

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Tese de Doutorado

Uso de Células Natural Killer Expandidas e Ativadas *In Vitro* na Presença de células apresentadora de antígenos artificial (aAPC) no Tratamento de Meduloblastoma

Álvaro Macedo Laureano

Orientadora: Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Uso de Células Natural Killer Expandidas e Ativadas *In Vitro* na Presença de células apresentadora de antígenos artificial (aAPC) no Tratamento Meduloblastoma

Álvaro Macedo Laureano

Orientadora: Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, como requisito para obtenção de título de Doutor em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2014

CIP - Catalogação na Publicação

MACEDO LAUREANO, ÁLVARO
USO DE CÉLULAS NATURAL KILLER EXPANDIDAS E
ATIVADAS IN VITRO NA PRESENÇA DE CÉLULAS
APRESENTADORA DE ANTÍGENO ARTIFICIAL (aAPC) NO
TRATAMENTO DE MEDULOBLASTOMA / ÁLVARO MACEDO
LAUREANO. -- 2014.
91 f.

Orientadora: LUCIA MARIANO DA ROCHA SILLA.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. IMUNOTERAPIA. 2. NK. 3. MEDULOBLASTOMA. 4.
CÂNCER DE CÉREBRO. I. MARIANO DA ROCHA SILLA, LUCIA,
orient. II. Título.

Agradecimentos

À minha orientadora, Dr^a Lucia Mariano da Rocha Silla, pela oportunidade única, pela confiança depositada em mim e pelos ensinamentos, tanto profissionais quanto pessoais.

Aos professores do MD Anderson Cancer Center, Dr. Laurence Cooper, Dr^a Vidya Gopalakrishnan, Dr. Dean Lee, por terem me recebido de braços abertos e me darem a oportunidade de participar no desenvolvimento de um trabalho tão bonito.

À equipe do Cooper Lab, Helen Huls, Harjeet Singh e Brian Rabinovich pelo apoio no desenvolvimento do projeto.

À equipe do laboratório da Dr^a Vidya, especialmente à Julie Humphries, por todo o suporte na parte de experimentação animal e histopatologia.

Às entidades financiadoras, que tornaram esse projeto possível: CAPES, DECIT/MS, NIH, Addis Faith Foundation e St Baldrick's Foundation.

À minha família, por todo o suporte e estímulo que me dá e sempre me deu, sem eles não seria o que sou.

Resumo

Meduloblastoma (MB) e Tumor Teratóide Rabdóide Atípico (TTRA) são tumores malignos do sistema nervoso central (SNC) que ocorrem na infância. Embora tenha havido um aumento na sobrevida, recorrência e metástases são frequentes e as opções terapêuticas poucas e tóxicas para crianças. Uma alternativa à terapia tradicional é a imunoterapia, que pode contornar os efeitos tóxicos associados à radioterapia e quimioterapia. De uma forma geral a imunoterapia depende da presença de antígenos associados a tumor (TAA) e/ou processamento de antígenos expressos pelo HLA classe I. No entanto, TAA para MB ou ATRT não estão bem definidos e tecidos neuronais tem a expressão de HLA classe I muito baixa. As células Natural Killer (NK) não dependem de TAA para citólise e são particularmente ativas na ausência de moléculas do HLA classe I tendo, portanto, potencial para o tratamento dessas doenças. Atualmente as barreiras para a aplicação clínica de células NK são quantitativas e qualitativas. Com o intuito de quebrar a barreira quantitativa foi criada uma plataforma tecnológica para a expansão das NK *ex vivo*. Essa plataforma consiste no cocultivo de células mononucleares de sangue periférico com células apresentadoras de antígeno artificiais (aAPC), que expressam Interleucina 21 ligada à membrana. Com essa tecnologia foi possível expandir células NK na ordem de 40.000 vezes. Também foi demonstrada a persistência das células NK expandidas *in vitro* por 3 semanas após infusão em cérebro murino e que essas células expressam altos níveis de citocinas antitumorais e estimulantes do sistema imune: Interferon gama e Fator de Necrose Tumoral alfa. Finalmente, foi demonstrada a atividade citolítica das células NK tanto *in vitro*, contra um painel de células de MB e ATRT, quanto *in vivo* em um modelo murino de MB. Os resultados obtidos fornecem a primeira evidência pré-clínica que provê suporte ao uso de células NK expandidas usando essa plataforma tecnológica no combate a cânceres de cérebro pediátricos. Com base nesses dados, nosso grupo no MD Anderson Cancer Center iniciou um ensaio clínico fase I para testar a segurança e eficácia de administração locorregional de células NK expandidas usando aAPC para o tratamento de tumores pediátricos da fossa posterior do cérebro.

PALAVRAS-CHAVE

Imunoterapia, célula NK, tumor de cérebro, meduloblastoma,

Abstract

Medulloblastoma (MBs) and Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor (ATRT) are malignant pediatric brain tumors. Although survival has improved, recurrence and metastasis are frequent with few therapeutic options for these children. Immunotherapy is an alternative to traditional therapies that may circumvent the potential toxicities associated with traditional chemotherapy and radiation approaches. Many immune based therapies rely on the presence of tumor associated antigens (TAAs) and/or antigen processing and class I human leukocyte antigen (HLA I) expression. However, TAAs for MB are not well defined and neuronal tissues have very low HLA I expression. Natural killer (NK) cells do not rely on TAA for cytotoxicity and therefore have potential for the treatment of these diseases. The current barriers to clinical application of NK therapy are quantitative and qualitative. To overcome quantitative barriers, we have worked with a platform technology for the ex vivo expansion of NK cells through co-culture of peripheral blood mononuclear cells with artificial antigen presenting cells expressing membrane-bound IL-21 (mbIL21) to promote a 40,000-fold expansion of NK cells. We also demonstrate prolonged life-span of ex vivo expanded NK cells and persistence for up to 3 weeks post-infusion in the murine brain. These cells express high levels of immune stimulatory and anti-tumor cytokines - interferon gamma and TNF-alpha following activation. Finally we demonstrate NK cytotoxic activity in vitro against a panel of primary and established ATRT and MB cells and in vivo following locoregional delivery in a mouse orthotopic model of MB. Our data provide the first pre-clinical evidence supporting the use of mbIL21 expanded NK cells against pediatric brain tumors. Based on this data we have initiated a novel Phase I clinical trial at MD Anderson Cancer Center to assess the safety and efficacy of locoregional delivery of mbIL21 expanded NK cells for the treatment of posterior fossa pediatric brain tumors.

KEYWORDS

Medulloblastoma, immunotherapy, NK cell, pediatric brain tumor.

Lista de tabelas

Tabela 1 Estratégia de busca de referências bibliográficas para embasamento dessa revisão.....	17
Tabela 2 Receptores de inibição e ativação de células NK	27

Lista de Figuras

- Figura 1: Cânceres de infância por tipo, média de número de casos por ano, porcentagem relativa e sexo. Idade 0 a 14 anos. Grã Bretanha 2006-2008..... 14
- Figura 2: Esquema comparando os subgrupos de meduloblastoma 20
- Figura 3: Representação esquemática da expansão de células NK usando K562- C19-mIL21: PBMC são co-cultivadas com aAPC irradiadas na presença de rhIL-2 por 21 dias, com adição de aAPC irradiadas a cada 7 dias e depleção de células CD3+ no dia 7..... 79
- Figura 4: Células NK em co-cultura com aAPC: Foto tirada com 10 dias de cultivo. As células NK formam grumos ao redor das aAPCs irradiadas. (aumento 40X)..... 79
- Figura 5: Diagrama do modelo animal 85

Lista de Abreviaturas

aAPC – Célula Apresentadora de Antígeno Artificial

APC – Célula Apresentadora de Antígeno

ADCC – Citotoxicidade Celular Anticorpo Dependente

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATRT – Tumor Teratóide Rabdóide Atípico

DNAM1 – Molécula Acessória DNAX

DMSO – Dimetil Sulfóxido

EBNA-1 - *Epstein-Barr nuclear antigen 1*

FFLuc – *Firefly Luciferase*

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HEK – *Human Embryonic Kidney*

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

IL-21 – Interleucina-21

IFN- γ – Interferon Gama

KIR – *Killer Immunoglobulin-like Receptor*

KCNA 1 - *Potassium Voltage-Gated Channel, Shaker-Related Subfamily, Member 1*

MB – Meduloblastoma

MDACC – MD Anderson Cancer Center – Texas, EUA

MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal

MIC (A/B) - *MHC class I polypeptide-related sequence (A/B)*

MOI – Multiplicidade de Infecção

MYC – *Myelocytomatosis*

MSR – Human Macrofage Scavenger Receptor

NCR – Receptor de Citotoxicidade Natural

NK – Natural Killer

NPR3 - *Natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBMC – Células Mononucleares de Sangue Periférico

PNET – Tumor Neuroectodermal Primário

R10 – Meio de Cultura RPMI 1640, enriquecido com 10% de SFB e 1% de L-Glutamina

Rev – Regulador de Expressão de Proteínas de Víriões

RhIL2 – Interleucina-2 humana recombinante

SFB – Soro Fetal Bovino

Shh – *Sonic Hedgehog*

SNC – Sistema Nervoso Central

STR – *Short Tandem Repeat*

rhIL-2 – Interleucina Recombinante Humana

Tet – Elemento regulatorio Tet

TU – Unidades Transdutoras

ULPB – *UL16 binding protein*

WNT – *Wingless-related integration site*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES	16
2.2	MEDULOBLASTOMA (MB)	18
2.2.1	<i>Incidência</i>	18
2.2.2	<i>Sobrevida</i>	18
2.2.3	<i>Classificação</i>	19
2.2.4	<i>Fatores de risco</i>	21
2.2.5	<i>Tratamento</i>	22
2.3	TUMOR TERATÓIDE RABDÓIDE ATÍPICO - ATRT	22
2.3.1	<i>Incidência</i>	23
2.3.2	<i>Sobrevida</i>	23
2.3.3	<i>Classificação</i>	23
2.3.4	<i>Fatores de Risco</i>	23
2.3.5	<i>Tratamento</i>	24
2.4	IMUNOTERAPIA PARA TUMORES DO SNC	25
2.5	CÉLULAS NATURAL KILLER	25
2.5.1	<i>Mecanismo de reconhecimento das células NK</i>	26
a.	<i>Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR):</i>	27
b.	<i>CD16 (FcγRIII):</i>	27
c.	<i>NKG2D (CD314)</i>	28
d.	<i>Receptores de citotoxicidade natural</i>	28
e.	<i>Heterodímeros CD94/NKG2</i>	29
f.	<i>DNAM1 (CD226)</i>	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO PRIMÁRIO	30
3.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	30
4	JUSTIFICATIVA	31
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
6	ARTIGO	39
6.1	GDF-15 MEDIATES RESISTANCE OF PEDIATRIC BRAIN TUMOR CELLS TO CYTOLYSIS BY NATURAL KILLER CELLS	39
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
8	PERSPECTIVAS	70

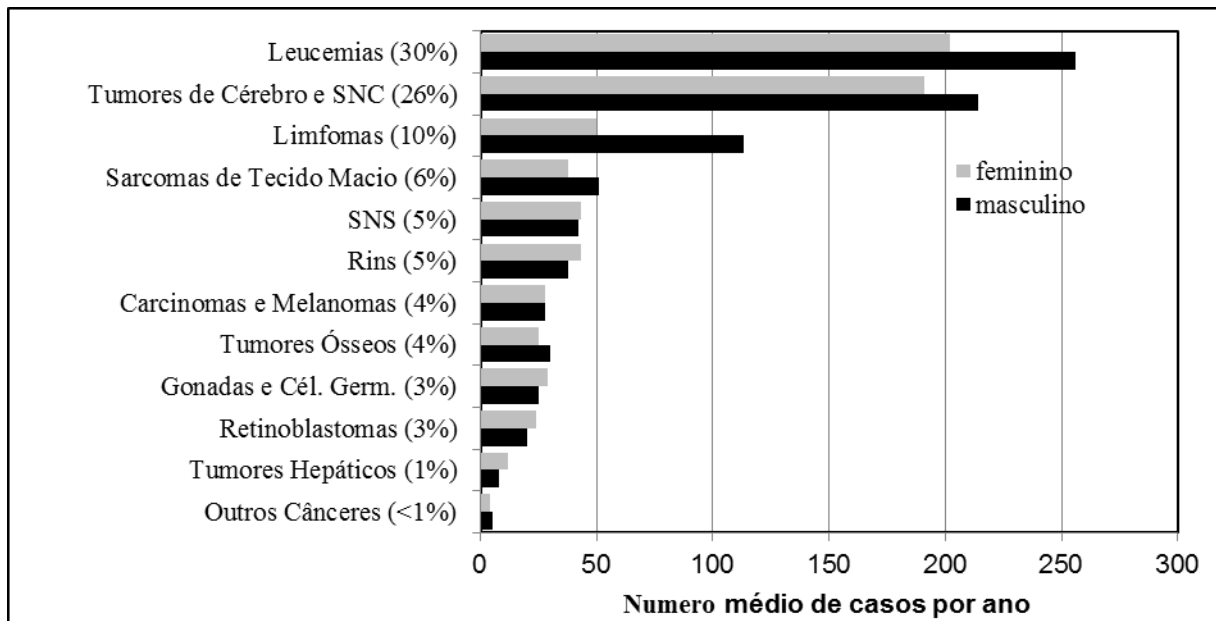
9 ANEXOS.....	71
9.1 ANEXO -1: MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
9.1.1 <i>Células e Linhagens Celulares</i>	72
a. Células mononucleares de sangue periférico	72
b. K562	72
c. Apresentadoras de antígeno artificiais (aAPC): K562-CI9-mIL21	73
d. Apresentadoras de antígeno artificiais (aAPC): K562-CI4-OKT3 <i>loaded</i>	73
e. HLA ^{neg} 721.221.....	73
f. DAOY.....	73
g. D283.....	74
h. MB003.....	74
i. MB01110.....	75
j. AB001.....	75
k. CHLA266.....	75
l. BT12	76
m. 293METR.....	76
9.1.2 <i>Fingerprinting</i>	77
9.1.3 <i>Tipagem HLA e KIR</i>	77
9.1.4 <i>Citometria de Fluxo</i>	78
9.1.5 <i>Propagação de células NK e T</i>	78
a. Células NK	78
b. Células T.....	79
9.1.6 <i>Ensaio de Atividade Citotóxica</i>	80
a. Ensaio de liberação de cromo.....	80
b. Análise do mecanismo de morte celular por NK	80
c. Análise de Atividade Celular Individual (<i>single cell</i>)	81
d. BioStation.....	82
9.1.7 <i>Marcação por Bioluminescência</i>	82
a. Geração de Vetor Lentiviral para a produção de células bioluminescentes	83
b. Titulação do Lentivírus	83
c. Transdução das Células Tumorais	83
9.1.8 <i>Modelo Animal</i>	84
a. Animais utilizados	84
b. Descrição do modelo animal.....	84
c. Análise <i>in vivo</i>	85
d. Histopatologia.....	85
9.1.9 <i>Ensaio de Mecanismo de Resistência à Atividade NK</i>	86
9.1.10 <i>Financiamento</i>	86
9.2 ANEXO 2: MAPA DO PLASMÍDEO PARA PLVU3G-EFFLUC-T2A-MKATES158A.	87
9.3 ANEXO 3: RESULTADOS DAS IMUNOFENOTIPAGENS DAS CÉLULAS NK POR CITOMETRIA DE FLUXO.	88

9.4 ANEXO 4: RESULTADOS DAS IMUNOFENOTIPAGENS DAS CÉLULAS T POR CITOMETRIA DE FLUXO90

1 INTRODUÇÃO

Tumores de sistema nervoso central (SNC) são os tumores não hematopoéticos mais comuns em crianças e adolescentes, representando 26% de todos os casos na Grã-Bretanha – Figura 1 – (1). Embora sendo segundo em incidência, os tumores de SNC são os principais responsáveis pela mortalidade por câncer na infância (2). Apesar dos avanços no tratamento (cirurgia, radiação cranioespinhal e quimioterapia) terem aumentado a sobrevivência desses pacientes (3), sequelas neurológicas, cognitivas e endócrinas significativas estão associadas aos efeitos da radiação no cérebro em desenvolvimento (4, 5) o que limita seu uso em crianças menores de três anos de idade. Além das sequelas, existe ainda o risco de recidiva, para a qual há carência de terapias efetivas. Esses fatores demonstram a urgência em desenvolver novas terapias para essas doenças.

Figura 1: Cânceres de infância por tipo, média de número de casos por ano, porcentagem relativa e sexo. Idade 0 a 14 anos. Grã Bretanha 2006-2008



Fonte: Adaptado de <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/>: Acessado em 15.10.2014

A imunoterapia vem sendo considerada uma alternativa terapêutica à radioterapia e quimioterapia sem os mesmos efeitos sistêmicos. Dentre as terapias que usam o sistema imune no combate ao câncer estão a infusão de células T e o uso de anticorpos monoclonais. Embora tenham sido usadas com sucesso no tratamento de várias doenças, essas terapias dependem do reconhecimento de antígenos específicos. Porém, até hoje não foram encontrados antígenos específicos para o meduloblastoma (MB) ou para o Tumor Teratóide Rabdoide Atípico (ATRT), este último bastante raro, mas sem opção terapêutica. Além disso, a maioria das imunoterapias depende da capacidade de um sistema imune funcional alcançar o

tumor, o que pode ser dificultado pela barreira hematoencefálica. Portanto, o uso de imunoterapia com injeção intratumoral ou no leito tumoral após a cirurgia, de células Natural Killer (NK) que não requerem um antígeno específico para reconhecimento do alvo, pode ter um potencial terapêutico para essas doenças.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura tem por objetivo reunir informações sobre os tumores de interesse do estudo – meduloblastoma e teratóide/rabdóide atípico -, trazendo dados demográficos, de tratamento e de classificação. Foi focada também a imunoterapia, especificamente com o uso de células *Natural Killer*, abordando seu uso em imunoterapia, passando por aspectos importantes, como mecanismos de ativação e inibição, bem como de reconhecimento dos alvos.

A estratégia de busca envolveu as bases de dados PubMed e Scopus, com buscas pelos termos “Natural Killer Cells”, “Medulloblastoma”, “Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor”, “Brain Tumor” e “Immunotherapy” e suas combinações, como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 Estratégia de busca de referências bibliográficas para embasamento dessa revisão.

	Resultado da pesquisa		Artigos utilizados na revisão	
	Scopus	PubMed	Scopus	PubMed
“Natural Killer Cells”	51.374	38.205	7	9
“Medulloblastoma”	9.750	6.775	21	13
“Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor”	487	214	5	4
“Brain Tumor”	71.344	12.815	16	8
“Immunotherapy”	107.294	63.663	11	4
“Natural Killer Cells” AND “Medulloblastoma”	23	8	2	2
“Natural Killer Cells” AND “Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor”	0	0	0	0
“Natural Killer Cells” AND “Brain Tumor”	168	51	2	1
“Natural Killer Cells” AND “Immunotherapy”	5.420	2.935	3	2
“Medulloblastoma” AND “Immunotherapy”	169		5	1
“Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor” AND “Immunotherapy”	3	1	1	1
“Brain Tumor” AND “Immunotherapy”	1302	365	6	3

2.2 MEDULOBLASTOMA (MB)

MB são tumores de origem neuroectodérmica que não derivam de células da glia e sim de neurônios imaturos presentes no desenvolvimento do cerebelo. O termo foi utilizado em 1925 por Bailey e Cushing para descrever tumores que ocupam a parte média do cerebelo e que apresentam como características histológicas grande densidade de células pluripotentes, pequenas, arredondadas com tendência à formação de rosetas e com abundância de figuras mitóticas (6). Em 1983, Rorke, Becker e Hinton publicaram artigo demonstrando a semelhança histológica entre os MBs e os tumores neuroectodermicos primários (Primary Neuroectodermal Tumor – PNET), fazendo com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) designasse como MB os tumores originados no cerebelo e PNET, os extra cerebelaes (7).

2.2.1 Incidência

MB é um tumor agressivo, de rápido crescimento, que surge no cerebelo ou no tronco encefálico e apresenta uma grande heterogeneidade biológica e molecular, responsável por 16 a 25% dos casos de câncer do SNC na infância, atingindo mais o sexo masculino (aproximadamente 60% dos pacientes são meninos) (8). De acordo com a OMS a incidência anual de MB em crianças menores de 15 anos é estimada em cerca de 0,25:100.000 (9, 10). O MB pode ocorrer em todas as idades, mas seu pico de incidência é aos 6 anos (11).

2.2.2 Sobrevida

Os avanços no tratamento do MB elevaram a sobrevida livre de evento em cinco anos de 55% nos anos de 1975-1977 para os atuais 70 a 80% (8, 12, 13). Mesmo sem recidivas, esses pacientes frequentemente apresentam sequelas do tratamento incluindo déficits motor, sensorial, endócrino, cognitivo e conseqüentemente social, podendo afetar significativamente a qualidade de vida desses indivíduos. Além disso, embora tenha havido uma significativa melhora na sobrevida, ainda há recidiva em 40% dos casos e morte de 30% dos pacientes (14). Embora crianças muito jovens normalmente não recebam o mesmo tratamento que os pacientes mais velhos, comprometendo a análise da influência da idade na sobrevida, estudos mostram uma tendência a um pior prognóstico em pacientes com menos de 3 anos de idade (3, 15-17). Cabe salientar que crianças menores de 3 anos de idade são responsáveis por 25 a 35% dos casos de MB (18).

2.2.3 Classificação

A origem dos MBs é atribuída à transformação neoplásica de neurônios imaturos remanescentes da camada granulosa externa – que deveriam desaparecer gradualmente até cerca de 6 meses após o nascimento (19).

A classificação de 2007 da OMS categoriza o MB de acordo com critérios histológicos em: clássico, desmoplástico/nodular, MB com extensa nodularidade, anaplásico e de células grandes. Devido a sua similaridade estes dois últimos tipos histológicos são agrupados como MB de grandes células/anaplásico (6), abaixo essa classificação mais detalhada:

- Meduloblastoma clássico: massa bem delimitada, com células pequenas, pouco diferenciadas, densamente agrupadas, com núcleos hipercromáticos com formato ovalado e citoplasma escasso.

- Meduloblastoma Desmoplástico/Nodular: é uma variante do MB clássico que geralmente surge em um hemisfério cerebelar, caracterizada pela formação de ilhas de centro pálido, com estroma rico em reticulina na periferia e escassez destas fibras no centro do tumor.





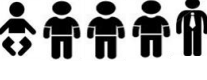




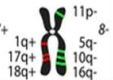
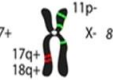
- Meduloblastoma com extensa nodularidade: de ocorrência em crianças e com bom prognóstico, essa variante se diferencia do desmoplástico por apresentar uma arquitetura nodular expandida, com zonas alongadas livres de reticulina.

- Meduloblastoma de grandes células/anaplásico: Essas duas variantes são caracterizadas por células monomórficas, com grandes núcleos vesiculares redondos, nucléolos proeminentes e citoplasma eosinofílico mais abundante que as outras variantes. Quando grupos dessas células se misturam com outros tipos celulares com pleomorfismo nuclear o tumor é classificado como anaplásico.

Outra classificação recentemente descrita é relacionada às características moleculares da doença, que divide os MB em 4 grupos: *Wnt*, *Shh*, Grupo 3 e Grupo 4. Os dois primeiros grupos, *Wnt* e *Shh* (de Sonic Hedgehog) são nomeados de acordo com a via de sinalização associada a sua patogênese. Por pouco se saber sobre a biologia dos outros dois subgrupos, estes tiveram mantidos os nomes genéricos (20). Em revisão feita por Kool e colaboradores, é

possível identificar que esses grupos apresentam diferenças em vários aspectos, como demográficos, genéticos e prognósticos (21), conforme representado na figura 2.

Figura 2: Esquema comparando os subgrupos de meduloblastoma

Consenso	WNT	SHH	GRUPO 3	GRUPO 4
Cho (2010)	C6	C3	C1/C5	C2/C4
Northcott (2010)	WNT	SHH	Grupo C	Grupo D
Kool (2010)	A	B	E	C/D
Thompson (2006)	B	C', D	E, A	A, C
Demografia				
Grupo etário (anos):				
 ≤ 4				
 >4 e ≤16				
 > 16				
Gênero: ♀ ♂	♂ ♂: ♀ ♀	♂ ♂: ♀ ♀	♂ ♂: ♀	♂ ♂: ♀
Clínica	Clássica, GCA raro	Desmoplástico/nodular, clássico, GCA	Clássica, GCA	Clássica, GCA
Histologia	M+ rara	M+ incomum	M+ muito frequente	M+ frequente
Metástase	Muito bom	<4 anos bom, outros intermediário	Ruim	Intermediário
Genética				
Expressão Gênica	CTNNB1 – mut. Sinalização WNT MYC+	PTCH/SMO/SUFU – mut. GLI2 – amplif. MYCN – amplif. Sinalização SHH MYCN+	MYC – amplif. Fotoreceptor/ GABAérgico MYC+++	CDK6/MYCN – amplif. Neuronal/ Glutamatérgico Mínimos MYC/MYCN

Legenda: Infant: M+: apresenta metástase GCA: grandes células/anaplástico.

Fonte: Adaptado de Taylor, Northcott, Korshunov, *et al.* 2012(20)

- Grupo Wnt: é o grupo mais conhecido, com melhor prognóstico e sobrevida superior a 90% (22). Praticamente ausente em crianças menores de 4 anos (21), esse tipo de tumor, que representa cerca de 10% dos casos de MB, é caracterizado por mutações no gene CTNNB1 que provocam hiperatividade da via de sinalização *Wnt*, impedindo a quebra de β -catenina, o que acarreta acúmulo dessa proteína e, conseqüentemente, na transcrição de genes de proliferação (23). Quase todos os tumores do grupo *Wnt* apresentam histologia clássica. Metástases foram encontradas em 9% dos casos e apenas em crianças (21).

- Grupo Sonic HedgeHog (*Shh*): é composto por tumores causados por alterações na via de sinalização *Shh*, uma das responsáveis pela diferenciação celular. Esse grupo corresponde a 28% dos MB (21). A maioria dos tumores desmoplástico/nodular são *Shh*, embora 50% dos tumores *Shh* não sejam desmoplástico/nodular. O prognóstico dos tumores

desse grupo é intermediário entre o grupo *Wnt* (bom) e o grupo 3 (mau), sendo similar ao do grupo 4 (20, 21).

- Grupo 3: caracterizados por um alto nível de expressão de *MYC* e presença do marcador NPR3, esses tumores têm o pior prognóstico dos 4 grupos (24). Raramente encontrados em adultos, tumores desse grupo representam aproximadamente um quarto dos MBs e afetam com uma frequência quase duas vezes maior pacientes do sexo masculino (21). Altamente metastáticos (46% dos casos) (24), embora apresentem mais frequentemente histologia clássica, eles são os responsáveis pela maioria dos tumores de grandes células/anaplásticos (14, 20, 21).

- Grupo 4: o maior dos quatro grupos, sendo responsável por 34% dos MBs. Por não haver um completo entendimento de sua patogênese, esses tumores são classificados como de Grupo 4 com base em seu perfil transcricional (20); Northcott e colaboradores sugerem que *KCNA1* seja usado como marcador imunohistoquímico para esse grupo, porém esse dado ainda carece de validação com maior número de amostras (24). Esses tumores frequentemente metastáticos, afetam cerca de duas vezes mais pacientes do sexo masculino e apresentam um prognóstico intermediário (20, 21).

2.2.4 Fatores de risco

Não existem causas definidas para o MB, embora alguns fatores tenham sido associados com o surgimento da doença. Um grupo da Alemanha (25) descreveu uma associação positiva entre elevado peso ao nascimento e risco aumentado para MB. Na Inglaterra, outro grupo encontrou associação entre infecção viral durante a gravidez com um aumento de 11 vezes na chance de desenvolver tumores malignos de SNC (26). Não foi encontrada uma associação entre pais fumantes e câncer do SNC, porém observou-se um risco quatro vezes maior em filhos de mães que fumaram durante a gravidez (27). Uma revisão de Baldwin e Preston-Martin reuniu estudos que avaliaram exposição dos pais a pesticidas e a incidência de tumores de cérebro na infância, observando que a maioria demonstrou associações positivas (28).

2.2.5 Tratamento

O tratamento padrão para MB é a ressecção cirúrgica seguida de quimioterapia e radioterapia cranioespinhal. Com esse tratamento, a sobrevida em 5 anos após o diagnóstico atinge níveis entre 60 e 80%, porém, com significativa morbidade. A ressecção cirúrgica é parte fundamental do tratamento. A proximidade do MB ao quarto ventrículo e ao tronco encefálico é um risco à morbidade embora, frequentemente, seja possível remover o tumor em sua totalidade sem danos às estruturas vizinhas (29).

O tratamento adjuvante à cirurgia mais importante é a radioterapia (6). Embora bastante eficaz, o tratamento com radiação está associado a alta incidência de sequelas. Os danos neurológicos, cognitivos e endócrinos são causados pela exposição do cérebro em desenvolvimento às altas doses de radiação usadas no tratamento da doença (4, 5). Massimino e colaboradores descreveram perda de até 30 pontos em QI nas crianças, além de disfunções endócrinas e de crescimento em função da irradiação das regiões do hipotálamo e glândula pituitária (6). Alguns estudos avaliaram o uso de baixas doses de radiação para controlar o crescimento do tumor e evitar os danos colaterais, observando baixo dano neurocognitivo, porém além de também ser observada uma diminuição no crescimento dos pacientes, houve um aumento da recidiva do tumor (30, 31).

Talvez pelos danos causados pela radiação ao cérebro em desenvolvimento, crianças menores de 3 anos têm pior prognóstico. Esses pacientes são tratados com doses bastante reduzidas de radiação, acompanhada um período prolongado de quimioterapia, com um risco de recidiva em torno de 65% (17, 32).

2.3 TUMOR TERATÓIDE RABDÓIDE ATÍPICO - ATRT

Assim como o MB, o ATRT é um tumor embrionário maligno do SNC, sendo um subgrupo dos tumores rabdóides. De ocorrência predominante na infância, 90% desses tumores ocorrem em crianças menores de 5 anos (33). Diferentemente do MB, o ATRT pode ocorrer em qualquer local do cérebro, porém é mais comum no cerebelo e no tronco cerebral (34).

2.3.1 Incidência

Diversos estudos reportaram uma incidência de ATRT entre 1 a 2% dos tumores de SNC. Um estudo austríaco relatou uma incidência estimada de 0,14:100.000 pessoas/ano (35). Embora relativamente raro na população geral, quando analisamos o grupo de crianças menores de 3 anos com tumores malignos no SNC, cerca de 20% destes são ATRT (36, 37).

O diagnóstico do ATRT é predominantemente baseado em achados morfológicos e imuno-histoquímicos, podendo ser auxiliado pelo diagnóstico genético. Alterações no gene INI1/hSNF5/SMARCB1/BAF47, um supressor tumoral localizado no braço longo do cromossomo 22 (22q11.2), são consideradas responsáveis pelo início do tumor (38).

2.3.2 Sobrevida

Em uma série de pacientes relatada por Woehrer (2010) a sobrevida de dois anos foi menor do que 15% para pacientes com menos de 3 anos de idade, justamente o grupo que apresenta a maior frequência da doença. Embora a radioterapia tenha se mostrado como uma terapia eficaz, principalmente se usada em um estágio precoce da doença, seu uso é descartado na maioria dos casos devido aos efeitos colaterais da radiação crânio-espinhal em crianças, particularmente nesta faixa etária (35).

2.3.3 Classificação

O ATRT não possui uma classificação padrão, porém é frequentemente classificado como localizado (ocorre em um único local do cérebro) ou disseminado – presente em diversos locais no SNC (39).

2.3.4 Fatores de Risco

Como comentado anteriormente, a ocorrência de tumores rabdóides está associada com alterações no gene INI1/hSNF5, em geral deleções ou mutações de inativação (40, 41). Esse gene é membro do complexo remodelador de cromatina SWI/SNF, sendo um importante supressor tumoral que regula transcrição gênica e influencia rotas envolvidas na formação de cânceres (34).

A idade é apontada como importante fator prognóstico. Indivíduos mais jovens tendem a ter um pior prognóstico. Em um estudo de 2011, von Hoff e colaboradores descrevem uma pior sobrevida em 3 anos, para crianças com ATRT menores de 1,2 anos de vida em

comparação com as maiores ($5\pm 5\%$ e $37\pm 10\%$, respectivamente). A sobrevida livre de eventos por 3 anos também foi pior no grupo mais jovem ($5\pm 5\%$ e $21\pm 8\%$) (42). Esses dados foram reforçados por um estudo publicado em 2012, em que a idade menor do que 2 anos foi identificada como pior prognóstico para a evolução da doença. Nesse mesmo estudo, também foi descrita, como pior prognóstico, uma forte marcação imunohistoquímica do tumor para claudina-6, uma importante proteína das *tight junctions*, que mantém a proximidade intercelular (43).

2.3.5 Tratamento

Embora tenha havido um aumento na sobrevida desses pacientes – muito em razão da melhora na identificação do ATRT – essa ainda é inferior à observada no MB (15 meses e 156 meses, respectivamente) (39). Usa-se, como tratamento para o ATRT, uma terapia combinada, com cirurgia, quimioterapia, metotrexato intratecal e radioterapia. Por se tratar de pacientes pediátricos muito jovens, esse tratamento muitas vezes acarreta danos irreversíveis ao cérebro, como pode ocorrer no tratamento do MB (36).

Existem diversos regimes de quimioterapia para ATRT, uma vez que não há um tratamento padrão estabelecido. Em estudo publicado em 2005, Geyer e colaboradores compararam o uso de uma combinação de vincristina, ciclofosfamida, etoposídeo e cisplatina com o uso da combinação de vincristina, carboplatina, ifosfamida e etoposídeo. De 284 pacientes, menores de 36 meses com tumores malignos de cérebro, 28 apresentavam ATRT. Embora não tenha observado diferença entre os tratamentos, a sobrevida dos pacientes de ATRT foi menor que a dos de MB ($29\pm 9\%$ e $43\pm 5\%$, respectivamente) (44). Diversos tratamentos com diferentes drogas foram testados, mas não há como definir quais drogas ou combinações são mais eficazes devido ao pequeno número de pacientes.

Alternativas terapêuticas vêm sendo estudadas, como injeção intratecal de quimioterápicos, ainda com resultados discordantes e não conclusivos, tanto por incluírem poucos pacientes, quanto por usarem diferentes drogas (combinação de citosina arabinosídeo, hidrocortisona e metotrexato ou mafosfamida ou, ainda, tiotepa (45-47). Uso de radioterapia, limitado a pacientes maiores de 3 anos e/ou a injeção intratecal de quimioterápicos, também apresentam resultados controversos (34).

2.4 IMUNOTERAPIA PARA TUMORES DO SNC

Como salientado anteriormente, apesar dos avanços no tratamento dos tumores do SNC ainda há carência de terapias efetivas para ATRT e para as recidivas de MB, que ocorrem em cerca de 40% dos casos, dos quais 30% vêm a óbito pela doença (14). Embora possa ser feita uma dissecação cirúrgica do tumor/metástases, essa técnica não é seletiva, geralmente acarretando na remoção de tecido saudável, o que em um ambiente como o cérebro pode provocar efeitos devastadores. Lembrando que uma única célula tumoral pode provocar recidiva, mesmo uma ampla remoção cirúrgica do tumor não garante que todas as células tumorais tenham sido removidas. O uso da radioterapia, embora possa reduzir o tamanho do tumor, pode causar danos às células saudáveis, podendo levar à desmielinização, perda de células endoteliais com déficits cognitivo e de memória. Além disso, ainda há a dificuldade em tratar crianças menores de 3 anos, pois o uso de radiação acarreta graves sequelas para o cérebro em desenvolvimento, provocando queda na qualidade de vida (6, 36, 48).

Tendo em vista os fatores expostos, é necessária a procura de alternativas ao tratamento convencional, particularmente nas recidivas. Uma possível alternativa é a imunoterapia, que vem sendo estudada em ensaios clínicos para doenças como linfoma (49), melanoma (50), esclerose múltipla (51) e glioblastomas (52), com resultados animadores. A falta de marcadores tumores-específicos para MB e ATRT torna inviável o uso de anticorpos monoclonais ou de células T, uma vez que ambas as terapias requerem marcadores específicos para reconhecer o tumor (53).

Dessa forma, esse projeto teve como objetivo investigar o papel de células NK que não necessitam marcadores específicos pois reconhecem o alvo, principalmente, pela diminuição na expressão de HLA classe I – artifício utilizado por células tumorais para escapar da detecção por células imunológicas específicas.

2.5 CÉLULAS NATURAL KILLER

As células NK são grandes linfócitos granulares, que perfazem cerca de 10% a 15% do total de linfócitos no sangue periférico e apresentam funções de citotoxicidade e imunomodulação. As células NK fazem parte do sistema imune inato produzindo respostas

rápidas a invasões do organismo por vírus e bactérias, ou à presença de células tumorais, sem precisar de um contato prévio como os linfócitos T (54).

As NK são caracterizadas por não apresentarem CD3 e expressarem CD56 em sua superfície. Estas células podem ser classificadas quanto à sua maturidade pela expressão de CD56, analisada por citometria de fluxo; as mais imaturas CD56^{bright} (alta expressão de CD56 na membrana) e as mais maduras CD56^{dim} (baixa expressão de CD56 na membrana). As células NK CD3⁻ CD56^{bright}, embora liberem quantidades significativas de citocinas, apresentam pouca ou nenhuma ação citotóxica (55). A população CD3⁻ CD56^{dim}, por sua vez, tem menor produção de citocinas, mas é capaz de lisar células espontaneamente (56).

As NK CD56^{bright} são produtoras de Interferon gama (IFN- γ). O IFN- γ é responsável por guiar a resposta Th1, ativar células apresentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cell* - APC), ativar macrófagos contra patógenos intracelulares e inibir a proliferação de células que sofreram transformações malignas ou infecção por vírus (57). A liberação de IFN- γ depende de 2 sinais, sendo o primeiro pela presença de IL-12 (liberada pela APC) e o segundo por interleucinas pró-inflamatórias, como IL-2 ou IL-15 ou ainda, pela ativação de um dos receptores das NK, como o NKG2D e o CD16 (55).

2.5.1 Mecanismo de reconhecimento das células NK

Por fazerem parte da primeira linha de defesa de nosso organismo, as células NK precisam estar sempre prontas a atacar alvos estranhos. Porém, se esse ataque for direcionado às células normais as consequências podem ser catastróficas, sendo assim, essas células precisam de um mecanismo que controle sua ação e as ajude a distinguir seus alvos. Esse mecanismo é baseado no equilíbrio de receptores de inibição e ativação presentes nas células NK (54, 58).

Há pouco tempo se acreditava que quando as células NK encontrassem um alvo que tivesse expressão de HLA classe I diminuída ou alterada “destravariam” seus mecanismos inibitórios e atacariam o alvo - teoria de *missing self* (59). Hoje sabe-se que esta teoria é apenas em parte correta, pois embora a mudança na expressão de HLA possa causar o “destravamento” dos mecanismos inibitórios da célula, isso não garante que a NK atacará o

alvo, o que depende da ligação simultânea a marcadores de ativação. As células NK apresentam uma vasta gama de receptores de ativação e inibição que reconhecem moléculas de HLA classe I, de HLA classe I-like e outras não relacionadas ao HLA, como pode ser visto na Tabela 1 (60).

A interação de ativadores e inibidores de atividade NK é bastante complexa e não completamente entendida. A ação das células NK não ocorre apenas quando há expressão de receptores de ativação e ausência dos de inibição, sua ação é também definida pela intensidade de sinais desses receptores (54). Abaixo a caracterização dos principais receptores conhecidos das células NK:

a. *Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR):*

Os KIR são a família mais estudada de receptores NK. Restritos às células NK e T CD8⁺ (61), esses receptores ligam-se às moléculas de HLA classe I -A, -B e -C, reconhecendo polimorfismos nessas moléculas. Os KIR são classificados de acordo com o número de domínios Ig-like – KIR2D (2 domínios) e KIR3D (3 domínios) – na região extracelular e de acordo com o comprimento dos seus domínios citoplasmáticos, longo (L) e curto (S), correspondendo à sua ação de inibidor ou ativador, respectivamente (62).

b. *CD16 (FcγRIII):*

Primeiro receptor de ativação de células NK identificado (63), o CD16 é capaz de efetuar uma resposta de citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC - do inglês *antibody dependent cell mediated cytotoxicity*) ao se ligar ao receptor Fc de anticorpos IgG. Cerca de 90% das células NK circulantes apresentam baixa expressão de CD56 e alta expressão de CD16 (CD56^{dim} e CD16^{high}) (57).

Tabela 2 Receptores de inibição e ativação de células NK

CD	Nome alternativo	Tipo de sinal	Ligante
CD2	LFA-2	Ativação	CD58(LFA-3)
CD7	LEU-9	Ativação	Galectina (SECTM1)
CD11a	LFA-1	Ativação	ICAM-1,-2,-3,-4,-5
CD11b	Mac-1	Ativação	ICAM-1, Fibrinogênio
CD16	FccRIII	Ativação	IgG

CD44	Receptor de Hialuronato	Ativação	Hialuronato
CD59	Protectina	Ativação	C8, C9
CD69	CLEC2C	Ativação	?
CD94/CD159a	CD94/NKG2A	Inibição	HLA-E
CD94/CD159c	CD94/NKG2C	Ativação	HLA-E
CD96	Tactile	Ativação	CD155
CD160	BY55	Ativação	HLA-C
CD223	Lag3	Ativação	HLA Classe II
CD226	DNAM-1	Ativação	CD112, CD155 MICA e MICB
CD314	NKG2D	Ativação	ULB-1,-2,-3,-4
CD319	CRACC	Ativação	CRACC
CD328	Siglec-7	Inibição	Ácido Siálico
CD329	Siglec-9	Inibição	Ácido Siálico
CD335	NKp46	Ativação	Hemaglutinina viral
CD336	NKp44	Ativação	Hemaglutinina viral
CD337	NKp30	Ativação	Hemaglutinina viral
Diversos	KIR2DS, KIR3DS	Ativação	HLA Classe I
Diversos	KIR2DL, KIR3DL	Inibição	HLA Classe I

Fonte: (adaptado de Alici e Sutlu, 2009).(60)

c. NKG2D (CD314)

Esse receptor de ativação, também presente em células T CD8 positivas, reconhece moléculas MICA, MICB e a família de proteínas ULPB. Essas moléculas tem sua expressão aumentada em células tumorais e em células sob estresse (64). Diferente do que ocorre com os KIR, o receptor NKG2D não apresenta polimorfismo (65).

d. Receptores de citotoxicidade natural

Os receptores de citotoxicidade natural (NCR, do inglês *Natural Cytotoxic Receptor*) NKp30 (CD337 ou NCR3), NKp46 (CD335 ou NCR1) e NKp 44 (CD336 ou NCR2) foram descritos como os principais receptores de ativação e os mais importantes da atividade citotóxica das células NK (58, 60). Os dois primeiros estão presentes em NK ativadas ou não

e o último apenas em células ativadas por IL-2 (66). Embora presente em alguns poucos tipos de células T, o NKp46 é um marcador para células NK comum a todas as espécies de mamíferos (67).

Os NCR têm um papel importante no combate a células tumorais, incluindo as de leucemias, neuroblastomas, mielomas e carcinomas. A densidade desses receptores na superfície das células NK é associada com a intensidade da resposta contra os alvos (68).

e. Heterodímeros CD94/NKG2

Pertencentes à família de receptores *C-type* lecitina, os heterodímeros CD94/NKG2 (A, C e E) reconhecem HLA-E (classe I não clássico). Esses receptores não apresentam uma expressão estável, diferente de seu equivalente em camundongos, o Ly49. Essa diferença de expressão é relacionada com a expressão de KIR, onde células NK que não apresentam KIR inibitório apresentam um heterodímero CD94/NKG2A (inibitório) (69).

CD94/NKG2C e CD94/NKG2E ligam-se à molécula de ativação DAP12, sendo, por isso, considerados receptores de ativação. É interessante observar que tanto o receptor inibitório CD94/NKG2A quanto os ativadores CD94/NKG2C,-E ligam-se ao HLA-E. Sugere-se que o reconhecimento da mesma molécula por receptores com funções contrárias seja um mecanismo de diferenciação entre alvos e células saudáveis (69), conferindo um importante papel no controle da ativação das células NK a esses receptores (70).

f. DNAM1 (CD226)

A molécula acessória DNAX (DNAM1) é um importante co-ativador de células NK no combate aos tumores, estimulando a citotoxicidade e liberação de citocinas quando há uma ligação entre DNAM1 e outro receptor de ativação NK com seus respectivos ligantes (71). O receptor DNAM1 reconhece CD155 (receptor de poliovírus) e CD122 (Nectina-2), frequentemente aumentados em células tumorais, conferindo uma maior susceptibilidade dos alvos à citotoxicidade das NK (72, 73).

Além da função de ativação das células NK, o DNAM1 também está associado à migração das mesmas, visto que essa molécula influencia no movimento dos monócitos pelas junções das células endoteliais (74).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Testar a aplicabilidade das células NK no tratamento do MB e ATRT.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Produzir células NK a partir de células mononucleares de sangue periférico utilizando a tecnologia de células apresentadoras de antígeno artificial (aAPC);
- Identificar, por citometria de fluxo, a pureza das células NK expandidas *in vitro*;
- Testar a capacidade das células NK de lisar células tumorais de MB *in vitro*;
- Testar a capacidade das células NK de lisar células tumorais de ATRT, *in vitro*.
- Desenvolver modelo animal de tumor de SNC que permita o acompanhamento do desenvolvimento do tumor *in vivo*;
- Demonstrar a co-localização das células NK na região do tumor;
- Demonstrar a eficácia das células NK no combate ao tumor *in vivo*;

4 JUSTIFICATIVA

Tanto o MB quanto o ATRT são doenças extremamente agressivas e, quando recidivadas, apresentam um mau prognóstico. Apesar dos avanços no tratamento das mesmas ainda há uma significativa parte de pacientes que não apresenta resposta às terapias convencionais ou que apresenta recidivas, geralmente refratárias ao tratamento. Além disso, o tratamento convencional está relacionado a várias sequelas que impactam na qualidade de vida dos pacientes. Por isso há necessidade de alternativas terapêuticas que, além de combater as células malignas, não causem tantos efeitos colaterais quanto os observados no tratamento convencional, principalmente levando em consideração os indivíduos menores de 3 anos de idade, em quem o tratamento por radioterapia é extremamente prejudicial.

Embora existam várias alternativas terapêuticas dentro da própria imunoterapia, a maioria depende de anticorpos específicos para reconhecer a células alvo. A célula NK é uma exceção, pois ela utiliza, para desencadear sua toxicidade, a alteração na expressão de moléculas de ativação e inibição, que ocorre em grande parte das células tumorais. Até o presente momento não existe nenhum estudo sobre o papel de células NK nesses cânceres.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. National Registry of Childhood Tumours. International Classification of Childhood Cancer. [Página digital] <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/childhoodcancer/incidence/#source72006-2007> [cited 2014 07/02/2014]; Third Edition: [
2. Pui CH, Gajjar AJ, Kane JR, Qaddoumi IA, Pappo AS. Challenging issues in pediatric oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2011;8(9):540-9.
3. Packer RJ, Rood BR, MacDonald TJ. Medulloblastoma: Present Concepts of Stratification into Risk Groups. *Pediatric Neurosurgery*. 2003;39(2):60-7.
4. Ris MD, Packer R, Goldwein J, Jones-Wallace D, Boyett JM. Intellectual outcome after reduced-dose radiation therapy plus adjuvant chemotherapy for medulloblastoma: A children's cancer group study. *Journal of Clinical Oncology*. 2001;19(15):3470-6.
5. Taylor RE, Bailey CC, Robinson K, Weston CL, Ellison D, Ironside J, et al. Results of a randomized study of preradiation chemotherapy versus radiotherapy alone for nonmetastatic medulloblastoma: The International Society of Paediatric Oncology/United Kingdom Children's Cancer Study Group PNET-3 Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(8):1581-91.
6. Massimino M, Giangaspero F, Garrè ML, Gandola L, Poggi G, Biassoni V, et al. Childhood medulloblastoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2011;79(1):65-83.
7. Suárez JC, Viano JC, Herrera EJ. Pasado, presente y futuro en el tratamiento del medulloblastoma. *Revista argentina de neurocirugía*. 2008;22:0-.
8. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/, based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2013. 2013.
9. Beygi S, Saadat S, Jazayeri SB, Rahimi-Movaghar V. Epidemiology of pediatric primary malignant central nervous system tumors in Iran: A 10 year report of National Cancer Registry. *Cancer Epidemiology*. 2013;37(4):396-401.
10. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*. 2007;114(2):97-109.
11. Gajjar A, Packer RJ, Foreman NK, Cohen K, Haas-Kogan D, Merchant TE. Children's oncology Group's 2013 blueprint for research: Central nervous system tumors. *Pediatric Blood and Cancer*. 2013;60(6):1022-6.
12. Lannering B, Rutkowski S, Doz F, Pizer B, Gustafsson G, Navajas A, et al. Hyperfractionated versus conventional radiotherapy followed by chemotherapy in standard-risk medulloblastoma:

Results from the randomized multicenter HIT-SIOP PNET 4 trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(26):3187-93.

13. Packer RJ, Gajjar A, Vezina G, Rorke-Adams L, Burger PC, Robertson PL, et al. Phase III study of craniospinal radiation therapy followed by adjuvant chemotherapy for newly diagnosed average-risk medulloblastoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(25):4202-8.
14. Jones DT, Jager N, Kool M, Zichner T, Hutter B, Sultan M, et al. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature*. 2012;488(7409):100-5. Epub 2012/07/27.
15. Evans AE, Jenkin Rd Fau - Sposto R, Sposto R Fau - Ortega JA, Ortega Ja Fau - Wilson CB, Wilson Cb Fau - Wara W, Wara W Fau - Ertel IJ, et al. The treatment of medulloblastoma. Results of a prospective randomized trial of radiation therapy with and without CCNU, vincristine, and prednisone. (0022-3085 (Print)).
16. Zeltzer PM, Boyett Jm Fau - Finlay JL, Finlay JI Fau - Albright AL, Albright AI Fau - Rorke LB, Rorke Lb Fau - Milstein JM, Milstein Jm Fau - Allen JC, et al. Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study. (0732-183X (Print)).
17. Evans AE, Jenkin RDT, Sposto R, Ortega JA, Wilson CB, Wara W, et al. The treatment of medulloblastoma. *Journal of Neurosurgery*. 1990;72(4):572-82.
18. Kaatsch P, Rickert CH, Kühl J, Schüz J, Michaelis J. Population-based epidemiologic data on brain tumors in German children. *Cancer*. 2001;92(12):3155-64.
19. Gilbertson RJ, Ellison DW. The Origins of Medulloblastoma Subtypes. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2008;3(1):341-65.
20. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: The current consensus. *Acta Neuropathologica*. 2012;123(4):465-72.
21. Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DTW, Schlanstein M, Northcott PA, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: An international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathologica*. 2012;123(4):473-84.
22. Ellison DW, Kocak M, Dalton J, Megahed H, Lusher ME, Ryan SL, et al. Definition of disease-risk stratification groups in childhood medulloblastoma using combined clinical, pathologic, and molecular variables. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(11):1400-7.
23. Gerber NU, Mynarek M, von Hoff K, Friedrich C, Resch A, Rutkowski S. Recent developments and current concepts in medulloblastoma. *Cancer Treatment Reviews*. 2014;40(3):356-65.
24. Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(11):1408-14.
25. Harder T, Plegemann A, Harder A. Birth weight and subsequent risk of childhood primary brain tumors: A meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*. 2008;168(4):366-73.
26. Fear NT, Roman E, Ansell P, Bull D. Malignant neoplasms of the brain during childhood: The role of prenatal and neonatal factors (United Kingdom). *Cancer Causes and Control*. 2001;12(5):443-9.

27. Milne E, Greenop KR, Scott RJ, Ashton LJ, Cohn RJ, De Klerk NH, et al. Parental smoking and risk of childhood brain tumors. *International Journal of Cancer*. 2013;133(1):253-9.
28. Baldwin RT, Preston-Martin S. Epidemiology of brain tumors in childhood - A review. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2004;199(2):118-31.
29. Albright AL, Sposto R, Holmes E, Zeltzer PM, Finlay JL, Wisoff JH, et al. Correlation of neurosurgical subspecialization with outcomes in children with malignant brain tumors. *Neurosurgery*. 2000;47(4):879-87.
30. Goldwein JW, Radcliffe J, Johnson J, Moshang T, Packer RJ, Sutton LN, et al. Updated results of a pilot study of low dose craniospinal irradiation plus chemotherapy for children under five with cerebellar primitive neuroectodermal tumors (medulloblastoma). *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics*. 1996;34(4):899-904.
31. Halberg FE, Wara WM, Fippin LF, Edwards MSB, Levin VA, Davis RL, et al. Low-dose craniospinal radiation therapy for medulloblastoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 1991;20(4):651-4.
32. Grill J, Sainte-Rose C, Jouvett A, Gentet JC, Lejars O, Frappaz D, et al. Treatment of medulloblastoma with postoperative chemotherapy alone: An SFOP prospective trial in young children. *Lancet Oncology*. 2005;6(8):573-80.
33. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2002;61(3):215-25; discussion 26-9. Epub 2002/03/16.
34. Kerl K, Holsten T, Frühwald MC. Rhabdoid tumors: Clinical approaches and molecular targets for innovative therapy. *Pediatric Hematology and Oncology*. 2013;30(7):587-604.
35. Woehrer A, Slavc I, Waldhoer T, Heinzl H, Zielonke N, Czech T, et al. Incidence of atypical teratoid/rhabdoid tumors in children. *Cancer*. 2010;116(24):5725-32.
36. Tekautz TM, Fuller CE, Blaney S, Fouladi M, Broniscer A, Merchant TE, et al. Atypical teratoid/rhabdoid tumors (ATRT): improved survival in children 3 years of age and older with radiation therapy and high-dose alkylator-based chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(7):1491-9. Epub 2005/03/01.
37. Oka H, Scheithauer BW. Clinicopathological characteristics of atypical teratoid/rhabdoid tumor. *Neurologia medico-chirurgica*. 1999;39(7):510-7; discussion 7-8. Epub 1999/08/07.
38. Jackson EM, Sievert AJ, Gai X, Hakonarson H, Judkins AR, Tooke L, et al. Genomic analysis using high-density single nucleotide polymorphism-based oligonucleotide arrays and multiplex ligation-dependent probe amplification provides a comprehensive analysis of INI1/SMARCB1 in malignant rhabdoid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(6):1923-30. Epub 2009/03/12.
39. Ho DMT, Hsu CY, Wong TT, Ting LT, Chiang H. Atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system: A comparative study with primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma. *Acta Neuropathologica*. 2000;99(5):482-8.
40. Versteeg I, Sévenet N, Lange J, Rousseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R, et al. Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature*. 1998;394(6689):203-6.

41. Biegel JA, Zhou JY, Rorke LB, Stenstrom C, Wainwright LM, Fogelgren B. Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer Res.* 1999;59(1):74-9. Epub 1999/01/19.
42. Von Hoff K, Hinkes B, Dannenmann-Stern E, von Bueren AO, Warmuth-Metz M, Soerensen N, et al. Frequency, Risk-Factors and Survival of Children With Atypical Teratoid Rhabdoid Tumors (AT/RT) of the CNS Diagnosed between 1988 and 2004, and Registered to the German HIT Database. *Pediatric Blood and Cancer.* 2011;57(6):978-85.
43. Dufour C, Beaugrand A, Le Deley MC, Bourdeaut F, André N, Leblond P, et al. Clinicopathologic prognostic factors in childhood atypical teratoid and rhabdoid tumor of the central nervous system: A multicenter study. *Cancer.* 2012;118(15):3812-21.
44. Geyer JR, Sposto R, Jennings M, Boyett JM, Axtell RA, Breiger D, et al. Multiagent chemotherapy and deferred radiotherapy in infants with malignant brain tumors: A Report from the Children's Cancer Group. *Journal of Clinical Oncology.* 2005;23(30):7621-31.
45. Athale UH, Duckworth J, Odame I, Barr R. Childhood atypical teratoid rhabdoid tumor of the central nervous system: A meta-analysis of observational studies. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology.* 2009;31(9):651-63.
46. Blaney SM, Kocak M, Gajjar A, Chintagumpala M, Merchant T, Kieran M, et al. Pilot study of systemic and intrathecal mafosfamide followed by conformal radiation for infants with intracranial central nervous system tumors: A pediatric brain tumor consortium study (PBTC-001). *Journal of Neuro-Oncology.* 2012;109(3):565-71.
47. Lafay-Cousin L, Hawkins C, Carret AS, Johnston D, Zelcer S, Wilson B, et al. Central nervous system atypical teratoid rhabdoid tumours: The Canadian Paediatric Brain Tumour Consortium experience. *European Journal of Cancer.* 2012;48(3):353-9.
48. Sonabend AM, Ogden AT, Maier LM, Anderson DE, Canoll P, Bruce JN, et al. Medulloblastoma: Challenges for effective immunotherapy. *Journal of Neuro-Oncology.* 2012;108(1):1-10.
49. Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, Brenner MK. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunological reviews.* 2014;257(1):107-26.
50. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine.* 2010;363(8):711-23. Epub 2010/06/08.
51. Meuth SG, Kleinschnitz C, Wiendl H. Recent clinical trials and future therapies. *J Neurol.* 2008;255(SUPPL. 6):93-6.
52. Badhiwala J, Decker WK, Berens ME, Bhardwaj RD. Clinical trials in cellular immunotherapy for brain/CNS tumors. *Expert Review of Neurotherapeutics.* 2013;13(4):405-24.
53. Jacobs JFM, Idema AJ, Bol KF, Nierkens S, Grauer OM, Wesseling P, et al. Regulatory T cells and the PD-L1/PD-1 pathway mediate immune suppression in malignant human brain tumors. *Neuro-Oncology.* 2009;11(4):394-402.
54. Lanier LL. NK cell recognition. *Annual Review of Immunology*2005. p. 225-74.

55. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: A unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood*. 2001;97(10):3146-51.
56. Walzer T, Jaeger S, Chaix J, Vivier E. Natural killer cells: from CD3-NKp46+ to post-genomics meta-analyses. *Current Opinion in Immunology*. 2007;19(3):365-72.
57. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112(3):461-9.
58. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:197-223. Epub 2001/03/13.
59. Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(5):329-39.
60. Alici E, Sutlu T. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: Current insights and future prospects. *Journal of Internal Medicine*. 2009;266(2):154-81.
61. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:217-51. Epub 2002/02/28.
62. Carrington M, Norman P. The KIR Gene Cluster: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine; 2003.
63. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol*. 1983;131(4):1789-96. Epub 1983/10/01.
64. Schumde M, Braun A, Pende D, Sonnemann J, Klier U, Beck JF, et al. Histone deacetylase inhibitors sensitize tumour cells for cytotoxic effects of natural killer cells. *Cancer letters*. 2008;272(1):110-21. Epub 2008/08/23.
65. Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *The Journal of experimental medicine*. 1991;173(4):1017-20. Epub 1991/04/01.
66. Fuchs A, Cella M, Kondo T, Colonna M. Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood*. 2005;106(6):2076-82. Epub 2005/06/09.
67. Walzer T, Blery M, Chaix J, Fuseri N, Chasson L, Robbins SH, et al. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(9):3384-9. Epub 2007/03/16.
68. Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, Moretta A. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Seminars in Immunology*. 2006;18(3):151-8.
69. Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ, Darcy PK, Kershaw MH. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunology and cell biology*. 2011;89(2):216-24. Epub 2010/06/23.
70. Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-E Complexed with HLA Class I Signal Sequence-derived

Peptides by CD94/NKG2 Confers Protection from Natural Killer Cell-mediated Lysis. *The Journal of experimental medicine*. 1998;187(5):813-8.

71. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011;331(6013):44-9. Epub 2011/01/08.
72. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *Journal of Experimental Medicine*. 2003;198(4):557-67.
73. Lakshmikanth T, Burke S, Ali TH, Kimpfler S, Ursini F, Ruggeri L, et al. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(5):1251-63. Epub 2009/04/08.
74. Bottino C, Castriconi R, Moretta L, Moretta A. Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends in Immunology*. 2005;26(4):221-6.
75. Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, Phatarpekar PV, Kopp LM, Johnson JL, et al. Membrane-Bound IL-21 Promotes Sustained Ex Vivo Proliferation of Human Natural Killer Cells. *PLoS One*. 2012;7(1):e30264. Epub 2012/01/27.
76. Singh H, Manuri PR, Olivares S, Dara N, Dawson MJ, Huls H, et al. Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the sleeping beauty system. *Cancer Research*. 2008;68(8):2961-71.
77. Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, Olivares S, Zhang L, Yang G, et al. Manufacture of Clinical-Grade CD19-Specific T Cells Stably Expressing Chimeric Antigen Receptor Using Sleeping Beauty System and Artificial Antigen Presenting Cells. *PLoS One*. 2013;8(5).
78. Hurton LV, Siddik RI, Singh H, Olivares S, Rabinovich BA, Tian R, et al. Identifying candidate allogeneic NK-cell donors for hematopoietic stem-cell transplantation based on functional phenotype. *Leukemia*. 2010;24(5):1059-62. Epub 2010/02/19.
79. Lorenzi PL, Reinhold WC, Varma S, Hutchinson AA, Pommier Y, Chanock SJ, et al. DNA fingerprinting of the NCI-60 cell line panel. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2009;8(4):713-24.
80. Somanchi SS, Senyukov VV, Denman CJ, Lee DA. Expansion, Purification, and Functional Assessment of Human Peripheral Blood NK Cells. *J Vis Exp*. 2011(48):e2540.
81. Cooper LJ, Al-Kadhimi Z, Serrano LM, Pfeiffer T, Olivares S, Castro A, et al. Enhanced anti-lymphoma efficacy of CD19 redirected influenza MP1-specific CTL's by co-transfer of T-cells modified to present influenza MP1. *Blood*. 2004.
82. Cooper LJ, Topp MS, Serrano LM, Gonzalez S, Chang WC, Naranjo A, et al. T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect. *Blood*. 2003;101(4):1637-44. Epub 2002/10/24.
83. Singh H, Manuri PR, Olivares S, Dara N, Dawson MJ, Huls H, et al. Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system. *Cancer Res*. 2008;68(8):2961-71. Epub 2008/04/17.
84. Varadarajan N, Julg B, Yamanaka YJ, Chen H, Ogunniyi AO, McAndrew E, et al. A high-throughput single-cell analysis of human CD8 + T cell functions reveals discordance for cytokine secretion and cytolysis. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(11):4322-31.

85. Han Q, Bradshaw EM, Nilsson B, Hafler DA, Love JC. Multidimensional analysis of the frequencies and rates of cytokine secretion from single cells by quantitative microengraving. *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology*. 2010;10(11):1391-400.
86. Rabinovich BA, Ye Y, Etto T, Jie QC, Levitsky HI, Overwijk WW, et al. Visualizing fewer than 10 mouse T cells with an enhanced firefly luciferase in immunocompetent mouse models of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(38):14342-6.
87. Inoue Y, Izawa K, Kiryu S, Tojo A, Ohtomo K. Diet and abdominal autofluorescence detected by in vivo fluorescence imaging of living mice. *Molecular imaging*. 2008;7(1):21-7. Epub 2008/04/04.
88. Lal S, Lacroix M, Tofilon P, Fuller GN, Sawaya R, Lang FF. An implantable guide-screw system for brain tumor studies in small animals. *Journal of Neurosurgery*. 2000;92(2):326-33.

6 ARTIGO

6.1 GDF-15 MEDIATES RESISTANCE OF PEDIATRIC BRAIN TUMOR CELLS TO CYTOLYSIS BY NATURAL KILLER CELLS

Alvaro Laureano^{1,10,11#}, William B. Brugmann^{1,#}, Cecele J. Denman¹, Harjeet Singh¹, Judy Moyes¹, M. Helen Huls¹, Soumen Khatua¹, David Sandberg^{1,3,8,9}, Lucia Silla^{10,11}, Dean A. Lee^{1*}, Laurence J.N. Cooper^{1*}, and Vidya Gopalakrishnan^{1,2,4,7*}

Departments of ¹Pediatrics, ²Molecular and Cellular Oncology, ³Neurosurgery and the ⁴Brain Tumor Center, ⁵Centers for Cancer Epigenetics and ⁶Stem Cells and Developmental Biology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030; ⁷Program in Neuroscience, The University of Texas Graduate School of Biomedical Sciences, Houston, Texas 77030; ⁸Departments of Pediatric Surgery and ⁹Neurosurgery, University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, Texas 77030, ¹⁰Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, 90035-903, ¹¹Centro de Tecnologia e Terapia Celular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil, 90035-903. # Equal contribution

***Correspondence to:** Vidya Gopalakrishnan, Departments of Pediatrics and Molecular and Cellular Oncology, Unit 853, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Blvd., Houston, Texas 77030, USA. Tel: (713) 792-0498; Fax: (713) 563-5407; E-mail: vgopalak@mdanderson.org

Abbreviated Title: NK-mediated Cytolysis of Pediatric Brain Tumors

Key words: IL-21/ Medulloblastoma/ ATRT/ Natural Killer Cells.

Statement of Conflict: Authors declare no conflict of interest.

Grant Support: This work was supported by funding from Noah's Light Foundation (LC, VG), Addis Faith Foundation and American Cancer Society grant 118165-RSG-09-273-01-DDC (VG), Physician Scientist Program of MD Anderson Cancer Center, St. Baldrick's Foundation (DAL), NCI Cancer Center Support (Core) Grant CA 16672 (LC), from Brazil (AL, LS): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Departamento de

Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (DECIT/SCTIE)

Abstract

Medulloblastomas and Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors (ATRTs) are malignant pediatric brain tumors. Currently, patients with recurrent and metastatic disease have no therapeutic alternatives, and unfortunately succumb to their disease. Here we provide pre-clinical evidence that adoptive transfer of natural killer (NK) cells may have potential for application in the treatment of children refractory brain tumors. Using a recently developed method to facilitate enhanced ex-vivo NK cell expansion and activation using membrane-bound IL-21, we demonstrate cytotoxicity *in vitro* of most cell lines of a panel of medulloblastoma and ATRT cells studied. Bioluminescence imaging and immunohistochemical analyses revealed persistence and cytotoxic activity of intratumorally infused NK cells in mouse orthotopic models of human medulloblastoma. Finally, we discovered that upregulation of the growth and differentiation factor 15 was associated with resistance of ATRT cells to NK-mediated lysis, and that its knockdown sensitizes NK-resistant cells to cytotoxicity.

Significance

Our work provides the first demonstration that membrane-bound IL-21-propagated NK cells can lyse most medulloblastoma and ATRT cells *in vitro* and *in vivo* and that NK-resistance is promoted by elevated expression of growth and differentiation factor 15. These data constitute the basis for a phase-I trial for children with recurrent/refractory brain tumors at our institution.

Introduction

Brain tumors are the second most common childhood malignancies and the leading cause of childhood cancer mortality (1, 2). Medulloblastoma is the most common malignant pediatric tumor of the central nervous system (CNS), accounting for approximately 20% of pediatric brain tumors (3). Atypical teratoid/rhabdoid tumor (ATRT) represents a related pediatric brain malignancy and generally occurs in children less than 3 years old (4). Current

treatment for these tumors consists of tumor resection, radiation and chemotherapy and has improved overall survival to 70-80% in medulloblastoma patients, although the prognosis for those patients with recurrent disease, metastases or diagnosis at less than 3 years of age remains poor (5). The prognosis for patients with ATRTs is worse and the overall survival rate for children less than 3 is only 17% (6, 7). Additionally, current therapy-related toxicities including impaired neurological development and function remain a critical problem associated with the treatment of both diseases, underscoring the need for novel therapeutic approaches (8).

Immunotherapy is gaining traction as a potential alternative to improve therapeutic success and circumvent the toxicities associated with chemotherapy and radiation. Currently, a number of therapeutics harness the immune system to combat cancer, ranging from administration of cytokines and monoclonal antibodies to dendritic cell (DC) and T cell infusions and have shown promise for the treatment of a variety of malignancies (9-12). Because of their reliance on the presence of tumor-associated antigens (TAAs) and/or antigen processing and HLA I expression, their application to pediatric brain tumors with poorly defined TAAs and low HLA I expression is limited (13). We have bypassed the requirement for TAA specificity by developing a therapy based on the innate immune system, specifically natural killer (NK) cells, to target medulloblastomas and ATRTs.

NK cells have long been recognized as a critical component of tumor immunosurveillance, and were first identified as cells with the ability to lyse tumor cells *in vitro* without prior sensitization (14, 15). Other studies have confirmed the importance of NK cells in tumor clearance. Low NK-like cytotoxicity has been associated with an increased cancer risk and the presence of large numbers of tumor infiltrating NK cells is associated with favorable outcomes in several malignancies (16-18). Unlike other cytotoxic cells such as CD8⁺ T cells, NK cells do not require antigen specificity for their activation (13). Instead, NK cell cytotoxicity is initiated by the upregulation of stress-related molecules on tumor cells and can be efficacious against antigen bland tumors and cancers characterized by heterogeneity such as medulloblastoma and ATRT (19-23).

Evidence from clinical trials in adults demonstrates that both autologous and allogeneic NK cells can successfully be employed as immunotherapy in solid and hematologic tumors (24-29). While NK cells have been shown to have a cytotoxic effect against medulloblastoma cell lines *in vitro*, *in vivo* studies have not been described and there

is a lack of data showing that NK cell can be used to treat other pediatric brain tumors (30). At least two important barriers exist to their clinical application for pediatric brain tumors. First, the challenge of obtaining sufficient numbers of cells for infusion without reducing life span has been a major obstacle limiting NK cell use for cancer immunotherapy (31, 32). Second, the blood-brain barrier, which restricts access to the central nervous system (CNS), creates an impediment to the administration of most therapies (33, 34).

In the current study we have circumvented the problem of limited expansion and life-span of therapeutic NK cells by using a recently developed method to expand large numbers of NK cells *ex vivo* from donor-derived peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Co-culture of PBMC with K562 artificial antigen presenting cells (aAPCs) expressing membrane-bound IL-21 (mbIL21) promotes a mean 47,967-fold expansion of NK cells (32). These *ex vivo* expanded and activated NK cells retain the ability to lyse a variety of tumor cell lines *in vitro* and to participate in antibody dependent cellular cytotoxicity (32). Using a panel of donor-derived NK cells expanded *ex vivo* with mbIL21-expressing aAPCs (mbIL21 aAPCs), we show significant cytolytic activity against many medulloblastoma and ATRT cell lines *in vitro*. Interestingly, an ATRT cell line (BT12) was resistant to lysis mediated by mbIL21-expanded NK cells from several donors, and was associated with high expression of growth and differentiation factor 15 (GDF-15). Importantly, knockdown of GDF-15 restored sensitivity of BT12 cells to cytotoxicity by NK cells expanded from multiple donors, demonstrating that GDF-15 is involved in the immune resistance of BT12 cells. Finally, we have circumvented potential problems posed by the blood-brain barrier by delivering NK cells intratumorally in a mouse orthotopic xenograft model. Using this approach, we not only observed persistence of mbIL21 aAPC-expanded NK cells to persist and for up to 21 days, but also blockade of medulloblastoma tumor growth *in vivo*. Thus, our data provide the first pre-clinical evidence supporting the use of mbIL21 aAPC expanded and activated NK cells to target pediatric brain tumors.

Results

mbIL21 aAPC stimulation promotes *ex vivo* expansion of NK cells

PBMC from five donors (A-E) were used for *ex vivo* expansion of NK cells. NK cell expansion and activation was achieved through 3 weeks of donor PBMC co-culture with irradiated K562 cells engineered to co-express 4-1BBL, CD64, CD86 and mbIL21 (mbIL21 aAPC) (Fig. 1A) (32). A 31 to 83-fold expansion of NK cells was obtained following the 1st

week of co-culture (Fig. 1B). The 2nd and 3rd weeks of stimulation resulted in a 538 to 13,646-fold and a 4942 - 212,361-fold expansion of NK cells respectively (Fig. 1B). Flow cytometric analyses were performed after CD3 depletion on day 7 of culture to assess the purity and phenotype of the expanded cell population. These analyses revealed that the expanded NK cells were 0 – 3% CD3_{pos} confirming minimal T cell contamination of the product (Fig. 1C). Flow cytometric analyses were also performed to measure the expression of the NK cell markers CD56 and CD16 on the *ex vivo* expanded NK cells. The expanded cells were 79 - 97% CD56 and CD16 double positive (DP), 0.5 - 23% CD16 single positive (SP) and 2 - 11% CD56 SP (Fig. 1D). These data confirm the NK cell identity of the expanded population.

mbIL21 aAPC-expanded NK cells lyse -medulloblastoma and ATRT cells *in vitro*

Functional assays were performed to test the ability of mbIL21 aAPC-expanded and activated NK cells to lyse medulloblastoma and ATRT cells *in vitro*. Cytotoxicity of mbIL21-expanded cells from various donors against a cohort of medulloblastoma (DAOY, D283 and MB003) and ATRT (BT12 and CHLA266) cell cultures was quantified using chromium release assays (CRA). Cytolysis of medulloblastoma (MB003) cells by mbIL21 aAPC-expanded NK cells was confirmed using video time-lapse microscopy (VTLM) (Videos S1). Tumor cell lysis was measured at effector cell:target cell ratios ranging from 20:1 to 1.25:1. We observed that DAOY, D283 and MB003 medulloblastoma cells were sensitive to NK cell-mediated killing by all mbIL21 aAPC-expanded NK cells with a maximal lysis efficiency of 53%, 42% and 59% respectively (Fig. 2A). As expected, these cells were insensitive to lysis by T cells expanded from the same donors. The average NK cell mediated killing at a 20:1 effector:target ratio is 50% (+/- 3; n = 5) for DAOY, 41% (+/- 4; n = 5) for D283 and 52% (+/- 4; n = 4) for MB003 cells (Fig. 2B). Similarly, the CHLA266 ATRT cells were also sensitive NK cell-mediated killing by all mbIL21 aAPC-expanded NK cells with 38% maximal lysis and were not susceptible to killing by T cells expanded from the same donors (Fig. 2A). The average NK cell mediated lysis at a 20:1 effector:target ratio was 34% (+/- 3; n = 4) for CHLA266 cells (Fig. 2B). In contrast, BT12 cells were considerably less susceptible to NK cell-mediated killing, exhibiting only 17% maximal lysis with any of the NK cells tested and an average NK cell mediated lysis of only 10% (+/- 3; n = 4) at a 20:1 effector:target ratio (Figs. 2A and 2B). These data support the conclusion that most

medulloblastoma and ATRT cells tested are sensitive to lysis by mbIL21 aAPC-expanded and activated NK cells, *in vitro*.

The levels of NK cell mediated killing increased as the effector:target ratio increased for a subset of NK cell and tumor cell combinations. This effect was most observable with DAOY target cells, indicating that maximal lysis by mbIL21 aAPC-expanded NK cells is only achieved at higher effector:target ratios for these cells (Fig. 2A). In contrast, the increase in NK cell mediated lysis with increasing effector:target ratios was much less dramatic for the control NK cell sensitive cell lines, K562 and 721.221 (Fig. 2A). Similarly, increasing effector:target ratios did not cause a significant variation in the cytolysis efficiency of the CHLA266 and D283 cells. This effect was particularly evident with the effector:target pairs of NK-C and D283 cells and NK-D/E and MB003, indicating that much like the control cells, maximal lysis by mbIL21 aAPC expanded NK cells is achieved at lower effector:target ratios for these cells (Fig. 2A). These observations suggest that there may be significant variability in the degree of susceptibility to lysis by mbIL21 aAPC-expanded NK cells among the medulloblastoma and ATRT cells tested.

Perforin is important for cytolysis by mbIL21 aAPC-expanded NK cells

NK cell effector function can be mediated by exocytosis of cytolytic granules containing perforin and granzymes leading to caspase-dependent target cell apoptosis (35). To confirm the role of cytolytic granules in the killing mechanism utilized by the mbIL21 aAPC expanded-NK cells, CRA were performed using NK-B and NK-D cells exposed to the perforin inhibitor folimycin. Pretreatment of the mbIL21 aAPC-expanded NK cells with 10 nM folimycin caused a significant decrease in the NK cell-mediated lysis of K562 ($p < 0.0001$) and MB003 ($p = 0.0002$) cells (Supplemental Fig. S1). Folimycin pre-treatment reduces NK cell-mediated lysis of K562 cells from 61% (+/- 8; n = 6) to 3% (+/- 2.5; n = 6) and that of MB003 cells from 58% (+/- 8; n = 4) to 8% (+/- 10; n = 4) (Supplemental Fig. S1). These findings support the conclusion that perforin activity is important for the effector function of mbIL21 expanded and activated NK cells.

Target cell lysis mediated by mbIL21 aAPC-expanded NK cells is independent of KIR mismatch

The initiation of NK cell activation and cytolytic activity is determined by a balance in the engagement of activating and inhibitory receptors on NK cells. Killer Ig-like receptors (KIRs) representing the predominant inhibitory receptors on human NK cells recognize common motifs on HLA-I molecules and loss of HLA-I expression can result in susceptibility to NK cell mediated lysis by shifting the balance of NK signals from inhibition to activation (36). To determine if mismatched KIR-HLA-I contributed to NK cell mediated lysis, we evaluated the inhibitory KIR genotype (KIR2DL1, KIR2DL2/3 and KIR3DL1) of the NK donors as well as the HLA-I genotype of NK donors and tumor cells. A few NK cell and target combinations with potential for KIR mismatch were identified (Supplemental Table S1). To determine whether there is enhanced cell lysis in the effector:target combinations with potential KIR mismatch, the percentage of cells lysed by NK-B cells, with potential KIR mismatches in combination with four tumor cell lines (D283, MB003, BT12 and CHLA266), was compared to the percentage of cells lysed by NK-A cells, with no predicted KIR mismatch in combination with the same four cell lines (Supplemental Table S1). The percentage of cells lysed was based on CRA results after four hours of co-culture at a 20:1 effector:target ratio (Fig. 2A). However, no correlation was detected between the efficiency of NK cell-mediated cytolysis and KIR mismatch as determined by paired student's t-test ($p = 0.816$). Therefore, the ability of the mbIL21 aAPC-expanded NK cells to lyse their targets appears to be independent of the presence of a KIR mismatch.

***Ex vivo* expanded NK cells block tumor growth in mouse intracranial models**

As a first step in testing the ability of mbIL21 aAPC-expanded and activated NK cells to block tumor growth *in vivo*, we measured the kinetics of NK cell persistence in the cerebella of immunodeficient NOD scid gamma null (NSG) mice. NK-B/E cells were labeled with the DiR fluorescent membrane dye prior to intracranial injection. Changes in fluorescence intensity were tracked over time as a measure of NK cell persistence. NK cells could be detected in the cerebella of NSG mice for up to 21 days following injection (Figs 3A and 3B). However, the fluorescence signal continued to decrease over time such that one week following injection, the mean fluorescence signal had decreased to 67% (+/- 27; n = 3) of the original intensity and continued decreasing to 46% (+/- 25; n = 3) and 31% (+/- 18; n = 3) two weeks and three weeks following injection respectively, indicating a progressive loss of mbIL21 aAPC-expanded NK cells (Fig. 3A). Based on these observations, mbIL21 aAPC-

expanded NK cells were injected once every seven days in subsequent experiments with tumor bearing animals to maintain adequate numbers of NK cells within the cerebella.

The kinetics of medulloblastoma tumor growth in NSG cerebella was also studied for temporal assessment of tumor expansion. In order to track medulloblastoma cells *in vivo*, DAOY cells were tagged with firefly luciferase (ffluc) via lentiviral transduction. DAOY ffluc medulloblastoma cells were injected into the cerebella of NSG mice and the bioluminescence (BL) signal was measured every 2-5 days thereafter. In agreement with other studies, a steady increase in BL intensity over time was observed starting 5-7 day post-implantation of tumor cells, indicating successful engraftment and continued tumor growth, and providing the rationale for the time-line of NK cell administration (Figs 3B and 4A).

Therefore, one week following the implantation of DAOY ffluc medulloblastoma cells into the cerebella of NSG mice (n=18), 4×10^5 DiR labeled NK-B cells or media were injected intratumorally. The BL signal was normalized to that at the time of implantation to assess the change in tumor size. As seen in Figs. 4A and 4B, the BL signal from the brains of tumor implanted animals injected with mbIL21 aAPC-expanded NK cells remained fairly constant over the duration of the experiment with less than a 1.5 fold increase in signal following NK cell injection. In contrast, the BL signal in control tumor bearing mice increased rapidly with a 2 fold increase in signal between days 7 and 14 and a greater than 3 fold increase in signal between days 7 and 21 (Figs. 3A and 3B). DiR labeled NK cells could be detected in the brains of injected mice throughout the experiment by fluorescence imaging (Fig. 4A). These findings suggest that mbIL21 aAPC-expanded and activated NK cells could block tumor growth in the murine brain.

Injected NK cells localize to the tumor and promote apoptosis *in vivo*

To confirm mbIL21 aAPC-expanded NK cell presence in the tumor bed, brains of mice with orthotopic xenografts were harvested at the conclusion of the experiment (day 21) and analyzed by hematoxylin eosin (H & E) staining and immunohistochemical analyses (Fig. 5). Tissue sections were stained with anti-CD45, anti-Ki-67, and anti-cleaved caspase 3 antibodies to measure NK cell infiltration, cell proliferation and induction of apoptosis respectively. CD45 staining was seen only in NK cell injected animals and completely restricted to tumor areas (Fig. 5B). Ki-67 positivity was seen in both NK-injected and

uninjected animals but was limited to the tumor area (Fig. 5C). Like NK-cell staining, cleaved-caspase 3 positivity was also confined to the tumor and only seen in tumors injected with mbIL21 aAPC-expanded NK cells, with no detectable signal in the normal cerebella (Fig. 5D). These results provide a strong correlation between NK cell presence in the tumor and induction of apoptosis in tumor cells. Lastly, to assess whether NK cell injections recruit glial cells to the tumor bed, brain sections from tumor bearing NK injected and uninjected animals were stained with anti-GFAP antibody to identify activated astrocytes. As observed in Fig. 5E, there is an abundance of strongly GFAP positive astrocytes along the tumor border in both NK cell injected and control mice, suggesting the occurrence of reactive gliosis in response to the presence of the tumor cells.

Resistance to lysis mediated by mbIL21 aAPC-expanded NK cells is due to GDF-15

As shown in Fig.2, BT12 ATRT cells exhibited minimal sensitivity to lysis by NK cells from multiple donors, indicating that resistance is tumor intrinsic. To investigate the molecular mechanism underlying the resistance of BT12 cells to lysis mediated by mbIL21-expanded NK cells, the expression of the known immunosuppressive molecules *IL10*, *CD274* (PD-L1), *IDO1*, *PTGES*, *HLA-G*, *TNFRSF10C* (DcR1), *TNFRSF10D* (DcR2), *Nos2*, *GDF15* and *ATP6V0A2* (RTF) was examined by qRT-PCR analysis. Of the various molecules examined, only two appeared to be consistently highly overexpressed in BT12 cells compared to the NK susceptible DAOY, D283, and CHLA266 cells. Prostaglandin E Synthase (*PTGES*) and growth and differentiation factor 15 (*GDF15*) expression were >9-fold higher in the BT12 cells compared to the NK susceptible cells (Fig. 6A). Therefore, knockdown experiments were performed to assess the contributions of *PTGES* and *GDF15* to the resistance of BT12 cells to lysis by NK cells. RNA interference was successfully employed to knockdown *PTGES* and *GDF15* in BT12 cells (Fig. 6B). 48 hours after knockdown, 4 hour calcein release assays were performed on the BT12 cells utilizing NK cells expanded from four new donors (F-I) at a 5:1 effector cell:target cell ratio. The results demonstrate that knockdown of *PTGES* in BT12 cells results in no change in NK cell-mediated cytotoxicity compared to control knockdown cells. However, knockdown of *GDF-15* resulted in an average specific cell lysis of 22.8% compared to an average 1.85% specific cell lysis for control knockdown cells, a 12.3-fold increase (Fig. 6C). This suggests that *GDF-15* contributes significantly to the resistance of BT12 cells to NK cell-mediated cytotoxicity.

Discussion

Pediatric brain tumors, including medulloblastoma and ATRT, are associated with significant mortality and morbidity. Additionally, radiation and chemotherapy employed in current therapies result in impaired neurologic function and development. Therefore, new treatments are necessary to improve outcomes and avoid current therapy-related toxicities. Immunotherapy and specifically NK cell treatment is particularly attractive because it does not rely on the presence of TAAs or any other single cell surface marker. NKT cells have been shown to be effective against medulloblastoma cells *in vitro* and *in vivo* (37). However, NKT cell activity is restricted to those cells expressing CD1d. High expression of CD1d was found to be applicable to the sonic hedgehog (SHH) subgroup medulloblastomas. Therefore, the *in vitro* and *in vivo* data demonstrating the efficacy of NKT cells against medulloblastomas was also restricted to SHH subgroup cell lines. In this regard, NK cells may be particularly desirable as they have the potential to be effective against multiple tumor subgroups and subpopulations.

Previous attempts to use NK cells to treat brain tumors have mostly involved lymphokine activated killer (LAK) cells. LAK cells are generated through *in vitro* stimulation of PBMC with IL- 2 and consist of both activated T cells and NK cells. These attempts were mostly successful in improving patient outcomes and were administered either intracranially or intrathecally (12). This focal administration of adoptive cell therapy bypasses the blood-brain barrier and allows for direct access to the tumor. However, these trials have been limited by the numbers of NK cells and infusions that could be administered. Thus, the vastly improved expansion of NK cells accomplished with mbIL21 activation has the potential to increase the number of focal infusions that can be administered as well as the number of NK cells infused which in turn has the potential to further improve patient outcomes.

This study is the first to demonstrate the feasibility of using *ex vivo* expanded mbIL21-stimulated NK cells to block the growth of primary and established medulloblastoma cells *in vitro* and *in vivo*. Previous *in vitro* studies have provided conflicting results on the efficacy of NK cells against medulloblastoma. Castriconi *et al.* showed that HTB-185, HTB-186 and 1603-MED medulloblastoma cell lines are susceptible to lysis mediated by IL-2 cultured NK cells (30). In contrast, Fernandez *et al.* reported moderate resistance in HTB-186 medulloblastoma cells to lysis mediated by resting NK cells (38). However Fernandez *et al.* also showed that NK cell activation with IL-15 greatly enhanced the susceptibility of HTB-

186 cells to NK cell lysis which supports our finding that activated NK cells efficiently lyse medulloblastoma cells *in vitro*. Indeed, NK cells expanded with mbIL21 aAPCs have an equivalent, if not better, cell-killing ability compared to NK cells expanded with membrane-bound IL-15 expressing aAPCs and are even more activated as determined by the significantly higher expression of IFN γ and TNF α (32). Additionally, two clinical trials have shown that adoptive cell transfer therapy with LAK cells improves outcomes in medulloblastoma patients (39, 40). However, it is impossible to extrapolate the NK cell contribution to the reported outcomes. Therefore, our data that mbIL21 aAPC-expanded and activated NK cells can limit the growth of medulloblastomas *in vivo* fills a significant gap in our understanding of the potential to use NK cells to treat pediatric brain tumors. This is also the first report demonstrating NK cell cytolytic activity against ATRT cells *in vitro*. Furthermore, by using mbIL21 aAPC-expanded and activated NK cells in our studies, we are utilizing a platform technology that allows the largest NK cell expansion described thus far and may therefore be highly tractable for clinical applications.

Our cytotoxicity assays showed that while most of the medulloblastoma and ATRT cell lines were susceptible to lysis by mbIL21 expanded and activated NK cells, BT12 ATRT cells were resistant. The BT12 cells overexpressed two immunosuppressive factors, *PTGES* and *GDF15*. Prostaglandin E2 (PGE₂), the product of PTGES enzymatic activity, has been shown to decrease the lysis of murine mammary tumor cells by murine NK cells (41). Additionally, knockdown of GDF-15 in murine glioma cells has been shown to increase their susceptibility to lysis by murine NK cells (42). Knockdown of PTGES in BT12 cells did not alter their resistance to NK cell lysis. This may perhaps be due to a lack of expression of the upstream limiting enzymes in PGE₂ synthesis, cyclooxygenase 1 and 2 (*PTGS1* and 2) in the BT12 cells (data not shown). However, knockdown of GDF-15 significantly enhanced the susceptibility of BT12 cells to NK cell mediated cytotoxicity. This raises the possibility that GDF-15 expression could be used as a prognostic biomarker to identify patients who will respond best to NK cell administration. Interestingly, while knockdown of GDF-15 in BT12 cells did increase their susceptibility to NK cell mediated lysis, there remained a population of cells that continued to display resistance to NK cells. These findings suggest the potential involvement of additional immunosuppressive molecules in the continued resistance of BT12 cells to NK-mediated lysis, although we cannot rule out the contribution of a transient transfection dependent variability in GDF-15 knockdown to the persistence of BT12

resistance. Definitive identification of the receptor through which GDF-15 acts as well as an understanding of how GDF-15 functions to inhibit NK cell activity will be important moving forward to understand how best to counteract the immunosuppressive role of GDF-15.

Cytotoxicity assays also revealed variability amongst the NK susceptible medulloblastoma and ATRT cell lines as determined by the varying percentages of these tumor cells lysed *in vitro*. Additionally, the primary medulloblastoma line, MB003, displayed variable susceptibility to lysis by NK cells derived from different donors. Several factors could be responsible for resistance in these cell populations. First, there may be different levels of ligands for activating receptors on different cell populations. Cell surface expression of activating ligands has not been examined to this point. Tumor cells are known to shed NK cell activating ligands such as MICA/B as a mechanism to avoid immune detection, a possibility that needs to be explored in future studies. A second possibility is that some of the medulloblastoma or ATRT cells may have upregulated survival pathways such as MEK or AKT, making them less susceptible to NK cell-mediated apoptosis through either the perforin and granzyme pathway or the death receptor pathway (43). Medulloblastoma and ATRT cells could also avoid NK-cell mediated apoptosis by downregulating or shedding death receptors such as DR4, a possibility that would be consistent with our previous findings (44). It is also possible that resistant medulloblastoma and ATRT populations could inhibit the cytolytic activity of mbIL21 NK cells through the expression of other immunosuppressive molecules such as TGF β or PD-L1 that were missed in the qRT-PCR screen because they were not expressed by the majority of cells (33). We are currently investigating whether one or more of these mechanisms are utilized by NK resistant cell populations in order to identify drugs or therapies to be combined with NK cells to promote more effective cytolysis.

Whether the tumor microenvironment and other stromal cell interactions present *in vivo* may alter or influence NK susceptibility through the release of immunomodulatory cytokines remains to be investigated. The influence of other immunosuppressive cell types such as T regulatory (Treg) cells on mbIL21 aAPC-expanded and activated NK cell cytolytic activity *in vivo* cannot be examined in the confines of our model system but would likely play an important role in regulating NK cell effector functions in the context of an immune competent host. Indeed a recent study has shown that medulloblastomas have fewer immune infiltrating cells compared to other pediatric brain tumors but that the myeloid component is skewed toward an immunosuppressive M2 phenotype compared to other pediatric brain

tumors (45). Conversely it is also possible that other activating immune cells or components may aid mbIL21 aAPC-expanded and activated NK cells to achieve more effective clearance of the tumor.

In conclusion, our pre-clinical study provides evidence in support of further research into the use of mbIL21 aAPC-expanded NK cells for the treatment of pediatric brain tumors. The current therapeutic need in medulloblastoma and ATRT is for children with extremely poor prognosis such as those with recurrent tumors or who present with metastatic tumors. Because of the young age of the children that develop these tumors, new therapies that do not include radiation and chemotherapy are needed. Our data provide evidence that mbIL21 aAPC expanded NK cells delivered intratumorally inhibit tumor growth, suggesting that intracranial administration of these NK cells directly into the tumor site or the ventricular space might provide an effective way to circumvent problems associated with systemic administration of therapeutics (46). Indeed, findings reported here have paved the way for the first in pediatrics Phase-I trial to examine the safety and feasibility of administering NK cells into the fourth ventricle of children with recurrent/refractory tumors of the posterior fossa. An additional expectation from delivery into the ventricular space is that it will allow for dispersal of mbIL21 aAPC-expanded NK cells, making it potentially attractive for the treatment of metastatic tumors. Thus, it will be important moving forward to determine the susceptibility of brain tumor metastases to NK cell-mediated lysis and to elucidate the differences between susceptible and resistant tumor populations. Moreover, an understanding of the mechanisms employed by resistant populations to evade NK cell recognition or lysis will allow opportunities for discovery of drugs that can synergize with the mbIL21 aAPC-expanded NK cells in the clearance of resistant tumor cells.

Materials and Methods

Cell Lines and Culture

DAOY and D283 MB cell lines (ATCC) were grown in MEM (Gibco), supplemented with 10% FBS (HyClone), 2% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen), 1% sodium-pyruvate (Invitrogen) and 1% non-essential aminoacids (Invitrogen). Primary MB cell line, MB003 (Kindly provided by Dr. Dennis A. Steindler; University of Florida), was grown on poly-L-ornithine coated plates in DMEM/F12 (Gibco), supplemented with 5% FBS, 1%

pen-strep, 1 μ g/mL laminin (Sigma), 1% N2 supplement (Invitrogen), 2.5 \cdot g/mL bovine pituitary extract (BD Biosciences), 20 ng/mL rhFGF basic and rhEGF (R&D Systems) and 1 ng/mL leukemia inhibitory factor (Chemicon). BT12 ATRT cell line was grown in DMEM (Gibco) supplemented with 10% FBS, 1% pen-strep and CHLA266 ATRT cell line was grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% pen-strep and 1X Insulin-Transferrin-Selenium supplement (Lonza). HLA_{neg}721.221, K562 and K562 mbIL21 cells were grown in RPMI 1640 (Thermo Scientific) supplemented with 10 % FBS, 1% pen-strep and 1% L-glutamine.

NK cell expansion

NK cells were maintained in NK media, consisting of RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 1% GlutaMAX (Gibco), 1% pen-strep and 50 IU/mL recombinant human IL-2 (Novartis), with replenishment of media and rhIL-2 as needed. NK cells were expanded from PBMC according to the procedure previously described (47). Briefly, the PBMCs were co-cultured with irradiated K562 cl9mIL21 aAPC for 21 days, with addition of new aAPC every 7 days. CD3⁺ cells were depleted from the culture at day 7, using CD3 isolation kit (Miltenyi Biotec). The purity of NK cells was assessed by flow cytometry and the cells frozen in freezing medium (10% DMSO, 40% RPMI, 50% FBS).

Flow Cytometry

Murine anti-human CD3 ϵ -FITC/PE (UCHT1), CD16-PE (3G8), CD56-PerCP-Cy5.5 (B159) and isotype controls, were obtained from BD Biosciences. Flow cytometry was performed on a BD FACSCalibur and analysis was performed utilizing FlowJo software.

VTLM

VTLM was performed using a BioStation IM (Nikon Instruments). 5,000 CellTracker Red (Invitrogen) labeled target cells were plated in a 3.5 cm Hi-Q4 culture dish (Nikon Instruments) overnight. The next day 20,000 NK cells were added to the chamber in complete media containing 100 nM Sytox 488 (Invitrogen). For imaging, 20 points were selected and

recorded for 24 hours with an interval of 2 minutes between each picture. Imaging videos were analyzed using NIS Elements software (Nikon Instruments).

Chromium Release Assay

The lytic potential of NK cells was measured by 4 hour chromium release assay(48). We tested five different effector to target (E:T) ratios (20:1, 10:1, 5:1, 2.5:1 and 1.25:1) and measured the amount of sodium chromate (^{51}Cr) released from the radiolabelled target cells. The NK cells (effectors) were thawed and allowed to recover for 2h in RPMI 1640 with 10% FBS and 1% Lglutamine. Target cells are incubated with 0.1mCi ^{51}Cr (PerkinElmer) for 1h at 37°C. The effector cells are added at different E:T ratios in triplicates and incubated for 4h. The maximum and spontaneous releases are determined by incubating targets in 1% Triton X-100 and medium, respectively. The supernatants are harvested to a LumaPlate (Packard) and the ^{51}Cr measured in a TopCount gamma counter (PerkinElmer). The percent specific lysis is calculated as follows:

$$\%^{51}\text{Cr release} = (\text{Experimental release} - \text{Background release}) / (\text{Maximum release} - \text{Background release}) \times 100.$$

T cells were expanded using OKT3-loaded aAPC (48) as a negative control. For perforin blocking experiments, folimycin was used to inhibit perforin. NK cells were treated with folimycin for 2 hours and washed with complete media before use in chromium release assays.

KIR mismatch

The KIR genotype of the NK cell donors was determined by the UT MDACC Division of Pathology/Laboratory Medicine. Because all five donors carried the genes for the inhibitory KIRs, KIR2DL1, KIR2DL2/3 and KIR3DL1, only the ligand:ligand compatibility model was necessary to determine the presence of KIR mismatch. KIR mismatch was calculated by the KIR ligand calculator at <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/ligand.html>.

RNA interference

BT12 cells were transfected with 50nM control ON-TARGET plus Non-targeting pool, ONTARGET plus Human PTGES siRNA smart pool or ON-TARGET plus Human GDF15 siRNA smart pool in 2 ul/ml Dharmafect 1 reagent (Dharmacon). Transfection was allowed to proceed for 24 hours after which time the media was changed. After 48 hours, the cells were collected for RNA analysis and calcein release assays.

Calcein Release Assay

Transfected BT12 cells were released from the plate using enzyme-free dissociation solution (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ -free PBS with 5 mM EDTA). Dissociated cells were loaded with 5 · g/ml Calcein AM (Life Technologies) at 10⁶ cells/ml in RPMI. 10⁴ Calcein AM loaded cells were incubated with donor-derived NK cells at a 5:1 effector cell:target cell ratio for 4 hours in a U-bottom 96-well plate. After 4 hours supernatants were collected and analyzed on a Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek). % Specific Cell Lysis was calculated as described above.

Quantitative Real Time PCR

RNA was isolated using a Quick RNA MiniPrep kit (Zymo Research) and cDNA was synthesized using an iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad). qRT-PCR was performed on a LightCycler 96 (Roche). qRT-PCR primers used were: 18S RNA Forward – GTGGTGTT GAGGAAAGCAGACATTG; 18S RNA Reverse – CATCCTTCTGTCTGTTCAAGAACCAGTC; *PTGES* Forward - CATCATCACGGGCCAAGT; *PTGES* Reverse – GTAGATGGTCTCCATGT CGTTC; *GDF15* Forward - GGATACTCACGCCAGAAGTG; *GDF15* Reverse – GAACAGAGCCCGG TGAAG. qRT-PCR results were normalized to cDNA reversed transcribed from normal human cerebellum RNA (Clontech).

Ffluc Transduction

DAOY cells were transduced with a lentivirus which encodes an enhanced firefly luciferase (Ffluc) and mKate (Kindly provided by Brian Rabinovich (49)). The lentiviral

vector was transfected into the packaging cell line 293METR using Lipofectamine Plus (Life Technologies) and supernatants were harvested at 48 and 72h post-transfection. Viral supernatant was filtered through a 0.45µm Nylon Membrane (Millipore), concentrated using Amicon Ultra -15 Centrifugal Filter Units (Millipore), and then titrated on 293METR cells. The lentivirus was added to confluent DAOY cells at a MOI of 5 with 5 µg/ml polybrene (Sigma-Aldrich). mKate positive cells were sorted on a BD Influx Cell Sorter (BD Biosciences) at the Flow Cytometry and Cellular Imaging Core Facility. The Luciferase activity of sorted DAOY mKate positive cells was verified by the addition of 140 mg/mL D-Luciferin (Sigma-Aldrich) followed by a 10 minute incubation at 37°C. The bioluminescence emission was analyzed using a TopCount gamma counter (PerkinElmer).

Xenograft

All animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at The University of Texas MD Anderson Cancer Center (UT-MDACC). NOD *scid* gamma null (NSG; NOD.Cg-*Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ* JAX) mice were purchased from Jackson Laboratories and bred and housed under specific pathogen-free conditions at the AAALAC-approved UT MDACC South Campus vivarium. All orthotopic xenograft experiments were performed using 4-6 week old mice. We used the model described by Lal *et al* (50), with modification of the injection site to 2 mm posterior, 1 mm lateral to the Lambda suture and 2 mm deep to achieve the cerebellum. A guide-screw (PlasticsOne) was placed at the site of injection and, ten days after the implantation, 10⁵ DAOY cells labeled with ffluc were injected into each animal in a 3 uL volume using an infusion pump (Harvard Apparatus) at a 30 uL/hour rate. 4 x 10⁵ DiR (Invitrogen) labeled NK cells were injected 7 days after tumor injection, using the same guide-screw, in a 3 uL volume. NK cells were injected once a week for 3 weeks. The tumor shrinkage and NK persistence were measured using an IVIS Spectrum (Caliper) to assess the bioluminescence of the tumor when in presence of D-Luciferin (Caliper) and the DiR fluorescence of the NK cells. Bioluminescence and fluorescence data were analyzed with Living Image (Xenogen) software. 21 days following DAOY injection the mice were sacrificed and the cerebella were formalin fixed for histopathology.

Histopathology

Cerebella were paraffin embedded, sectioned and stained by the UT MDACC DVMS pathology core. Sections were stained with H & E, anti-human CD45 (NCL-L-LCA-RP; Leica), anti-human Ki- 67 (MM1; Leica), anti-mouse/human cleaved caspase 3 (polyclonal; Biocare Medical) and antimouse/ human GFAP (GA5; Cell Signaling). All slides were imaged using a Nikon Eclipse Ti and analyzed with NIS Elements software (Nikon).

References

1. Pui CH, Gajjar AJ, Kane JR, Qaddoumi IA, Pappo AS. Challenging issues in pediatric oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 Sep;8(9):540-9. PubMed PMID: 21709698. Pubmed Central PMCID: 3234106. Epub 2011/06/29. eng.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012 Jan-Feb;62(1):10-29. PubMed PMID: 22237781. Epub 2012/01/13. eng.
3. Rutkowski S, von Hoff K, Emser A, Zwiener I, Pietsch T, Figarella-Branger D, et al. Survival and prognostic factors of early childhood medulloblastoma: an international metaanalysis. *J Clin Oncol*. 2010 Nov 20;28(33):4961-8. PubMed PMID: 20940197. eng.
4. Oka H, Scheithauer BW. Clinicopathological characteristics of atypical teratoid/rhabdoid tumor. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 1999 Jul;39(7):510-7; discussion 7-8. PubMed PMID: 10437379. Epub 1999/08/07. eng.
5. Gajjar A, Chintagumpala M, Ashley D, Kellie S, Kun LE, Merchant TE, et al. Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma (St Jude Medulloblastoma-96): long-term results from a prospective, multicentre trial. *The lancet oncology*. 2006 Oct;7(10):813-20. PubMed PMID: 17012043. eng.
6. Tekautz TM, Fuller CE, Blaney S, Fouladi M, Broniscer A, Merchant TE, et al. Atypical teratoid/rhabdoid tumors (ATRT): improved survival in children 3 years of age and older with radiation therapy and high-dose alkylator-based chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005 Mar 1;23(7):1491-9. PubMed PMID: 15735125. Epub 2005/03/01. eng.
7. Finkelstein-Shechter T, Gassas A, Mabbott D, Huang A, Bartels U, Tabori U, et al. Atypical teratoid or rhabdoid tumors: improved outcome with high-dose chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2010 Jul;32(5):e182-6. PubMed PMID: 20495479. Epub 2010/05/25. eng.
8. Mabbott DJ, Penkman L, Witol A, Strother D, Bouffet E. Core neurocognitive functions in children treated for posterior fossa tumors. *Neuropsychology*. 2008 Mar;22(2):159-68. PubMed PMID: 18331158. eng.

9. Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol*. 2013 May;10(3):230-52. PubMed PMID: 23604045. Epub 2013/04/23. eng.
10. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011 Dec 22;480(7378):480-9. PubMed PMID: 22193102. Epub 2011/12/24. eng.
11. Prieto PA, Yang JC, Sherry RM, Hughes MS, Kammula US, White DE, et al. CTLA-4 blockade with ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2012 Apr 1;18(7):2039-47. PubMed PMID: 22271879. Pubmed Central PMCID: 3319861. Epub 2012/01/25. eng.
12. Ishikawa E, Takano S, Ohno T, Tsuboi K. Adoptive cell transfer therapy for malignant gliomas. *Adv Exp Med Biol*. 2012;746:109-20. PubMed PMID: 22639163. Epub 2012/05/29. eng.
13. Ogbomo H, Cinatl J, Jr., Mody CH, Forsyth PA. Immunotherapy in gliomas: limitations and potential of natural killer (NK) cell therapy. *Trends Mol Med*. 2011 Aug;17(8):433-41. PubMed PMID: 21507717. Epub 2011/04/22. eng.
14. Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer*. 1975 Aug 15;16(2):230-9. PubMed PMID: 1080480. Epub 1975/08/15. eng.
15. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002 Nov;2(11):850-61. PubMed PMID: 12415255. Epub 2002/11/05. eng.
16. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*. 2000 Nov 25;356(9244):1795-9. PubMed PMID: 11117911. Epub 2000/12/16. eng.
17. Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jimenez R, Chillon MJ, Jareno J, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002 Jan;35(1):23-8. PubMed PMID: 11750709. Epub 2001/12/26. eng.
18. Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 1997 Jun 15;79(12):2320-8. PubMed PMID: 9191519. Epub 1997/06/15. eng.
19. Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol*. 2007 May;7(5):329-39. PubMed PMID: 17438573. Epub 2007/04/18. eng.
20. Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, Dalton J, Finkelstein D, Lau CC, et al. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations.

Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2006 Apr 20;24(12):1924-31. PubMed PMID: 16567768. Epub 2006/03/29. eng.

21. Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011 Apr 10;29(11):1408-14. PubMed PMID: 20823417. Epub 2010/09/09. eng.

22. Charboneau A, Chai J, Jordan J, Funkhouser W, Judkins A, Biegel J, et al. P-Akt expression distinguishes two types of malignant rhabdoid tumors. *J Cell Physiol*. 2006 Nov;209(2):422-7. PubMed PMID: 16897758. Epub 2006/08/10. eng.

23. Birks DK, Donson AM, Patel PR, Dunham C, Muscat A, Algar EM, et al. High expression of BMP pathway genes distinguishes a subset of atypical teratoid/rhabdoid tumors associated with shorter survival. *Neuro Oncol*. 2011 Dec;13(12):1296-307. PubMed PMID: 21946044. Pubmed Central PMCID: 3223096. Epub 2011/09/29. eng.

24. Escudier B, Farace F, Angevin E, Charpentier F, Nitenberg G, Triebel F, et al. Immunotherapy with interleukin-2 (IL2) and lymphokine-activated natural killer cells: improvement of clinical responses in metastatic renal cell carcinoma patients previously treated with IL2. *Eur J Cancer*. 1994;30A(8):1078-83. PubMed PMID: 7654433. Epub 1994/01/01. eng.

25. deMagalhaes-Silverman M, Donnenberg A, Lembersky B, Elder E, Lister J, Rybka W, et al. Posttransplant adoptive immunotherapy with activated natural killer cells in patients with metastatic breast cancer. *J Immunother*. 2000 Jan;23(1):154-60. PubMed PMID: 10687148. eng.

26. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science (New York, NY)*. 2002 Mar 15;295(5562):2097-100. PubMed PMID: 11896281. eng.

27. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. 2005 Apr 15;105(8):3051-7. PubMed PMID: 15632206. eng.

28. Iliopoulou EG, Kountourakis P, Karamouzis MV, Doufexis D, Ardavanis A, Baxevasis CN, et al. A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Dec;59(12):1781-9. PubMed PMID: 20703455. Epub 2010/08/13. eng.

29. Ishikawa E, Tsuboi K, Saijo K, Harada H, Takano S, Nose T, et al. Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer research*. 2004 May-Jun;24(3b):1861-71. PubMed PMID: 15274367. eng.

30. Castriconi R, Dondero A, Negri F, Bellora F, Nozza P, Carnemolla B, et al. Both CD133+ and CD133- medulloblastoma cell lines express ligands for triggering NK receptors and are susceptible to NK-mediated cytotoxicity. *European journal of immunology*. 2007 Nov;37(11):3190-6. PubMed PMID: 17918205. eng.

31. Gong W, Xiao W, Hu M, Weng X, Qian L, Pan X, et al. Ex vivo expansion of natural killer cells with high cytotoxicity by K562 cells modified to co-express major histocompatibility complex class I chain-related protein A, 4-1BB ligand, and interleukin-15. *Tissue Antigens*. 2010 Dec;76(6):467-75. PubMed PMID: 20670353. Epub 2010/07/31. eng.
32. Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, Phatarpekar PV, Kopp LM, Johnson JL, et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PloS one*. 2012;7(1):e30264. PubMed PMID: 22279576. eng.
33. Wainwright DA, Nigam P, Thaci B, Dey M, Lesniak MS. Recent developments on immunotherapy for brain cancer. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2012 Jun;17(2):181-202. PubMed PMID: 22533851. Pubmed Central PMCID: 3361622. Epub 2012/04/27. eng.
34. Poli A, Kmiecik J, Domingues O, Hentges F, Blery M, Chekenya M, et al. NK cells in central nervous system disorders. *J Immunol*. 2013 Jun 1;190(11):5355-62. PubMed PMID: 23687193. Epub 2013/05/21. eng.
35. Purdy AK, Campbell KS. Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Igl like receptors (KIR). *Cancer Biol Ther*. 2009 Dec;8(23):2211-20. PubMed PMID: 19923897. Pubmed Central PMCID: 2825280. Epub 2009/11/20. eng.
36. Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L, et al. NK cells and cancer. *J Immunol*. 2007 Apr 1;178(7):4011-6. PubMed PMID: 17371953. Epub 2007/03/21. eng.
37. Liu D, Song L, Brawley VS, Robison N, Wei J, Gao X, et al. Medulloblastoma expresses CD1d and can be targeted for immunotherapy with NKT cells. *Clin Immunol*. 2013 Oct;149(1):55-64. PubMed PMID: 23891738. Epub 2013/07/31. eng.
38. Fernandez L, Portugal R, Valentin J, Martin R, Maxwell H, Gonzalez-Vicent M, et al. In vitro Natural Killer Cell Immunotherapy for Medulloblastoma. *Front Oncol*. 2013;3:94. PubMed PMID: 23626949. Pubmed Central PMCID: 3630393. Epub 2013/04/30. eng.
39. Silvani A, Salmaggi A, Parmiani G, Boiardi A. Successful adoptive immunotherapy with lymphokine-activated killer cells in the treatment of medulloblastoma disseminated via cerebrospinal fluid: case report. *Neurosurgery*. 1994 Jun;34(6):1078-80; discussion 80-1. PubMed PMID: 8084395. Epub 1994/06/01. eng.
40. Okamoto Y, Shimizu K, Tamura K, Miyao Y, Yamada M, Matsui Y, et al. An adoptive immunotherapy of patients with medulloblastoma by lymphokine-activated killer cells (LAK). *Acta Neurochir (Wien)*. 1988;94(1-2):47-52. PubMed PMID: 3177046. Epub 1988/01/01. eng.
41. Martinet L, Jean C, Dietrich G, Fournie JJ, Poupot R. PGE2 inhibits natural killer and gamma delta T cell cytotoxicity triggered by NKR and TCR through a cAMP-mediated PKA type I-dependent signaling. *Biochem Pharmacol*. 2010 Sep 15;80(6):838-45. PubMed PMID: 20470757.
42. Roth P, Junker M, Tritschler I, Mittelbronn M, Dombrowski Y, Breit SN, et al. GDF-15 contributes to proliferation and immune escape of malignant gliomas. *Clin Cancer Res*. 2010 Aug 1;16(15):3851-9. PubMed PMID: 20534737.

43. Hersey P, Zhang XD. Treatment combinations targeting apoptosis to improve immunotherapy of melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2009 Nov;58(11):1749-59. PubMed PMID: 19551381. Epub 2009/06/25. eng.
44. Aguilera DG, Das CM, Sinnappah-Kang ND, Joyce C, Taylor PH, Wen S, et al. Reactivation of death receptor 4 (DR4) expression sensitizes medulloblastoma cell lines to TRAIL. *J Neurooncol*. 2009 Jul;93(3):303-18. PubMed PMID: 19148581. Epub 2009/01/17. eng.
45. Griesinger AM, Birks DK, Donson AM, Amani V, Hoffman LM, Waziri A, et al. Characterization of Distinct Immunophenotypes across Pediatric Brain Tumor Types. *J Immunol*. 2013 Nov 1;191(9):4880-8. PubMed PMID: 24078694. Epub 2013/10/01. eng.
46. Sandberg DI, Peet, M., Johnson, M.D., Cole, P., Koru-Sengul, T., and Luqman, A. Chemotherapy administration directly into the fourth ventricle in a nonhuman primate model: Laboratory investigation. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*. 2012;9(5):530-41
47. Somanchi SS, Senyukov VV, Denman CJ, Lee DA. Expansion, Purification, and Functional Assessment of Human Peripheral Blood NK Cells. *J Vis Exp*. 2011 (48):e2540.
48. Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, Olivares S, Zhang L, Yang G, et al. Manufacture of clinical-grade CD19-specific T cells stably expressing chimeric antigen receptor using Sleeping Beauty system and artificial antigen presenting cells. *PloS one*. 2013;8(5):e64138. PubMed PMID: 23741305. Pubmed Central PMCID: 3669363. Epub 2013/06/07. eng.
49. Rabinovich BA, Ye Y, Etto T, Jie QC, Levitsky HI, Overwijk WW, et al. Visualizing fewer than 10 mouse T cells with an enhanced firefly luciferase in immunocompetent mouse models of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(38):14342-6.
50. Lal S, Lacroix M, Tofilon P, Fuller GN, Sawaya R, Lang FF. An implantable guide-screw system for brain tumor studies in small animals. *Journal of Neurosurgery*. 2000 2011/10/11;92(2):326-33.

Figures and Legends

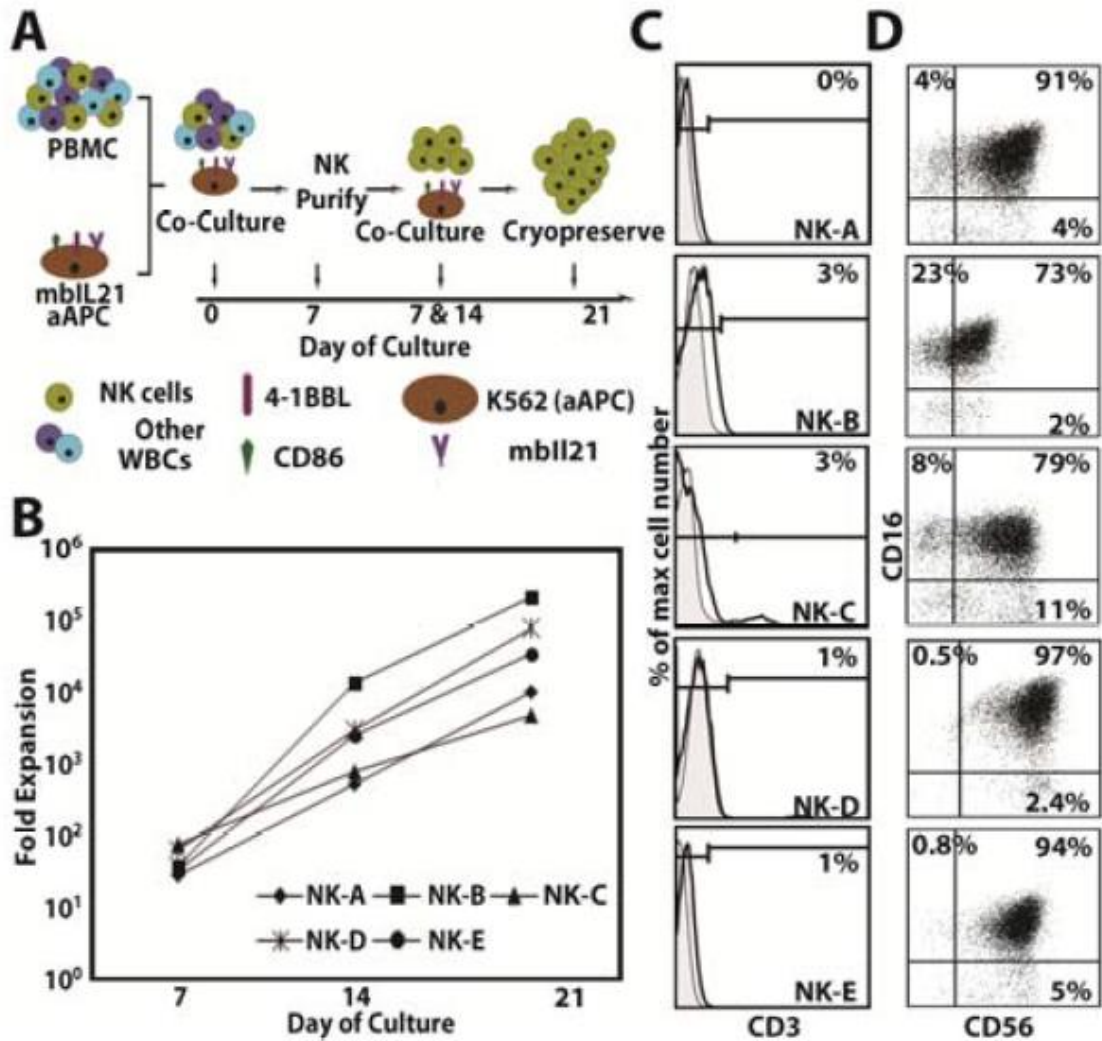
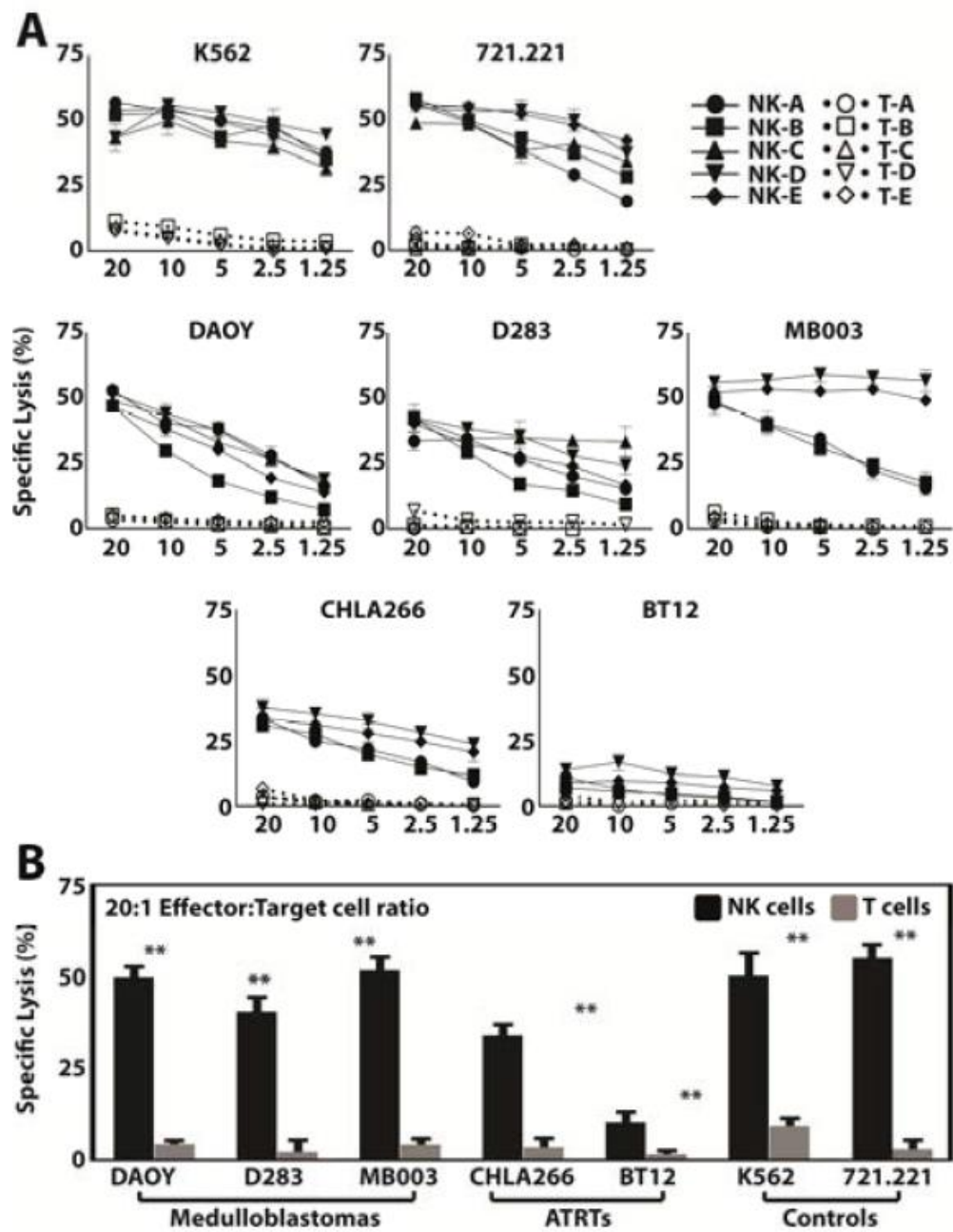


Figure 1: Culture of PBMCs with mbIL21 aAPCs results in NK cell expansion. A) Scheme of NK cell expansion using mbIL21. B) Line graph depicting the expansion of NK (A-E) cells following 7, 14 and 21 days of co-culture with mbIL21 aAPCs. C) Flow cytometric histograms (left) of day 7 NK (A-E) cells showing the percentage of CD3 positive cells. D) Flow cytometric dot plots (right) of day 7 NK (A-E) cells showing the distribution of CD16 and CD56 expression respectively. Gray lines represent the isotype control.



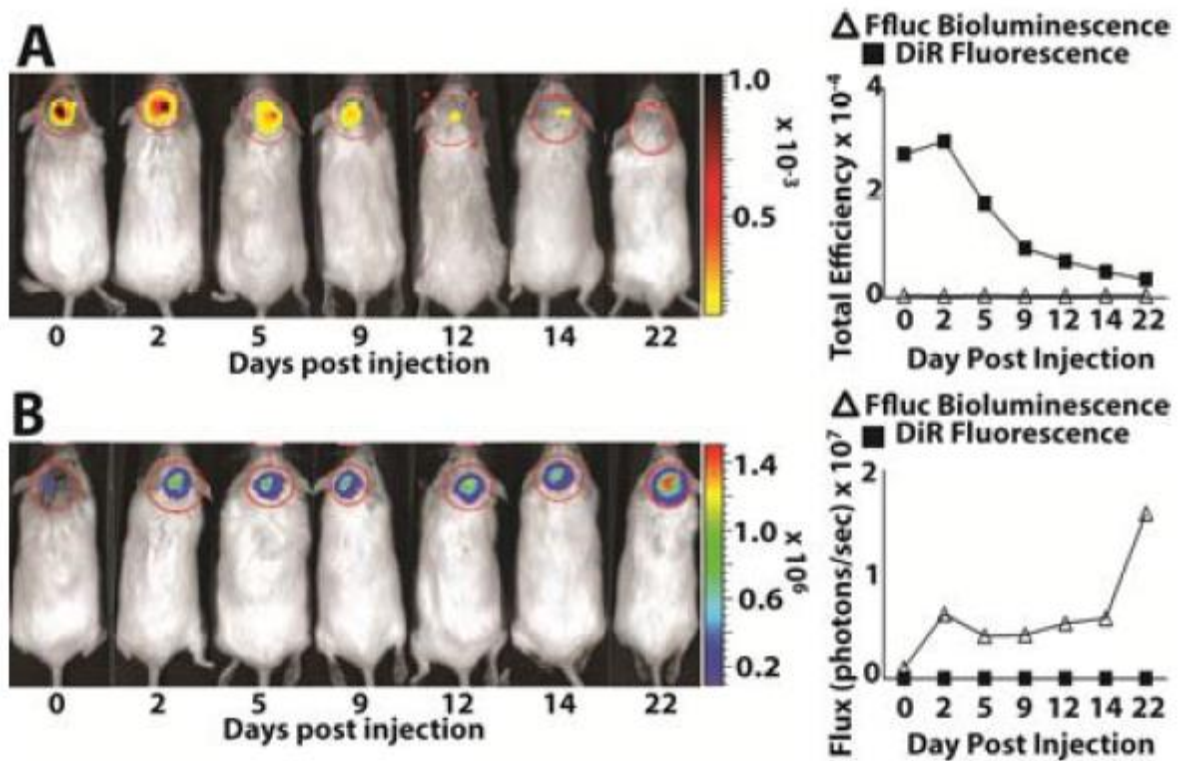


Figure 3: The kinetics of *in vivo* NK cell persistence and tumor growth can be measured. A) Representative images (left) showing the persistence of fluorescence signal over 22 days in an NSG cerebellum injected with 4×10^5 DiR labeled mbIL21 aAPC expanded NK cells. Representative line graph (right) showing the total efficiency of DiR fluorescence detected over 22 days in NSG cerebella injected with 4×10^5 DiR labeled NK cells (filled squares) or 10^5 ffluc expressing DAOY medulloblastoma cells (open triangles). B) Representative images (left) showing the increasing bioluminescence signal over 22 days in an NSG cerebellum injected with 10^5 ffluc expressing DAOY medulloblastoma cells. Representative bar graph (right) showing the total flux of ffluc bioluminescence over 22 days in an NSG cerebellum injected with 10^5 ffluc expressing DAOY medulloblastoma cells (open triangles) or 4×10^5 DiR labeled mbIL21 NK cells (filled squares).

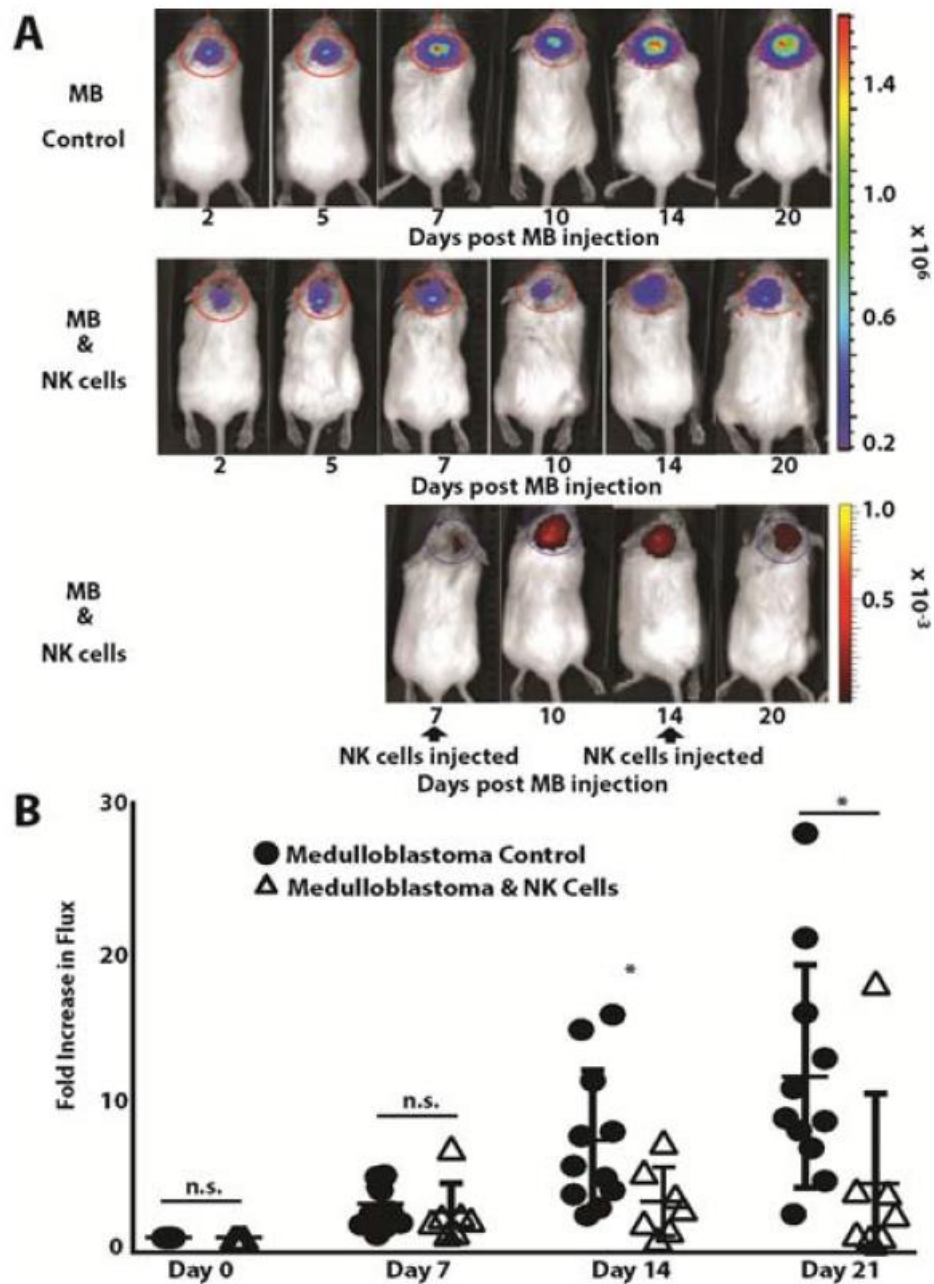


Figure 4: mbIL21 aAPC expanded NK cells limit the growth of medulloblastoma tumors in vivo. A) Representative images showing the changes in bioluminescence and fluorescence signal over 20 days in the cerebella of NSG mice injected with 10^5 ffluc expressing DAOY medulloblastoma cells on day 0 and either media or 4×10^5 DiR labeled mbIL21 NK cells on days 7 and 14. The top panels show the change in bioluminescence signal in the cerebellum of an NSG mouse injected with DAOY cells and media. The middle panels show the change in bioluminescence signal in the cerebellum of an NSG mouse injected with DAOY cells and mbIL21 aAPC expanded NK cells. The bottom panels show the change in fluorescence signal in the cerebellum of the same NSG mouse depicted in the middle panels. B) Scatter plot showing the fold change in flux values detected over 21 days in the cerebella of NSG mice injected with 10^5 ffluc expressing DAOY medulloblastoma cells on day 0 and either media (open triangles) or 4×10^5 DiR labeled mbIL21 NK cells (black circles) on days 7 and 14. Black bars represent the mean and error bars represent the standard deviation. $^* = p < 0.05$; n.s. = not significant; MB = medulloblastoma.

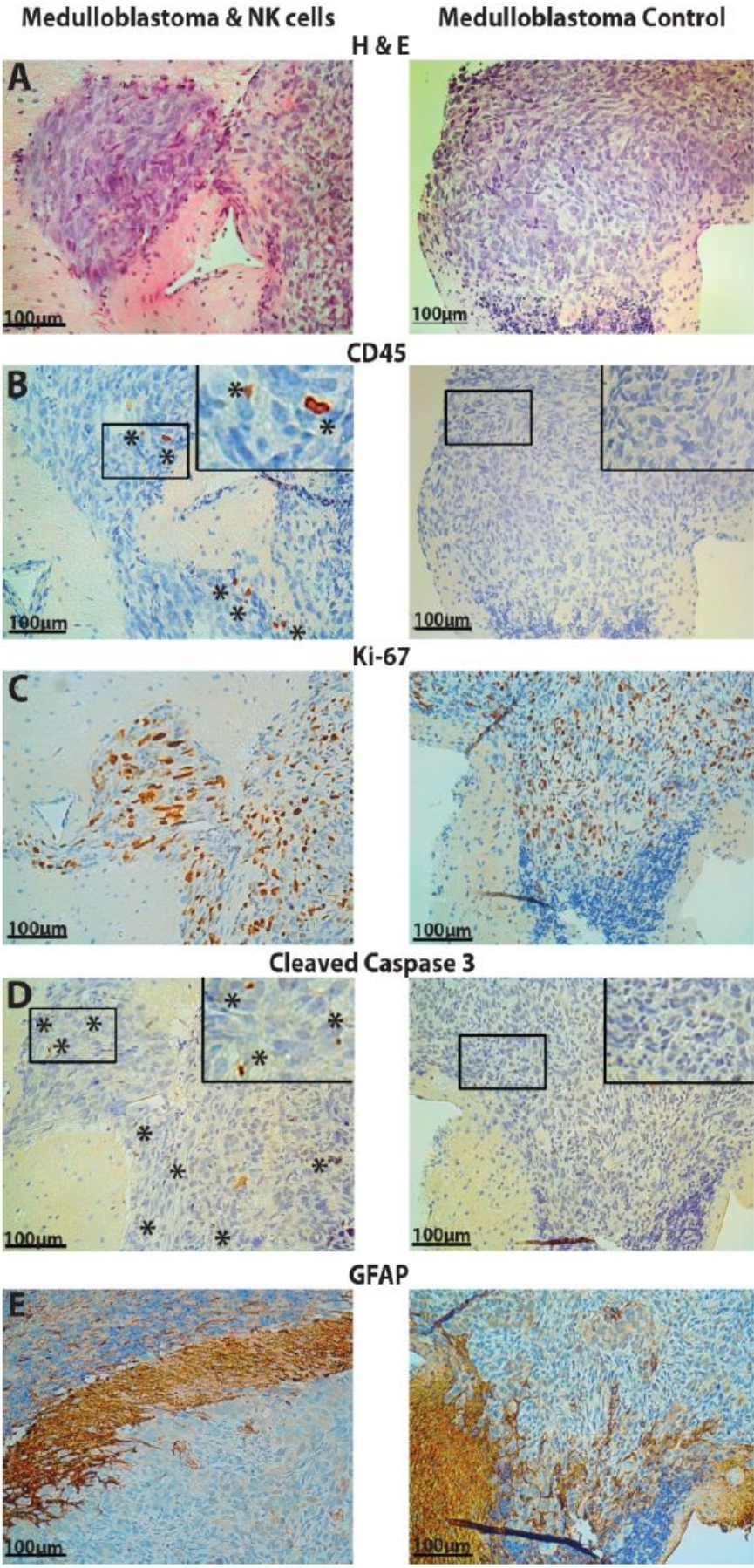


Figure 5: NK cells can be detected in the tumor of orthotopic xenograft mice. Representative 20X images of slides from the brains of medulloblastoma orthotopic xenograft mice stained with A) H and E; B) anti-CD45; C) anti-Ki-67; D) anti-cleaved caspase 3 and E) anti-GFAP. Images from mice treated with mblL21 aAPC expanded NK cells are shown on the left and images from control mice are shown on the right. * shows the location of CD45 positive cells in Figure 4B and cleaved caspase 3 positive cells in Figure 4D.

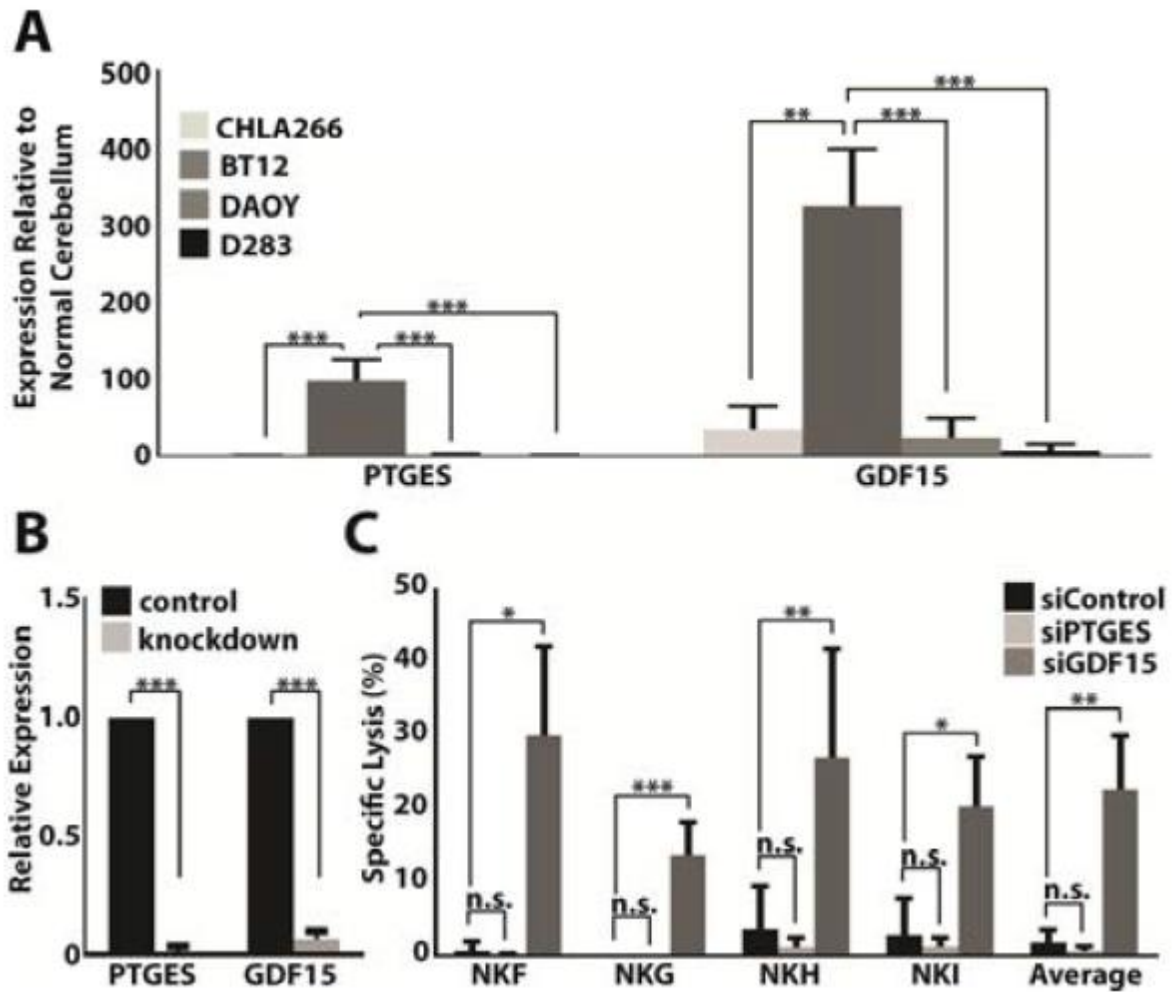
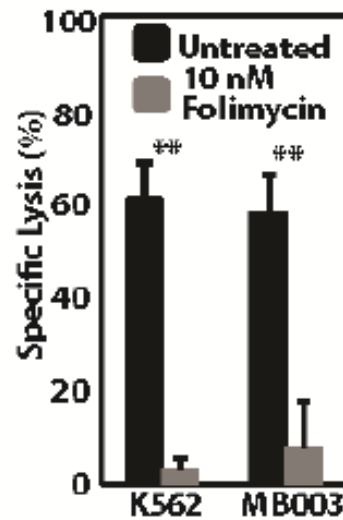


Figure 6: GDF-15 mediates resistance to NK cell lysis. A) Bar graph depicting the overexpression of *PTGES* (left) and *GDF15* (right) in NK resistant BT12 cells (dark gray bars) compared to NK susceptible CHLA266 (light gray bars), DAOY (gray bars) and D283 (black bars) cells. qRT-PCR was used to calculate expression from three RNA samples for each cell line and data was normalized to normal cerebellum. B) Bar graph depicting knockdown efficiency in BT12s using RNA interference 48 hours post transfection. qRT-PCR was used to calculate the expression of *PTGES* in siPTGES knockdown BT12s (left gray bar) and expression of *GDF15* in siGDF15 knockdown BT12s (right gray bar) and the results were normalized to expression of *PTGES* and *GDF15* in siControl BT12s (black bars) respectively. C) Bar graph showing the mean percentage of siControl BT12s (black bars), siPTGES BT12s (light gray bars) and siGDF15 BT12s (dark gray bars) lysed in a four hour incubation with NK cells expanded from four donors (NKFI). The average percentage of siControl, siPTGES and siGDF15 BT12 cells lysed by NK cells from all four donors is shown on the right. Error bars represent the standard deviation. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$; n.s. = not significant.

Video S1: NK-D cells lyse MB003 medulloblastoma cells. VTLM movie showing lysis of MB003 medulloblastoma cells by NK-D mbIL21 aAPC expanded NK cells.



Supplemental Figure S1: Chromium release assays demonstrate the importance of perforin in mbIL21 NK cell-mediated cytotoxicity. Bar graph showing the mean percentage of K562 cells (left bars) and MB003 medulloblastoma cells (right bars) lysed after 4 hours of co-culture with NK-B and NK-D cells. NK-B and NK-D cells were pretreated for 2 hours before co-culture with no inhibitor or 10 nM folimycin (perforin inhibitor). Error bars represent the S.D. ** = $p < 0.01$.

	DAOY	D283	MB003	CHLA266	BT12
NKA	-	-	-	-	-
NKB	-	+	+	+	+
NKC	-	-	-	-	-
NKD	-	+	-	-	-
NKE	-	-	-	+	+

Supplemental Table S1: Some of the NK cell and target cell combinations result in a potential KIR mismatch. Table showing NK cell and target cell combinations that result in a potential KIR mismatch. Gray squares with (-) symbols indicate combinations with no potential KIR mismatch. White squares with (+) symbols indicate combinations with potential KIR mismatch.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expansão de células NK *in vitro*, antes um empecilho para o uso dessas células como terapia, foi tornada um procedimento relativamente simples e bastante efetivo com o uso da plataforma tecnológica baseada no uso das aAPC. As células NK produzidas utilizando essa técnica podem ser consideradas de grau clínico, demonstrando expansão numérica e atividade citotóxica contra alvos pré-estabelecidos e contra tumores de cérebro pediátricos.

O estudo de células individuais permitiu analisar o comportamento das células NK contra alvos. Demonstrando que uma mesma célula NK pode combater mais de um alvo, bem como demonstramos que algumas NK passam pelo alvo, fazem contato com o mesmo mas não o atacam. Observou-se ainda, que mais de uma célula NK pode atacar o mesmo alvo.

Estudos continuam sendo desenvolvidos por nossos colaboradores do MDACC para compreendermos o porquê de algumas células tumorais serem resistentes à ação das células NK. Já foi descartada a combinação KIR e HLA, que nos nossos experimentos não mostrou alteração na citotoxicidade das NK contra os alvos.

8 PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, nossos colaboradores do MDACC já estão dando andamento a uma nova etapa do projeto para testar a segurança da injeção de células NK em cérebros de indivíduos saudáveis, usando macacos Rhesus (*Macaca mulatta*). No fim de 2012 realizamos a padronização da expansão células NK desses primatas, usando a mesma plataforma utilizada para a expansão de NK humana. Nessa etapa confirmamos que as aAPC clone9 são capazes de estimular o crescimento das células NK dos Rhesus, então estabelecemos as condições ideais de cultura dessas células, o que incluiu: proporção de aAPC clone9 para cada PBMC, quantidade de rhIL2 a ser adicionada e concentração de células em cultura. Após padronizada essa técnica, submetemos o projeto de experimentação animal que foi aprovado recentemente no MDACC. O próximo passo, que é a injeção dessas células nos animais, tem previsão de início para novembro. Caso confirme-se que as células NK não são nocivas ao cérebro de Rhesus saudáveis, terá início um protocolo clínico para aplicação das NK em portadores de meduloblastoma.

No laboratório CTC, no HCPA, está sendo padronizando a cultura das células NK humanas de grau clínico, de acordo com as boas práticas de manufatura e de acordo com a RDC nº 9, 14 de março de 2011. Essas células passarão por testes de controle de qualidade para atestar sua pureza e atividade. Serão comparados os resultados com os obtidos pelo grupo do MDACC e iniciaremos um projeto testando a eficácia das células NK expandidas em nosso laboratório para combater tumores de cérebro, como os próprios meduloblastoma e ATRT, além de gliomas. Também será implantado modelo animal para esses tumores para testarmos a atividade das NK *in vivo*.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO -1: MATERIAIS E MÉTODOS

Esse projeto foi executado em uma colaboração entre o MD Anderson Cancer Center (MDACC), de Houston, TX e o Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A parte experimental do projeto foi executada nos laboratórios do Dr. Laurence Cooper, Dra. Vidya Gopalakrishnan, Dr. Dean Lee (todos do MDACC) e no laboratório do Dr. Navin Varadarajan, na Universidade de Houston. O modelo animal foi desenvolvido e analisado no Departamento de Medicina Veterinária do MDACC.

9.1.1 Células e Linhagens Celulares

a. Células mononucleares de sangue periférico

Essas células foram obtidas já separadas por gradiente de concentração utilizando Ficoll do banco de sangue regional da costa do golfo - *Gulf Coast Regional Blood Center* – dos EUA. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC , do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) foram utilizadas para a expansão de células NK e T (vide ítem 4.5).

b. K562

As células K562 foram adquiridas junto à ATCC (*American Type Culture Collection* – EUA), essa linhagem de leucemia mielóide crônica, por sua susceptibilidade à células NK, é frequentemente utilizada como um alvo para ensaios de citotoxicidade destas células. Nesse estudo as células K562 foram utilizadas como controles positivos nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

A manutenção dessas células foi realizada com a utilização de meio R10, composto por: RPMI 1640 (*Thermo Scientific*, EUA), suplementado com 10% SFB (*Hyclone*, EUA) e 1% de L-glutamina (*Gibco/Invitrogen*, EUA). A troca de metade do meio foi realizada em intervalos de 2 dias.

A criopreservação de todas as células foi feita em meio de congelamento, composto por 40% RPMI 1640, 50% SFB e 10% Dimetil Sulfoxido – DMSO (*Sigma-Aldrich*, EUA).

c. Apresentadoras de antígeno artificiais (aAPC): K562-Cl9-mIL21

As Células Apresentadoras de Antígeno Artificiais (aAPC), *K562-Clone9-membrane bounded IL21*, são originadas de células K562 modificadas geneticamente para co-expressar: CD64, CD86, CD137L, tCD19 e uma ou molécula análoga à interleucina 21 ligada à membrana, conforme descrito em artigo publicado pelo grupo do MDACC (75). Essas células foram então irradiadas com 100Gy de radiação γ e criopreservadas em um banco de células para posterior uso. A manutenção dessas células em cultura foi realizada exatamente da mesma forma e com o mesmo meio que a das K562.

d. Apresentadoras de antígeno artificiais (aAPC): K562-Cl4-OKT3 loaded

Originadas de forma semelhante às K562-Cl9-mIL21, as aAPC clone 4 foram modificadas para expressar CD19, CD64, CD86, CD137L e interleucina 15 ligada à membrana (com co-expressão de proteína fluorescente verde (GFP, do inglês *Green Fluorescent Protein*) (76). As aAPC clone 4 foram também irradiadas com 100Gy de radiação γ e após foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-CD3 (clone OKT3, *eBioscience*), que apresenta grande afinidade pelo CD64. Essas células são então criopreservadas em um banco de células e descongeladas imediatamente antes do uso (77). Essas células foram utilizadas para expansão de células T *in vitro*. A exemplo das K562, também foram mantidas em R10.

e. HLA^{neg} 721.221

A linhagem linfoblastóide de células B HLA^{neg}721.221, foi modificada para expressar ligantes KIR pela Dr^a Lenka Hurton (78), que gentilmente cedeu essa linhagem. Devido a sua sensibilidade à ação das células NK, essa linhagem foi também utilizada como controle positivo nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*. A manutenção dessa linhagem é a mesma das K562.

f. DAOY

Linhagem celular de MB desmoplástico do grupo *Shh*, também chamada HTB-186, é uma linhagem aderente, obtida de um tumor cerebelar de um menino de 4 anos de idade, comprada junto à ATCC. Essas células foram mantidas em meio de cultura MEM, suplementado com 10% de SFB, 2% L-glutamina, 1% penicilina/estreptomicina, 1% piruvato de sódio e 1% aminoácidos não essenciais (todos reagentes da Gibco, EUA). A troca de meio

era feita a cada 2 dias. Quando atingiam 80% de confluência as células eram tripsinizadas (*TrypLE Express* - Gibco, EUA) e replaqueadas ou criopreservadas em meio de congelamento.

Ensaios realizados com células DAOY:

- Fingerprinting
- Tipagem HLA e KIR
- Ensaios de atividade citotóxica *in vitro*: liberação de cromo, *biostation*, *single cell*
- Marcação por bioluminescência
- Desenvolvimento de modelo animal
- Ensaio de atividade citotóxica *in vivo*
- Histologia

g. D283

Essa linhagem de MB, pertencente ao grupo 4, também é chamada HTB-185, apresenta culturas com células em suspensão formando agregados e algumas células aderentes. Essas células foram obtidas da ATCC e mantidas no mesmo meio que as DAOY, porém, por se tratar de uma cultura mista de aderentes e não aderentes, quando a confluência de 80% era atingida as células aderentes eram ressuspensas com um raspador *cell scraper* para serem replaqueadas ou congeladas.

Ensaios realizados com essas células:

- Fingerprinting
- Tipagem HLA e KIR
- Ensaios de atividade citotóxica: liberação de cromo, *biostation*, *single cell*

h. MB003

Essa linhagem celular aderente, proveniente de uma paciente de 3 anos, foi cedida pelo Dr. Dennis Steindler, da Universidade da Flórida. Por se tratar de uma linhagem primária não existem dados classificando-a entre os grupos de MB.

Essas células foram mantidas em meio de cultura DMEM/F12 (Gibco, EUA), suplementado com 5% de SFB, 1% penicilina/estreptomicina, 1% de suplemento N2

(Invitrogen, EUA), enriquecido com extrato pituitário bovino (BD Biosciences), rhFGF (R&D Systems, EUA), rhEGF (R&D Systems, EUA) e fator inibidor de leucemia (Chemicon, EUA), com trocas de meio a cada 2 dias e tripsinização conforme a confluência.

Ensaio realizado com essas células:

- Fingerprinting
- Tipagem HLA e KIR
- Ensaio de atividade citotóxica: liberação de cromo, *biostation, single cell*

i. MB01110

Essa linhagem primária foi isolada pelo laboratório da Dr^a Vidya Gopalakrishnan a partir do tumor de um menino de 9 anos, portador de MB. Essa linhagem também não foi classificada nos grupos de MB e utiliza o mesmo meio das MB003

Ensaio realizado com essas células:

- Fingerprinting
- Tipagem HLA e KIR
- Ensaio de atividade citotóxica: liberação de cromo, *biostation, single cell*

j. AB001

Linhagem primária de ATRT, proveniente de um paciente do MDACC do sexo masculino. Em seu cultivo foram utilizados o mesmo método e meio de cultura das DAOY, porém com 20% de SFB.

Ensaio realizado com essas células:

- Fingerprinting
- Tipagem HLA e KIR
- Ensaio de atividade citotóxica: liberação de cromo, *biostation, single cell*

k. CHLA266

Linhagem de ATRT de fossa posterior, proveniente do grupo de oncologia pediátrica da Texas Tech University, isolada de uma paciente de 1,5 ano.

A manutenção dessas células foi feita em meio de cultura IMDM (Lonza, EUA), enriquecido com 20% SFB (Gibco, EUA), 1% L-glutamina (Lonza, EUA), 1% piruvato de sódio, 1% penicilina/estreptomicina (Gibco, EUA) e solução ITS – Insulina, Transferrina, Selênio – (Lonza, EUA), com trocas de meio a cada dois dias e tripsinização conforme confluência.

Ensaio realizados com essas células:

- *Fingerprinting*
- Tipagem HLA e KIR
- Ensaio de atividade citotóxica: liberação de cromo, *biostation, single cell*

l. BT12

Também proveniente do banco de células da Texas Tech, essa linhagem de ATRT foi isolada de uma paciente de 4 meses de idade. Sua manutenção seguiu os mesmos parâmetros das CHLA266.

Ensaio realizados com essas células:

- *Fingerprinting*
- Tipagem HLA e KIR
- Ensaio de atividade citotóxica: liberação de cromo, *biostation, single cell*

m. 293METR

A linhagem celular 293METR foi um presente do Dr. Brian Rabinovich do MDACC. Essa linhagem foi modificada a partir da linhagem 293T, uma variante da linhagem HEK (*Human Embryonic Kidney*), derivada de células epiteliais renais embrionárias humanas. Essas células são largamente usadas em pesquisa de biologia celular por serem de fácil crescimento e eficiente transfecção. Rabinovich modificou a linhagem 293T para que a mesma expressasse:

- MSR – *Human Macrophage Scavenger Receptor* – esse receptor melhora a adesão das células ao plástico das garrafas de cultura;

- EBNA-1 - *Epstein–Barr nuclear antigen 1* – garante a replicação episomal do vetor durante a mitose;

- Tet – elemento regulatório Tet – regulador da expressão gênica

- Rev – Regulador de expressão de proteínas de vírions – é um gene do HIV que produz uma proteína que permite que fragmentos do mRNA do vírus seja exportado do núcleo para o citoplasma.

As células 293METR foram cultivadas em DMEM com 10% SFB, HEPES, L-glutamina, penicilina/estreptomicina e Normocina (todos da Invitrogen, EUA).

9.1.2 Fingerprinting

Para garantir que as linhagens celulares usadas nos experimentos eram puras e que não houve contaminação cruzada por outras linhagens ou mutação, foi feita uma caracterização dessas células por *fingerprinting*.

Esse método consiste na análise de STR – *short tandem repeat* –, que são sequências de DNA hipervariáveis curtas que apresentam repetições de unidades com 2 a 7 pares de bases. O perfil dessas repetições é único para cada linhagem celular (79). Quando se trata de uma linhagem conhecida as STR são comparadas com um banco de dados para atestar sua similaridade. Em caso de linhagem nova, essa é testada para demonstrar que não se encaixa como alguma linhagem já identificada.

Para a análise das linhagens foi feita a extração de DNA usando o kit *Qiagen Blood & Cell Culture DNA Maxi* (Qiagen, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA extraído foi então enviado ao núcleo de caracterização celular do MDACC, onde foi analisado pelo kit *Promega Power Plex 16HS* (Promega, EUA).

9.1.3 Tipagem HLA e KIR

O KIR e HLA dos doadores foi genotipado pela Divisão de Patologia do MDACC. Tendo em vista a presença dos genes KIR inibitórios: KIR2DL1, KIR2DL2/3 e KIR3DL1; em todos os doadores, analisamos somente a compatibilidade entre ligantes para determinar a presença da incompatibilidade KIR, que foi calculada usando o recurso “*KIR ligand calculator*” do Instituto Europeu de Bioinformática, disponível em:

- <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/ligand.html>.

9.1.4 Citometria de Fluxo

Os anticorpos murino anti-humano CD3-FITC, CD3-PE, CD4-APC, CD8-PerCP-Cy5.5 CD32 FITC, CD16-PE, CD56-PerCP-Cy5.5, NKG2D-APC, HLA-I-PerCP-Cy5.5, CD70-PE, CD133-PE, C-met e controles de isotipo foram todos obtidos junto à BD Biosciences, EUA.

As amostras foram adquiridas com um citômetro de fluxo FacsCalibur (BD Biosciences, EUA) e analisadas pelo software FlowJo (Tree Star, Inc., EUA).

9.1.5 Propagação de células NK e T

a. Células NK

A propagação das células NK foi realizada conforme descrito anteriormente (80): Células K562-C19-mIL21 (aAPC clone 9) irradiadas com 100Gy foram descongeladas e colocadas em co-cultura com as PBMC por 21 dias, com adição de aAPC clone 9 irradiadas a cada 7 dias (Figuras 3 e 4). As células NK foram mantidas em meio R10, suplementado com 50 UI/mL de IL-2 humana recombinante – *rhIL-2* – (Novartis, EUA), com troca de meio e reposição de *rhIL-2* a cada 2 dias.

As células CD3⁺ foram removidas da cultura no dia 7, utilizando seleção imunomagnética. A suspensão celular era incubada com *beads* metálicos, marcados com anti-CD3⁺ na sua superfície. Essa solução passava, então, pelas colunas magnéticas (Miltenyi Biotec, EUA), onde as células CD3⁺ ficavam presas ao magneto e as células NK passavam livremente. A pureza das células NK era testada por citometria de fluxo e as células semeadas em co-cultura com as aAPC irradiadas ou congeladas em meio de congelamento.

Para os ensaios as células NK criopreservadas eram descongeladas, ressuspensas em meio R10 e colocadas em estufa a 37° C com 5% de CO₂ por 2 horas.

Figura 3: Representação esquemática da expansão de células NK usando K562- CI9-mIL21: PBMC são co-cultivadas com aAPC irradiadas na presença de rhIL-2 por 21 dias, com adição de aAPC irradiadas a cada 7 dias e depleção de células CD3+ no dia 7.

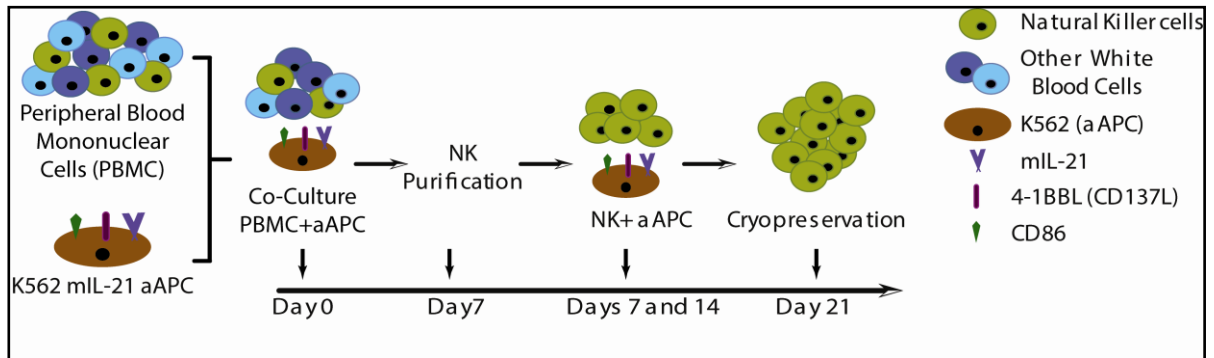
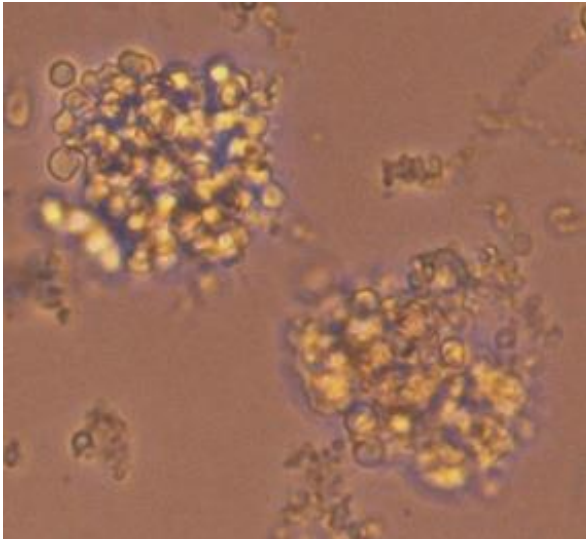


Figura 4: Células NK em co-cultura com aAPC: Foto tirada com 10 dias de cultivo. As células NK formam grumos ao redor das aAPCs irradiadas. (aumento 40X)



b. Células T

Células T foram obtidas de forma semelhante às NK, a partir dos mesmos doadores de PBMC, usando aAPCs. Porém, para a expansão das células T foram usadas K562-CI4-OKT3 loaded (aAPC clone 4) irradiadas e co-cultivadas com PBMC, na presença de rhIL-2 e IL-21 solúvel (81). No dia 7 as células CD56⁺ foram retiradas da cultura utilizando o mesmo método de colunas imunomagnéticas.

Essas células foram utilizadas como controles negativos para ensaios de citotoxicidade, para demonstrar que as células dos doadores não apresentavam nenhuma memória contra as células alvo. Tal qual as NK, essas células eram descongeladas para os experimentos.

9.1.6 Ensaios de Atividade Citotóxica

a. Ensaio de liberação de cromo

O potencial lítico das células NK foi analisado por Ensaio de Liberação de Cromo Radioativo (82, 83). Nesse ensaio, as células efetoras (T e NK) são descongeladas e colocadas em meio R10 por 2h a 37°C para descansar. As células-alvo são marcadas com 0,1mCi de cromo radioativo (Cr^{51}) – Perkin-Elmer, EUA – por 1h a 37°C. Após a incubação as células-alvo são lavadas três vezes em meio para remover o excesso de Cr^{51} e diluídas a uma concentração de 50.000 por ml em DMEM com 10% de SFB.

As células efetoras são concentradas a 10^6 células/ml e semeadas em uma placa de 96 poços de fundo em “U” (Corning, EUA). O plaqueamento é feito em triplicata, com diluição seriada de forma a termos 5 diferentes proporções efetor:alvo (E:T) – 20:1; 10:1; 5:1; 2,5:1 e 1,25:1. A seguir, 5.000 células tumorais são adicionadas a cada poço. A liberação máxima e espontânea de Cr^{51} é obtida incubando as células-alvo com 1% de detergente Triton X-100 e meio, respectivamente.

As placas são centrifugadas para aumentar o contato das células e incubadas por 4h a 37°C com 5% de CO_2 . Em seguida, as placas são novamente centrifugadas e 50 μ L do sobrenadante transferidos para um placa de cintilação LumaPlate (Packard, EUA) para medir a liberação de Cr^{51} em um contador TopCount Gamma (Packard, EUA). O percentual de lise é calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\%Cr^{51} \text{ liberado} = (\text{liberação da amostra} - \text{liberação espontânea}) / (\text{liberação máxima} - \text{liberação espontânea}) \times 100.$$

Os controles usados foram:

- Controle Negativo: Células T autólogas
- Controle Positivo: HLA^{neg}721.221 e K562 (não modificadas) - ambas suscetíveis à lise por células NK, mas não por células T.

b. Análise do mecanismo de morte celular por NK

Os principais mecanismos de morte celular pelas células NK são liberação de perforina e granzima B. Para bloquear a morte celular mediada por Perforina e Granzima B as

células NK foram tratadas com seus respectivos inibidores Concanamicina-A e Z-AAD-CMK (ambos da Sigma-Aldrich, EUA). O tratamento foi feito com diferentes concentrações das drogas por duas horas, onde foi analisado o efeito da dose e o efeito combinado das duas drogas, comparados à ausência de drogas por ensaio de liberação de cromo.

c. Análise de Atividade Celular Individual (*single cell*)

Analisamos a atividade de células NK utilizando um método de aquisição de imagens de alto desempenho. O procedimento foi realizado em colaboração com o Dr. Navin Varadarajan, da Universidade de Houston. A técnica, descrita em 2011 (84), consiste em marcar as células efectoras e células-alvo com diferentes marcadores (Calceína 405 e Cell Tracker Red, respectivamente) e um marcador de vitalidade (Sytox 488) – todos da Invitrogen.

Esse método nos permite estudar o comportamento das células NK em diferentes cenários –1 NK e 1 alvo, 1 NK e 2 alvos, 2 NK e 1 alvo – isolados uns dos outros por uma barreira física (micro-poço) e nos fornece dados de vários desses cenários ao mesmo tempo em um formato relativamente simples de ser interpretado.

Para esse ensaio utilizamos uma placa com cerca de 85.000 micro-poços, feita de elastômero de silicone moldado (85). Por seu caráter hidrofóbico a placa deve ser oxidada por plasma de oxigênio por 30s, o que nos permite ao mesmo tempo esterilizar e dar um caráter hidrofílico à placa. Após, as células NK marcadas com Calceína 405 são distribuídas na superfície da placa e incubadas a 37°C por 10 minutos para assentarem por gravidade. Em seguida a placa é lavada com R10 e as células-alvo, marcadas com Cell Tracker Red, são plaqueadas da mesma forma. Após a segunda incubação a placa é lavada novamente com R10, imersa em uma solução de R10 com 500nM do marcador de morte celular Sytox e incubada a 37°C por 15 minutos. Passados os 15 minutos (t=0), são coletadas imagens da placa usando um microscópio automatizado de epifluorescência Zeiss Observer Z1 (Zeiss, Alemanha), equipado com um sistema de iluminação de alta velocidade Lambda DG4 (Sutter, EUA). Após, a placa é colocada em estufa a 37°C 5% de CO₂ por 4 horas e então uma segunda sequência de aquisição de imagens é efetuada (t=4h).

Para analisar os resultados foi usado um algoritmo capaz de localizar cada poço na placa e definir, pela presença de fluoróforos, quais poços contêm qual tipo de células, número de células e se estão vivas ou mortas. Para calcular o potencial lítico das NK primeiro

subtraímos os poços que apresentaram células mortas (marcadas por Sytox) em $t=0$, depois comparamos com os resultados obtidos em $t=4h$.

d. BioStation

BioStation IM (Nikon) é um equipamento que permite que se observe células microscopicamente por um longo período de tempo, uma vez que a máquina é formada por uma incubadora montada sobre um microscópio, que mantém temperatura e concentração de CO_2 constantes a $37^\circ C$ e 5%, respectivamente. Nesse ensaio podemos observar de forma constante as células durante um período, diferente do método anterior, onde observamos apenas 2 pontos de tempo. Essa capacidade de observação do comportamento das células em um determinado intervalo de tempo nos permite visualizar o ataque das NK aos alvos e, com isso, ter uma melhor compreensão de como as células NK efetuam esses ataques.

Para esse teste 5.000 células alvo (DAOY, AB001 e MB003) foram semeadas em placas de 3,5cm com fundo de vidro. Depois de encubar *overnight*, as células foram marcadas com *Cell Tracker Red* (Invitrogen, EUA), de acordo com protocolo do fabricante. Então, 20.000 células NK foram ressuspendidas em meio contendo 100nM de Sytox 488 e adicionadas às placas já em que estavam os alvos marcados. Essas placas foram então colocadas individualmente na câmara da BioStation, onde 20 pontos foram selecionados e as imagens adquiridas em intervalos de 2 minutos durante 24 horas. Findada a aquisição os vídeos gerados foram analisados usando o software NIS Elements (Nikon, Japão). A morte dos alvos foi observada pela fluorescência do marcador Sytox 488.

9.1.7 Marcação por Bioluminescência

Tendo em vista que precisaríamos detectar o desenvolvimento do MB em nosso modelo animal, optamos por desenvolver células com o marcador bioluminescente Firefly Luciferase (FfLuc) (86). Quando em presença de D-Luciferina (Caliper, EUA) a enzima *FfLuc* quebra essa proteína emitindo luz. Com esse marcador seria possível estimar o tamanho do tumor com base na intensidade de luz emitida. Para podermos selecionar essas células por citometria de fluxo adicionamos um marcador de fluorescência mKate, que quando excitado por uma onda de 588nm emite luz a 633 nm.

a. Geração de Vetor Lentiviral para a produção de células bioluminescentes

Vírions de lentivírus foram gerados por transfecção da linhagem de empacotamento 293METR com plasmídeos expressando *FfLuc* (86) e mKate S158A, vetor de empacotamento pCMV-dR8.2 e vetor envelope pCMV-VSVG (vide mapa em Anexo 7.1), usando Lipofectamina-2000 (Invitrogen, EUA). Sobrenadantes foram coletados 48 e 72 horas após o início da transfecção e filtrados em membrana de náilon 0.45µm (Millipore, EUA). Após, os sobrenadantes são concentrados usando filtros Amicon Ultra -15 – 100KDa - (Millipore, EUA) centrifugados a 5000g por 15 minutos. A solução de vírions concentrada é aliquotada e congelada a -80°C.

b. Titulação do Lentivírus

Em uma placa de 24 poços foram colocadas cerca de 30.000 células 293METR em 1mL de DMEM por poço e incubadas por 18 horas a 37°C. Após a incubação, o meio era removido e 500µL de meio novo era adicionado. Diluições seriadas do vetor lentiviral foram realizadas e adicionadas aos poços com Polybrene (Sigma-Aldrich, EUA), a fim de aumentar a eficiência da transdução. Após, a placa foi centrifugada por 1,5 horas a 2000RPM em centrífuga refrigerada a 4°C e colocada em estufa a 37°C por 3 dias. Então as células foram tripsinizadas e coletadas para medir a expressão de mKate por citometria de fluxo. A concentração de vetores virais foi calculada como Unidades Transdutoras (TU) por mL=%mKate positivo x 30.000 células/volume de vetor viral usado.

c. Transdução das Células Tumorais

Células DAOY foram cultivadas em meio completo até atingirem uma confluência de 80%. O lentivírus foi adicionado, na presença de Polybrene, a uma Multiplicidade de Infecção (MOI) de 5. O volume foi calculado de acordo com as seguintes equações:

$$- (\text{número de células por placa}) \times (\text{MOI desejado}) = \text{Total de TU necessárias};$$

$$- (\text{Total de TU necessárias}) / (\text{TU/ml calculada na titulação}) = \text{mL de partículas lentivirais por poço}.$$

A transdução foi realizada da mesma forma que fora feita a titulação. As células positivas para FfLuc/mKate foram separadas por citometria de fluxo, com base na fluorescência do mKate, usando um BD Influx Cell Sorter (BD Biosciences, EUA). Depois de feita a separação as células eram colocadas em cultura com o mesmo meio usado para as DAOY.

A atividade da luciferase nas células DAOY positivas para mKate foi analisada por emissão de bioluminescência em um contador TopCount Gamma (Packard, EUA). Após a adição de 140µg/mL de D-Luciferina (Sigma-Aldrich, EUA) a placa foi coberta e incubada por 10 minutos a 37°C, então analisamos a emissão de luz no contador.

9.1.8 Modelo Animal

a. Animais utilizados

Esses experimentos foram aprovados pelo comitê institucional para uso e cuidado animal do MDACC, sob o número 061106331. Foram usados camundongos imunodeficientes NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ JAX), obtidos do *The Jackson Laboratory* (EUA) e mantidos e reproduzidos em área livre de patógenos aprovada pela AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) no MDACC. Os animais usados para os experimentos tinham entre 4 e 6 semanas de vida e consumiam dieta livre de alfafa, a fim de evitar a *background* de autofluorescência gerada por esse vegetal (87).

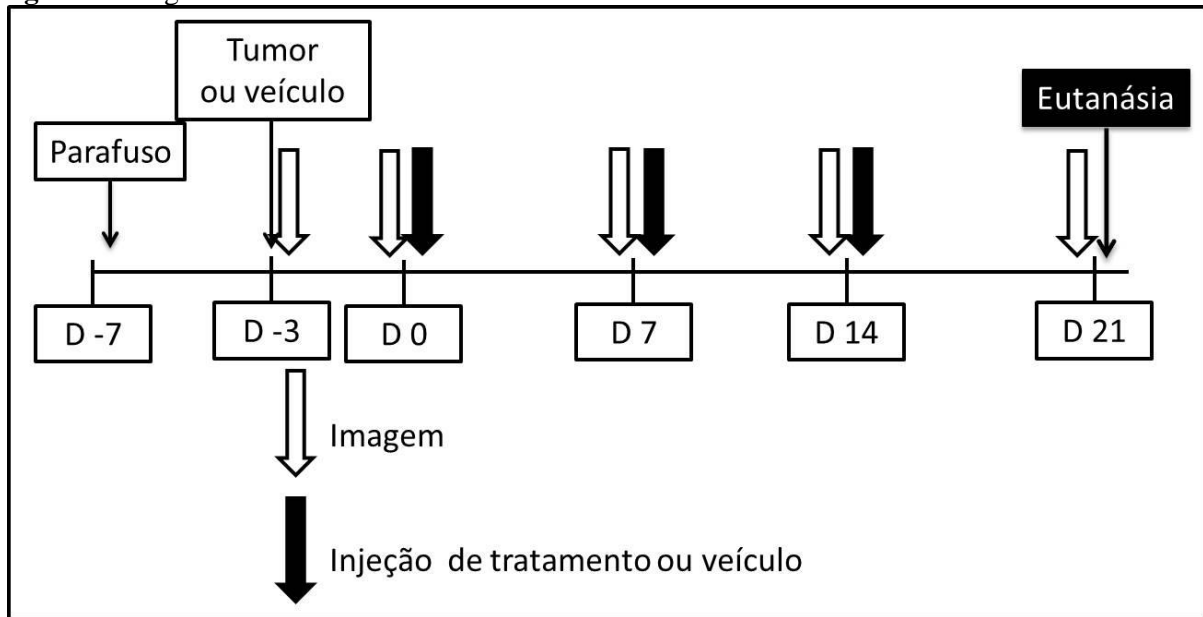
b. Descrição do modelo animal

O modelo animal utilizado foi o descrito por Lal e colaboradores (88), com modificação do local de injeção para 2mm posterior e 1mm lateral à sutura lambda, a fim de alcançar o cerebelo. Resumindo o método, os animais são anestesiados com isoflurano a 5% na indução e 2% para manutenção, então é aberta uma cavidade no crânio usando uma microfuradeira cirúrgica (Ideal Micro-Drill™, Harvard Apparatus, EUA), onde é colocado um parafuso-guia (PlasticsOne, EUA). Após 7 dias os animais foram separados em 3 grupos: tumor (n = 10), células NK (n = 10) e tratamento (n = 15) . O tamanho amostral foi calculado pelo departamento de estatística do MDACC, utilizando o *software* STATA 12 (StataCorp LP, EUA), com um nível de significância de 5% e poder de 90%.

Os grupos tumor e tratamento receberam 100.000 células DAOY marcadas com ffLuc, ressuspendidas em 3µL de meio. O grupo células NK recebeu 3µL de meio. A injeção das

células foi feita usando uma bomba de infusão (Harvard Apparatus) a uma velocidade constante de 30 μ L/hora. Após 5 dias da injeção do tumor, os grupos tratamento e células NK receberam 400.000 células NK em 3 μ L de meio a cada 7 dias por 3 semanas, enquanto que o grupo tumor recebeu só o meio (Figura 5). Após 21 dias os animais foram sacrificados em câmara de CO₂.

Figura 5: Diagrama do modelo animal



c. Análise *in vivo*

Para certificar-se de que as células NK foram injetadas no cerebelo e testar sua persistência, fizemos a primeira injeção de células NK marcadas com o marcador fluorescente DiR (Life Technologies, EUA), de acordo com instruções do fabricante (n = 3). A presença e persistência das células foi avaliada usando o equipamento IVIS Spectrum (Caliper, EUA) com conjunto com o software Living Image (Xenogen, EUA).

Avaliou-se o tamanho do tumor com base na bioluminescência das células tumorais marcadas com FfLuc em presença de D-Luciferina, medida pelo IVIS Spectrum. Para avaliar a mudança de tamanho dos tumores, normalizamos a emissão do dia 0 e a partir daí analisamos os dados.

d. Histopatologia

Os cerebelos dos animais foram fixados com formaldeído e enviados à divisão de patologia veterinária do MDACC para inclusão em parafina, secção e marcação. As lâminas

seccionadas foram marcadas por H&E, anticorpos anti CD45 humano (Leica, EUA), anti Ki67 humano (Leica, EUA), anti Caspase-3 clivada murina/humana (Biocare Medical, EUA) e anti GFAP murina/humana (Cell Signaling, EUA). As imagens foram analisadas por um patologista. As lâminas de H&E e CD45 foram analisadas usando o sistema ImageScope (Aperio, EUA). As demais foram adquiridas usando o microscópio Eclipse Ti (Nikon, EUA) e analisadas com o software NIS Elements (Nikon, EUA).

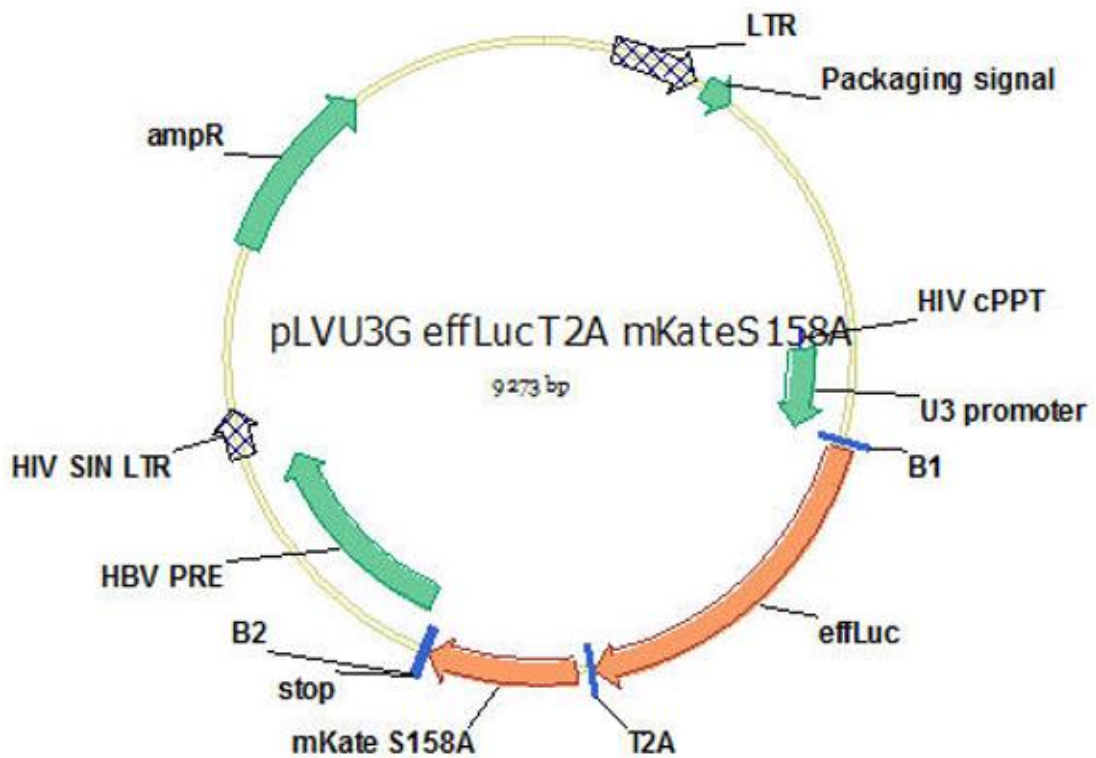
9.1.9 Ensaios de Mecanismo de Resistência à Atividade NK

Os ensaios para desvendar o mecanismo de resistência das células NK (RNA de Interferência e PCR quantitativo) foram realizados por William B. Brugmann do MDACC para cumprir exigências feitas pelos revisores do artigo.

9.1.10 Financiamento

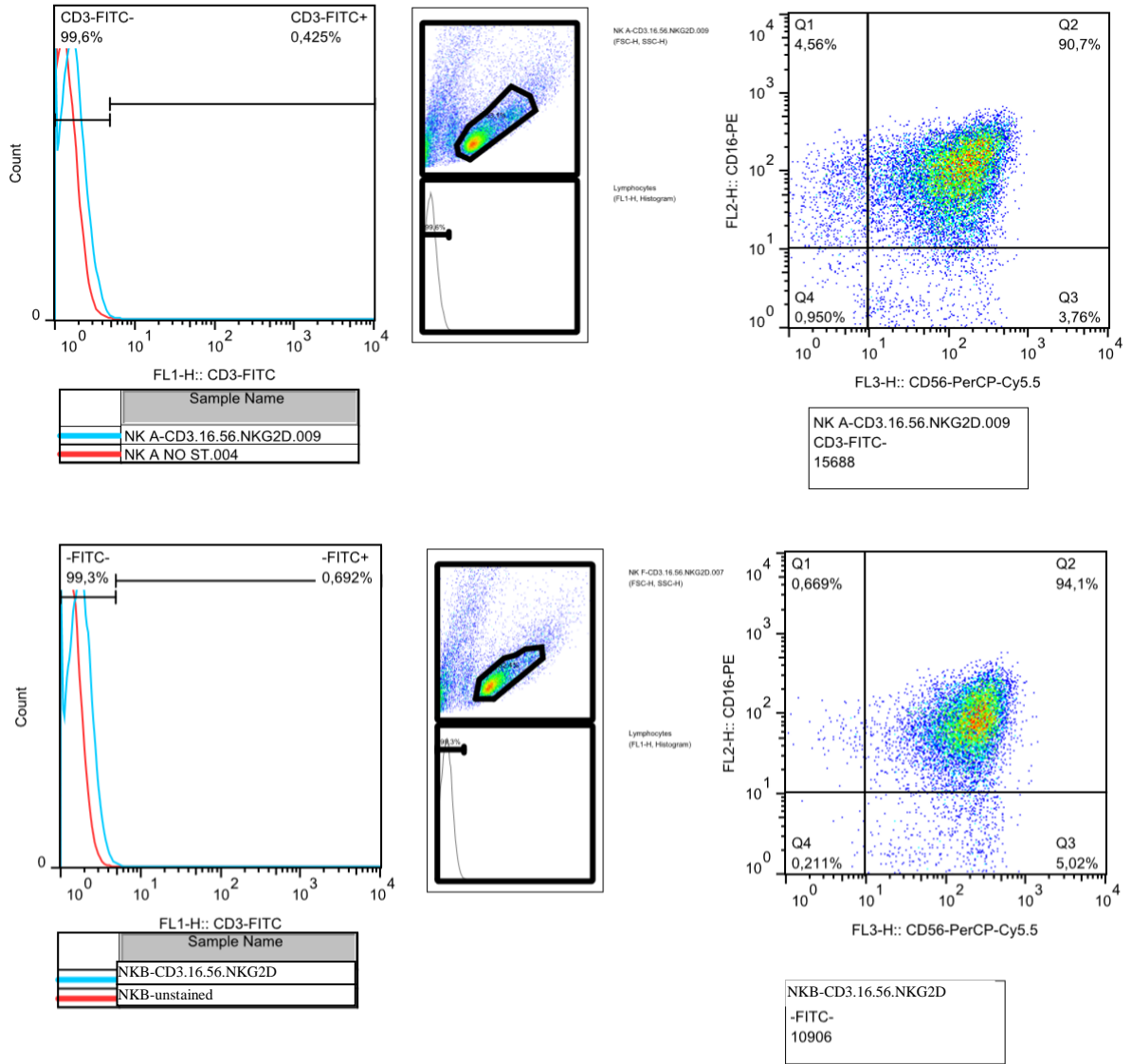
Esse estudo foi possibilitado pelos seguintes financiadores CAPES, DECIT/MS, CNPq, Addis Faith Foundation, St. Baldrick's Foundation e National Institutes of Health.

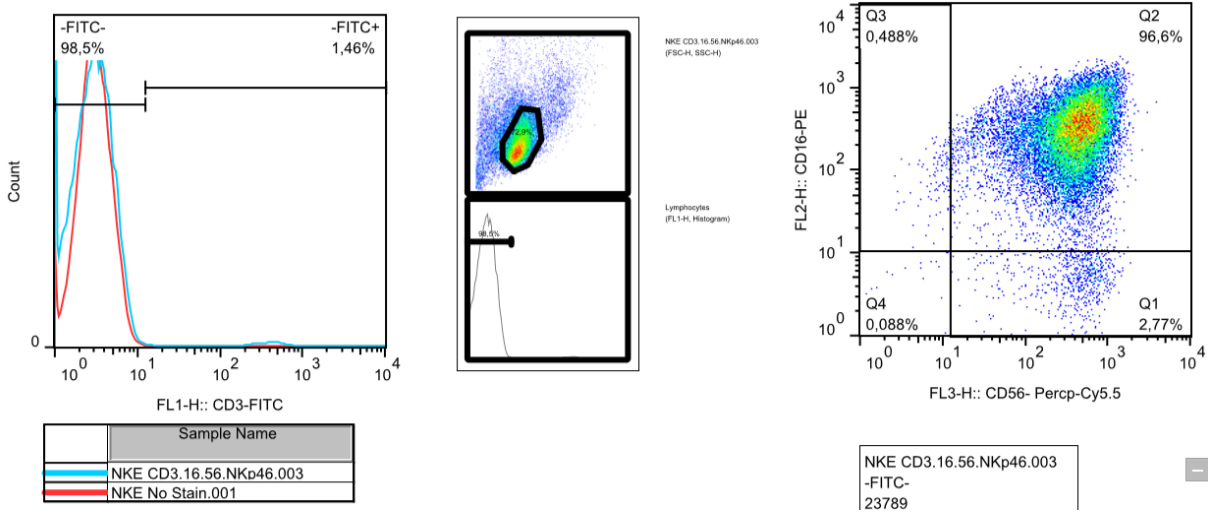
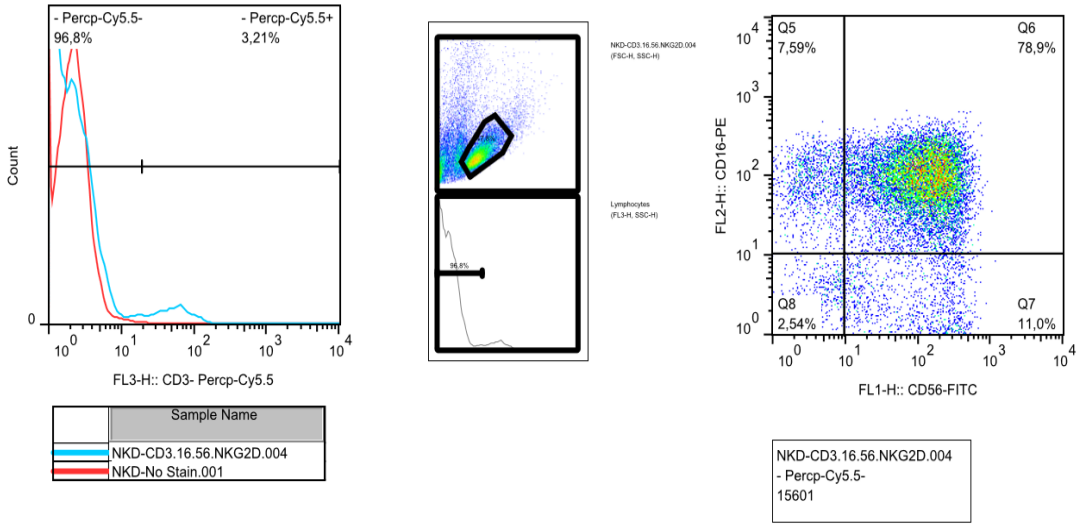
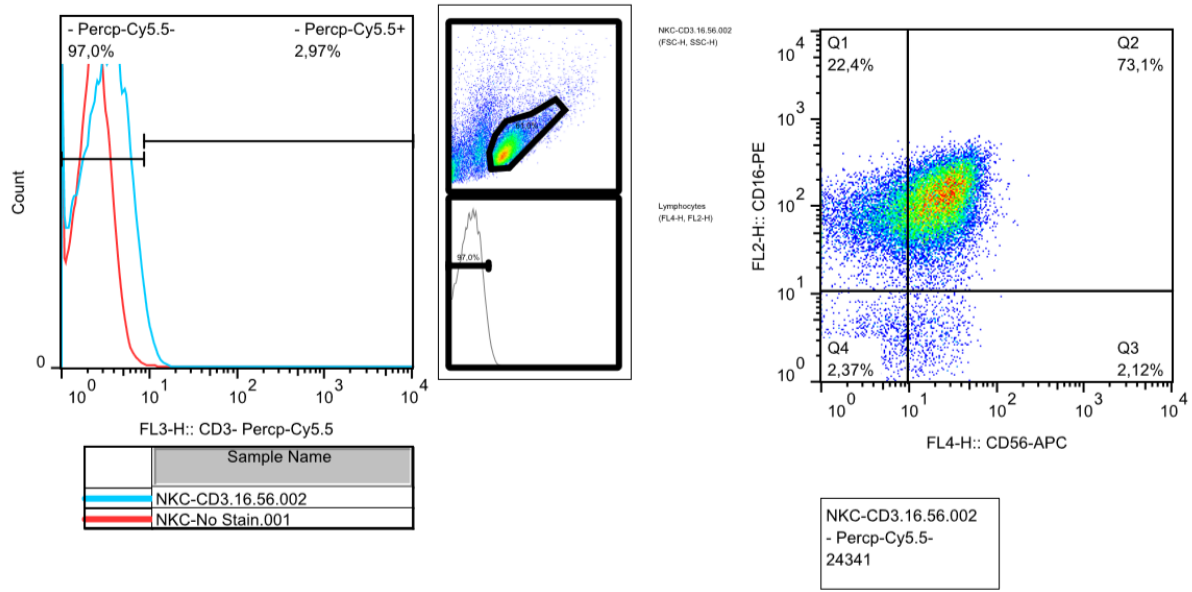
9.2 ANEXO 2: MAPA DO PLASMÍDEO PARA PLVU3G-EFFLUC-T2A-MKATES158A.



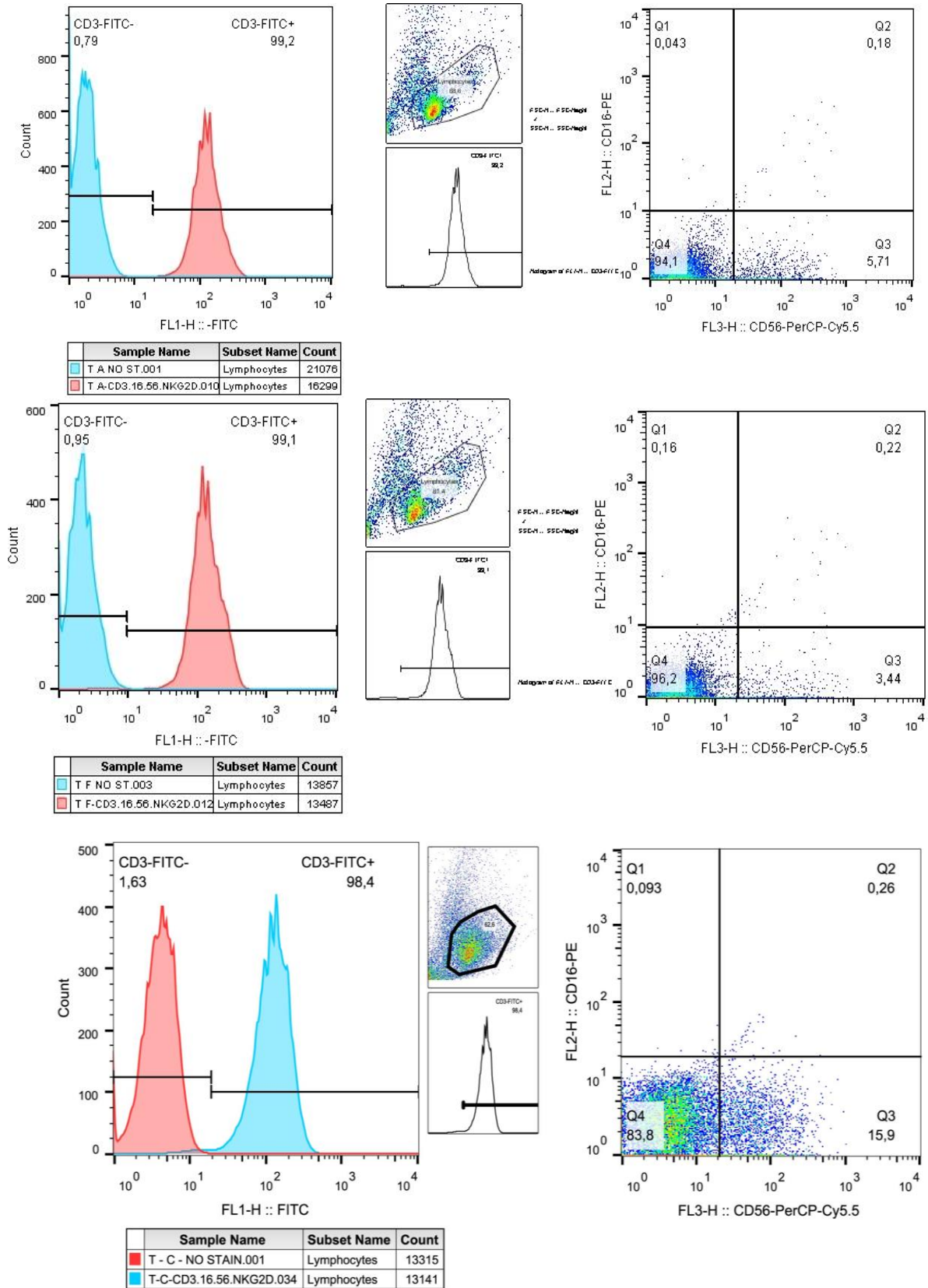
Legenda: LTR: *long terminal repeat*; HIV cPPT: *HIV central polypurine tract*; B1: *Gateway donor site B1*; effLuc: *enhanced firefly Luciferase*; T2A: *T2A ribosomal slip site*; mKate S158A: proteína de fluorescência mKate aperfeiçoada; B2: *Gateway donor site B2*; HBV PRE: Elemento pós-translacional regulatório de Hepatite B; HIV SIN LTR: *HIV self-inactivating long terminal repeat*; ampR: resistência à ampicilina (β -Lactamase).

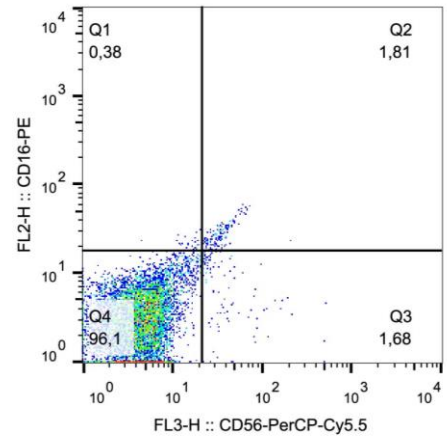
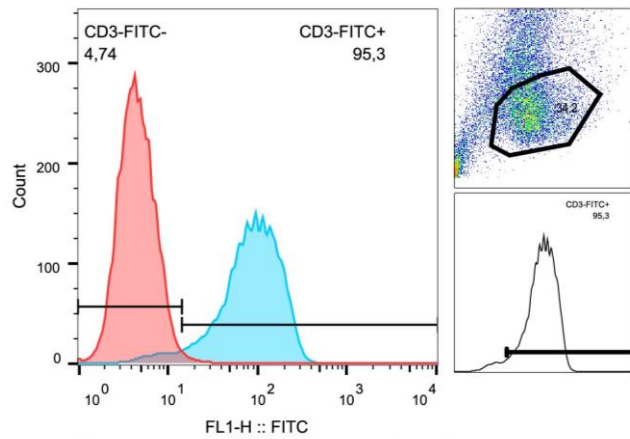
9.3 ANEXO 3: RESULTADOS DAS IMUNOFENOTIPAGENS DAS CÉLULAS NK POR CITOMETRIA DE FLUXO.



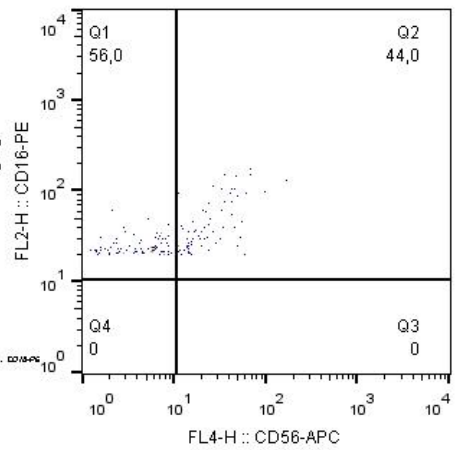
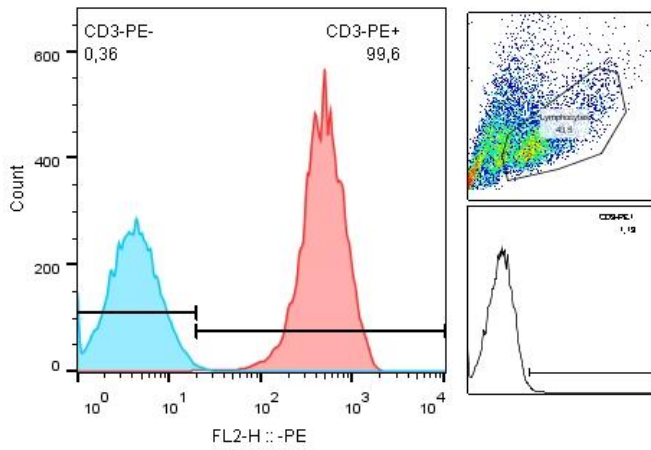


9.4 ANEXO 4: RESULTADOS DAS IMUNOFENOTIPAGENS DAS CÉLULAS T POR CITOMETRIA DE FLUXO





Sample Name	Subset Name	Count
T-E-NORM- NO STAIN.009	Lymphocytes	9149
T-E-CD3.16.56.NKG2D.036	Lymphocytes	7256



Sample Name	Subset Name	Count
TE-no stain.004	Lymphocytes	12330
TE-CD3.16.56.005	Lymphocytes	18458