não ocorre a sua ativação e as células tumorais conseguem escapar (Jeffrey Medin, Daniel Fowler-Experimental and Applied Immunotherapy-Humana Press (2010)).

Transferência adotiva de células

A imunoterapia é uma estratégia que usa certos componentes do Sistema imune para combater doenças como o cancro. Isto pode ser atingido de diferentes maneiras:

-Estimulação do próprio sistema imune para que assim consiga produzir um ataque mais eficiente às células tumorais;

-Administração de constituintes do sistema imune, como as proteínas necessárias a este sistema.

A imunoterapia inclui uma variedade de tratamentos que podem funcionar de maneira diferente. Enquanto algumas parecem fortalecer o sistema imune indiscriminadamente, outras fortalecem o sistema imune para que se torne mais reativo e efetivo contra células específicas (Kirkwood 2013).

A transferência adotiva de células (ACT) consiste na (re)introdução de grandes quantidades de linfócitos com atividade anti tumoral num doente. Antes da reintrodução dos linfócitos, sofrem uma expansão *ex vivo* na presença de certas interleucinas e de fatores de crescimento de modo a que estes compostos imunoestimulatórios passam também ser ativados (Parkhurst, Riley et al. 2011).

A Imunoterapia baseada em células NK tem como objetivo ultrapassar a quiescência destas células nos doentes. Uma estratégia está focada na ativação ou proliferação das células NK do próprio doente ou na indução de células NK com maior citotoxicidade. Estes objetivos têm tido sucesso no tratamento de certos tumores, através da administração de citocinas e IFN do tipo I. Estes compostos estão envolvidos na diferenciação e ativação destas células, sendo que as interleucinas-2, -12, -15, -18 e -21 fazem parte dessas citocinas (Cheng et al. 2012).

Outra estratégia é recorrendo ao uso de células NK alogénicas expandidas. Neste caso, as células NK alogénicas são ativadas ou expandidas *in vivo* ou *ex vivo* e assim não são inibidas por antígenos histocompatíveis do próprio ao contrário do que acontece com as células NK autólogas.

Outra abordagem consiste no uso de linhas celulares de NK alogénicas estáveis que favorecerá a produção em larga escala. Assim, as células são transferidas depois de expandidas *ex vivo*.

Outras abordagens alternativas baseiam-se em modificações genéticas das células NK ou de linha celular de NK com o objetivo de apresentarem uma maior expressão de citocinas, recetores Fc de maneira a seguir dois caminhos diferentes. Por exemplo, silenciando a expressão de recetores inibidores, ou levando a um aumento da expressão dos recetores ativadores (Cheng et al. 2013).

Para além do reconhecimento dos recetores MHC classe I, as células NK também exibem outras formas de reconhecimento. Ao contrário das células T, as NK não expressão recetores específicos para antígenos, como dito anteriormente, a função das células NK é mediada pelo balanço de sinais ativadores e inibidores que são reconhecidos por uma variedade de recetores expressos à superfície. Assim sendo, a manipulação deste tipo de células com o objetivo de as tornar prontamente reativas contra células tumorais pode ser uma importante ferramenta no combate e na erradicação de tumores em combinação com outros tipos de tratamentos convencionais como a quimioterapia (Parkhurst, Riley et al. 2011).

Objetivos

Objetivos

O primeiro objetivo deste trabalho foi fazer uma caracterização fenotípica e funcional das linhas celulares tumorais de 3 tumores diferentes: Carcinoma Pancreático: Panc-1 e MiaPaca-2; Cancro colo-retal: LS1034; C2BBel e WiDr; Leucemia Mieloide Crónica: K562.

O objetivo principal deste trabalho foi fazer uma ativação e expansão de células NK de doadores saudáveis *in vitro* seguido de co-cultura com as células tumorais medindo o efeito de diversas citocinas e do uso de anticorpos não-depletantes na atividade citotóxica das células NK.

Com esta abordagem esperamos contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para combater tumores sólidos envolvendo as células *Natural Killer*.

Materiais e Métodos

População em estudo

As amostras de células NK foram obtidas de 20 dadores saudáveis de ambos os sexos com idades compreendidas entre os 20 e os 40 anos provenientes do Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e elaborado com o consentimento informado de todos os dadores.

Cultura Celular

Após a receção das linhas celulares, foram descongeladas e postas em culturas aderentes a 37° C, numa atmosfera controlada com 5% de dióxido de carbono. Foi usado meio de cultura *Dubelcco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) para as linhas celulares Panc-1 e MiaPaca-2 (Pâncreas), WiDr e C2BBel (Colo-retal). Para as linhas celulares LS1034 (Colo-retal) e K562 (Leucemia Mieloide Crónica) foi usado o meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI). Os dois meios foram suplementados com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico/antimitótico (Penicilina/Estreptomicina).

Para a realização dos estudos *in vitro* foram utilizadas 2 linhas celulares do cancro do Pâncreas (Panc-1 e MiaPaca-2) obtidas e certificadas pela *American Type Culture Collection* (ATCC).

- A linha celular Panc-1 é derivada de um homem de 56 anos de idade com um adenocarcinoma na cabeça do pâncreas que tinha invadido a parede duodenal.

- A linha celular MiaPaca-2 é derivada de um adenocarcinoma pancreático de um homem de 65 anos de idade que apresentou dores abdominais por 6 meses e com uma massa abdominal superior palpável.

Para a realização dos estudos *in vitro* foram utilizadas 3 linhas celulares do cancro Colo-retal (LS1034, C2BBe1 e WiDr) obtidas e certificadas pela ATCC.

A linha celular LS1034 foi isolada do cego de uma mulher caucasiana com 54 anos de idade. Possui uma mutação no gene TP53, na posição 245 que corresponde à alteração de uma glicina por uma serina.

A linha celular C2BBe1 é um clone da linha celular CaCo-2 obtida por diluição limitante. Foi isolada do cólon de um homem de 72 anos de idade, caucasiano e diagnosticado com CRR. Este clone foi selecionado devido à localização apical da proteína Vilina e com base na homogeneidade morfológica.

A linha celular WiDr foi isolada do cólon de uma mulher com 78 anos de idade diagnosticada com CCR. Apresenta uma morfologia epitelial e possui uma mutação do gene TP53 presente no codão 273 que representa uma substituição do aminoácido arginina por histidina na proteína p53.

Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs)

A técnica mais utilizada para obter PBMCs consiste na separação dos diferentes tipos celulares presente no sangue periférico através de uma separação por gradiente de densidade, normalmente usando Ficoll-Paque®.

Resumindo, o sangue periférico foi diluído 1:3 com PBS 1x EDTA 0.1mM. O sangue diluído foi depois transferido para um Falcon® de 50mL com 10 ml de Ficoll-Paque®.

Depois o tubo foi centrifugado 20 minutos a 400g à temperatura ambiente. As PBMCs foram recolhidas e lavadas duas vezes com PBS 1x EDTA 0.1 mM. Por último, as células foram ressuspensas em 10 ml de meio completo (RPMI 1640 com Glutamax suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal e 1% de Penicilina/Estreptomicina).

Contagem de células

Depois de isoladas, as células foram contadas no COULTER AC.T (Beckman Coulter, Pasadena, Califórnia, EUA) usando 12 µL da suspensão de leucócitos em meio completo. O aparelho COULTER AC.T conta e distingue células através da detecção e medição de mudanças na resistência elétrica quando uma partícula num líquido condutor passa através de um pequeno orifício.

Viabilidade Celular

Para medir a viabilidade celular o método utilizado foi o azul de tripano. Este teste assenta no pressuposto de que as células viáveis possuem as membranas celulares intactas, ou seja, impermeáveis para certos marcadores, como o azul de tripano. Assim, as células mortas ou senescentes perdem a integridade das suas membranas e são marcadas (Strober 2001). Para isso 10 µL de suspensão celular são adicionados a 10 µL de Azul de Tripano (0.2%). De seguida 10 µL são transferidos para uma câmara de Neubauer e contadas no microscópio.

Enriquecimento de células *Natural Killer* – Separação celular magnética

As células NK foram isoladas das PBMCs através de uma separação magnética (MACS), uma seleção negativa, recorrendo ao kit de isolamento de células NK humanas (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha) seguindo as instruções do produtor. Resumidamente, determinou-se o número de células. De seguida, 100 µL de *Biotin-Antibody cocktail* foi adicionado para cada 10^8 células totais e incubou-se a 4°C por 5 minutos. 300 µL de tampão foi adicionado por cada 10^8 de células totais seguido da adição de 200 µL de *Micro Beads* por 10^8 de células totais e incubadas a 4°C durante 15 minutos. As células foram então passadas por uma coluna de depleção em que a porção que passa representa a porção negativa da suspensão celular, onde estão as células de interesse, as células *Natural Killer*. As colunas de Depleção LS foram hidratadas previamente com 3 ml de tampão e lavadas duas vezes com 3 ml de tampão depois da passagem da suspensão celular marcada.

Estimulação *in vitro* de células NK

A estimulação *in vitro* de células NK foi feita através da adição das interleucinas 2, 12 e 18, e da adição do anticorpo monoclonal anti-CD16.

Foram postas em cultura entre 0,5 a 1×10^6 células numa placa de 96 poços durante 24h com meio completo (RPMI 1640 com Glutamax, 10% Soro Fetal Bovino e 1% de antibiótico/antimitótico) juntamente com os diferentes estímulos: IL-2 (100 ng/ml), IL-2 + anti-CD16 (100 ng/ml de IL-2 e 3µg/ml de anti-CD16), anti-CD16 (3µg/ml) e a combinação de IL-2, IL-12 e IL-18 (100 ng/ml cada).

Ensaio de Desgranulação - CD107a

Foram co-cultivadas 10^6 células NK com células alvo (num rácio efectoras:alvo 3:1) durante 5 horas numa placa de 96 poços. Adicionou-se CD107a no início do experimento e passada uma hora de co-cultura adicionou-se Brefeldina A em cada poço e seguiu-se a incubação por mais 4 horas. Terminadas as 4h, as células foram colhidas e marcadas com anticorpos monoclonais e procedeu-se à aquisição dos dados alcançados usando o citómetro BD FACSCanto II.

Ensaio de citotoxicidade - LDH

Foram co-cultivadas $1,5 \times 10^5$ células NK com células alvo (num rácio efectoras:alvo 3:1) durante 4 horas numa placa de 96 poços. No fim desse tempo, usando o *kit Cytotoxicity Detection Plus LDH* adquirido à ROCHE, foi adicionado uma solução de lise para os controlos positivos. De seguida adicionou-se a mistura de mistura preparada na hora e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente. Por último foi adicionado a solução stop e foi lida a placa no espectrofotómetro Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Genotipagem HLA – PCR-SSP

Inicialmente procedeu-se à extração de DNA das células recorrendo ao *kit High Pure PCR Template Preparation* da ROCHE (Basileia, Suíça). Depois de obtido o DNA genómico (com posterior medição da concentração e pureza) procedeu-se ao PCR com as placas para HLA-ABC, HLA-DR-DQ e KIR (Olerup®, West Chester, PA, USA).

Depois do PCR terminado fez-me uma eletroforese para confirmação dos diversos alelos presentes.

Expressão Génica – qPCR em tempo real

Inicialmente procedeu-se à extração de RNA das células (com posterior medição da concentração e pureza) e posteriormente à conversão a cDNA através de PCR de transcrição reversa. Depois de obtido cDNA, procedeu-se ao qPCR em tempo real usando *primers* específicos para os genes de interesse para o estudo. Esta técnica foi feita usando o LightCycler 480 ROCHE® e os *primers* foram adquiridos à Qiagen®.

Marcação extracelular e Intracelular para Citometria de Fluxo

Foram adicionados 10^6 células a cada tubo de citometria. Os anticorpos monoclonais demonstrados na Tabela I foram adicionados seguindo as instruções dos produtores. As células foram depois incubadas no escuro à temperatura ambiente. Depois de terminada a incubação foram adicionados 100 μ L de *Fix and Perm Medium A*® (para marcação intracelular) durante 10 minutos nas mesmas condições que anteriormente.

As células foram então lavadas com 2 ml de PBS 1x e centrifugadas a 300g por 5 minutos e descartado o sobrenadante. Para a marcação intracelular, adicionou-se 100 μ L de *Fix and Perm Medium B*® juntamente com os anticorpos monoclonais e incubou-se por mais 20 minutos nas mesmas condições descritas anteriormente. As células foram lavadas com PBS 1X e centrifugadas a 300g por 5 minutos. Por último, as células foram ressuspensas com 300 μ L de PBS 1X e passadas no citómetro de fluxo.

Tabela I - Resumo das reatividades dos anticorpos monoclonais, conjugados e respetivos clones.

Reatividade Anticorpo	Conjugado	Clone
CD48	PE	TÜ145
CD62L	FITC	DREG-56
CD96	PE	NK92.39
CD112	PE	R2.525
CD117	PE	104D2
CD127	PerCpCy5.5	A019D5
CD137	APC	4B4-1
CD137L	PE	5F4
CD155	PE	TX24
CD226	FITC	TX25
CD244	FITC	C1.7
CD273	PE	MIH18
CD274	FITC	MIH1
CD279	APC	MIH4
CD319	PE	162.1
HLA-ABC	FITC	W6/32
HLA-DR	FITC	G46-6
HLA E	PR	3D12
MICA/MICB	PE	6D4
TIGIT	APC	741182
ULBP-1	FITC	170818

Análise Citometria de Fluxo

Os dados de todas as amostras foram adquiridas no citómetro de fluxo FACSCanto II da BD Biosciences utilizando o software FACS Diva versão 6.1.3. Os dados obtidos foram analisados posteriormente usando o FlowJo versão 10.0.7 (Tree Star Inc, Ashland, USA).

Compostos

Foram usados os seguintes compostos: PBS, RPMI 1640 com Glutamax, DMEM com Glutamax, Soro Bovino Fetal, Penicilina, Estreptomicina (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); Todos os anticorpos e as interleucinas recombinantes humanas 12

e 18 foram adquiridos à Biolegend (San Jose, CA, USA). A IL-2 foi adquirida à ROCHE (Basileia, Suíça).

Análise estatística

A análise estatística foi feita recorrendo ao software GraphPad Prism versão 6. Foram usados os seguintes testes: Mann-Whitney não paramétrico, One-Way ANOVA e Two-Way ANOVA. O teste Tukey's foi feito quando necessário. Valores de P estatisticamente significativos foram anotados com: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Resultados

Caracterização das linhas celulares do Cancro do Pâncreas e do Cancro Colo-retal

De modo a caracterizar os ligandos presentes nas células tumorais que potencialmente serão reconhecidos pelas células NK, procedeu-se à cultura das linhas celulares de cancro do pâncreas e de cancro colo-retal. Na figura 10 está demonstrado a morfologia das células de ambas as linhas celulares do CP. Na figura relativa à linha celular Panc-1 (A) podemos verificar que as células são mais redondas e na figura da linha celular MiaPaca-2 (B) está demonstrado que as células são mais estendidas.

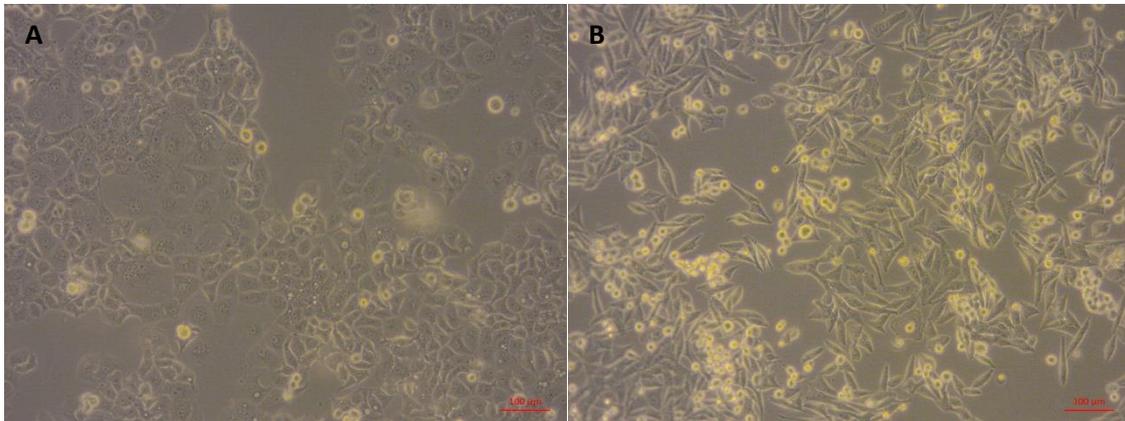


Figura 10 – Imagens com ampliação de 200X das linhas celulares do Cancro do Pâncreas Panc-1 (A) e MiaPaca-2 (B) em cultura captadas por microscopia de contraste de fase num microscópio invertido.

Relativamente à figura 11, está demonstrado a morfologia de cada uma das linhas celulares do CCR. Podemos verificar que as células da linha celular LS1034 crescem em aglomerados. A linha celular C2BBel apresentam aglomerados e são células mais volumosas. E as células da linha celular WiDr crescem mais rapidamente, sendo que também apresentam uma morfologia mais circular.

Resultados

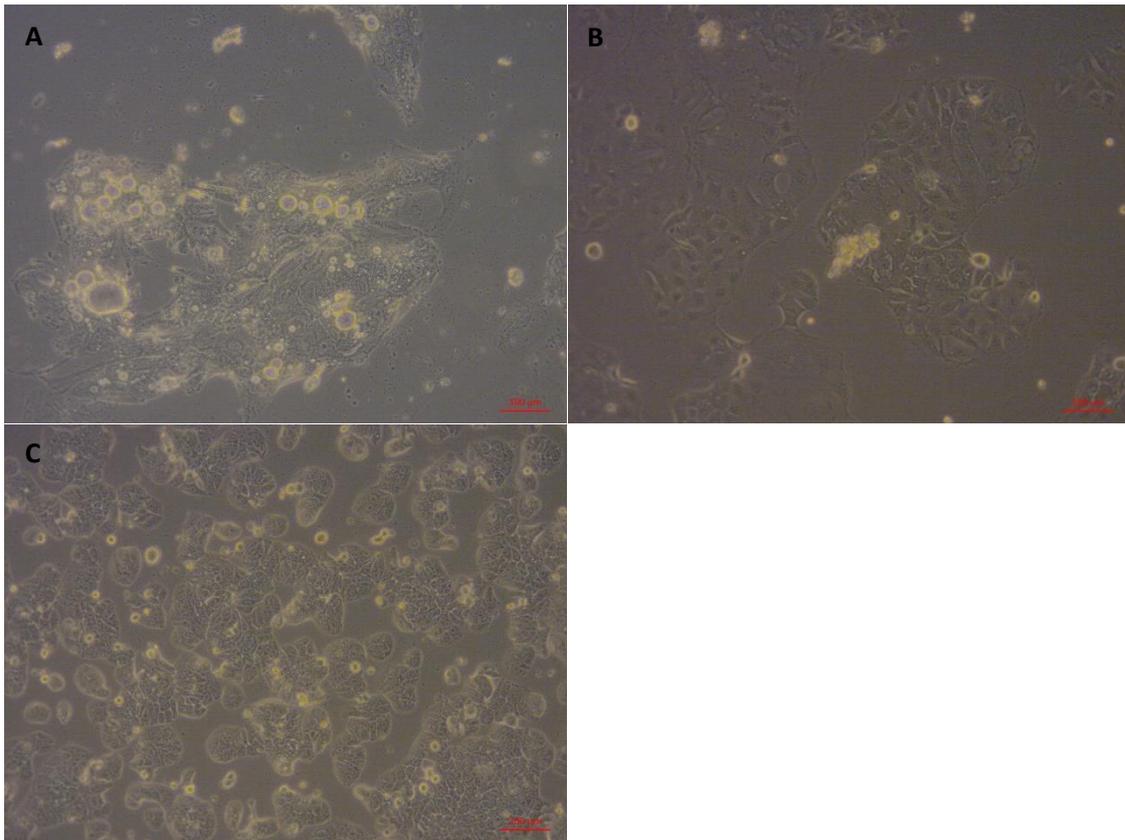


Figura 11 – Imagens com ampliação de 200X das linhas celulares do Cancro Colo-retal LS1034 (A), C2BBel (B) e WiDr (C) em cultura captadas por microscopia de contraste de fase num microscópio invertido.

Um dos principais objetivos do presente trabalho foi o de fazer uma caracterização das linhas celulares ao nível dos recetores expressos à superfície, e assim tentar perceber como estas diferenças de expressão de determinados recetores podem ser favoráveis para o uso de células *Natural Killer* em imunoterapia para cada um dos tipos de tumores (Figura 12).

Resultados

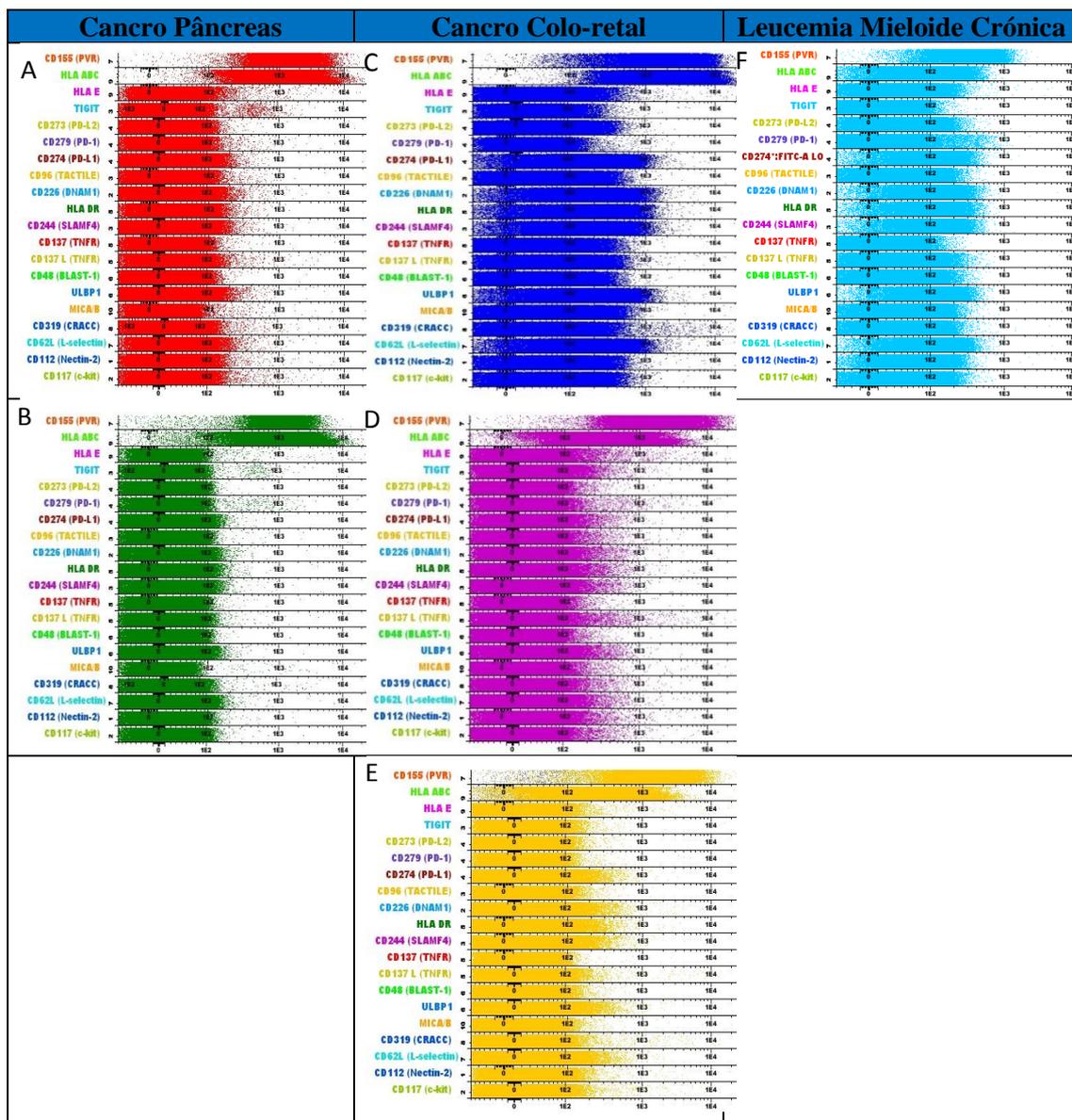


Figura 12 – Caracterização da expressão de recetores de superfície das linhas celulares do tumor do Pâncreas (A; B), Colo-retal (C; D; E) e de Leucemia (F), com a referida percentagem de células que expressam os recetores e a densidade do recetor em cada célula.

Os recetores estudados estão envolvidos direta ou indiretamente na ativação ou inibição das células NK influenciando assim a sua atividade. Podemos verificar na figura 12 que ambas as linhas celulares do CP (Figura 12 A; B) apresentam uma expressão elevada dos recetores CD155 (PVR) e do HLA-ABC. Relativamente às linhas do CCR (Figura 12 C; D; E) é possível observar uma maior expressão dos recetores inibidores

Resultados

CD155 (PVR) e do HLA-ABC. Por último é possível verificar que a linha celular referente à Leucemia Mieloide Crónica não apresenta expressão dos recetores inibidores HLA-ABC sendo por isso considerada sensível às células NK.

Marcador	Panc1		MiaPaca2		LS1034		C2BBe1		WiDr		K562	
	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF	%	MIF
CD155 (PVR)	56,9	1567	60,5	1209	54,3	2539	78,3	1579	60,9	1544	53,5	485
HLA-ABC	60,8	1172	56,1	956	73,8	2476	12	868	4,54	830	0,7	437
HLA-E	2,45	178	2,59	104	3,64	289	2,09	322	0,42	270	0,6	299
TIGIT	1,09	384	0,36	378	1,43	222	1,41	283	0,39	190	0,4	162
CD273 (PD-L2)	0,31	160	0,34	121	2,63	295	0,6	213	0,28	166	0,68	275
CD279 (PD-1)	0,6	185	0,6	224	0,82	237	1,13	340	0,17	202	3,31	269
CD274 (PD-L1)	0,72	199	0,32	168	5,14	653	1,31	273	1,25	255	-	-
CD96 (TACTILE)	0,61	178	0,42	129	2,48	350	0,87	297	0,23	203	0,83	257
CD226 (DNAM1)	0,92	204	0,64	152	4,94	705	1,45	306	1,61	255	1,2	376
HLA-DR	0,63	211	0,55	158	3,25	788	1,79	269	1,37	252	1,63	348
CD244 (SLAMF4)	1,06	187	0,26	179	3,79	740	1,13	328	1,2	263	0,92	385
CD137 (TNFR)	0,26	158	0,13	151	1,96	350	0,38	228	0,014	322	0,27	205
CD137 L (TNFR)	0,69	208	0,39	144	1,78	416	1,69	377	0,48	266	0,68	296
CD48 (BLAST-1)	0,3	151	0,36	118	1,31	354	0,38	221	0,13	209	1,02	238
ULBP1 (L NKG2D)	0,75	228	0,3	169	2,85	793	1,56	283	1,13	278	1,14	358
MICA/B	0,53	194	0,54	103	1,75	473	0,76	249	0,21	198	1,11	246
CD319 (CRACC)	0,58	225	0,5	136	2,4	444	1,06	275	0,74	240	1,24	237
CD62L (L-selectin)	1,19	203	0,85	148	3,17	798	1,6	262	1,34	271	0,71	433
CD112 (Nectin-2)	0,68	199	0,38	134	4,8	317	1,16	312	0,41	211	0,41	323
CD117 (c-Kit)	0,95	225	0,45	133	3,7	347	1,14	298	0,59	281	0,58	303
CD127 (receptor IL-7)	0,78	209	0,43	169	1,9	461	1,52	304	0,34	230	4,7	316

Figura 13 - Caracterização da expressão de recetores de superfície das linhas celulares do tumor do Pâncreas, Colo-retal e de Leucemia Mieloide Crónica, com a percentagem de células que expressam os recetores e a densidade do recetor em cada célula.

Na Figura 13 está demonstrado a percentagem da expressão dos recetores em estudo e da densidade que estes apresentam em cada célula. Segundo os resultados demonstrados, pode-se ver que há uma maior expressão dos recetores inibidores, como o PVR, HLA-ABC ou HLA-E para as linhas do CP e quase nenhuma expressão dos recetores ativadores. Relativamente à densidade destes recetores nas células, nota-se uma correlação direta, se estão expressos numa elevada percentagem de células, a sua densidade (MIF) é elevada nesses mesmos recetores, como acontece nos recetores inibidores HLA-ABC e PVR.

Resultados

Para as diferentes linhas celulares do CCR pode-se ver também uma maior expressão dos recetores inibidores (PVR, HLA-ABC, HLA-E) sendo que nestas linhas é possível observar um ligeiro aumento da expressão de alguns recetores ativadores e o aumento da densidade destes recetores nas células. Dos resultados referentes à linha celular de leucemia podemos ver que não há expressão do recetor inibidor HLA-ABC e a um ligeiro aumento da expressão dos diversos recetores ativadores.

Expressão Génica

A expressão de determinados constituintes pelas células tumorais podem ter um impacto direto nas próprias células, como o ciclo celular, ou ter um impacto em outras células com a libertação de determinadas citocinas ou de fatores de crescimento. Com o intuito de tentar perceber que constituintes as linhas celulares expressam procedeu-se à quantificação da expressão génica de alguns constituintes vitais em algumas funções.

Ciclo Celular

A quantificação da expressão dos genes que têm um papel fundamental no ciclo celular está demonstrada na figura 14.

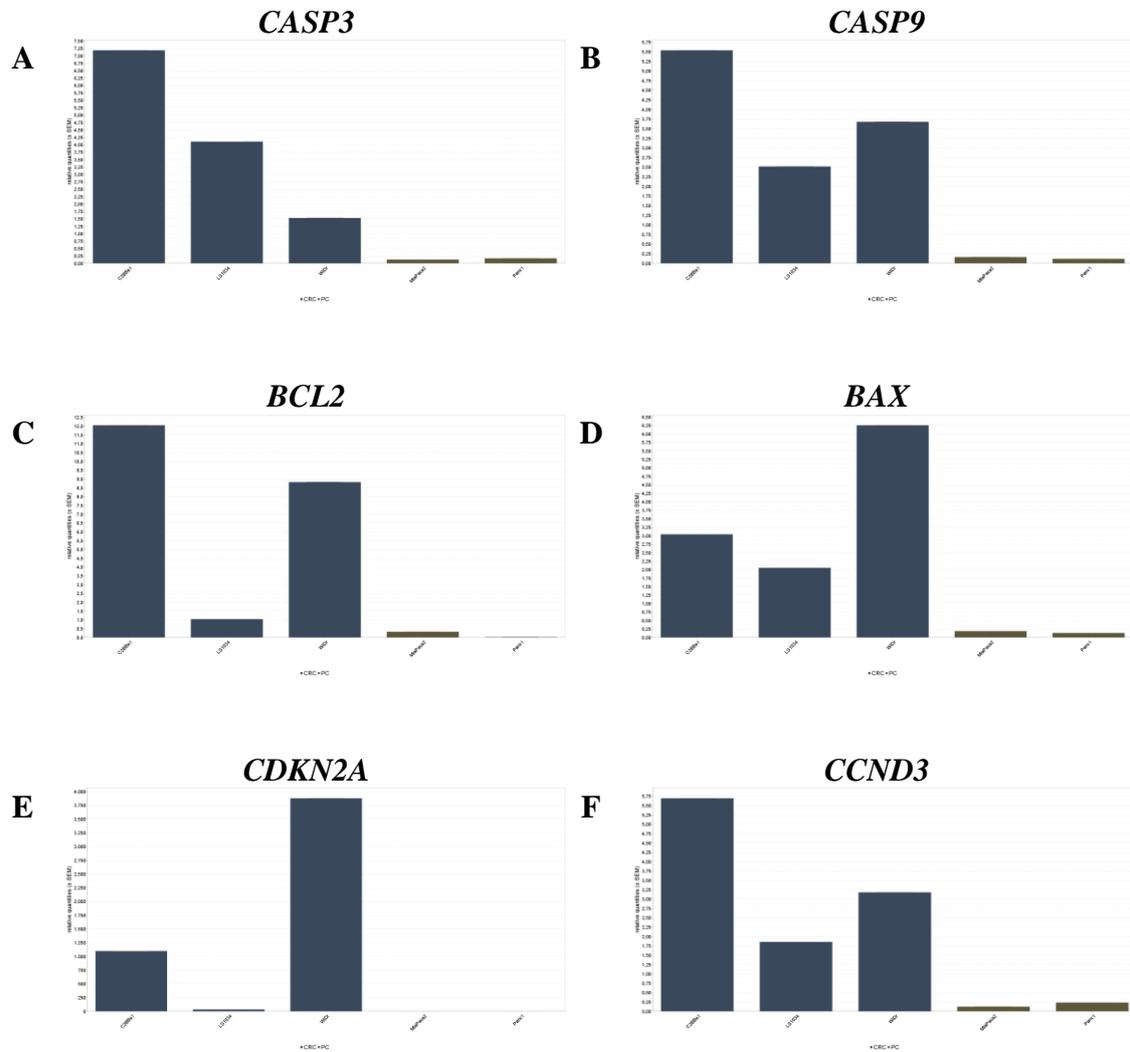


Figura 14 - Quantificação da expressão de constituintes importantes no ciclo celular. **(A)** Caspase 3; **(B)** Caspase 9; **(C)** BCL2; **(D)** CCDN3; **(E)** CDKN2A; **(F)** BAX.

As caspases 3 e 9 estão diretamente envolvidas numa cascata de mecanismos na apoptose celular (Makishima et al. 2011; Shultz et al. 2010). Segundo a figura 14 **(A)** e

Resultados

(B), os níveis de expressão destes genes são superiores nas linhas celulares do CCR enquanto nas linhas do CP a sua expressão é quase nula.

O *BCL2* e o *BAX* são genes que codificam proteínas que estão envolvidas na regulação da morte celular (apoptose), através da indução (pró-apoptóticas), ou pela inibição (anti-apoptóticas) (Hu et al. 2014; Zhao et al. 2014). Segundo a figura 14 (C) e (D) os níveis de expressão destes genes são mais elevados nas linhas celulares do CCR comparativamente com as linhas celulares do CP.

O gene *CDKN2A* atua como supressor tumoral e está sobre-expresso na senescência celular (Shima 2012). Segundo os resultados demonstrados na figura 14 (E), a sua expressão é praticamente nula nas duas linhas celulares do CP e na linha celular LS1034 do CCR. Nas linhas C2BBel e WiDr do CCR a sua expressão é mais elevada.

A proteína codificada pelo gene *CCND3* é um promotor tumoral, a sua maior expressão está relacionada com um fraco prognóstico para vários tipos de tumores (Z. Liu et al. 2015). Segundo os resultados demonstrados na figura 14 (F) a expressão do gene *CCND3* é superior nas linhas celulares do CCR comparativamente às linhas celulares do CP.

Resposta Imunoinflamatória

A quantificação da expressão dos genes que têm um papel importante na resposta imunoinflamatória está demonstrada na figura 15.

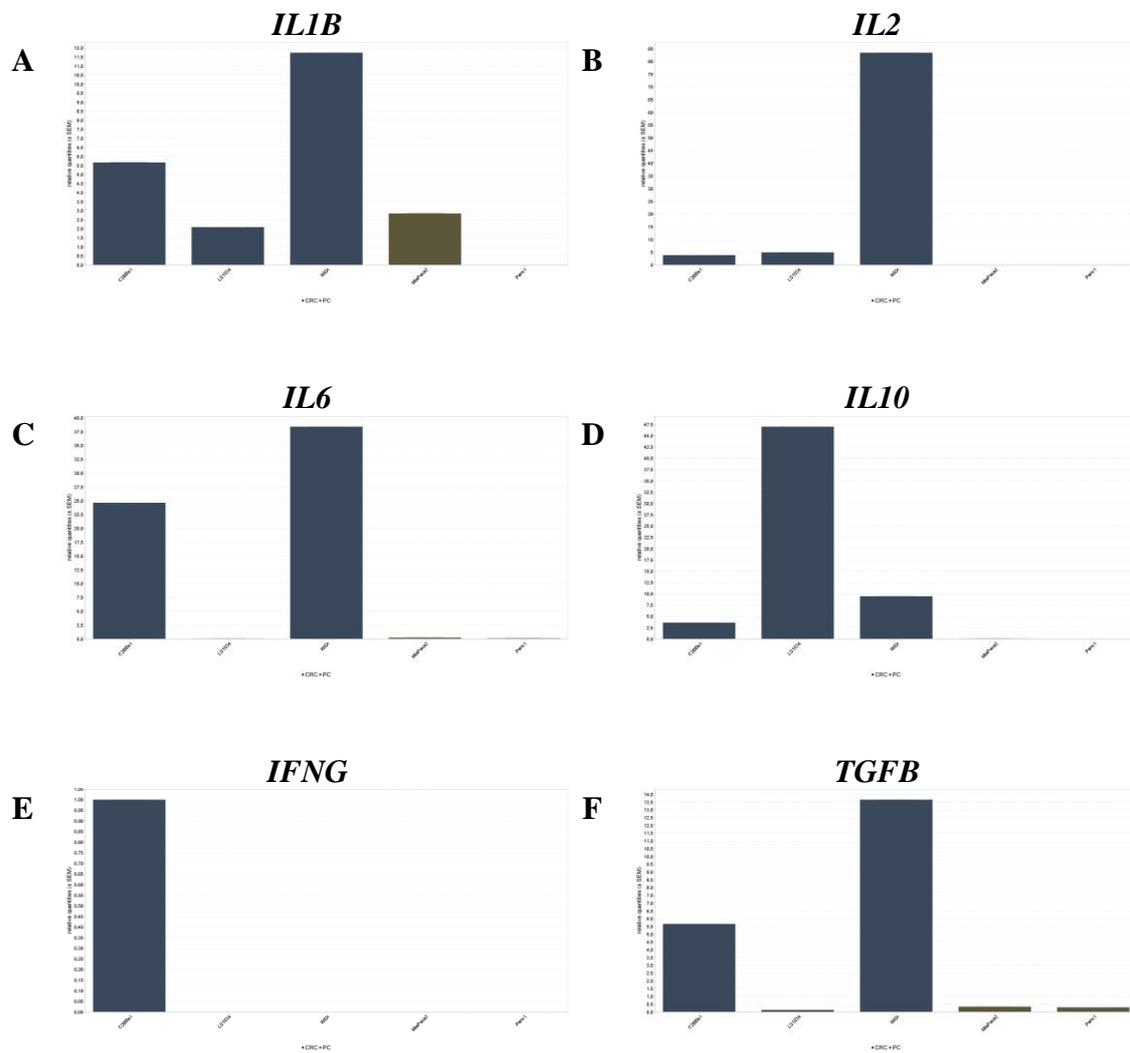


Figura 15 - Quantificação da expressão de genes importantes na resposta imunoinflamatória. (A) IL1B; (B) IL2; (C) IL6; (D) IL10; (E) IFNG; (F) TGFB.

Resultados

O gene *IL1B* codifica a citocina IL-1 β que é um importante mediador da resposta inflamatória e está envolvida numa variedade de atividades celulares incluindo a proliferação celular, diferenciação e a apoptose (Laddha et al. 2014). Segundo os dados demonstrados na figura 15 (A), a expressão de *IL1B* é superior na linha celular WiDr seguida pela expressão na linha C2BBe1, depois pela linha MiaPaca2 e por último a linha LS1034. Na linha celular Panc1 a sua expressão é praticamente inexistente.

O gene *IL-2* codifica a interleucina 2. Esta citocina tem um papel na regulação da atividade dos glóbulos brancos, como os linfócitos, que são responsáveis pela imunidade (Bandyopadhyay, Montagna, and Macian 2012). Segundo os dados da figura 15 (B), este gene está muito expresso na linha celular WiDr do CCR. A expressão nas linhas C2BBe1 e na LS1034 é bastante inferior sendo que em ambas as linhas do CP a sua expressão é praticamente nula.

O gene *IL-6* codifica a interleucina 6. Esta citocina é pró-inflamatória e tem um papel importante na resposta imunológica (Erb et al. 2013). Como demonstrado na figura 15 (C), tanto a linha celular WiDr e a C2BBe1 do CCR têm uma elevada expressão desta citocina, enquanto nas linhas LS1034, Panc1 e MiaPaca2 a sua expressão é escassa.

A interleucina 10 é uma citocina que é codificada pelo gene *IL-10*. É uma citocina anti-inflamatória com um papel importante na imunorregulação e na inflamação (Minnicelli et al. 2012). Segundo os dados da figura 15 (D), a expressão desta interleucina é mais elevada nas linhas do CCR, em especial na linha LS1034, sendo que nas linhas do CP a sua expressão é praticamente nula.

O gene *IFNG* codifica a citocina IFN- γ . Esta citocina tem um papel crítico tanto na imunidade inata como na adquirida contra vírus e bactérias entre outros. Tem a

Resultados

capacidade de inibir a proliferação e sensibilizar a apoptose celular das células tumorais (F. Wang et al. 2013). Segundo os dados da figura 15 (E), apenas a linha celular C2BBe1 do CCR expressa esta citocina, ao contrário das outras linhas onde não há expressão deste gene.

O gene *TGFB* codifica a citocina TGF- β que tem um papel importante na resposta imunoinflamatória, como por exemplo na ativação ou não dos linfócitos T (Poniatowski et al. 2015). Segundo os dados demonstrados na figura 15 (F), a expressão desta citocina é muito elevada na linha WiDr. Por contraste, as linhas LS1034, MiaPaca2 e Panc1 a expressão deste gene é quase nula.

Outros

Para além dos constituintes previamente falados, existem outros que têm um papel distinto mas muito importante em alguns processos celulares. Destes constituintes destacam-se o NF-K β e o VEGF.

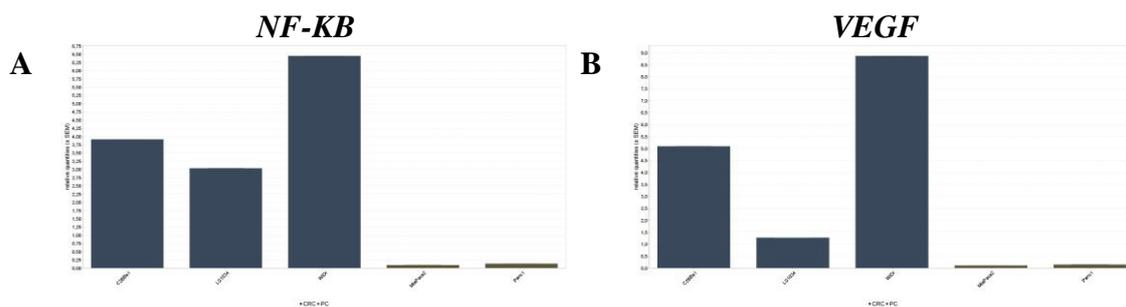


Figura 16 - Quantificação da expressão de genes com diferentes funções (A) NF-K β ; (B) VEGF;

O gene *NF-KB* codifica o complexo proteico NF-K β . Este complexo está frequentemente ativado em tumores e está envolvido no crescimento tumoral, progressão

Resultados

e na resistência à quimioterapia (Tafani et al. 2013). Segundo os dados da figura 16 (A), a expressão deste gene é superior nas linhas do CCR relativamente às linhas do CP.

O gene *VEGF* codifica o fator de crescimento *vascular endothelial growth factor*. É um fator de crescimento e está envolvido na metastização e na criação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos já existentes, angiogénese, processo este vital na manutenção e crescimento tumoral (X. Wang et al. 2013). Segundo os dados da figura 16 (B), a expressão deste gene é superior nas linhas celulares do CCR. Nas linhas do CP a expressão deste gene é muito baixa, quase inexistente.

Genotipagem HLA

As células NK têm um papel importante na defesa do organismo porque consegue eliminar células infetadas por vírus ou células tumorais mas consegue poupar as células do próprio organismo. Isto deve-se principalmente a uma variedade de recetores especializados que reconhecem moléculas do Complexo Major de Histocompatibilidade de classe I expressas em células saudáveis. A falta de expressão destes recetores em algumas células levam à ativação das células NK que irão lisar as células alvo (a Moretta et al. 1996).

Resultados

Tabela II - Genotipagem HLA das diversas linhas celulares de CP, de CCR e Leucemia Mieloide Crónica.

Gene	A		B		C		DQB1		DRB1	
K562	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Panc1	02	11	38	38	12	12	06	06	13	13
MiaPaca2	24	24	14	14	08	08	05	05	01	01
LS1034	02	26	08	27	02	07	02	03	03	04
C2BBe1	02	02	15	15	04	04	03	03	04	04
WiDr	01	24	35	44	02	04	02	02	04	07

Segundo a Tabela II podemos concluir que a linha celular K562 não expressa os genes do MHC classe I e classe II. A linha celular Panc1 expressa os alelos A*11, B*38 e C*12 que são reconhecidos pelas células NK levando à inibição da atividade das mesmas. A linha celular MiaPaca2 expressa os alelos A*24 e C*08 reconhecidos pelas células NK. Relativamente às linhas do CCR, a LS1034 expressa os alelos B*27, C*02 e C*07 que são reconhecidos pelas células NK. A linha C2BBe1 expressa o alelo C*04 que é reconhecido pelas NK e por último a linha WiDr expressa os alelos A*24, B*44, C*02 e C*04 que são reconhecidos pelas células NK. Todas as linhas celulares tumorais tanto do CP e do CCR expressam os genes relativamente ao HLA-DQ e HLA-DR mas estes genes não são reconhecido pelas células NK.

Ensaio de desgranulação: CD107a

O objetivo principal deste trabalho é o de medir a capacidade citotóxica das células NK contra as linhas celulares do CP e do CCR usando como comparação a linha celular K562 de Leucemia Mieloide Crónica que é sensível às NK. Para medir esta capacidade

Resultados

citotóxica recorreu-se ao ensaio de desgranulação CD107a (Aktas et al. 2009; Alter, Malenfant, and Altfeld 2004). Este ensaio consiste na medição da desgranulação das células NK quando interagem com as células alvo.

Não estimulado

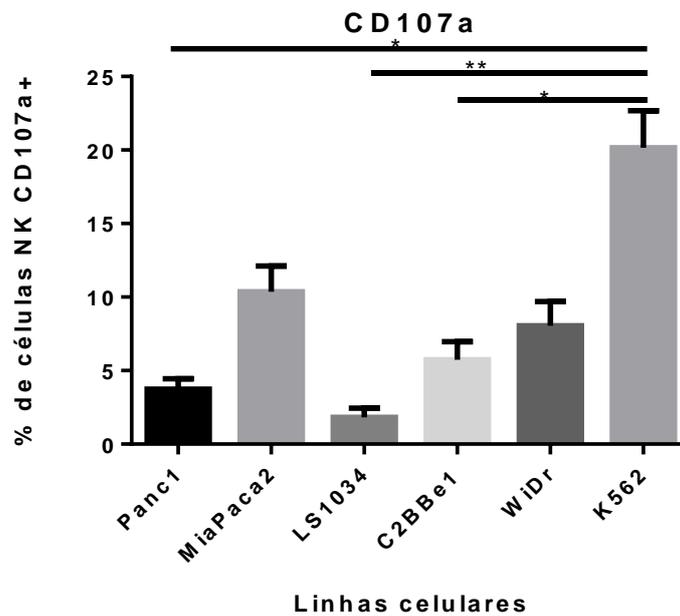


Figura 17 - Comparação entre a liberação de CD107a pelas células NK de dadores saudáveis na interação com a linha celular K562 e com as diversas linhas celulares do CP e do CCR. As células foram incubadas por 24h a 37°C. A liberação de CD107a foi obtida através de Citometria de fluxo e as células NK foram selecionadas como uma população CD3⁻CD56⁺.

Pela observação da figura 17 é possível concluir que as células NK têm uma menor atividade citotóxica nas linhas celulares de CP e de CCR comparativamente com a linha K562. Dentro das linhas de CP é possível observar que a linha Panc1 é mais resistente à citotoxicidade das NK. Nas linhas de CCR podemos concluir que há uma diferença na resistência à citotoxicidade das NK sendo que a linha mais resistente é a linha LS1034.

Resultados

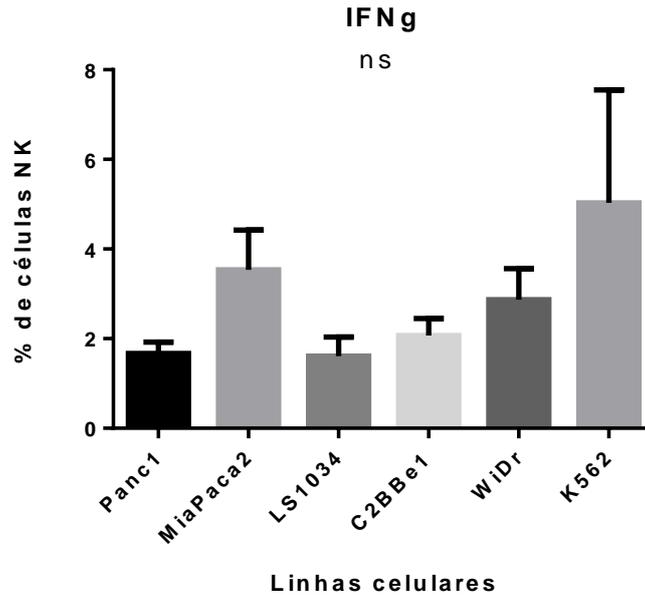


Figura 18 - Comparação entre a liberação de IFN- γ pelas células NK de dadores saudáveis na interação com a linha celular K562 e entre as diversas linhas celulares do CP e do CCR.

Segundo a figura 18, apesar de não haver significância estatística, é possível observar que a liberação de IFN- γ nas linhas celulares de CP e CCR é inferior relativamente à liberação na linha celular K562. Como observado na figura referente aos dados da liberação de CD107a, também no IFN- γ há uma menor percentagem na linha Panc1 e na linha LS1034.

Também foi possível fazer uma medição dos níveis de Perforina e Granzima β secretados pelas células NK (dados não demonstrados) e foi possível concluir que não se não apresentaram alterações relevantes entres as várias linhas celulares.

Estimulação com Interleucina-2

A Interleucina2 é uma citocina essencial no sistema imune. A estimulação das células NK com IL-2 promove a sua ativação e consequentemente o aumento da sua atividade citotóxica (Yu et al. 2000).

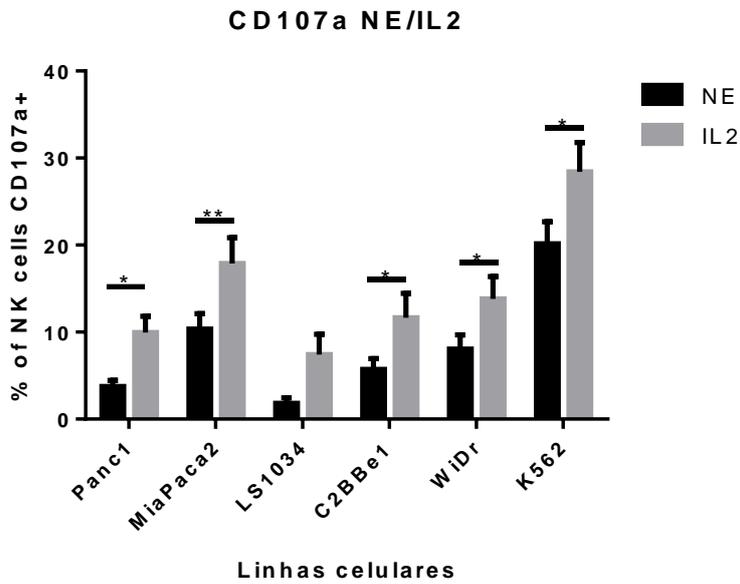


Figura 19 - Liberação de CD107a pelas células NK de doadores saudáveis após estimulação com IL2 por 24h a 37°C.

Segundo os dados da figura 19 é possível concluir que a estimulação das células NK com IL-2 durante 24h aumenta significativamente a liberação de CD107a após a interação com as diversas linhas celulares tumorais.

Resultados

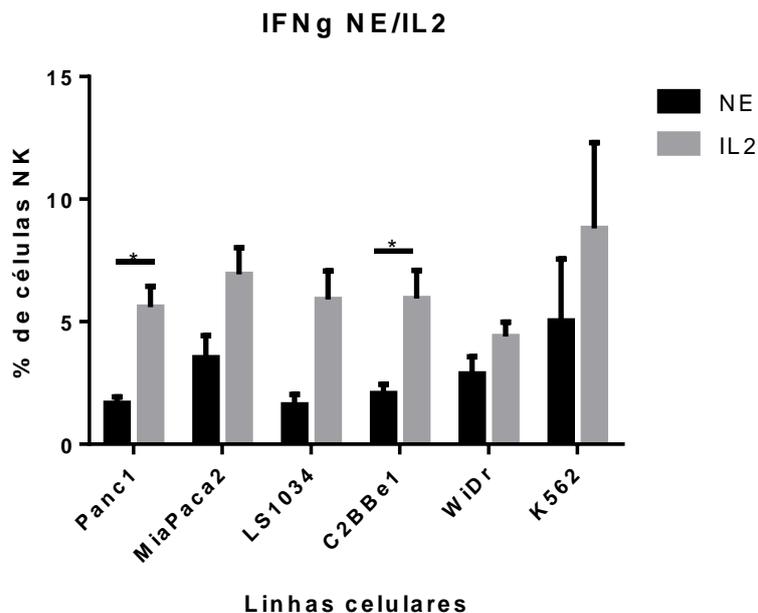


Figura 20 - Liberação de IFN- γ pelas células NK de dadores saudáveis após estimulação com IL-2 por 24h a 37°C.

A figura 20 demonstra que, apesar de em algumas linhas celulares os resultados não serem estatisticamente significativos, a estimulação das células NK com IL-2 aumenta a liberação de IFN- γ após a interação com as linhas celulares tumorais.

Também se mediu a liberação de Perforina e Granzima β pelas células NK depois de estimuladas com IL-2 e não foi possível observar variação dos valores de citocinas secretadas (dados não demonstrados).

Para a obtenção dos valores de expressão de CD107a das células NK na interação destas com as várias linhas celulares procedeu-se à seleção das células CD56⁺ CD107a⁺ como demonstrado na figura 21 para as linhas do CP e na figura 22 para as linhas do CCR.

Resultados

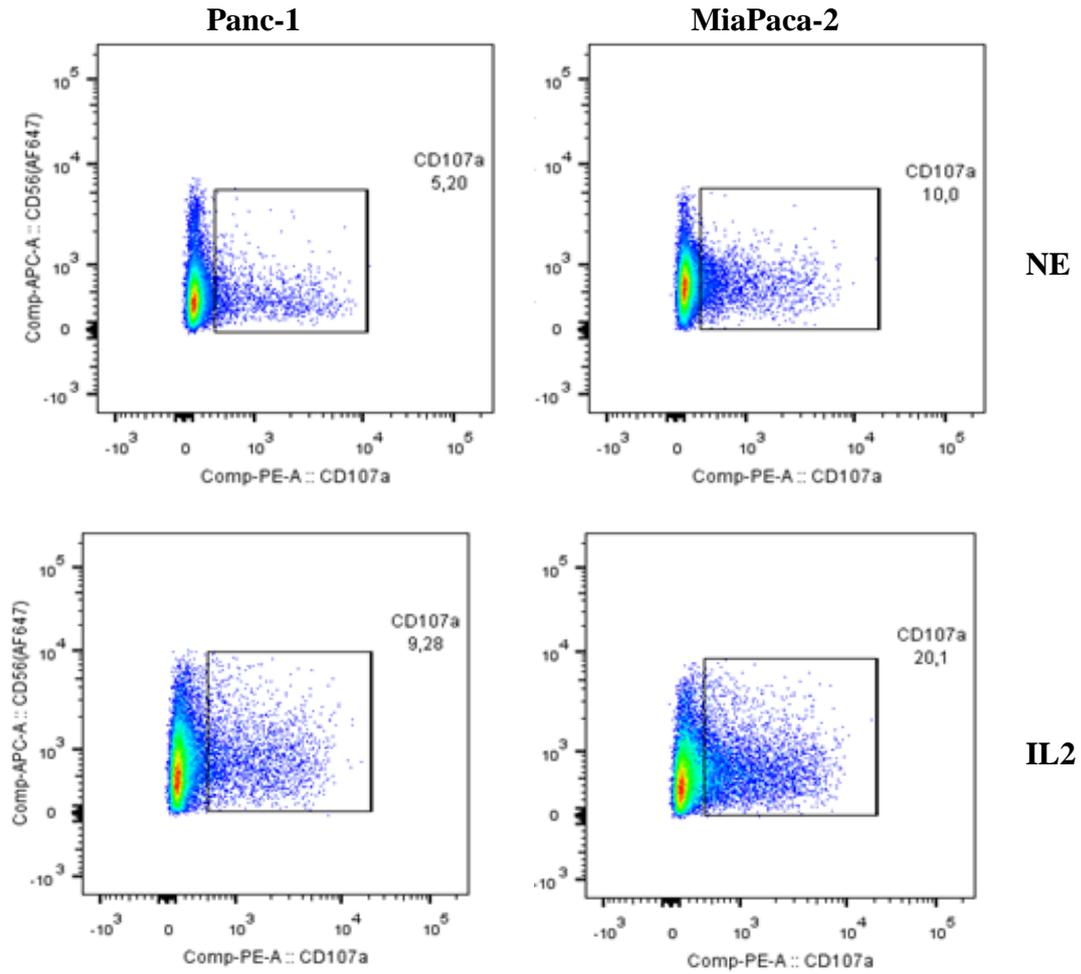


Figura 21 – Comparação entre a expressão de CD107a da linha celular Panc-1 e da MiaPaca-2 sem estímulo e estimuladas com IL-2.

Resultados

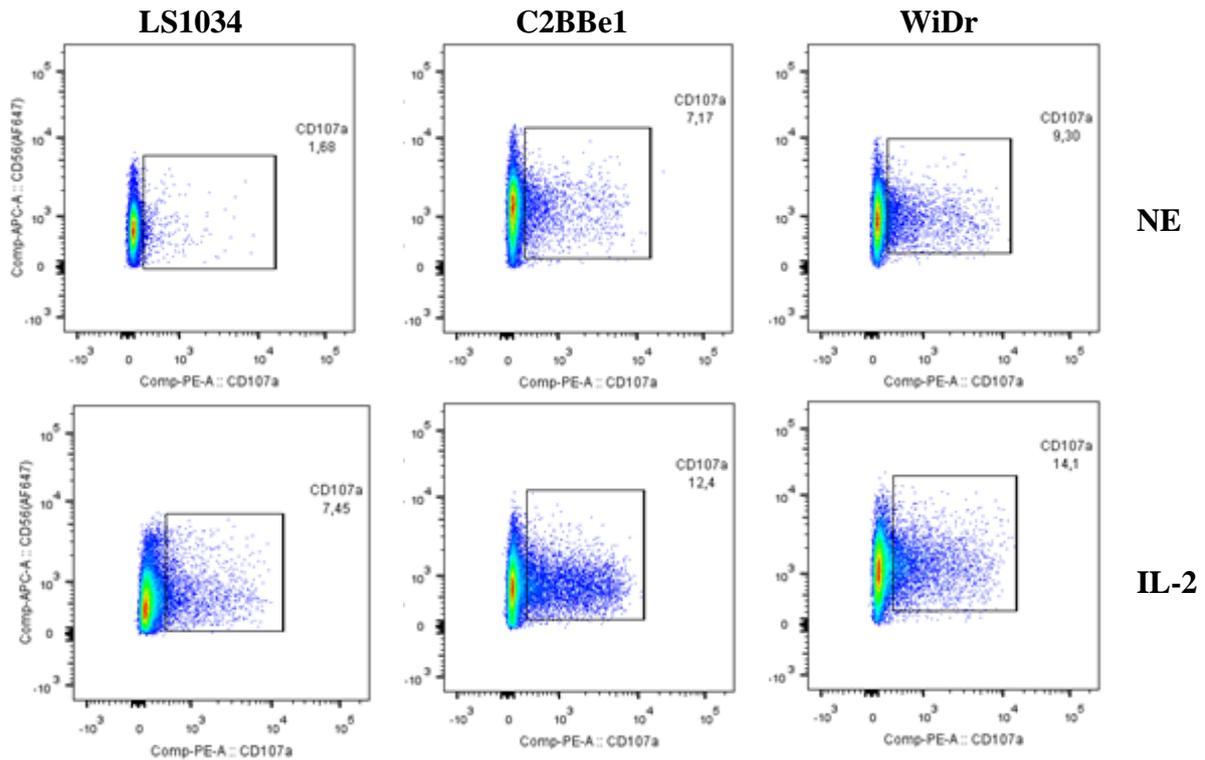


Figura 22 - Comparação entre a expressão de CD107a da linha celular LS1034, da C2BBe1 e da WiDr sem estimulação e estimuladas com IL-2.

Ensaio de citotoxicidade - LDH

Embora os ensaios de desgranulação CD107a e o ensaio de citotoxicidade com ^{51}Cr sejam os ensaios estabelecidos pela comunidade científica como os ensaios de referência, existem alguns problemas associados a cada um deles. O ensaio CD107a é um ensaio de desgranulação, ou seja, não mede diretamente a atividade citotóxica das células NK mas sim a sua desgranulação, não nos dando a certeza se de facto há morte celular das células alvo (Aktas et al. 2009; Alter, Malenfant, and Altfeld 2004).

O ensaio com ^{51}Cr apesar de nos informar realmente da atividade citotóxica das células NK, devido à sua radioatividade é necessário seguir algumas normas de segurança (Nelson, Kurman, and Serbousek 2001).

Resultados

Assim sendo, o ensaio de libertação de LDH é uma alternativa viável, credível e mais barata tendo ainda a vantagem de ser possível testar mais condições devido à necessidade de pequenas quantidades tanto de células NK como de células tumorais. Contudo, este ensaio possui uma desvantagem, a quantidade de LDH libertado não é exclusivo às células tumorais, segundo a literatura, as células NK após entrarem em contacto com diversas células alvo acabam por lisar, libertando também elas LDH para o meio.

LDH vs CD107a

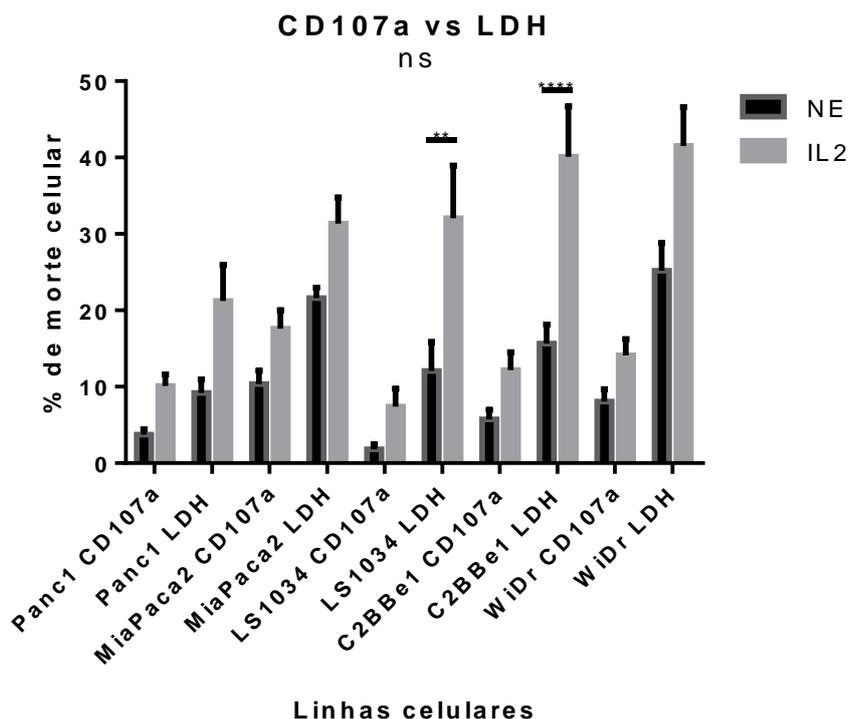


Figura 23 – Comparação da quantificação da morte celular entre o ensaio de citotoxicidade CD107a e o ensaio de LDH quando em contacto com as células NK sem estimulação prévia e após estimulação com IL-2.

Resultados

Segundo a figura 23, podemos observar que há uma correlação direta entre os dois ensaios citotóxicos. Tanto no ensaio de CD107a como no ensaio de LDH observa-se nas diversas linhas celulares tumorais um valor de morte celular inferior nas amostras sem estimulação prévia. Após a estimulação com IL-2 podemos observar que há um aumento da atividade das células NK, citotoxicidade, tanto no ensaio de CD107a como no ensaio de LDH.

Ensaio com anti-CD16 - LDH

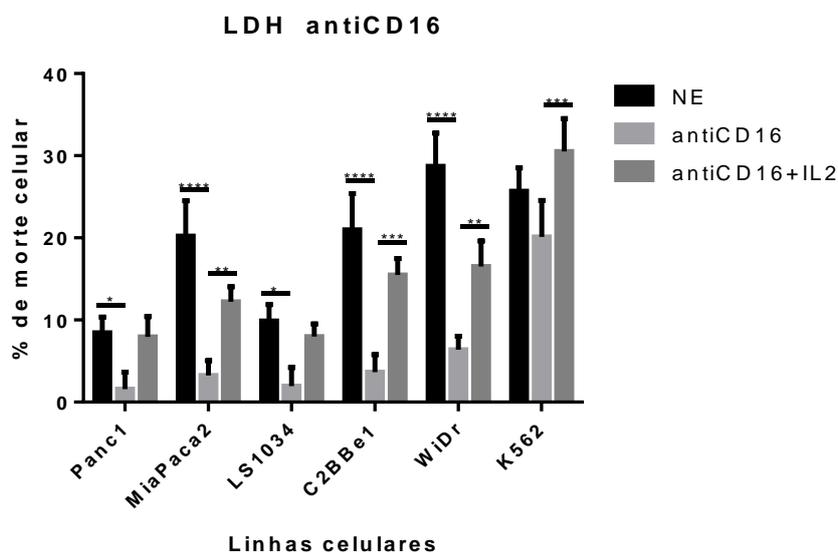


Figura 24 – Comparação entre a libertação de LDH pelas linhas celulares tumorais na interação com as células NK de doadores saudáveis. As células foram incubadas por 24h a 37°C. A libertação de LDH foi obtida através de espectrofotometria.

Segundo a figura 24 podemos concluir que após a estimulação das células NK com anti-CD16 há uma diminuição significativa da atividade citotóxica das células NK comparativamente com os resultados obtidos sem estimulação prévia. Também é possível

Resultados

observar, e este é o ponto-chave nesta figura, que ao estimular com IL-2 as amostras que anteriormente foram estimuladas com anti-CD16 resultou num aumento significativo, para níveis perto do das amostras sem estimulação, da atividade citotóxica das células NK.

Discussão

Os tumores do Pâncreas e Colo-retal são dos tumores sólidos mais malignos, têm uma taxa de mortalidade muito elevada não havendo tratamentos realmente eficazes, em especial quando a sua descoberta ocorre em estádios mais avançados. Para dificultar ainda mais os tratamentos destas patologias, a probabilidade de reincidência, ou o reaparecimento do tumor é muito elevada, aumentando assim a taxa de mortalidade (Fouad et al. 2013; Wolfgang et al. 2013).

Desde a descoberta das células NK, tem aumentado o interesse da comunidade científica na sua capacidade de eliminar células infetadas por vírus e em especial na capacidade de reconhecer e eliminar células tumorais. Este interesse tem o objetivo de desenvolver novas estratégias terapêuticas recorrendo às células NK para tratamentos imunoterapêuticos combinados com outros tratamentos já estabelecidos.

Embora possuam a habilidade de destruir células tumorais ou células infetadas sem necessidade de sensibilização prévia, as suas células alvo têm evoluído de maneira a escaparem aos mecanismos de citotoxicidade das células NK (Aktas et al. 2009) devido à presença de citocinas presentes no microambiente tumoral ou através da diminuição da expressão de recetores ativadores como consequência de diversos mecanismos entre outros (L. Moretta et al. 2014).

Está definido que a ativação das células NK está dependente do balanço entre sinais ativadores e sinais inibidores entre as NK e as células alvo. Assim, será de extrema importância fazer uma caracterização dos recetores expressos à superfície das células alvo que poderão ser reconhecidos pelas células NK de maneira a se conseguir perceber o porquê de a atividade citotóxica ser maior em alguns casos e menor noutros.

Expressão elevada dos recetores HLA-ABC e PVR nas linhas celulares tumorais

Segundo os dados da figura 13, as linhas celulares do cancro do Pâncreas têm os níveis de expressão dos recetores inibidores elevados. Destes recetores podem-se destacar o PVR e o HLA-ABC. Apesar de serem considerados inibidores, estes recetores podem desempenhar o papel de inibidor ou de ativador dependendo dos recetores expressos pelas células NK que os reconheçam. Se o recetor PVR for reconhecido pelo recetor TIGIT vai enviar um sinal inibidor às células NK, se for reconhecido pelos recetores CD96 (TACTILE) ou CD226 (DNAM-1) vai originar um sinal ativador levando à ativação das células NK (Maier et al. 2007). O mesmo se passa relativamente aos recetores HLA-ABC. Se forem reconhecidos pelos recetores KIR das células NK, vão enviar sinais inibidores, mas se o HLA-C for reconhecido pelos recetores CD160 (BY55) ou DAP12 vai enviar sinais ativadores levando à ativação das células NK (Vivier and Ugolini 2010). Relativamente aos recetores HLA-ABC, se os recetores A densidade destes recetores nas células tumorais do CP é bastante elevada. Contudo, a expressão dos recetores ativadores é quase nula como pode ser visto pela percentagem de células que expressam como pela densidade expressa em cada célula (MIF). Estes resultados indicam que o balanço dos sinais ativadores e inibidores desregulando, mostrando que poderá levar à inibição da atividade citotóxica das células NK (Vivier et al. 2012). Nas linhas do CCR a expressão de HLA-ABC é bastante diferente entre si, enquanto na linha LS1034 a sua expressão é elevada, nas linhas C2BBel e WiDr apenas uma pequena percentagem das células expressam. Desta forma será expectável que a linha celular LS1034 seja mais resistente às células NK comparativamente com as outras linhas do CCR. Isto está definido com a linha celular K562 que é uma linha sensível às células NK devido à não expressão dos recetores inibidores HLA-ABC e está demonstrado na figura 13.

Quantificação da expressão génica de constituintes promotores ao desenvolvimento tumoral

A perceção da expressão génica de alguns constituintes essenciais em alguns processos celulares importantes são vitais para a compreensão da atividade citotóxica das células NK. A Caspase 3, a Caspase 9, a BCL2 e a BAX estão envolvidas na regulação da apoptose celular (Lin et al. 2013; H. Liu et al. 2013; Xie 2010). Segundo a figura 14, a expressão destes genes nas linhas celulares do CP é quase nula, enquanto nas linhas do CCR a sua expressão é superior (sendo que na linha LS1034 os níveis de expressão são inferiores). Isto poderá demonstrar que na presença das células NK, as linhas do CP são mais resistentes pois não possuem mecanismos apoptóticos. Para além disso, esta é uma das características das células tumorais, a ausência de mecanismos apoptóticos, levando a que haja um aumento do número de células tumorais presentes.

As proteínas CDKN2A e a CCND3 estão envolvidas na supressão tumoral (Kit W 2012; Weng et al. 2012). A expressão destes genes é superior nas linhas do CCR (exceto na linha LS1034 relativamente à CDKN2A) enquanto nas linhas celulares do CP a sua expressão é praticamente nula. Estes resultados mostram que as linhas do CP são mais resistentes à morte pois não há produção destas moléculas que poderiam levar à sua supressão, já nas linhas do CCR poderão estar mais suscetíveis.

A quantificação da expressão de constituintes que podem influenciar a resposta inflamatória é de vital importância. Esta quantificação poderá facilitar a compreensão do porquê de a resposta imunológica ser mais ou menos eficaz para cada linha celular do CCR e do CP.

A interleucina-1 β é um importante medidor da resposta inflamatória (Datta De et al. 2011). Segundo os dados da figura 15 a expressão elevada desta citocina nas linhas do

CCR e na linha MiaPaca-2 do CP poderá levar a uma inflamação crónica no microambiente tumoral onde poderá levar à inibição da resposta imune.

A IL-2 é uma citocina com um papel importante na regulação da atividade dos glóbulos brancos, como os linfócitos, que vão efetuar a resposta imune (León, García-Martínez, and Carmenate 2013). Os baixos níveis de expressão desta citocina nas linhas C2BBe1 e LS1034 do CCR e em ambas as linhas do CP podem influenciar negativamente a resposta imunológica, tornando o ataque das células imunes menos eficaz contra as respetivas patologias.

A interleucina-6 é uma citocina pró-inflamatória com um impacto significativo na magnitude da resposta imunológica (West et al. 2008). Os elevados níveis de expressão nas linhas C2BBe1 e na WiDr poderão promover a inflamação no local do tumor influenciando negativamente a capacidade de as células imunológicas lisarem as células tumorais. Nas restantes linhas celulares, o mesmo não se verificar, os níveis de expressão são quase nulos, não conseguindo assim influenciar negativamente a resposta imunológica.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que tem um papel importante na imunorregulação e na inflamação (Chang et al. 2013b). A baixa expressão desta citocina pelas linhas celulares do CP poderá promover a inflamação já existente no microambiente tumoral, levando assim a uma diminuição da resposta imunológica. A expressão desta citocina pelas linhas do CCR, em especial pela linha LS1034, poderá ter um efeito anti-inflamatório, contrariando as características normais existentes no ambiente tumoral, beneficiando assim a resposta imune.

A proteína IFN- γ é uma citocina e tem um papel crítico tanto na imunidade inata como na adquirida contra vírus e bactérias entre outros (Aune et al. 2013). A expressão desta citocina pelas células tumorais pode levar a uma desregulação da resposta imune, isto porque as células imunes devido ao grande nível desta citocina presente no meio, parar a sua excreção, conseguindo assim as células tumorais escapar à lise celular. Segundo os dados da figura 15, a linha celular C2BBel tem os níveis de expressão desta citocina elevados, podendo levar à inativação da resposta imune. As restantes linhas não expressam, estando sujeitas à atividade das células imunes.

A citocina TGF- β pode ter influência nas células imunes, é um promotor tumoral favorecendo o microambiente tumoral perfeito para as células, levando à inibição das células NK (Kubiczkova et al. 2012). Possui características de supressor tumoral pois consegue inibir a proliferação e induzir a apoptose em múltiplos tipos celular. No entanto, paradoxalmente, tem um papel duplo no desenvolvimento tumoral, pois consegue promover a invasão celular do tumor e a metastização através da modulação do sistema imune assim como do ambiente tumoral (Katz et al. 2013). Nas linhas do CP a sua expressão é quase nula, enquanto na linha C2BBel e WiDr do CCR a sua expressão é elevada, favorecendo uma menor atividade das células NK (Medina-Echeverz, Fioravanti et al. 2014).

Um regulador importante na resposta imunitária a infeções é o complexo proteico NF-K β . A regulação incorreta deste complexo proteico tem sido ligada ao cancro, a doenças inflamatórias e auto-imunes (Demchenko et al. 2014). Segundo os dados da figura 16, os níveis de expressão deste gene pelas linhas celulares do CCR são elevados. Estes níveis poderão levar a uma desregulação da resposta imunológica, facilitando a sobrevivência e proliferação do tumor.

Um processo essencial para a sobrevivência tumoral é a angiogénese, ou seja, a criação de vasos sanguíneos a partir de uns já existentes. A proteína VEGF é um fator de crescimento e está envolvido na criação de novos vasos sanguíneos, processo este vital na manutenção e crescimento dos tumores. A função da VEGF no cancro não está apenas limitada à angiogénese e à permeabilidade vascular. Os sinais mediados pela VEGF contribuem em aspetos chave na tumorigénese como o funcionamento das células estaminais tumorais e na iniciação do tumor (Hira Lal Goel 2012). Na linha celular C2BBel e WiDr do CCR a expressão deste fator é elevada, promovendo assim a sobrevivência e o crescimento do tumor. Na linha LS1034 do CCR a expressão é inferior enquanto nas linhas do CP a expressão é quase nula, podendo dificultar o crescimento tumoral das mesmas.

Expressão genotípica dos alelos HLA classe I reconhecidos pelos recetores KIR das células *Natural Killer*

O MHC é uma família de genes diversificada que tem um papel importante no sistema imune dos vertebrados e na sua autoimunidade. São glicoproteínas de superfície, codificadas pelos genes MHC e são vitais tanto para a resposta imune mediada célula-célula como para a resposta imune hormonal (Sin et al. 2012).

Nos humanos existem três moléculas MHC classe I clássicas, a HLA-A, HLA-B e HLA-C, assim como três moléculas não clássicas, a HLA-E, HLA-F e HLA-G que possuem funções imuno reguladoras (Meissner et al. 2012).

Uma das maiores classes de recetores inibidores das células NK são os KIR. É uma família diversificada e polimórfica que interage com os ligandos altamente polimórficos MHC classe I. A sua principal função está envolvida na geração de

diversidade nas respostas imunes a patógenos assim como recebem atenção considerável como marcadores associados a potenciais doenças (Manuscript 2012).

Para conseguirmos identificar que alelos dos recetores HLA as células NK reconhecem foi necessário fazer uma genotipagem dos HLA classe I. Ficou demonstrado na tabela 2 que todas as linhas celulares do CP e do CCR expressam os recetores HLA-ABC. A linha Panc-1 expressa os alelos HLA A*11, HLA B*38 e HLA C*12 que são reconhecidos pelo recetores inibidores KIR das células NK. Também a linha celular MiaPaca-2 expressa os alelos HLA A*24 e HLA C*08 que são reconhecidos pelas NK.

Estes dados mostram que a atividade citotóxica das células NK poderá ser diminuída comparativamente com a linha celular K562 (linha sensível às NK por não expressarem HLA-ABC à superfície). Segundo os dados relativos às linhas celulares do CCR, todas as linhas expressam alelos HLA-C que são reconhecidos pelos KIR das NK (HLA-C*02/07 para as LS1034; HLA-C*04 para as C2BBel e HLA C*02/04 para as WiDr). Para o HLA A, apenas a linha celular WiDr expressa alelos reconhecidos pelos KIR que é o HLA-A*24.

Por último, a linha celular C2BBel não expressa nenhum alelo do HLA B que seja reconhecido pelas NK enquanto a linha LS1034 e WiDr expressam HLA-B*27 e HLA-B*44, respetivamente. Com estes dados podemos esperar uma diminuição da atividade citotóxica das células NK comparativamente com a linha K562, sendo que haverá uma diferença na sensibilidade nas diferentes linhas celulares devido ao diferente número de alelos reconhecidos pelas células NK, variando assim a magnitude da resposta imunológica.

Atividade citotóxica das células NK na interação com as células tumorais alvo

Depois de caracterizadas as linhas celulares tumorais tanto na expressão de recetores celulares como na expressão de constituintes importantes ao ciclo celular e na resposta imunoinflamatória torna-se vital medir a capacidade das células NK de lisarem as células alvo.

O ensaio de desgranulação CD107a é o ensaio padrão para a medição da citotoxicidade das células NK. Quando as NK interagem com as células alvo, são ativadas e desgranulam, esses grânulos (contendo Perforina ou Granzima β) expressam à superfície CD107a que podem ser medidos por Citometria de Fluxo (Murugin et al. 2011). Contudo, este ensaio não demonstra realmente a atividade citotóxica das células NK, mas sim a capacidade de desgranulação, não dando para saber se os grânulos entraram de facto em contacto com as células alvo.

Segundo a figura 17, as células NK não estimuladas expressam grânulos quando em contacto com as linhas celulares do CP e do CCR, embora os níveis de expressão sejam bastante inferiores comparativamente com a linha K562 (linha sensível a NK). Relativamente às linhas do CP, a linha Panc-1 é mais resistente relativamente à linha MiaPaca-2, esta maior resistência estará relacionada com a maior expressão dos recetores inibidores demonstrados anteriormente.

Relativamente às linhas do CP os nossos resultados sugerem que a linha LS1034 será mais resistente as células NK, seguida pela linha C2BBel sendo a linha WiDr a mais sensível, sendo que são bastante mais resistentes que a linha K562. A linha LS1034 é a linha mais resistente é a linha com maior expressão dos recetores HLA-ABC.

Outro mecanismo de citotoxicidade das células NK é a libertação de IFN- γ após a interação com as células alvo (Vivier et al. 2012). O IFN- γ para além de ter efeito nas células tumorais, também recruta e ativa outras células efetoras imunes como as Dendríticas e os linfócitos T citotóxicos.

Na figura 18 podemos observar que as células NK libertam IFN- γ quando ativadas pelas linhas celulares tumorais do CP e do CCR. Os níveis de libertação de IFN- γ são inferiores aos níveis de CD107a mas equivalem em cada linha celular, sendo que a linha Panc-1 é mais resistente que a MiaPaca-2 no CP e a linha LS1034 também é a mais resistente das linhas tumorais do CCR. Contudo, continuam a ser mais resistentes às NK que a linha K562 de Leucemia Mieloide Crónica.

De maneira a tentar aumentar o efeito citotóxico das células NK para uma possível futura estratégia de imunoterapia baseada em células NK, recorreu-se à estimulação das mesmas com interleucinas-2. A IL-2 é uma citocina essencial ao sistema imune, de modo que irá promover a ativação das NK e consequentemente o aumento da sua atividade citotóxica (Eguizabal et al. 2014).

Depois de estimuladas as células NK com IL-2 durante 24h, foi possível verificar na figura 19 um aumento significativo da atividade citotóxica (expressão de CD107a) em todas as linhas celulares tanto do CP como das linhas celulares tumorais do CCR. Em ambas as linhas do carcinoma pancreático verifica-se um aumento significativo da expressão de CD107a para níveis bastante interessantes, sendo que devido à presença dos recetores HLA-ABC inibidores, estes níveis mantêm-se inferiores relativamente aos da linha K562.

Nas linhas do CCR também é possível verificar um aumento significativo da expressão de CD107a. Apesar de na linha LS1034 este aumento não ser estatisticamente significativo, é possível observar que a estimulação das NK com IL-2 aumenta bastante a expressão de CD107a.

A estimulação das células NK com IL-2 para além de aumentarem a expressão de CD107a também têm um impacto na sua libertação de IFN- γ como demonstrado na figura 20. Apesar de os resultados da linha celular MiaPaca-2 do CP e das linhas LS1034 e WiDr do CCR não serem estatisticamente significativos, é possível concluir que a estimulação com IL-2 aumenta bastante a libertação de IFN- γ pelas células NK. Contudo tanto na expressão de CD107a como na libertação de IFN- γ as linhas celulares tumorais do CP e do CCR são mais resistentes que a linha K562.

Apesar de o ensaio de citotoxicidade padrão das células NK ser o de desgranulação CD107a, não se pode medir exatamente a citotoxicidade mas sim a desgranulação. Com isto, o ensaio de quantificação de LDH é uma alternativa credível e mais acessível em termos monetários (possibilitante também fazer medições com mais estímulos e condições devido à necessidade de pequenas quantidades de células NK e de células alvo). Neste sentido, observando a figura 23 é possível concluir que há uma correlação direta entre os resultados obtidos no ensaio de CD107a e os resultados do ensaio de citotoxicidade LDH. Como nos resultados do ensaio de CD107a é possível verificar um aumento da morte celular das células tumorais (citotoxicidade das NK) quando se faz estimulação com IL-2 sendo que essa percentagem é superior no ensaio de LDH.

O recetor CD16 das células NK é uma molécula da superfamília Ig conhecida por estar envolvida na citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e é o maior responsável pela ativação da lise celular pelas células NK (Mandelboim et al. 1999;

Parsons et al. 2014). A diminuição da expressão do recetor CD16 ou a sua inativação vai diminuir a atividade citotóxica das células NK. Um dos mecanismos de escape das células tumorais às células NK é a libertação de citocinas que irão inibir os recetores CD16. Com isto, as células NK vão perder a sua atividade citotóxica (Igney and Krammer 2002; Waldhauer and Steinle 2008). Assim, torna-se vital a descoberta de uma maneira de conseguir contrariar este mecanismo que as células tumorais usam para escapar às células NK.

Como demonstrado por Tseng, Cacalano, & Jewett, 2015, a ativação dos recetores CD16 das células NK recorrendo ao uso de anticorpos anti-CD16, que mimetiza o efeito da ligação a um ligando, resulta numa grande diminuição da atividade citotóxica e no aumento da secreção de citocinas pelas células NK num processo chamado anergização (“split anergy”) (Tseng, Cacalano, and Jewett 2015).

Recorrendo ao uso de anti-CD16 conseguimos mimetizar o efeito das células tumorais e testar mecanismos que possam contrariar este processo. Segundo os resultados demonstrados na figura 24, estimulando as células NK com anti-CD16, é possível verificar que houve uma diminuição significativa da atividade citotóxica das células NK, do mesmo modo que as células tumorais conseguem *in vivo*. Mas estimulando as células NK com anti-CD16 e com IL-2 observa-se um aumento significativo da atividade citotóxica das células NK para níveis próximos às células sem estimulação.

Deste modo, a estimulação das células NK com IL-2 para além de aumentarem a sua citotoxicidade, também conseguem fugir à anergização das mesmas provocadas pela libertação de citocinas pelas células tumorais.

Conclusões e perspectivas futuras

O presente trabalho teve como objetivo perceber se as células NK podem ser utilizadas em imunoterapia para o cancro do Pâncreas e Colo-retal e se será possível melhorar de alguma forma a resposta citotóxica das NK.

Consequentemente, ficou demonstrado que as linhas celulares do CP e do CCR expressam à sua superfície celular recetores inibidores (HLA-ABC e PVR) que serão reconhecidos pelas células NK. Este balanço entre sinais inibidores e ativadores está desequilibrado, levando a que haja um predomínio dos sinais inibidores, diminuindo a atividade citotóxica das células NK.

A quantificação da expressão génica das linhas celulares demonstrou que as diferentes linhas celulares expressam proteínas capazes de moldar a resposta imune de maneira a diminuir a magnitude dessa resposta levando a uma maior resistência tumoral às células NK. A expressão de proteínas capazes de alterar a resposta imunoinflamatória demonstra que as células tumorais são extremamente malignas impossibilitando uma resposta imune competente.

Ficou demonstrado que as linhas celulares do CP e do CCR possuem alelos do HLA-ABC que são reconhecidos pelas células NK, alelos estes que são reconhecidos pelos KIR que são recetores inibidores, dificultando o ataque das células NK.

Apesar de todas estas adversidades para uma resposta efetiva das células NK, ficou demonstrado pelo ensaio de CD107a e pela expressão de IFN- γ que as células NK conseguem ter uma atividade citotóxica relativamente eficaz contras as diferentes linhas celulares tumorais, mesmo sendo essa resposta inferior quando comparada com a linha K562 (linha celular de leucemia mieloide crónica sensível às células NK por falta da expressão dos recetores HLA-ABC). Ficou ainda demonstrado que quando estimuladas

com IL-2, as células NK conseguem aumentar a magnitude da sua atividade citotóxica contra as linhas celulares em estudo.

Devido aos mecanismos de escape das células tumorais, as células NK perdem poder citotóxico quando foram estimuladas com anti-CD16 (mimetizando a anergia provocada pelas células tumorais *in vivo*). Mesmo neste caso, ficou demonstrado pelo ensaio de LDH que ao se estimular as células NK com IL-2, é possível voltar a tornar as células NK eficazes e capazes de combater as células tumorais.

Com este trabalho ficou demonstrado que as células NK podem ser uma ferramenta eficaz no tratamento de tumores do Pâncreas e tumores Colo-retal. De referir que esta estratégia imunoterapêutica deve ser um complemento aos tratamentos já estabelecidos (como quimioterapia, radioterapia, cirurgia, etc).

Com o objetivo de obter resultados mais fidedignos com o que aconteceria *in vivo* relativamente à magnitude da atividade citotóxica das células NK, esperamos fazer estes mesmos estudos recorrendo a um modelo de cultura 3D devido à maior semelhança com o microambiente tumoral, onde há a presença de matriz extracelular, inexistente no modelo de cultura 2D. Também será de extrema importância, fazer uma co-cultura nestes modelos 3D com células tumorais, mas também com células do estroma e células do sistema imune, pois só assim poderemos perceber o que realmente acontece no ambiente tumoral e quais as interações entre os diferentes tipos celulares.

Adicionalmente, pretendemos incluir estímulos novos, como a utilização de um *cocktail* de citocinas, esperando assim obter um ataque mais eficaz das células NK e ao mesmo tempo influenciando as outras células do sistema imune como as células Dendríticas ou os linfócitos T citotóxicos.

Referências

Referências

- Aktas, Esin et al. 2009. "Relationship between CD107a Expression and Cytotoxic Activity." *Cellular Immunology* 254(2): 149–54.
- Alter, Galit, Jessica M. Malenfant, and Marcus Altfeld. 2004. "CD107a as a Functional Marker for the Identification of Natural Killer Cell Activity." *Journal of Immunological Methods* 294(1-2): 15–22.
- Aune, Thomas M. et al. 2013. "Epigenetic Activation and Silencing of the Gene That Encodes IFN- γ ." *Frontiers in Immunology* 4(MAY): 1–8.
- Balkwill, Frances R, Melania Capasso, and Thorsten Hagemann. 2012. "The Tumor Microenvironment at a Glance." *Journal of cell science* 125(Pt 23): 5591–96.
- Bandyopadhyay, Sanmay, Cristina Montagna, and Fernando Macian. 2012. "Silencing of the IL2 Gene Transcription Is Regulated by Epigenetic Changes in Anergic T Cells." *European Journal of Immunology* 42(9): 2471–83.
- Beli, Eleni et al. 2013. "Natural Killer Cell Development and Maturation in Aged Mice." *Mechanisms of ageing and development* 135: 33–40.
- Beutler, B. 2004. "Innate Immunity: An Overview." *Molecular Immunology* 40(12): 845–59.
- Bewick, Sharon, Ruoting Yang, and Mingjun Zhang. 2009. "The Danger Is Growing! A New Paradigm for Immune System Activation and Peripheral Tolerance." *PloS one* 4(12): e8112.
- Bryceson, Yenan T et al. 2005. "Cytolytic Granule Polarization and Degranulation Controlled by Different Receptors in Resting NK Cells." *The Journal of experimental medicine* 202(7): 1001–12.
- Caligiuri, Michael a. 2008. "Human Natural Killer Cells." *Blood* 112(3): 461–69.
- Chammas, Roger. 2010. "Câncer E O Microambiente Tumoral Cancer and the Tumor Microenvironment." 89(1): 21–31.
- Chang, Jung-Su et al. 2013a. "Association between Interleukin 1beta and Interleukin 10 Concentrations: A Cross-Sectional Study in Young Adolescents in Taiwan." *BMC pediatrics* 13(1): 123.
- . 2013b. "Association between Interleukin 1beta and Interleukin 10 Concentrations: A Cross-Sectional Study in Young Adolescents in Taiwan." *BMC pediatrics* 13(1): 123.
- Chaplin, David D. 2010. "Overview of the Immune Response." *The Journal of allergy and clinical immunology* 125(2 Suppl 2): S3–23.
- Cheng, Min et al. 2012. "Natural Killer Cell Lines in Tumor Immunotherapy." *Frontiers of Medicine* 6(1): 56–66.
- . 2013. "NK Cell-Based Immunotherapy for Malignant Diseases." *Cellular & molecular immunology* 10(3): 230–52.
- Cooper, Max D., and Matthew N. Alder. 2006. "The Evolution of Adaptive Immune Systems." *Cell* 124(4): 815–22.
- Correa de Sampaio, Pedro et al. 2012. "A Heterogeneous in Vitro Three Dimensional Model of Tumour-Stroma Interactions Regulating Sprouting Angiogenesis." *PloS one* 7(2): e30753.
- Datta De, Dipanjana et al. 2011. "IL1B Induced Smad 7 Negatively Regulates Gastrin Expression." *PLoS ONE* 6(3).
- Deer, Emily L. et al. 2010. "Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines." *Pancreas* 39(4): 425–35.
- Demchenko, Yulia N et al. 2014. "Novel Inhibitors Are Cytotoxic for Myeloma Cells with NFkB Inducing Kinase-Dependent Activation of NFkB." *Oncotarget* 5(12).
- Desbois, Melanie et al. 2012. "Natural Killer Cells in Non-Hematopoietic Malignancies." *Frontiers in Immunology* 3(DEC): 1–12.
- Dranoff, Glenn. 2004. "Cytokines in Cancer Pathogenesis and Cancer Therapy." *Nature reviews. Cancer* 4(1): 11–22.
- Dunn, Gavin P, Catherine M Koebel, and Robert D Schreiber. 2006. "Interferons, Immunity and Cancer Immunoediting." *Nature reviews. Immunology* 6(11): 836–48.
- Eguizabal, Cristina et al. 2014. "Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy: Pluripotent Stem Cells-Derived NK Cells as an Immunotherapeutic Perspective." *Frontiers in Immunology* 5(September): 1–10.

Referências

- Erb, Holger H H et al. 2013. "IL6 Sensitizes Prostate Cancer to the Antiproliferative Effect of IFN α 2 through IRF9." *Endocrine-Related Cancer* 20(5): 677–89.
- Finlay, B Brett, and Grant McFadden. 2006. "Anti-Immunology: Evasion of the Host Immune System by Bacterial and Viral Pathogens." *Cell* 124(4): 767–82.
- Fouad, Mona N et al. 2013. "Schoen RE, Pinsky PF, Weissfeld JL, et Al. Colorectal-Cancer Incidence and Mortality with Screening Flexible Sigmoidoscopy. N Engl J Med. 2012;366(25):2345–57." 366(25): 2345–57.
- Fu, Binqing et al. 2011. "CD11b and CD27 Reflect Distinct Population and Functional Specialization in Human Natural Killer Cells." *Immunology* 133(3): 350–59.
- Ghosn, Marwan et al. 2014. "Optimum Chemotherapy in the Management of Metastatic Pancreatic Cancer." *World journal of gastroenterology : WJG* 20(9): 2352–57.
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144(5): 646–74.
- Hanahan, Douglas, Robert A Weinberg, and San Francisco. 2000. "The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco." 100: 57–70.
- Hira Lal Goel. 2012. "NIH Public Access." *Changes* 29(6): 997–1003.
- Hu, Qi et al. 2014. "Molecular Determinants of Caspase-9 Activation by the Apaf-1 Apoptosome." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(46): 16254–61.
- Igney, Frederik H, and Peter H Krammer. 2002. "Immune Escape of Tumors: Apoptosis Resistance and Tumor Counterattack." *Journal of leukocyte biology* 71(6): 907–20.
- Junttila, Melissa R, and Frederic J de Sauvage. 2013. "Influence of Tumour Micro-Environment Heterogeneity on Therapeutic Response." *Nature* 501(7467): 346–54.
- Katz, Lior H et al. 2013. "Targeting TGF- B Signaling in Cancer." *Expert opin Ther Targets* 17(7): 743–60.
- Kirkwood, John 2012. 2013. "Immunotherapy of Cancer in 2012." 62(5): 309–35.
- Kit W, Tam 2013. 2012. "NIH Public Access." *Changes* 29(6): 997–1003.
- Kubiczkova, Lenka, Lenka Sedlarikova, Roman Hajek, and Sabina Sevcikova. 2012. "TGF-Beta -- an Excellent Servant but a Bad Master." *Journal of Translational Medicine* 10(1): 183.
- De la Chapelle, Albert. 2004. "Genetic Predisposition to Colorectal Cancer." *Nature reviews. Cancer* 4(10): 769–80.
- Laddha, Naresh C. et al. 2014. "Association of Neuropeptide Y (NPY), Interleukin-1B (IL1B) Genetic Variants and Correlation of IL1B Transcript Levels with Vitiligo Susceptibility." *PLoS ONE* 9(9): e107020.
- León, Kalet, Karina García-Martínez, and Tania Carmenate. 2013. "Mathematical Models of the Impact of IL2 Modulation Therapies on T Cell Dynamics." *Frontiers in Immunology* 4(DEC): 1–21.
- Lin, Yuan-feng et al. 2013. "Targeting the XIAP / Caspase-7 Complex Selectively Kills Caspase-3 – Deficient Malignancies." *The Journal of Clinical Investigation* 123(9): 3861–75.
- Liu, Hong et al. 2013. "Interleukin 17A Inhibits Autophagy through Activation of PIK3CA to Interrupt the GSK3B-Mediated Degradation of BCL2 in Lung Epithelial Cells." *Autophagy* 9(5): 730–42.
- Liu, Zhehui et al. 2015. "MiR-592 Inhibited Cell Proliferation of Human Colorectal Cancer Cells by Suppressing of CCND3 Expression." 8(3): 3490–97.
- Maier, Michael K. et al. 2007. "The Adhesion Receptor CD155 Determines the Magnitude of Humoral Immune Responses against Orally Ingested Antigens." *European Journal of Immunology* 37(8): 2214–25.
- Makishima, Tomoko et al. 2011. "Inner Ear Dysfunction in Caspase-3 Deficient Mice." *BMC Neuroscience* 12(1): 102.
- Mandelboim, O et al. 1999. "Human CD16 as a Lysis Receptor Mediating Direct Natural Killer Cell Cytotoxicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(10): 5640–44.
- Manuscript, Author. 2012. "NIH Public Access." *Changes* 29(6): 997–1003.

- Maria, Andrea De, Federica Bozzano, Claudia Cantoni, and Lorenzo Moretta. 2011. "Revisiting Human Natural Killer Cell Subset Function Revealed Cytolytic CD56 Dim CD16 + NK Cells as Rapid Producers of Abundant IFN- γ on Activation."
- Marie, Suely Kazue Nagahashi, and Sueli Mieko Oba Shinjo. 2011. "Metabolism and Brain Cancer." *Clinics (São Paulo, Brazil)* 66 Suppl 1: 33–43.
- Meissner, Torsten B et al. 2012. "NLRC5 Cooperates with the RFX Transcription Factor Complex to Induce MHC Class I Gene Expression." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188(10): 4951–58.
- Migliore, Lucia, Francesca Migheli, Roberto Spisni, and Fabio Coppedè. 2011. "Genetics, Cytogenetics, and Epigenetics of Colorectal Cancer." *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011: 792362.
- Minnicelli, Carolina et al. 2012. "Relationship of Epstein-Barr Virus and Interleukin 10 Promoter Polymorphisms with the Risk and Clinical Outcome of Childhood Burkitt Lymphoma." *PLoS ONE* 7(9): 1–7.
- Montaldo, Elisa et al. 2013. "Human NK Cell Receptors/markers: A Tool to Analyze NK Cell Development, Subsets and Function." *Cytometry Part A* 83(8): 702–13.
- Moretta, a et al. 1996. "Receptors for HLA Class-I Molecules in Human Natural Killer Cells." *Annual review of immunology* 14: 619–48.
- Moretta, Alessandro, Franco Locatelli, and Lorenzo Moretta. 2008. "Human NK Cells: From HLA Class I-Specific Killer Ig-like Receptors to the Therapy of Acute Leukemias." *Immunological Reviews* 224(1): 58–69.
- Moretta, Lorenzo et al. 2014. "Human NK Cells: From Surface Receptors to the Therapy of Leukemias and Solid Tumors." *Frontiers in Immunology* 5(MAR): 1–8.
- Moretta, Lorenzo, and Alessandro Moretta. 2004. "Killer Immunoglobulin-like Receptors." *Current opinion in immunology* 16(5): 626–33.
- Murugin, Vladimir V. et al. 2011. "Reduced Degranulation of NK Cells in Patients with Frequently Recurring Herpes." *Clinical and Vaccine Immunology* 18(9): 1410–15.
- Nelson, D L, C C Kurman, and D E Serbousek. 2001. "51Cr Release Assay of Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC)." *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* Chapter 7: Unit 7.27.
- Parsons, Matthew S et al. 2014. "Anti-HIV Antibody-Dependent Activation of NK Cells Impairs NKp46 Expression." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192(1): 308–15.
- Poniatowski, Łukasz a., Piotr Wojdasiewicz, Robert Gasik, and Dariusz Szukiewicz. 2015. "Transforming Growth Factor Beta Family: Insight into the Role of Growth Factors in Regulation of Fracture Healing Biology and Potential Clinical Applications." *Mediators of Inflammation* 2015: 1–17.
- Quail, Df, and Ja Joyce. 2013. "Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Metastasis." *Nature medicine* 19(11): 1423–37.
- Shima, Kaori et al. 2012. 2012. "Shima, Kaori et Al. 2012." *Changes* 29(6): 997–1003.
- Shultz, Jacqueline C. et al. 2010. "Alternative Splicing of Caspase 9 Is Modulated by the Phosphoinositide 3-kinase/Akt Pathway via Phosphorylation of SRp30a." *Cancer Research* 70(22): 9185–96.
- Sin, Yung Wa et al. 2012. "Evolution of MHC Class I Genes in the European Badger (*Meles Meles*)." *Ecology and Evolution* 2(7): 1644–62.
- Smith, R T. 1994. "Cancer and the Immune System." *Pediatric clinics of North America* 41(4): 841–50.
- Sostres, Carlos, Carla Jerusalem Gargallo, and Angel Lanás. 2014. "Aspirin, Cyclooxygenase Inhibition and Colorectal Cancer." *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics* 5(1): 40–49.
- Sounni, Nor Eddine, and Agnès Noel. 2013. "Targeting the Tumor Microenvironment for Cancer Therapy." *Clinical chemistry* 59(1): 85–93.
- Stella Tsai, Chin-Shaw et al. 2010. "Serum Cellular Apoptosis Susceptibility Protein Is a Potential Prognostic Marker for Metastatic Colorectal Cancer." *The American journal of pathology* 176(4): 1619–28.

Referências

- Strober, W. 2001. "Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability." *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* Appendix 3: Appendix 3B.
- Szot, Christopher S, Cara F Buchanan, Joseph W Freeman, and Marissa N Rylander. 2011. "3D in Vitro Bioengineered Tumors Based on Collagen I Hydrogels." *Biomaterials* 32(31): 7905–12.
- Tafari, Marco et al. 2013. "Modulators of HIF1 α and NF κ B in Cancer Treatment: Is It a Rational Approach for Controlling Malignant Progression?" *Frontiers in Pharmacology* 4 FEB(February): 1–12.
- Takeda, K et al. 2001. "Involvement of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand in Surveillance of Tumor Metastasis by Liver Natural Killer Cells." *Nature medicine* 7(1): 94–100.
- Trinchieri, G. 1995. "Natural Killer Cells Wear Different Hats: Effector Cells of Innate Resistance and Regulatory Cells of Adaptive Immunity and of Hematopoiesis." *Seminars in immunology* 7(2): 83–88.
- Tseng, Han-ching, Nicholas Cacalano, and Anahid Jewett. 2015. "Split Anergized Natural Killer Cells Halt Inflammation by Inducing Stem Cell Differentiation, Resistance to NK Cell Cytotoxicity and Prevention of Cytokine and Chemokine Secretion." 6(11).
- Vesely, Matthew D., and Robert D. Schreiber. 2013. "Cancer Immunoediting: Antigens, Mechanisms, and Implications to Cancer Immunotherapy." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1284(1): 1–5.
- Vinay, Dass S. et al. 2015. "Immune Evasion in Cancer: Mechanistic Basis and Therapeutic Strategies." *Seminars in Cancer Biology*: 1–14.
- Vivier, Eric et al. 2011. "Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells." *Science (New York, N.Y.)* 331(6013): 44–49.
- . 2012. "Targeting Natural Killer Cells and Natural Killer T Cells in Cancer." *Nature reviews. Immunology* 12(4): 239–52.
- Vivier, Eric, and Sophie Ugolini. 2010. "NK Cells: Receptors and Functions." *Nature* 66(11): 2010–2010.
- Waldhauer, I, and a Steinle. 2008. "NK Cells and Cancer Immunosurveillance." *Oncogene* 27(45): 5932–43.
- Wang, Fang et al. 2013. "Downregulation of IFNG in CD4+ T Cells in Lung Cancer through Hypermethylation: A Possible Mechanism of Tumor-Induced Immunosuppression." *PLoS ONE* 8(11): 2–9.
- Wang, Xiaolei, Ximei Chen, Jianping Fang, and Changqing Yang. 2013. "Overexpression of Both VEGF-A and VEGF-C in Gastric Cancer Correlates with Prognosis, and Silencing of Both Is Effective to Inhibit Cancer Growth." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 6(4): 586–97.
- Watnick, Randolph S. 2012. "The Role of the Tumor Microenvironment in Regulating Angiogenesis." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(12): a006676.
- Weng, Heng-You et al. 2012. "Translational Repression of Cyclin D3 by a Stable G-Quadruplex in Its 5' UTR: Implications for Cell Cycle Regulation." *RNA Biology* 9(8): 1099–1109.
- West, Erin R, Min Xu, Teresa K Woodruff, and Lonnie D Shea. 2008. "NIH Public Access." *October* 28(30): 4439–48.
- Wolfgang, Christopher L Cl Christopher L Cl et al. 2013. "Recent Progress in Pancreatic Cancer." *CA: A Cancer ...* 63(5): 318–48.
- Wong, G S, and a K Rustgi. 2013. "Matricellular Proteins: Priming the Tumour Microenvironment for Cancer Development and Metastasis." *British journal of cancer* 108(4): 755–61.
- Xie, Maohua et al. 2014. 2010. "NIH Public Access." 9(2): 1–14.
- Yu, T K, E G Caudell, C Smid, and E a Grimm. 2000. "IL-2 Activation of NK Cells: Involvement of MKK1/2/ERK but Not p38 Kinase Pathway." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164(12): 6244–51.

Referências

- Zhao, Guoping et al. 2014. “Activating the Pro-Apoptotic Bcl-2 Protein Bax by a Small Molecule Induces Tumor Cell Apoptosis.” *Molecular and Cellular Biology* 34(7): 1198–1207.
- Zhu, Qingchao et al. 2014. “Analysis of the Intestinal Lumen Microbiota in an Animal Model of Colorectal Cancer.” *PloS one* 9(3): e90849.
- Zitvogel, Laurence, Lewis L Lanier, Wayne M Yokoyama, and Sophie Ugolini. 2011. “NIH Public Access.” 331(6013): 44–49.