

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ESTUDOS SOBRE O ISOLAMENTO E EXPANSÃO DE CÉLULAS *NATURAL KILLER* (NK) DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO NA PRESENÇA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS

Juliana Monteiro Furlan

Porto Alegre
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ESTUDOS SOBRE O ISOLAMENTO E EXPANSÃO DE CÉLULAS *NATURAL KILLER* (NK) DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO NA PRESENÇA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS

Juliana Monteiro Furlan

Orientador: Prof. Dra Lúcia Mariano da Rocha Silla

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2016

RESUMO

Introdução: A célula NK possui uma importante função no sistema imune inato de defesa primária contra vírus e patógenos e também realiza a imunovigilância tumoral. Muitos estudos clínicos tem avaliado o uso dessas células na imunoterapia adotiva.

A expansão e a ativação da célula NK requer sinais e estímulos para manter a sua sobrevivência. Atualmente existem muitos protocolos para a expansão e ativação da célula NK, porém não existe uma definição do melhor método para uso clínico.

Objetivo: O estudo tem como objetivo avaliar a melhor forma para expansão das células NK isoladas de células mononucleares do sangue de cordão umbilical e placentário.**Método:** Foram avaliadas cinco diferentes condições para expansão de células NK de mononucleares isoladas do sangue do cordão umbilical e placentário. Foram testados protocolos utilizando as interleucinas (IL), IL-2, IL-3, IL-15; com ou sem a presença do co-cultivo com células-tronco mesenquimais do cordão umbilical (CTM-CU) e, também o co-cultivo com células apresentadoras de antígeno artificiais ligadas a IL-21 à membrana (mbIL21 APC).

Resultados: Os protocolos utilizando co-cultivo com APC mbIL21 foram superiores aos demais quanto à capacidade de expansão de células NK (CD3-, CD56+, CD16+). O protocolo de co-cultura de APC, CTM-CU e estímulo com IL-2 apresentaram um aumento significativo de NK (CD3-, CD56+, CD16+) quando comparado ao protocolo de APC/IL-2 sem CTM-CU ($p < 0,05$). **Conclusão:** A expansão *ex vivo* de células NK na presença das APC e CTM-CU apresentaram uma proporção estatisticamente superior de célula NK CD16+ quando comparada com condições de cultivo com apenas a APC, tendo essas células NK potencial para utilização na imunoterapia adotiva associada com anticorpos monoclonais ou anticorpos bi-específicos.

Palavras-chave: Células *Natural Killer*. Sangue de Cordão Umbilical. Células-tronco Mesenquimais. Imunoterapia.

ABSTRACT

Background: Natural killer (NK) cells play a major role in innate immunity, especially against viral pathogens, and are also a part of the immune surveillance of tumors. Several clinical trials have evaluated the use of these cells for adoptive cell immunotherapy. Ex vivo expansion of NK cells, however, is a complex process which requires multiple cell signals to ensure cell survival, proliferation, and activation. There are many protocols used for NK cell expansion and activation, however, there is a lack of evidence regarding which method is the most effective for clinical grade NK cells expansion. **Objective:** The main purpose of this study is to evaluate an optimal protocol for the ex vivo expansion of NK cells isolated from umbilical cord blood mononuclear cells (CB-MNC). **Methods:** Five different conditions for the expansion of umbilical cord-derived NK cells were evaluated. Each protocol was a different combination of interleukins (IL-2, IL-3, and IL-15) with or without the presence of feeder cells or artificial antigen presenting cells (aAPCs). Feeder cells utilized were umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UC-MSC), and aAPCs were membrane-bound IL-21 artificial APCs (mbIL21 aAPCs). **Results:** Protocols employing mbIL21 aAPCs demonstrated greater expansion of natural killer cells (CD3⁺ CD56⁺) than the other protocols. The protocol employing aAPCs, IL-2 and UC-MSC feeder cells had a statistically significant higher proportion of CD16⁺ NK cells when compared to the protocol without the MSC feeder cells, but there was no significant difference in the expansion of total natural killer cells concerning these two protocols. **Conclusion:** Ex vivo expansion of NK cells in the presence of aAPCs and UC-MSC feeder cells yielded a significant higher proportion of CD16⁺ NK when compared to the aAPCs only culture condition, and could be a better product for NK adoptive immunotherapy in conjunction with monoclonal or bi-specific antibodies.

Key Words: Natural killer cell, umbilical cord blood, mesenchymal stem cells, Immunotherapy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática da diferenciação das células NK.. Adaptado de. Montaldo E, Zotto G Del, Chiesa M Della, Mingari MC, Moretta A, Maria A De, et al. Human NK cell receptors/markers: A tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytom Part A*. 2013;83(8):702–13 13
- Figura 2. Adaptado de Punt J, Owen J, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22(11):633–40.(27)..... 15
- Figura 3. Adaptado De Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):239–52. 17
- Figura 4. Figura esquemática da estrutura do cordão umbilical.27
- Figura 5. Adaptada de Mennan C, Wright K, Bhattacharjee A, Balain B, Richardson J, Roberts S. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. *Biomed Res Int*. 2013;2013.....27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Receptores e Ligantes KIR humano	19
Tabela 2. Receptores de lectina tipo C e receptores de citotoxicidade natural.	20

LISTA DE SIGLA E ABREVIATURAS

ADCC - *Antibody-dependent Cell-mediated cytotoxicity* (Citotoxicidade Celular Mediada por Anticorpo)

aAPC - *artificial antigen presenting cells* (Células apresentadoras de antígenos artificial)

CB-MNC – *Cord Blood – Mononuclear cells*

CD - *Cluster of differentiation*

EVL - Enxerto contra a leucemia

CTH - Célula-tronco hematopoética

CTM - Célula-tronco mesenquimal

CU - Cordão umbilical

DECH - Doença do enxerto contra o hospedeiro

GW - Geleia de Wharton

HLA - *Human leukocyte antigen* (Antígeno leucocitário humano)

IL- Interleucina

IMF - Intensidade média de fluorescência

ITAM - *Immunoreceptor tyrosine- based activation motif*

ITIM - *Immunoreceptor tyrosine- based inhibition motif*

iNK – células Natural Killer imaturas

LMA - Leucemia mieloide aguda

LLA - Leucemia linfóide aguda

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

MNC – Células *Mononucleares*

mNK – células Natural Killer maduras

MO - Medula óssea

MSC - *Mesenchymal Stem Cell*

NCAM - Molécula de adesão das células neurais

NK - *Natural Killer*

NKP - Precursores da célula Natural Killer

KIR - *Killer-immunoglobulin liker receptor*

SP - Sangue periférico

SCUP- Sangue de cordão umbilical e placentário

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TCTH - Transplante de células-tronco hemapoéticas

UC-MSK - *Umbilical Cord - Mesenchymal Stem Cell*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES ...	11
2.2 Sistema Imunológico	12
2.3 Função e mecanismo de ação da célula NK	13
2.4 Receptores da Célula NK.....	16
2.4.1 Receptor KIR (<i>killer immunoglobulin-like receptors</i>)	17
2.4.2. Receptores de lectina (<i>C-type lectin receptor family</i>).....	19
2.4.3. Receptores de citotoxicidade natural	19
2.5. Sistema HLA - <i>Human Leukocyte Antigen</i>	20
2.6. Fontes de Células NK	21
2.7. Células NK e transplante de células-tronco hematopoéticas	22
2.8 Protocolos de expansão da Célula NK.....	24
2.9 Células tronco-mesenquimais	25
2.9.1 Isolamento das Células-Tronco Mesenquimais	28
2.9.2 Terapia Celular com: Células-Tronco Mesenquimais	28
2.10 Interação Células-Tronco Mesequimais e Células NK	29
3 MARCO TEÓRICO	30
4 JUSTIFICATIVA	31
5 OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo Geral	32
5.2 Objetivos Específicos.....	32
6 ESQUEMA DO ESTUDO	33
7 REFERÊNCIAS	34
8 ARTIGO EM INGLÊS	43
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
10 PERSPECTIVAS FUTURAS	59
11 ANEXOS	60

1 INTRODUÇÃO

As células Natural Killer (NK), desde a sua identificação em 1975 por Herberman, foram classificadas como linfócitos com base na sua ação citotóxica (1,2). Fenotipicamente definidas pela expressão da molécula de superfície CD56 e ausência do CD3, estão envolvidas na resposta primária contra células tumorais e infecções virais. Também estão descritas como linfócitos granulares envolvidos na imunidade inata, tendo funções efetoras na secreção de interferon gama (IFN- γ) e citotoxicidade dependente de perforina. No sangue periférico, correspondem a 10 - 15% de todos os linfócitos (3). As células NK humanas foram caracterizadas em duas subpopulações celulares que se diferenciam pela expressão da molécula de superfície CD56 ou NCAM (molécula de adesão celular neural), sendo classificadas como mais imaturas as que expressam uma maior densidade de CD56, denominadas de CD56^{bright} e, maduras, as células com baixa densidade de CD56, denominadas CD56^{dim}. Caligiuri e colaboradores (2006), sugerem que o desenvolvimento das células NK ocorre a partir da célula-tronco hematopoética CD34⁺ em CD56^{bright}, e a sua maturação ocorre em quatro etapas (4). Acredita-se que a célula NK CD56^{bright} seja o precursor da CD56^{dim}. Tal desenvolvimento foi sugerido porque a célula CD56^{bright} possui telômeros mais longos que as células CD56^{dim} (5).

Embora inicialmente as células CD56^{bright} e CD56^{dim} tenham sido considerados como diferentes estágios de maturação da célula NK, atualmente também sugere-se que são um subconjunto de células funcionalmente distintas e possuem um perfil de receptores distintos, podendo transitar entre os fenótipos (5). Além disso, as células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} apresentam diferenças no seu perfil citotóxico e na capacidade para a produção de citocinas (6).

As células NK vem sendo empregadas como uma das principais alternativas para pacientes não respondedores da terapêutica padrão contra a leucemia mielóide e, também, como adjuvante ao uso de anticorpos monoclonais ou anticorpos bi-específicos para direcionar a ação da célula NK na transferência adotiva de células NK autólogas ou alogênicas (7–11).

A imunoterapia celular como alternativa terapêutica cresceu significativamente ao longo das últimas décadas. O principal desafio na terapia celular com a transferência adotiva de células imunes é o pequeno número obtido das possíveis

fontes de coleta, além das dificuldades com a produção de células em larga escala seguindo as Boas Práticas de Manufatura (Good Manufacturing Practices - GMP) (12–14). Boissel *et al.*, (2008) demonstraram que as células-tronco mesenquimais (CTM) do tecido do cordão umbilical apresentam a capacidade de estimular a expansão de células NK do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) *ex vivo* devido a sua capacidade de produção de diferentes citocinas (15). Considerando as dificuldades técnicas que envolvem o isolamento e expansão de células NK e a baixa disponibilidade dessas células no organismo torna-se necessário o desenvolvimento de protocolos para ativar e expandir este grupo celular (11,16).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Esta revisão está baseada nas principais características das células NK e na capacidade de expansão das células *NK* do sangue de cordão umbilical e placentário, sangue periférico e medula óssea e a sua utilização na imunoterapia adotiva. A busca de informações foi realizada nas bases de dados PubMed e SciELO, além da consulta de livros *on-line* e impressos, no período de publicação entre 1975 e 2016. Foram realizadas buscas utilizando os termos: human *natural killer*, mesenchymal stem cells, cord blood, peripheral blood, bone marrow, cellular immunotherapy, sendo utilizado 90 artigos e 2 livros para estruturar essa revisão bibliográfica.

		PUBMED		CAPES	
	1	623014	1	657.406	1
1. Cell therapy	3	507958	2	947.278	2
2. Cell proliferation	2	122791	3	31.915	2
3. Cell culture techniques	3	49799	4	97.258	2
4. Hematopoietic stem cell transplantation	2	265339	5	118.683	1
5. Immunotherapy	2	13025	6	118.683	2
6. Mesenchymal stem cell transplantation	3	51603	7	120.632	2
7. Natural killer cells	2	102179	8	45.514	1
8. Umbilical cord blood	3	31.003	1 + 4	30.242	2
	3	9781	1 + 7	7.520	2
	3	5.362	1 + 8	3.482	4
	5	2.803	2 + 6	490	2
	6	6.004	2 + 7	6.874	3
	5	5.159	2 + 8	1.656	1
	4	949	3 + 7	92	1
	2	2.284	3 + 8	198	1
	2	1419	4 + 7	1734	1
	2	3.556	4 + 8	3.323	0

2.2 Sistema Imunológico

A resposta do sistema imunológico a agentes como vírus e células tumorais é categorizada em inata ou adaptativa. As diferentes populações de linfócitos são caracterizadas pela expressão de proteínas de superfície, denominadas CD – *Cluster of Differentiation*. Dentro da família dos linfócitos, estão presentes os linfócitos T, que possuem duas populações funcionalmente distintas: T *helper* (CD3⁺/CD4⁺) e T citotóxicos (CD3⁺/CD8⁺). A estimulação antigênica das células T *helper* resulta na secreção de citocinas, com a função de auxiliar na diferenciação e proliferação celular, também ativando outras células como linfócitos B (CD19⁺/CD20⁺) e macrófagos (37). Ainda dentro da população dos linfócitos T, está inserida a população das células T regulatórias, com a função de inibir a resposta imune. A célula NK, pertence à família dos linfócitos CD3⁻, sendo consideradas como não linfócito T e não linfócito B. Então, as células NK pertencem à terceira classe de linfócitos e realiza a resposta imune imediata (imunidade inata) contra vírus, bactérias e células tumorais (17,18). A resposta imune adaptativa necessita que os antígenos sejam processados e apresentados aos linfócitos através das células apresentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cells* - APCs) (37). As análises imunofenotípicas e genotípicas das células NK são importantes ferramentas para a identificação e definição da população NK mais alorreativa, através da análise do perfil de receptores ativadores e inibidores (19). A caracterização da célula NK isolada de diferentes tecidos possibilita a investigação dos diferentes estágios de diferenciação, permitindo inferir que a célula CD34⁺ ou célula comprometida com a linhagem NK pode circular da medula óssea para o sangue periférico, onde sofre, a diferenciação (17).

Montaldo e colaboradores (2013) sugeriram que é possível identificar três etapas distintas de diferenciação da célula NK: precursores de células NK (NKP), células NK imaturas (iNK) e células NK maduras (mNK), através da análise dos seus marcadores, conforme modelo proposto (**Figura 1**)(17).

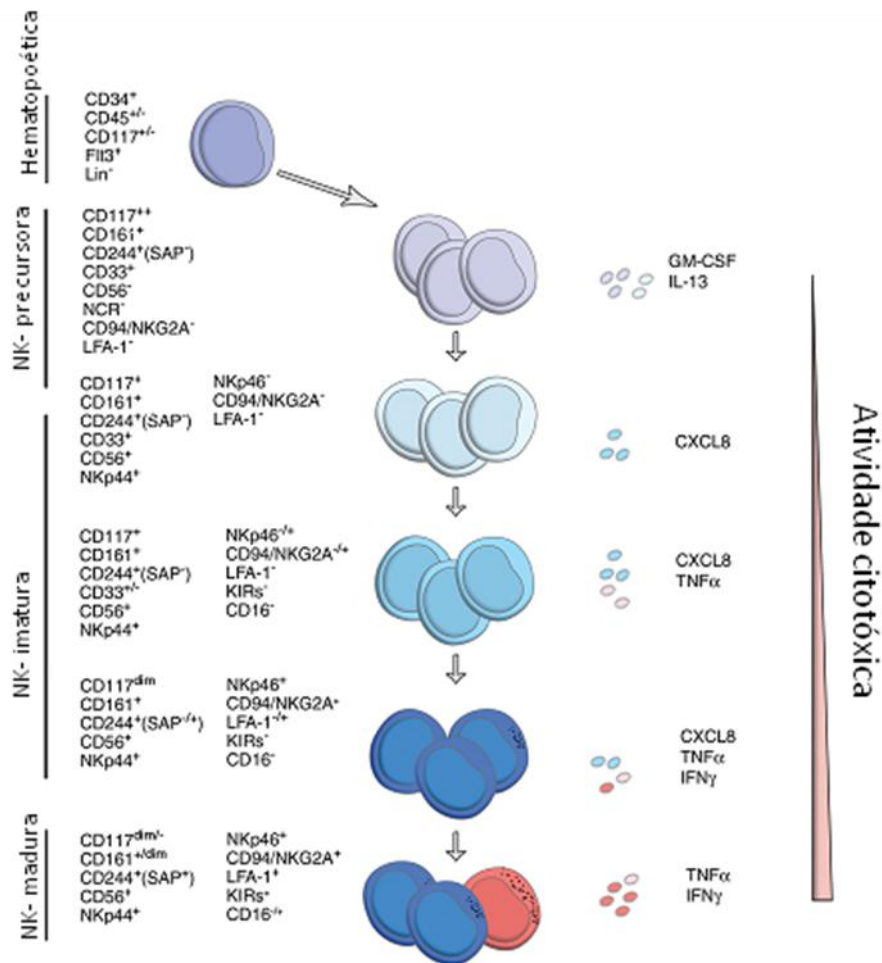
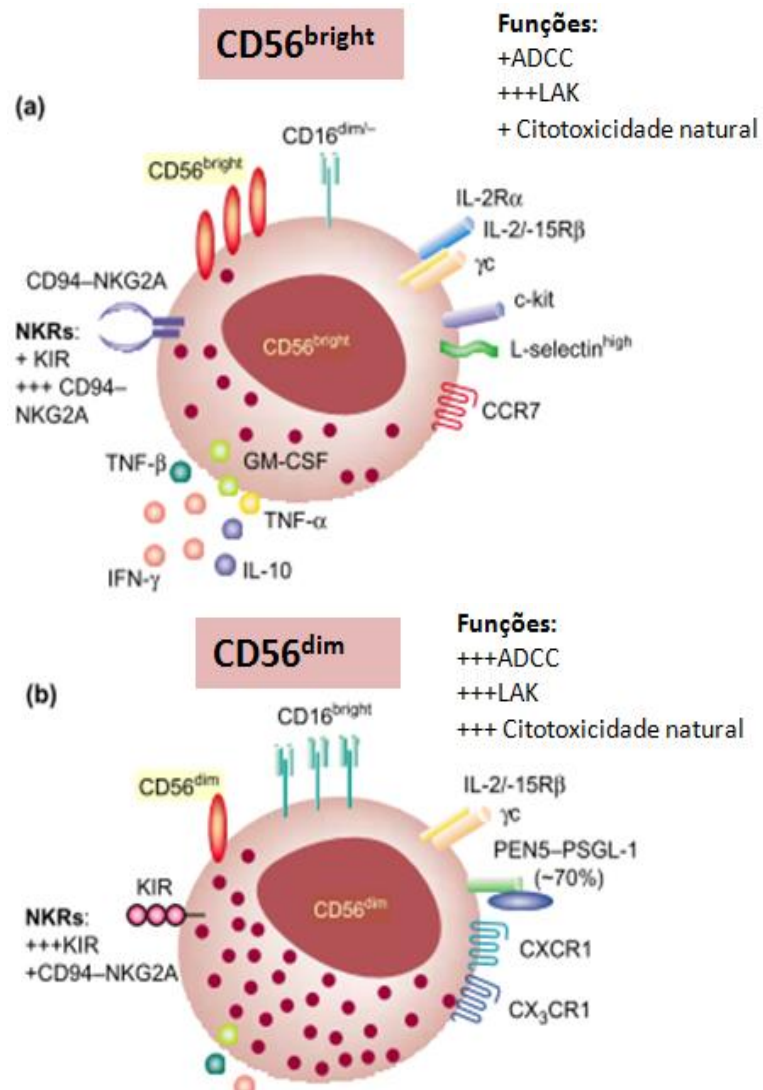


Figura 1. Representação esquemática da diferenciação das células NK. Células CD34+ cultivada na presença de interleucinas SCF, Flt3-L, IL-7, IL-15 (1 o-IL-21). Adaptado de Montaldo E, Zotto G Del, Chiesa M Della, Mingari MC, Moretta A, Maria A De, et al. Human NK cell receptors/markers: A tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytom Part A*. 2013;83(8):702–13

2.3 Função e mecanismo de ação da célula NK

A célula NK está envolvida diretamente no controle inicial contra infecções virais e na imunovigilância tumoral, podendo agir diretamente contra a célula alvo tumoral ou mediar a resposta *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC) por meio da ligação de receptores de membrana à porção Fc γ RIIIa (CD16) da célula NK, sendo esse expresso em grande parte das células NK citotóxicas (18). O sistema de vigilância tumoral foi descrito pela primeira vez pelos imunologistas Macfarlane Burnet e Lewis Thomas (1957), propondo que a função do sistema imunológico é reconhecer células modificadas antes que elas se transformem em

tumores. Este conceito é apoiado por estudos experimentais, os quais demonstraram que quando os ratos foram depletados de células NK, estes apresentavam maior crescimento tumoral (20). Observa-se, também, maior incidência de tumores em humanos com imunodeficiências que afetam as células NK (20,21). Sabe-se que 90% das células NK humanas são CD56^{dim} e expressam alta densidade de CD16⁺, enquanto a menor parte, é composta por são CD56^{bright}, com CD16 de baixa ou nenhuma expressão (3). Estudos recentes relatam que as células CD56^{dim} podem ser funcionalmente aprimoradas pelas interações entre células-superfície, tais como: receptores KIRs ativadores e inibidores, NKG2A e HLA I (10,22). Essa habilidade foi descrita como "*licensing*" (licenciamento ou educação), sendo a célula NK influenciada diretamente pela rede de sinalização, acrescentando a essas um novo nível de heterogeneidade funcional. Embora as células NK sejam classificadas como células do sistema inato, suas características funcionais são semelhante às características dos linfócitos citotóxicos, células envolvidas com o sistema imune adaptativo (22). Foi demonstrado, em estudo com modelo animal infectado pelo citomegalovírus (CMV), que após a transferência adotiva de células NK, estas células podem residir em órgãos linfóides e não linfóides durante meses, revelando consonância com a função anteriormente atribuída somente às células envolvidas no sistema imune adaptativo (23,24). As diferenças de expressão dos receptores entre as subpopulações estão bem caracterizadas, no entanto, o significado funcional *in vivo* destas não está completamente definido. A ação das células NK considera o balanço entre sinais dos receptores ativadores e inibitórios (11). A célula CD56^{bright}/CD16^{dim}, possui uma importante função imunorregulatória através da produção de citocinas, porém, são mediadores pouco eficientes na citotoxicidade e ADCC. Por outro lado, as células CD56^{dim}/CD16^{bright} produzem baixos níveis de citocinas e são potentes mediadores da ADCC e perfil morfológico mais granular que a CD56^{bright}. **(Figura 2)** (17). Quando essas células são estimuladas com altas concentrações de interleucinas, diferenciam-se em células matadoras ativadas por linfoquina (células - LAK) (7). O processo de maturação da célula NK também é caracterizado por aumento da capacidade citolítica e uma diminuição do potencial proliferativo, quando comparado com células mais imaturas (25–27).



A) Representação esquemática das funções da célula NK CD56^{bright}

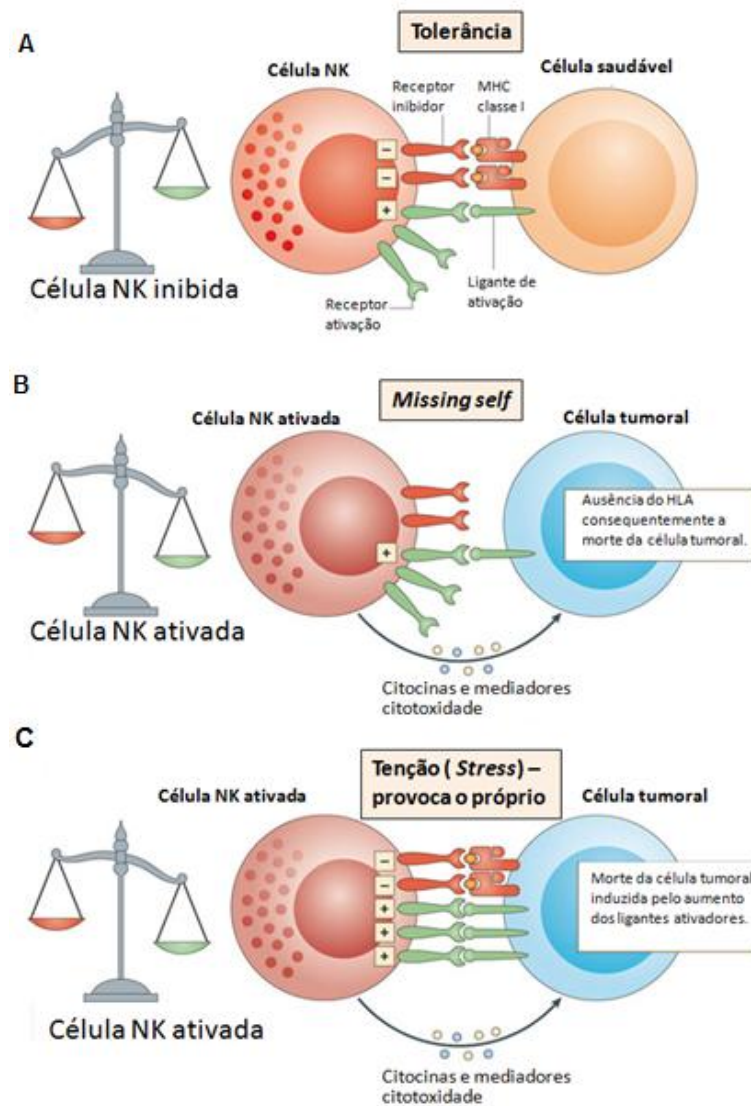
B) Representação esquemática das funções da célula NK CD56^{dim}

Figura 2. Adaptado de Punt J, Owen J, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol. 2001;22(11):633–40.(27)

2.4 Receptores da Célula NK

Os receptores das células NK podem ser funcionalmente caracterizados pela sua especificidade de reconhecer a molécula do Complexo maior de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* - MHC) classe I, sendo capaz de distinguir entre nenhuma, baixa ou altas quantidades dessa (28,29). A célula NK é regulada pelos seus receptores de superfície ativadores e inibidores e sua capacidade de interação com o MHC (30). Através da sua interação com o MHC, a célula NK tem a capacidade de reconhecer os tecidos próprios (*self*) e não próprios (*non-self*), protegendo as células-alvo da lise mediada pela célula NK (30,31). Dessa forma, células tumorais ou células infectadas por vírus que possuem baixa expressão ou não expressam o MHC, tornam-se alvos potenciais da célula NK (**Figura 3**). Esse sistema de reconhecimento foi proposto pelo pesquisador Karre 1990, como a teoria do *missing self* (32).

Nos seres humanos, três famílias de receptores foram identificadas: a primeira família descrita é a killer immunoglobulin (Ig)-like receptor (KIR), a qual reconhece, principalmente, HLA-A, HLA-B e HLAC, moléculas clássicas de MHC I; a segunda família é a de receptores de lectina do tipo C (*C-type lectin receptor family*) que reconhece HLA-E, molécula não clássica de MHC I; e a terceira família é a dos receptores de citotoxicidade natural (NCR), cujos ligantes ainda são pouco conhecidos (3,6,33). O conhecimento das interações das células NK expandidas e seus ligantes durante fase de expansão celular, tem grande importância para a terapia celular.



- Ocorre a ligação de receptores inibitórios ao MHC I, sendo que estes estão expressos em maior quantidade que os receptores ativadores, regulando negativamente a célula NK.
- Receptores de ativação ligam-se ao seu sítio de ligação na célula-alvo e o receptor inibitório não encontra o seu ligante, ocasionando o ataque contra a célula-alvo.
- Receptores de ativação encontram um número maior de ligante que os receptores de HLA, ocasionando a destruição da célula-alvo.

Figura 3. Adaptado De Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(4):239–52.

2.4.1 Receptor KIR (*killer immunoglobulin-like receptors*)

Pertence à superfamília de imunoglobulinas e subdivide-se em dois ou três domínios de Ig-like extracelulares, respectivamente KIR2D e KIR3D, os quais podem

ter um domínio citoplasmático de ativação, denominado curto = *short* (S) ou de inibição, denominado longo = *long* (L). Os *receptores* KIR são codificados por 15 genes e 2 pseudogenes, localizados no cromossomo 19q13.4. A expressão dos genes KIR ocorre de forma aleatória, podendo as células NK expressarem o produto da combinação de dois ou mais genes (10). Os receptores KIR de ativação (ex: KIR2DS, KIR3DS) ligam-se a uma proteína transmembrana, denominada DAP12, que possui um motivo de ativação do receptor baseado em tirosina ITAM (*Immunoreceptor tyrosine- based activation motif*) (3). A ligação do receptor KIR com o seu ligante acarreta fosforilação dos resíduos de tirosina ITAM, ativando a célula NK. Os receptores KIR inibitórios (ex: KIR2DL, KIR3DL) possuem um motivo inibidor, também baseado na tirosina ITIM (*Immunoreceptor tyrosine- based inhibition motif*) (3). A inibição ocorre, quando o ligante se associa ao KIR e a tirosina no seu ITIM é fosforilada, permitindo que fosfatases intracelulares inibam a sinalização celular (7,22). Os receptores KIR inibidores possuem o repertório de ligantes bem estabelecidos, enquanto que os KIR ativadores ainda não foram completamente identificados. Os principais ligantes conhecidos são os do MHC classe I (Antígenos Leucocitários Humanos - HLA-C1, HLA-C2 e HLA-Bw4). Na **Tabela 1** estão apresentados os receptores KIR e seus respectivos ligantes. As células NK que expressam KIR inibitório e realizam interação com o HLA expresso em tecido autólogo, tornam-se "licenciadas" durante o seu desenvolvimento, enquanto que nas células NK não licenciada, o KIR inibitório está inativo. Após o licenciamento, a célula NK aumenta a sua capacidade citotóxica (alorreativa) contra alvos tumorais, aonde a expressão HLA é ausente, quando comparada com células não licenciadas (10,34). O receptor KIR inibitório (2DL1 ligante C2, 2DL2 e 2DL3 ligante C1 e 3DL1 ligante Bw4), é o principal alvo de investigação das interações e o consequente licenciamento (10,35). Wang e colaboradores (2016) demonstraram que as células NK, quando licenciadas, sustentam o seu estado ao serem expandidas *ex vivo* sem a presença de células que expressem o HLA. Observaram, também, que a interação KIR e seu ligante pode ocorrer durante a fase de expansão, podendo modificar o repertório de KIR ativador e inibidor (10). Muitos pesquisadores acreditam que o KIR inibidor está envolvido com o licenciamento da célula NK (10,20,34). A expressão do receptor KIR inibidor no sangue periférico parece estar envolvida com estágios mais tardios de diferenciação da célula NK, devido à observação de que células mais imaturas expressam primeiro o

CD94/NKG2A e, posteriormente, adquirem o KIR, enquanto que células completamente diferenciadas apresentam somente o KIR (28).

Tabela 1. Receptores e Ligantes KIR humano

Receptores	Ligantes	Sinal
KIR2DL1	HLA-C do grupo 2 (Cw2, 4, 5, 6 e outros)	Inibidor
KIR2DL2	HLA-C do grupo 1 (Cw1, 3, 7, 8 e outros)	Inibidor
KIR2DL3	HLA-C do grupo 1	Inibidor
KIR2DL5	Ainda não identificado	Inibidor
KIR3DL1	HLA-Bw4	Inibidor
KIR3DL2	A3, A11 e outros ainda não identificados	Inibidor
KIR3DL3	Ainda não identificado	Inibidor
KIR2DS1	HLA - C do grupo 2	Ativador
KIR2DS2	HLA - C do grupo 1	Ativador
KIR2DS3	Ainda não identificado	Ativador
KIR2DL4	HLA-G	Ativador
KIR2DS4	Ainda não identificado	Ativador
KIR2DS5	Ainda não identificado	Ativador
KIR3DS1	Ainda não identificado	Ativador

Fonte: Adaptado de Moretta L, Locatelli F, Pende D, Marcenaro E, Mingari MC, Moretta A. Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(3):764–71.

2.4.2. Receptores de lectina (*C-type lectin receptor family*)

Os receptores de lectina (*C-type lectin receptor family*), CD94/NKG2A receptor inibidor e o receptor NKG2D ativador possuem um papel na atividade da célula NK. Os genes CD94 e NKG2 estão localizados no cromossoma 12p13 e não apresentam polimorfismo (Tabela 2) (36).

2.4.3. Receptores de citotoxicidade natural

Receptores de citotoxicidade natural NCR são o NKP30, NKP44 e NKP46. Os genes desses receptores estão localizados dentro do MHC, no cromossomo 6 (Tabela 2) (22).

Tabela 2. Receptores de lectina tipo C e receptores de citotoxicidade natural.

Receptores	Ligante	Sinal
NKG2A	HLA-E	Inibidor
NKG2D	HLA-E	Ativador
NKP46	Ainda não identificados	Ativador
NKP44	Ainda não identificados	Ativador
NKP30	Ainda não identificados	Ativador

Fonte: Adaptado de Moretta L, Locatelli F, Pende D, Marcenaro E, Mingari MC, Moretta A. Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(3):764–71.

2.5. Sistema HLA - *Human Leukocyte Antigen*

A descoberta do MHC foi realizada por Jean Dausset e seus colaboradores em 1954, por meio das observações de rejeição de tecidos transplantados entre camundongos. A partir disso, verificaram como o corpo humano reagia à transfusão sanguínea, constatando que soros de indivíduos submetidos à transfusão aglutinavam os leucócitos do receptor. Observaram que anticorpos presentes reagiam com os antígenos expressos na superfície dos leucócitos. Após essas observações, os pesquisadores chegaram à conclusão que o MHC humano era composto pelo designado sistema de HLA (37).

Este sistema está localizado no braço curto do cromossomo 6 e compreende cerca de 200 genes presentes nos leucócitos em todas as células nucleadas de todos os órgãos e tecidos (37). A resposta imune utiliza-se das moléculas HLA classes I e II, apesar de possuir três regiões codificadoras. A expressão desse sistema ocorre de forma codominante, ou seja, os dois alelos herdados dos pais (pai e mãe) são expressos, sendo uma herança haplótipica, visto que é herdado e transmitido em bloco. Sendo assim, irmãos podem herdar os mesmos haplótipos HLA (probabilidade de 25%), denominados HLA-idênticos e, quando apenas tiverem um haplótipo e comum, são HLA-haploidenticos (probabilidade de 50%). O HLA classe I é expresso em quase todas as células nucleadas do organismo, enquanto o HLA classe II é expresso nos linfócitos B, células dendríticas, macrófagos, células de Langerhans e células tímicas. A função do HLA classe I é apresentar pequenas moléculas (peptídeo antigênico) estranhas ao receptor da célula T CD8⁺ (receptor: TCR) e também interagir com os receptores de inibição das células NK, evitando a

lise de células autólogas. (38). A identificação dos receptores e do HLA expresso em células-alvo possibilita a seleção dos grupos de células mais alorreativas para o transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) (39). A presença de células alorreativas foi documentada pela primeira vez por Ruggeri e colaboradores (40).

2.6. Fontes de Células NK

O sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP), o sangue periférico (SP) e a medula óssea (MO) são possíveis fontes de isolamento de células NK para a expansão e uso na imunoterapia celular (11,41). O SP é uma importante fonte de células NK, porém devido ao pequeno percentual de células NK disponíveis, necessita de maiores volumes e/ou coleta por aférese (11,42).

O SCUP possui um percentual maior de células NK em comparação com o SP, porém a quantidade celular obtida é menor, devido ao volume limitado das unidades de SCUP. Essa fonte de células é considerada não invasiva e com disponibilidade imediata, visto que o material a ser coletado seria desprezado e, também, devido ao grande número de bancos de células de cordão umbilical e placentário com material armazenado, disponível para o uso. As células NK do SCUP possuem uma menor capacidade citotóxica em comparação com as células NK do SP, o que pode estar associado à menor expressão do CD16⁺ (41). Deste modo, os protocolos de expansão de células NK de SCUP devem estar associados a métodos de ativação celular, tornando as células NK do SCUP comparáveis com as células NK do SP quanto à sua capacidade de expansão e ativação. As células NK do SCUP, antes da estimulação, possuem um fenótipo mais imaturo, podendo ser transformado em um fenótipo mais maduro, quando estimuladas (41).

A medula óssea é uma fonte de células progenitoras CD34⁺ e precursores NK. Pesquisadores demonstraram, em estudos *in vitro*, que o estroma medular dá suporte para a maturação da célula NK (4). A maturação no ambiente medular ainda não foi completamente esclarecida e sugere-se, também, que os precursores NK podem migrar para tecidos periféricos, onde podem sofrer o processo de maturação final (4).

2.7. Células NK e transplante de células-tronco hematopoéticas

O transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) tem o objetivo de restabelecer a hematopoese, procedimento necessário, após o tratamento com altas doses de quimioterapia e/ou irradiação corporal total (fase de condicionamento) (43). O TCTH é indicado para as doenças neoplásicas (linfomas, leucemias, mieloma múltiplo) e não neoplásicas (aplasia medular, hemoglobinopatias, distúrbios imunológicos ou metabólicos congênitos). O tratamento quimioterápico pode ser do tipo mieloablativo, ocasionando a destruição do sistema imunoematopoético ou não mieloablativo, quando ocorre a destruição parcial. Após esta fase de condicionamento, ocorre a infusão das células-tronco hematopoéticas (CTH) seguida de um período de aplasia até a "pega do enxerto" (confirmação da enxertia) (43). As CTH estão disponíveis no SP, MO e SCUP (11). A escolha da fonte de CTH depende de muitos fatores dentre esses: tipo de patologia e disponibilidade de células compatíveis com o receptor (43). O TCTH pode ser do tipo alogênico - aparentado (doador familiar) ou não aparentado (doador não familiar); singênico (entre irmãos gêmeos HLA idênticos); autólogo (células do próprio paciente) ou haploidênticos (normalmente o doador é um dos pais, neste caso a compatibilidade HLA é de 50% com o receptor).

As principais complicações do TCTH são a toxicidade associada ao tratamento quimioterápico e a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Segundo Pasquini (2015), as principais causas de mortalidade no TCTH são doença de base, seguida da DECH (44). A DECH é uma complicação associada ao TCTH alogênico e infusão de linfócitos, onde células T citotóxicas efetoras CD8⁺ do doador reagem contra antígenos do receptor, apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APC) (45). Na DECH, o ataque aos tecidos do receptor leva à produção desequilibrada de fatores inflamatórios.

A DECH aguda está associada com o aumento de infecções oportunistas devido ao tratamento com corticosteroides, podendo ocorrer em maior ou menor grau (46). A resposta clínica ao uso de imunossupressores para tratamento da DECH determina uma melhor sobrevida, entretanto a refratariedade ao medicamento eleva em 80% a mortalidade (47). O estudo de terapias alternativas ao TCTH para o tratamento de neoplasias hematológicas, particularmente da leucemia mielóide aguda (principal indicação ao TCTH), vem sendo ativamente explorado.

Dentre as possíveis terapias alternativas está a imunoterapia adotiva. Atualmente, estudos pré-clínicos e clínicos para investigar o mecanismo de ação, a segurança e a eficácia dessas terapias estão sendo desenvolvidos (48–50)

A experiência clínica no cenário do transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) ao longo dos anos contribuiu com o conhecimento da biologia celular da célula NK. A imunoterapia celular como alternativa terapêutica cresceu significativamente ao longo das últimas décadas (7). Atualmente, as células NK estão sendo empregadas como uma das principais alternativas para pacientes não respondedores da terapêutica padrão, na leucemia mielóide, e, também, como adjuvante ao uso de anticorpos monoclonais para direcionar a ação da célula NK na transferência adotiva de células NK autólogas ou alogênicas (8–11). O estudo das interações entre células NK ativadas e não ativadas em resposta a vírus ou células tumorais tem favorecido o desenvolvimento de terapias contra o câncer (30,51).

A habilidade citotóxica das NK sobre células tumorais foi inicialmente reconhecida pela capacidade de lise de células leucêmicas de ratos (1). Essa capacidade anti-tumoral em transplantes alogênicos, haploidênticos de célula-tronco hematopoéticas (TCTH), principalmente relatada nos pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA), tem sido associada à ocorrência do efeito do enxerto versus a leucemia (EVL) que seria, assim, mediado por células NK alorreativas do doador às células leucêmicas residuais do receptor. Ruggeri e colaboradores (2002), observaram que pacientes com leucemia mielóide aguda, após receberem o TCTH de doadores haploidênticos com células NK que expressavam receptores KIR cujo ligante estava ausente nas células do paciente, apresentaram uma sobrevida livre de doença significativamente superior. A sobrevida em pacientes com incompatibilidade KIR foi de 65% em cinco anos, enquanto para aqueles sem disparidade NK foi de 5% (40). Desse modo, a alorreatividade tem demonstrado afetar positivamente o resultado de transplante alogênico e haploidêntico e o efeito EVL parece ser independente da ocorrência da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), indicando que as células NK, ao contrário dos linfócitos T, são capazes de matar células leucêmicas preservando os tecidos normais (19,50). Durante a fase de recuperação imune após o TCTH, as células NK são as primeiras a se recuperarem. Dean A. Lee e colaboradores (2016) acreditam que esta recuperação precoce se correlaciona com o efeito EVL e também com a redução da DECH (42).

2.8 Protocolos de expansão da Célula NK

O principal desafio na terapia celular com a transferência adotiva de células imunes é o pequeno número de células que pode ser obtido das possíveis fontes de coleta e, também, as dificuldades com a produção de células em larga escala seguindo as Boas Práticas de Manufatura (Good Manufacturing Practices - GMP) (12–14). O desenvolvimento de protocolos para ativar e expandir as células NK torna-se necessário, visto a baixa disponibilidade dessas células no organismo (11,16). As principais estratégias de expansão de células imunes estão baseadas no uso de citocinas e células apresentadoras de antígenos. Os protocolos de expansão/ativação podem perdurar de 2 a 4 semanas na presença de interleucinas (IL-2, IL-3, IL-12, IL-15, IL-18), podendo variar a combinação das interleucinas e a presença ou não das *feeder cells* e/ou células apresentadoras de antígenos (APC) (14–16,41,52). As interleucinas são importantes na maturação, proliferação e ativação da célula NK. O uso das APC artificiais, principalmente a linhagem celular K562, célula maligna, geneticamente modificada para expressar IL-21 ligada na membrana, promove a proliferação celular com estímulos somente da IL-2, sem a necessidade da combinação de outras interleucinas. A partir dos resultados com este protocolo, os autores concluíram que o aumento do potencial proliferativo da célula NK, quando estimulada com APC artificial, descartaria a necessidade de coleta periférica por aférese, visto que a punção venosa foi suficiente para a expansão (14). Por outro lado, Alnabhan e colaboradores (2015) demonstraram que a combinação somente de IL-2 + IL-15 em culturas de NK do SCUP são mais eficientes para estimular a citotoxicidade e secreção de citocinas do que culturas estimuladas somente com IL-2 e a combinação de IL-18 e IL-15 induzem a uma significativa proliferação e secreção de citocinas (52). Os protocolos de expansão das células NK podem iniciar com células a fresco ou criopreservadas (8,9). Observa-se que a criopreservação de células NK expandidas diminui a capacidade citotóxica após o descongelamento, podendo essa situação ser revertida após a ativação com IL-2 *overnight* (33).

As citocinas são proteínas que intermediam a resposta imune inata e adquirida. A produção das citocinas pode ser realizada por diversas células e estas também atuam sobre muitos tipos celulares. Essas proteínas regulam a extensão da

resposta imune, uma vez que influenciam na proliferação e diferenciação dos linfócitos (37). As interleucinas, fatores de crescimento de colônias e interferon são denominadas citocinas.

A interleucina 2 (IL-2) foi inicialmente descrita como um fator de crescimento das células T, mas hoje, sabe-se que desempenha muitos outros papéis na resposta do sistema imune. A IL-2 é responsável por estimular a proliferação e diferenciação dos linfócitos T e B e células NK, aumenta a sobrevivência das células através da indução da proteína antiapoptótica Bcl-2, (37) promove o crescimento das células NK e aumenta a sua capacidade citotóxica, estimulando a expansão das células matadoras ativadas por citocina.

A IL-3, também denominada como fator estimulador de multi-linhagens de colônias (multi-CSF), é um produto de células T/CD4+, que atua sobre a célula-tronco e nas células imaturas da medula óssea. A sua atuação promove a expansão de células que se diferenciam em todos os tipos de células maduras conhecidas (37).

A interleucina 15 (IL-15) atua na biologia da célula NK, provendo a sobrevivência, proliferação e ativação. A IL-15 também é expressa por muitas células do sistema imune, como células dendríticas e células não hematopoéticas (31).

2.9 Células tronco-mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células multipotentes e possuem capacidade de diferenciação em osteoblastos, condroblastos e adipócitos (53,54). Quando cultivadas são aderentes ao plástico, sendo caracterizadas pela expressão positiva para CD105, CD73 e CD90 e expressão negativa para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR (54). As CTMs estão distribuídas por diversos compartimentos do organismo (cérebro, medula óssea, pâncreas, timo, baço, rim, fígado, pulmão, tecido adiposo, tecidos neonatais, mucosa da laringe e polpa dentária, entre outros) (55–58). Baseados nas características de auto-renovação, diferenciação e imunomodulação, diversos estudos envolvendo o isolamento, cultivo e/ou aplicação de CTMs para uso terapêutico em diferentes patologias, estão sendo desenvolvidos (48,59). Embora inicialmente consideradas como células capazes de se diferenciar em células originárias dos diferentes

folhetos embrionários (Caplan, 1991), hoje sabe-se que as CTMs são precursoras de células do colágeno e dos tecidos adiposo e ósseo e que sua interação com os diversos órgãos e tecidos parece atuar na regeneração celular por mecanismos parácrinos (60). Na medula óssea, em particular, compõe o estroma ou nicho medular facilitando a proliferação e diferenciação das células-tronco hematopoéticas (61,62).

A capacidade imunomoduladora das CTMs ainda não está totalmente elucidada, mas inclui interações com linfócitos T, linfócitos B, células apresentadoras de antígenos e células NK (63). Há evidências que CTMs atuam diminuindo a diferenciação de monócitos em células dendríticas; suprimindo a proliferação de células mononucleares, e a expressão de moléculas de superfície co-estimulatórias e atuam na alteração da secreção de quimiocinas (64–66). Além disso, as CTMs são consideradas pouco imunogênicas, pois tem baixa expressão de HLA de classe I e não expressam HLA de classe II (67,68).

A obtenção de CTMs tem sido amplamente estudada a partir da medula óssea, do tecido adiposo, do sangue periférico e, mais recentemente, do cordão umbilical e placentário, visto que este último é de uma fonte alternativa de material biológico usualmente descartado sem utilização e com vantagens de coleta não invasiva e segura (58,64,66,69). As CTMs provenientes de diversas fontes apresentam, além de diferenças na capacidade proliferativa e no potencial de diferenciação, variação no potencial imunomodulador, com a vantagem de que de CTMs isoladas do cordão umbilical apresentam ainda menor expressão de HLA-A, B e C, podendo diminuir a reação do hospedeiro (66,69,70).

O cordão umbilical está interligado com a placenta, origina-se da vesícula vitelínica, sendo recoberto pelo âmnion, membrana mais interna dos tecidos que compõe a placenta. Apresenta aspecto espiralado com aparência esbranquiçada. O seu tamanho pode variar 30 -100 cm comprimento e 0,8 - 2 cm diâmetro (71). O seu interior é composto por tecido conjuntivo mucóide (Geleia de Wharton), presente entre as duas artérias e a veia do cordão umbilical (**Figura 4 e Figura 5**) sendo uma eficiente fonte de CTM, com grande capacidade proliferativa e de diferenciação multipotente (72).

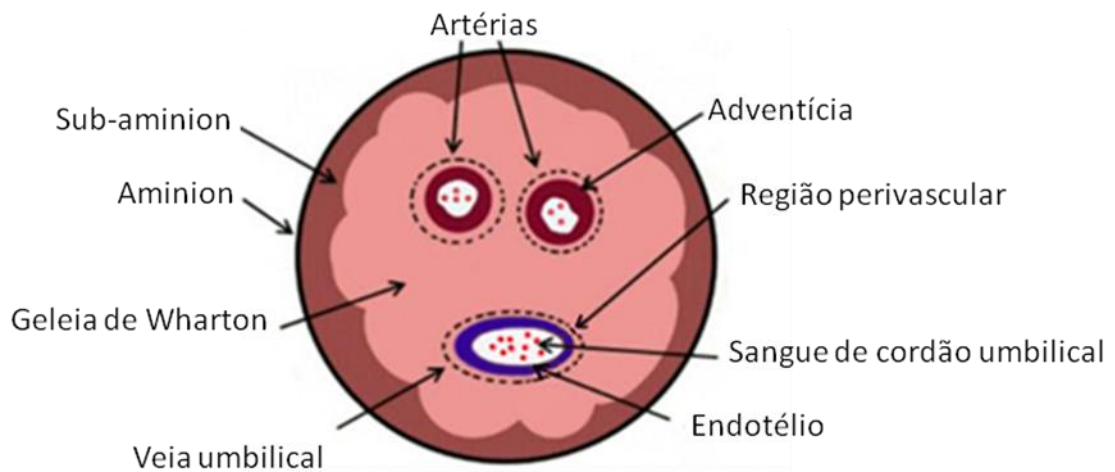


Figura 4. Figura esquemática da estrutura do cordão umbilical.

Adaptada de, Kim D-W, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang S-D, Borlongan C. Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. *Int J Mol Sci*,2013;14(6):11692–712.



Figura 5. Adaptada de Mennan C, Wright K, Bhattacharjee A, Balain B, Richardson J, Roberts S. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. *Biomed Res Int.* 2013;2013.

2.9.1 Isolamento das Células-Tronco Mesenquimais

Os protocolos de isolamento das diversas fontes de CTMs podem ser variados. O isolamento de CTMs do sangue periférico, medula óssea, assim como sangue de cordão umbilical, utiliza-se da separação da camada mononuclear por gradiente de densidade com centrifugação (58,73,74). Já o isolamento de CTM de tecidos como cordão umbilical, tecido adiposo e outros, a maioria dos protocolos utilizam a digestão enzimática com colagenase tipo I, II ou IV, utilizada isoladamente ou em associação com outras enzimas como a tripsina. O emprego dessas soluções podem variar desde as suas concentrações e o tempo de digestão, podendo ser de minutos a horas. Após a digestão enzimática, alguns protocolos sugerem o isolamento com o gradiente de densidade para a separação da camada mononuclear (70,75). Observa-se, que as ações terapêuticas das CTMs disponíveis podem sofrer alteração de acordo com o protocolo de isolamento (57). Vários estudos têm avaliado a interação entre CTMs e NK, e analisado os efeitos imunomoduladores entre essas (15,76–78).

2.9.2 Terapia Celular com: Células-Tronco Mesenquimais

Considerando a capacidade de diferenciação em linhagens celulares, recuperação imune, migração para o local da lesão e secreção de fatores solúveis essenciais para manter a sobrevivência e proliferação, muitos estudos avaliam o isolamento, cultivo celular e uso clínico em diversas patologias como lesão renal, doenças autoimunes, doença do enxerto contra o hospedeiro entre outras (59,79,80). Houve um crescente aumento de ensaios clínicos com CTMs até o ano 2015. Observa-se que a infusão das CTMs possui um benefício comprovado na DECH e alterações hematológicas (81).

Estudos clínicos com infusão de CTMs em alterações renais demonstram eficácia clínica e melhora em tecidos renais lesados (80). A aplicação em alterações autoimunes e inflamatórias pelo perfil imunomodulado das CTMs, trouxe uma nova perspectiva na terapia em doenças como diabetes, doença inflamatória intestinal e lúpus eritematoso sistêmico (56,82,83).

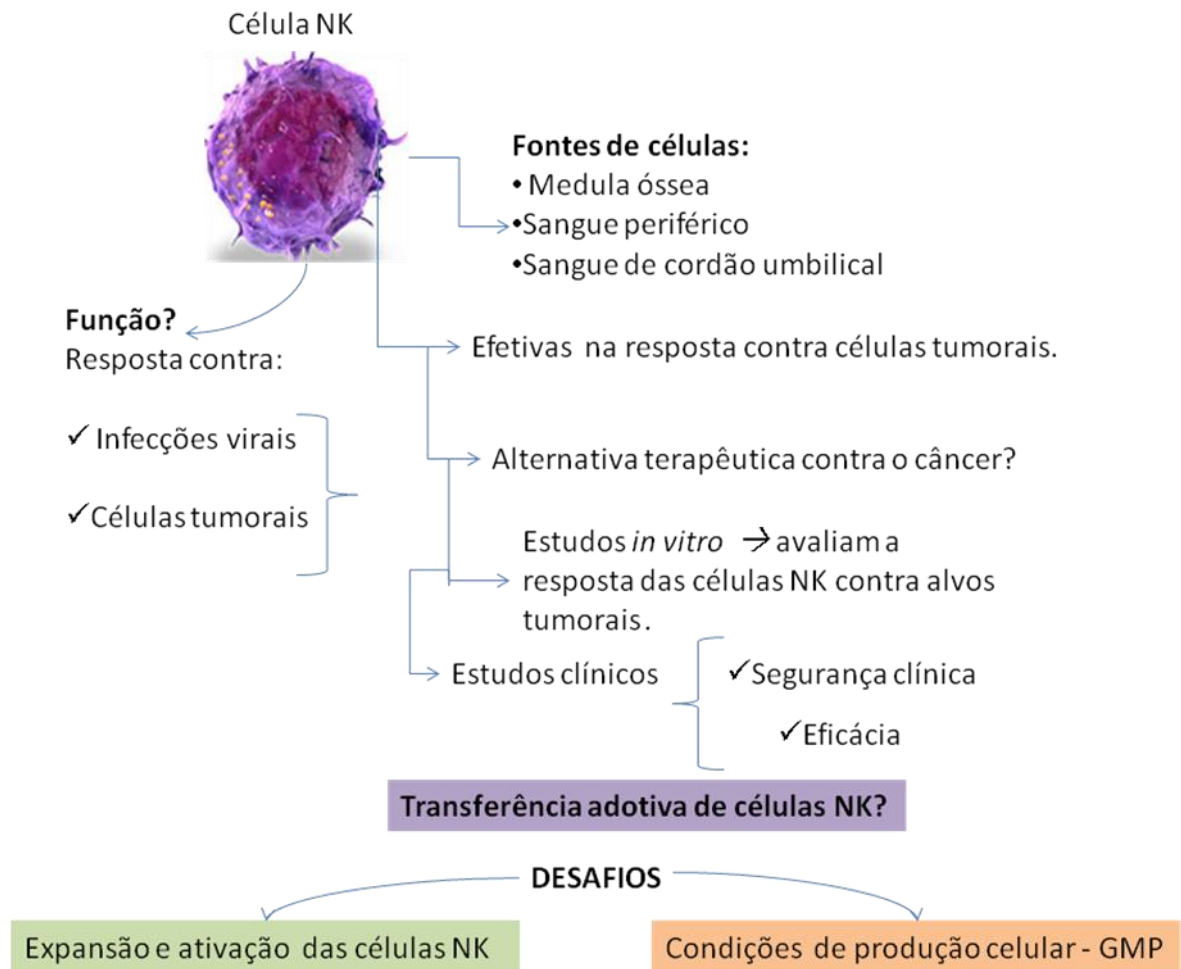
Na DECH, a aplicação clínica das CTMs tem sido avaliada em pacientes portadores de DECH aguda, refratários ao tratamento padrão com corticosteroides.

Estudos clínicos de fase I/II ou fase II demonstram eficácia clínica com algum ou nenhum evento adverso (59,63,84).

2.10 Interação Células-Tronco Mesequimais e Células NK

As CTMs, em função da sua capacidade de imunomodulação, tem sido muito utilizadas para tratamento da DECH aguda resistente a esteróides e, com isso, torna-se essencial para a imunoterapia o entendimento sobre a interação dessas células com as células do sistema imune inato envolvidas com a recuperação imune pós TCTH, DECH e EVL, (85). Ensaio de co-cultivo de CTMs com NK têm avaliado a relação da CTMs, que conhecidamente possuem um papel de imunossupressão, com as células NK, que são conhecidas principalmente pela sua atividade citotóxica contra células tumorais. Chatterjee et al. (2014) analisaram os mecanismos envolvidos em co-culturas de CTMs de cordão umbilical (CU) com NK de sangue periférico (SP), sem a utilização de citocinas, para ativação da célula NK, e observaram que as CTMs exercem um papel de imunossupressão sobre elas. Por outro lado, Thomas et. al. (2014) observaram que as células NK do sangue periférico ou de linhagem celular (NK-92), quando estimuladas com IL-12 e IL-18 e co-cultivadas com CTMs humanas da medula óssea, apresentaram uma maior capacidade de secreção de IFN- γ . Boissel e colaboradores (2008) também observaram que a utilização de CTMs de CU e citocinas em co-cultivo com células NK, estimulam a proliferação de células NK de SCUP (15). Desse modo, a investigação das interações entre CTMs e NK obtidas de diferentes fontes, em sistema de co-cultivo, com ou sem a presença de citocinas, torna-se importante para elucidar os efeitos e os mecanismos de imunorregulação entre essas células.

3 MARCO TEÓRICO



4 JUSTIFICATIVA

A terapia celular tem sido amplamente estudada como uma promissora terapia contra alguns tipos de oncopatologias. A célula NK possui uma importante função no sistema imune inato de defesa primária contra vírus e patógenos, sendo que também realiza a imunovigilância tumoral. Devido ao seu potencial contra células tumorais, a célula NK está sendo muito explorada na imunoterapia adotiva. Muitos estudos clínicos têm sido realizados para avaliar a segurança e a eficácia do uso de células NK na terapia celular. O principal desafio é o desenvolvimento de um protocolo de expansão e ativação de células NK em condições de Boas Práticas de Manufatura (GMP-Good Manufacturing Practices). Assim sendo, o presente trabalho visa avaliar protocolos de isolamento e expansão das células NK isoladas do SCUP, analisando, também, a capacidade de CTMs do cordão umbilical atuarem como fator estimulatório de expansão e ativação da célula NK, sendo protocolos alternativos à metodologia já padronizada na literatura.

5 OBJETIVOS

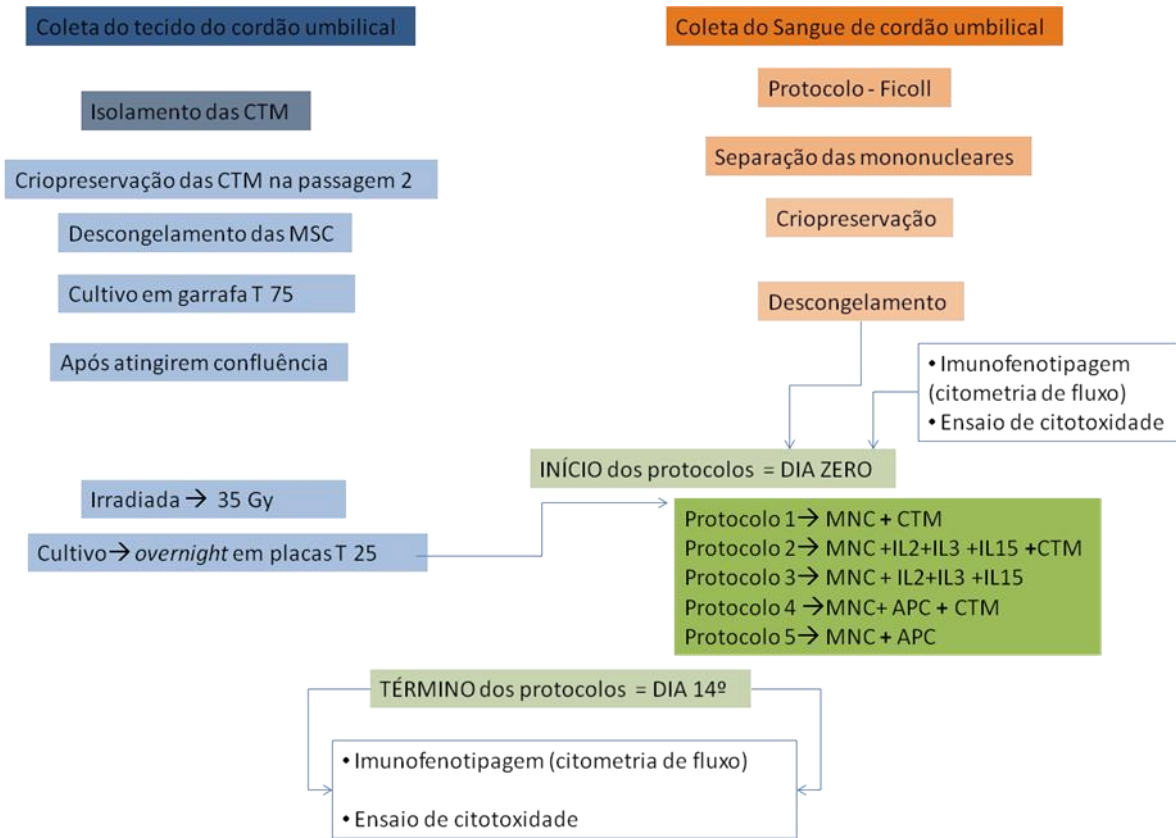
5.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e expandir células NK do SCUP em diferentes condições de cultivo com a presença de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical, interleucinas e/ou células apresentadoras de antígenos artificiais, a fim de verificar qual a melhor forma de expandir as células NK.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar, caracterizar e expandir CTMs do cordão umbilical;
- b) Isolar, caracterizar e expandir células NK de sangue de cordão umbilical e placentário;
- c) Avaliar a capacidade proliferativa de células NK em co-cultura com CTMs na ausência de interleucinas;
- d) Avaliar a capacidade proliferativa de células NK em co-cultura com CTMs associadas às interleucinas IL2, IL3 e IL15;
- e) Avaliar a capacidade proliferativa de células NK estimuladas com as interleucina IL2, IL3 e IL15 sem o co-cultivo;
- f) Avaliar a capacidade proliferativa de células NK estimuladas com células apresentadoras de artificial (aAPC) e IL-2;
- g) Avaliar a capacidade proliferativa de células NK estimuladas com células apresentadoras de artificial (aAPC) com IL-2 e co-cultivadas com CTMs.
- h) Comparar a capacidade citotóxica das células NK expandidas nas diferentes condições.

6 ESQUEMA DO ESTUDO



7 REFERÊNCIAS

1. Syngeneic CA, Tumors A, Herberman RB, Nu ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural Cy Tototoxic Reactivity of Mouse Lymphoid. *Building*. 1975;239:230–9.
2. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. “Natural” killer cells in the mouse. *Eur J Immunol*. 1975;(5):112–7.
3. Farag SS, VanDeusen JB, Fehniger T a, Caligiuri M a. Biology and clinical impact of human natural killer cells. *Int J Hematol* [Internet]. 2003;78(1):7–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12894845>
4. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev*. 2006;214(1):56–72.
5. Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol* [Internet]. 2013;34(12):573–82. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2013.07.005>
6. Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: An update and future directions. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2013;132(3):536–44. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.07.006>
7. Knorr DA, Bachanova V, Verneris MR, Miller JS. Clinical utility of natural killer cells in cancer therapy and transplantation. *Semin Immunol* [Internet]. 2014;26(2):161–72. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2014.02.002>
8. Spanholtz J, Tordoir M, Eissens D, Preijers F, Van Meer Der A, Joosten I, et al. High log-scale expansion of functional human natural killer cells from umbilical cord blood CD34-positive cells for adoptive cancer immunotherapy. *PLoS One*. 2010;5(2).
9. Lapteva N, Szmania SM, van Rhee F, Rooney CM. Clinical grade purification and expansion of natural killer cells. *Crit Rev Oncog* [Internet]. 2014;19(1-2):121–32. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4095851&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
10. Wang W, Erbe AK, Alderson KA, Phillips E, Gallenberger M, Gan J, et al. Human NK cells maintain licensing status and are subject to killer immunoglobulin-like receptor (KIR) and KIR-ligand inhibition following ex vivo expansion. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2016;65(9):1047–59. Available at: "<http://dx.doi.org/10.1007/s00262-016-1864-z>
11. Becker PSA, Suck G, Nowakowska P, Ullrich E, Seifried E, Bader P, et al. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2016;65(4):477–84. Available at: "<http://dx.doi.org/10.1007/s00262-016-1792-y>
12. Spanholtz J, Preijers F, Tordoir M, Trilsbeek C, Paardekooper J, de Witte T, et

- al. Clinical-grade generation of active NK cells from cord blood hematopoietic progenitor cells for immunotherapy using a closed-system culture process. *PLoS One*. 2011;6(6).
13. Introna M, Franceschetti M, Ciocca a, Borleri G, Conti E, Golay J, et al. Rapid and massive expansion of cord blood-derived cytokine-induced killer cells: an innovative proposal for the treatment of leukemia relapse after cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006;38(9):621–7.
 14. Denman CJ, Senyukov V V., Somanchi SS, Phatarpekar P V., 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).
 15. Boissel L, Tuncer HH, Betancur M, Wolfberg A, Klingemann H. Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Increase Expansion of Cord Blood Natural Killer Cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(9):1031–8.
 16. Shimasaki N, Coustan-smith E, Kamiya T. Expanded and armed natural killer cells for cancer treatment. *Cytotherapy* [Internet]. 2016;(March). Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.06.013>
 17. Montaldo E, Zotto G Del, Chiesa M Della, Mingari MC, Moretta A, Maria A De, et al. Human NK cell receptors/markers: A tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytom Part A*. 2013;83(8):702–13.
 18. Guillerey C, Huntington ND, Smyth MJ. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat Immunol* [Internet]. 2016;17(9):1025–36. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.3518>
 19. Moretta L, Locatelli F, Pende D, Marcenaro E, Mingari MC, Moretta A. Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(3):764–71.
 20. Orr MT, Lanier LL. Natural Killer Cell Education and Tolerance. *Cell* [Internet]. 2010;142(6):847–56. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.031>
 21. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2015;16(1):7–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26694935> \n <http://www.nature.com/nrc/journal/v16/n1/pdf/nrc.2015.5.pdf>
 22. Davies JOJ, Stringaris K, Barrett J a., Rezvani K. Opportunities and limitations of natural killer cells as adoptive therapy for malignant disease. *Cytotherapy* [Internet]. 2014;16(11):1453–66. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.03.009>
 23. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* [Internet]. 2009;457(7229):557–61. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07665>

24. Vivier E, Raulet D, Moretta A, Caligiuri M, Zitvogel L, Lanier L, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* [Internet]. 2011;331(6013):44–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1198687>
<http://www.sciencemag.org/content/331/6013/44.full.pdf>
25. Moretta L. dim human NK cells Dissecting. *Blood*. 2010;116(19)(2010 Nov 11):3689–91.
26. Lopez-vergès S, Milush JM, Pandey S, York V a, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dim CD16+ NK cell subset. *Blood* [Internet]. 2010;116(19):3865–74. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2981540&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
27. Björkström NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson M a, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK cell differentiation uncoupled from NK cell education. *Blood* [Internet]. 2010;116(19):3853–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20696944>
28. Moretta L, Pietra G, Vacca P, Pende D, Moretta F, Bertina A, et al. Human NK cells: From surface receptors to clinical applications. *Immunol Lett* [Internet]. 2016;178:15–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2016.05.007>
29. Vilches C, Parham P. KIR: Diverse, Rapidly Evolving Receptors of Innate and Adaptive Immunity. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2002;20(1):217–51. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.20.092501.134942>
30. Suck G, Linn YC, Tonn T. Natural Killer Cells for Therapy of Leukemia. *Transfus Med Hemotherapy*. 2016;43(2):89–95.
31. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2012;12(4):239–52. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3174>
<http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nri3174>
32. Ljunggren HG, Kren V. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990;11(C):237–44.
33. Punt J, Owen J, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22(11):633–40.
34. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song Y-J, Yang L, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* [Internet]. 2005;436(7051):709–13. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079848>

35. Yu J, Heller G, Chewning J, Kim S, Yokoyama WM, Hsu KC. Hierarchy of the human natural killer cell response is determined by class and quantity of inhibitory receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands. *J Immunol.* 2007;179(9):5977–89.
36. MURPHY, K. *Imunobiologia de Janeway*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014
37. Liu S, Zhu Z, Zi B, Liu C, Yu Y. Abbas Fattah. Dyn ofa 3-D F Spat Parallel Manip with Flex Links. 2010;2327–31.
38. Finn E. Mahmoud Abbas. Slate [Internet]. 2003; Available at: http://www.slate.com/articles/news_and_politics/assessment/2003/06/mahmoud_abbas.html
http://www.slate.com/articles/news_and_politics/assessment/2003/06/mahmoud_abbas.single.html
39. Pende D, Marcenaro S, Falco M, Martini S, Bernardo ME, Montagna D, et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: Evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood.* 2009;113(13):3119–29.
40. 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 (80-) [Internet].* 2002;295(5562):2097–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11896281>
<http://www.sciencemag.org/content/295/5562/2097.full.pdf>
41. Cany J, Dolstra H, Shah N. Umbilical cord blood-derived cellular products for cancer immunotherapy. *Cytotherapy [Internet].* 2015;17(6):739–48. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.03.005>
42. Lee DA, Denman CJ, Rondon G, Woodworth G, Chen J, Fisher T, et al. Haploidentical Natural Killer Cells Infused before Allogeneic Stem Cell Transplantation for Myeloid Malignancies: A Phase I Trial. *Biol Blood Marrow Transplant [Internet].* 2016;22(7):1290–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.04.009>
43. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol [Internet].* 2016;7(November):507. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00507/full>
44. Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L, et al. NK cells and cancer. *J Immunol.* 2007;178(7):4011–6.
45. Kim Y-J, Broxmeyer HE. Immune regulatory cells in umbilical cord blood and their potential roles in transplantation tolerance. *Crit Rev Oncol Hematol*

- [Internet]. 2011;79(2):112–26. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3000883&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
46. Antin JH, Chen AR, Couriel DR, Ho VT, Nash RA, Weisdorf D. Novel approaches to the therapy of steroid-resistant acute graft-versus-host disease. Vol. 10, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2004. p. 655–68.
 47. Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, Navarrete C, Dazzi F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK*. 2007;21(9):1992–9.
 48. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2007;21:1733–8.
 49. Cichocki F, Sitnicka E, Bryceson YT. NK cell development and function - Plasticity and redundancy unleashed. *Semin Immunol* [Internet]. 2014;26(2):114–26. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2014.02.003>
 50. Locatelli F, Moretta F, Brescia L, Merli P. Natural killer cells in the treatment of high-risk acute leukaemia. *Semin Immunol* [Internet]. 2014;26(2):173–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2014.02.004>
 51. Klingemann H. Challenges of cancer therapy with natural killer cells. *Cytotherapy*. 2015;17(3):245–9.
 52. Alnabhan R, Madrigal A, Saudemont A. Differential activation of cord blood and peripheral blood natural killer cells by cytokines. *Culture*. 2015;(April 2014).
 53. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2005;7(5):393–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236628>
 54. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2006;8(4):315–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>
 55. Wei X, Yang X, Han Z, Qu F, Shao L, Shi Y. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2013;34(6):747–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23736003>
 56. Cras A, Farge D, Carmoi T, Lataillade J-J, Wang DD, Sun L. Update on mesenchymal stem cell-based therapy in lupus and scleroderma. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2015;17(1):301. Available at: <http://arthritis-research.com/content/17/1/301>

57. Bortolotti F, Ukovich L, Razban V, Martinelli V, Ruozi G, Pelos B, et al. In vivo therapeutic potential of mesenchymal stromal cells depends on the source and the isolation procedure. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2015;4(3):332–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.01.001>
58. Secunda R, Vennila R, Mohanashankar AM, Rajasundari M, Jeswanth S, Surendran R. Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. *Cytotechnology*. 2014;67(5):793–807.
59. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371(9624):1579–86.
60. Caplan A. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* [Internet]. 1991;9(5):641–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1870029>
61. Conget P a, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* [Internet]. 1999;181(1):67–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10457354>
62. Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, et al. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*. 2006;107(5):1878–87.
63. Nauta AJ, Fibbe WE. Review in translational hematology Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Library (Lond)*. 2008;110(10):3499–506.
64. Flemming A, Schallmoser K, Strunk D, Stolk M, Volk HD, Seifert M. Immunomodulative efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured in human platelet lysate. *J Clin Immunol*. 2011;31(6):1143–56.
65. Tomic S, Djokic J, Vasilijic S, Vucevic D, Todorovic V, Supic G, et al. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2011;20(4):695–708. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20731536>
66. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*. 2009;126(1-2):37–42.
67. Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, Gambardella S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: State of the art. *Int J Clin Exp Med*. 2010;3(4):248–69.

68. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003;31(10):890–6.
69. Wu K-H, Chan C-K, Tsai C, Chang Y-H, Sieber M, Chiu T-H, et al. Effective treatment of severe steroid-resistant acute graft-versus-host disease with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 2011;91(12):1412–6.
70. Barlow S, Brooke G, Chatterjee K, Price G, Pelekanos R, Rossetti T, et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008;17(6):1095–107.
71. Moore K a, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*. 2006;311(5769):1880–5.
72. Batsali AK, Kastrinaki M-C, Papadaki H a, Pontikoglou C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton’s Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther [Internet]*. 2013;8(2):144–55. Available at: <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cscr/2013/00000008/00000002/art00005><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23279098>
73. Avanzini MA, Bernardo ME, Cometa AM, Perotti C, Zaffaroni N, Novara F, et al. Generation of mesenchymal stromal cells in the presence of platelet lysate: A phenotypic and functional comparison of umbilical cord blood- and bone marrow-derived progenitors. *Haematologica*. 2009;94(12):1649–60.
74. Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004;22(4):625–34.
75. Zhu SF, Zhong ZN, Fu XF, Peng DX, Lu GH, Li WH, et al. Comparison of cell proliferation, apoptosis, cellular morphology and ultrastructure between human umbilical cord and placenta-derived mesenchymal stem cells. *Neurosci Lett [Internet]*. 2013;541:77–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23523648>
76. Sotiropoulou P a, Perez S a, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006;24(1):74–85.
77. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell – natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2 – induced NK-cell proliferation. *Blood*. 2006;107(4):1484–90.
78. Thomas H, Jäger M, Mauel K, Brandau S, Lask S, Flohé SB. Interaction with Mesenchymal Stem Cells Provokes Natural Killer Cells for Enhanced IL-12 / IL-18-Induced Interferon-Gamma Secretion. 2014;2014(Dc).

79. Ciccocioppo R, Gallia A, Sgarella A, Kruzliak P, Gobbi PG, Corazza GR. Long-term follow-up of Crohn disease fistulas after local injections of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mayo Clin Proc.* 2015;90(6):747–55.
80. Hattori Y, Kim H, Tsuboi N, Yamamoto A, Akiyama S, Shi Y, et al. Therapeutic potential of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in models of acute kidney injury. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(10):1–18. Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0140121>
81. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant* [Internet]. 2015;1–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26423725>
82. Klinker MW, Wei C-H. Mesenchymal stem cells in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases in experimental animal models. *World J Stem Cells* [Internet]. 2015;7(3):556–67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4404391&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
83. Xie Z, Hao H, Tong C, Cheng Y, Liu J, Pang Y, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells elicit macrophages into an anti-inflammatory phenotype to alleviate insulin resistance in type 2 diabetic rats. *Stem Cells.* 2016;34(3):627–39.
84. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Review Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells : An Update. 2016;25:829–48.
85. Le Blanc K, Davies LC. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol Lett.* 2015;168:140–6.
86. Mennan C, Wright K, Bhattacharjee A, Balain B, Richardson J, Roberts S. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. *Biomed Res Int.* 2013;2013.
87. Basford C, Forraz N, McGuckin C. Optimized multiparametric immunophenotyping of umbilical cord blood cells by flow cytometry. *Nat Protoc* [Internet]. 2010;5(7):1337–46. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.88>
88. Khaziri N, Mohammadi M, Aliyari Z, Rad JS, Nasrabadi HT, Charoudeh HN. Cord blood mononuclear cells have a potential to produce NK cells using IL2Rg cytokines. *Adv Pharm Bull* [Internet]. 2016;6(1):5–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2016.002>
89. Lin SJ, Huang YC, Cheng PJ, Lee PT, Hsiao HS, Kuo ML. Interleukin-15 enhances the expansion and function of natural killer T cells from adult peripheral and umbilical cord blood. *Cytokine.* 2015;76(2):348–55.
90. de Lima M, McNiece I, Robinson SN, Munsell M, Eapen M, Horowitz M, et al. Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *N Engl J*

Med [Internet]. 2012;367(24):2305–15. Available at:
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=medl&NEWS=N&AN=23234514>

91. Robinson SN, Ng J, Niu T, Yang H, McMannis JD, Karandish S, et al. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Bone Marrow Transplant [Internet]. 2006;37(4):359–66. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1705258>
92. Legislação em Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO - RDC Nº. 50, DE 21 DE FEVEREIRO DE 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2002;1–125.

8 ARTIGO EM INGLÊS

UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS (UC-MSC) UTILIZED AS FEEDER CELLS NOT ONLY DID NOT IMPAIRED UC-NK CELL EXPANSION IN THE PRESENCE OF GENETICALLY ENGINEERED ARTIFICIAL ANTIGEN PRESENTING CELLS (aAPC), BUT ALSO YEALDED A SIGNIFICANTLY HIGHER PROPORTION OF CD16+ NK CELLS.

Juliana Monteiro Furlan^{1,2,3}, Anelise Bergmann Araújo^{1,2}, Fabiane Spagnol⁴, Vanessa Valim³ Gabrielle Dias Salton¹, Melissa Helena Angeli¹, Tissiana Schmalfluss¹, Nathan Bugs³ Maria Aparecida Lima da Silva³, Liane Marise Röhsig¹, Lúcia Silla^{1,3}.

¹ *Cryobiology Unit and Umbilical Cord Blood Bank, Hemotherapy Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil*

² *Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

³ *Cellular Technology and Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil*

⁴ *Unit of Personalized Diagnostic, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil*

Corresponding author:

Juliana Monteiro Furlan

Unidade de Criobiologia e Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário,
Serviço de Hemoterapia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos, 2350 zip code: 90035-903

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Phone: 55 51 33597676/ Fax: 55 51 33598001

juliamfurlan@yahoo.com.br

Abbreviations:

aAPC: artificial antigen presenting cells

CB-MNC: Cord blood-mononuclear cells

⁵¹Cr: chrome

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

FBS: fetal bovine serum

HLA: Human leukocyte antigen

MHC Major histocompatibility complex

MNC: mononuclear cells

MSC: mesenchymal stem cells

NCR: Natural cytotoxicity receptors

PBS: phosphate buffered saline

UC-MSC: umbilical cord-derived mesenchymal stem cells

ABSTRACT

Background: Natural killer (NK) cells play a major role in innate immunity, especially against viral pathogens, and are also a part of the immune surveillance of tumors. Several clinical trials have evaluated the use of these cells for adoptive cell immunotherapy. Ex vivo expansion of NK cells, however, is a complex process which requires multiple cell signals to ensure cell survival, proliferation, and activation. There are many protocols used for NK cell expansion and activation, however, there is a lack of evidence regarding which method is the most effective for clinical grade NK cells expansion. Objective: The main purpose of this study is to evaluate an optimal protocol for the ex vivo expansion of NK cells isolated from umbilical cord blood mononuclear cells (CB-MNC). Methods: Five different conditions for the expansion of umbilical cord-derived NK cells were evaluated. Each protocol was a different combination of interleukins (IL-2, IL-3, and IL-15) with or without the presence of feeder cells or artificial antigen presenting cells (aAPCs). Feeder cells utilized were umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UC-MSC), and aAPCs were membrane-bound IL-21 artificial APCs (mbIL21 aAPCs). Results: Protocols employing mbIL21 aAPCs demonstrated greater expansion of natural killer cells (CD3- CD56+) than the other protocols. The protocol employing aAPCs, IL-2 and UC-MSC feeder cells had a statistically significant higher proportion of CD16+ NK cells when compared to the protocol without the MSC feeder cells, but there was no significant difference in the expansion of total natural killer cells concerning these two protocols. Conclusion: Ex vivo expansion of NK cells in the presence of aAPCs and UC-MSC feeder cells yielded a significant higher proportion of CD16+ NK when compared to the aAPCs only culture condition, and could be a better product for NK adoptive immunotherapy in conjunction with monoclonal or bi-specific antibodies.

Key Words: Natural killer cell, umbilical cord blood, mesenchymal stem cells, Immunotherapy.

INTRODUCTION

Natural killer (NK) cells are a subset of lymphocytes with a major role in innate immunity, serving crucial functions for tumor immune surveillance and defense against viral infections. Phenotypically, such cells are characterized by the expression of CD56 and the lack of CD3 expression. Natural killer cells can act directly against target tumor cells or can mediate Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), a function provided by the molecule FcγRIIIa (CD16), which is expressed on the surface of most natural killer cells (1,2).

It is known that ninety percent of natural killer cells are CD56^{dim}, expressing high density of CD16 receptors (2). On the other hand, the approximately ten percent of CD56^{bright} cells have particularly low expression of CD16. Such phenotypical differences are already well characterized; however, their *in vivo* functional significance isn't yet completely understood. The CD56^{bright}/CD16^{dim} subset of cells have an important immunoregulatory function, demonstrating significant cytokine production levels, but are poor mediators of direct cellular cytotoxicity and ADCC. The CD56^{dim}/CD16^{bright} subset cells, on the other hand, are good mediators of cytotoxicity and ADCC, having a more granular morphology, but demonstrate low levels of cytokines production (3). When stimulated with high interleukin concentrations, these cells differentiate into lymphokine-activated killer cells (LAK cells), which are the effector cells able to kill tumor cells (4).

Adoptive cell immunotherapy is a therapeutic approach currently in worldwide expansion. Infused allogeneic or autologous natural killer cells, for example, are being studied as an alternative for patients with refractory myeloid leukemia, or as an adjuvant to monoclonal antibody therapy (5–8). Understanding the interactions between natural killer cells and other types of cells, such as mesenchymal stem cells, may prove to be an important tool for improving adoptive cell therapy, considering that such interactions may influence the therapeutic potential of infused cells, either improving or impairing it.

One of the main challenges of adoptive cell immunotherapy is obtaining sufficient cell numbers from the selected source. Natural killer cells represent only a small portion of lymphocytes in human peripheral blood, which makes it imperative that efficient protocols for cell harvesting and expansion are developed (5,9). Another challenge is that cell expansion must be scaled up to allow production of large volumes of cell products in accordance with Good Manufacturing Practices (GMP) (10,11). The main approaches for expanding and activating immune cells usually rely on the use of cytokines and antigen presenting cells (APCs). Such protocols may employ a variety of cytokines (IL-2, IL-3, IL-12, IL-15, IL-18) in different combinations and periods of time, and may or not employ feeder cells and/or artificial antigen presenting cells (aAPC) (4,9,12,13).

MATERIALS AND METHODS

Umbilical cord blood and tissues were collected from healthy donors at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)'s Umbilical Cord Blood Bank (UCBB) after signed informed consent. Three samples of umbilical cord blood were used to isolate the mononuclear cells, and three samples from other donors were used to isolate mesenchymal stem cells. Cord blood used for this study were those that did not meet minimum volume and cellularity criteria established in Brazilian legislation, and thus could not be processed and cryopreserved in the UCBB. The inclusion criteria for donation were: maternal age greater than 18 years; gestational age greater than or equal to 35 weeks; no premature rupture of membranes for longer than 18 hours; minimum of two prenatal care visits during the pregnancy; no other abnormalities or diseases that could interfere with placental function. Samples were collected and screened for infectious diseases.

ISOLATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM UMBILICAL CORD

Cord segments of 10-15cm were cut longitudinally and blood vessels were removed. The cord was then cut into small pieces and washed with saline solution (Supplementary Figure S1), DMEM (Gibco®, Life Technologies NY, USA) 10% Fetal Bovine Serum (FBS), (Gibco®, Life Technologies NY, USA) and digested with collagenase type I 2mg/mL (Gibco®, Life Technologies NY, USA). After 16 hours of incubation at 37°C and washing with DMEM/FBS, a new enzymatic digestion with trypsin-EDTA 0,25% was carried for 30 min at 37°C. Then, after inactivation with DMEM/FBS, samples were cultured in a 6-well plate in DMEM supplemented with 20% FBS, 1% penicillin-streptomycin antibiotic solution and 2mM L-glutamine at 37°C in humidified 5% CO₂. Umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MS) were then cultured to passage two, when they were cryopreserved.

MESENCHYMAL STEM CELLS DIFFERENTIATION ASSAY

UC-MS stem cells were differentiated into osteocytes, adipocytes, and chondrocytes using STEMPRO® Differentiation Kit (Gibco®, Life Technologies NY, USA) for 10-14 days, 28 days and 28 days, respectively, with medium change twice a week. Alizarin Red staining was used to confirm calcium mineralization in osteogenic induction and to confirm chondrogenesis potential. Oil Red staining was used to confirm adipogenic differentiation.

MESENCHYMAL STEM CELLS FLOW CYTOMETRY

Flow cytometry was performed employing a FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA.) and data analysis was performed using FlowJo software. Phenotypic analysis was performed employing a kit specific to human MSCs (BD Stemflow hMSC Analysis Kit, BD Biosciences, USA), which analyzed CD11b, CD19, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, and HLA-DR expression. Further, CD29-APC conjugated (BD Biosciences, USA) was analyzed. UC-MSC staining was performed according to manufacturer's instructions. Each sample analyzed had 10,000 gated events acquired. Cells were considered as MSCs when positive for CD90, CD73, CD105, CD29, and CD44 and negative for CD34, CD45, CD14, CD3, and HLA-DR in immunophenotypic analysis, in accordance with prior studies (14,15).

UMBILICAL CORD MONONUCLEAR CELLS ISOLATION

Mononuclear cells were isolated from umbilical cord blood using Ficoll -Histopaque® - 1077 (Sigma-Aldrich). Cells were cryopreserved using 10% DMSO in FBS and RPMI-1640 (Gibco®, Life Technologies NY, USA)

NATURAL KILLER CELLS FLOW CYTOMETRY

Flow cytometric analysis was performed using BD FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), and data analysis was performed using Infinicyt™1.7 (Cytognos, Salamanca, Spain). The following monoclonal antibodies were used: CD34-APC, CD56-PE, CD16-PE CY7, CD3-APC H7, CD19-APC, NKG2D-APC, from BD Biosciences, USA; CD56-FITC, CD45-FITC from eBioscience (Ireland); CD45- PerCp, CD14-APC from Exbio (Czech Republic); KIR2DL3-APC, KIR3DL1/DL2-PE from Miltenyi Biotec GmbH (Germany) and NKG2A-PE Cy7 from R&D Systems (Minneapolis, MN -USA). Cell viability was determined with 7-AAD (Exbio, Czech Republic). Natural killer cells were defined as CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻ and CD56⁺ cells (16). The expression of NKG2A, NKG2D, KIR2DL3, and KIR3DL1/DL2 was determined using the median fluorescence intensity (MFI) of cells.

NATURAL KILLER CELLS EXPANSION

One-week prior to the beginning of the NK cells culture,, UC-MSCs were thawed and washed with 20% FBS/RPMI medium 1640 (Gibco®). Afterward, cells were plated in T25 flasks with 20% FBS/RPMI 1640 overnight. UC-MSCs were trypsinized, irradiated at 3,500 cGy, and 2×10^5 cells were plated and incubated in humidified 5% CO₂ air at 37°C overnight to be used as a feeder cell layer.

Cord blood mononuclear cells were cultivated using five different protocols for 14 days, as seen in Table 1. Cytokines used were IL-2 (1000 IU/mL, Proleukin®), IL-3 (10 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN) and IL-15 (10 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN). The immunophenotypic characterization of MNCs and NK cells was performed at the beginning of the protocol (day zero) and after 14 days.

CYTOTOXICITY ASSAY

Cytotoxic activity of natural killer cells was measured by chromium release assay at day 1 and day 14. Mononuclear cells were incubated with 5×10^3 ⁵¹Cr-labeled target cells (K562) in a V-bottomed 96-well plate at the following MNC:target cell ratios: 50:1 ; 25:1 ; 12.5:1 ; 6.25:1 ; 3:1 ; 1.5:1 ; 0.8:1 ; and 0.4:1. The proportion of spontaneous and maximum chromium release was determined by incubating target cells both in medium alone or in the presence of 1% Triton X-100. Specific cytolysis was calculated by evaluating the release of ⁵¹Cr using TopCount NXT (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Downers Grove, IL, USA).

STATISTICAL ANALYSIS

Data were analyzed with Generalized Estimating Equations (GEE), Bonferroni and Kruskal-Wallis tests. Statistical analysis was performed using PASW-SPSS 18.0. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$.

RESULTS

Mononuclear cells and MSC were successfully isolated from umbilical cord blood and umbilical cord tissue, respectively. Cell surface antigen expression of UC-MSC were $0.1\pm 0\%$ CD45/CD34/CD19/CD11b/HLA-DR; $0.5\pm 0.2\%$ CD14; $0.2\pm 0.2\%$ CD3; $99.2\pm 0.3\%$ CD73; $99.3\pm 0.3\%$ CD90; $80.7\pm 1.6\%$ CD105; $97.6\pm 1.1\%$ CD29; $91.7\pm 6.7\%$ CD44 and 9.3 ± 1.9 CD56 which is a pattern consistent with human MSCs. The differentiation capacity of these cells is shown in Supplementary Figure. S2.

Regarding the expansion of natural killer cells (CD3- CD56+), protocols 4 and 5, both using IL-2 and coculture with aAPCs, had a significantly greater increase ($p \leq 0,05$) in NK cell numbers when compared with the other protocols, as shown in Figure.1. Protocol 4, which utilized aAPCs and UC-MSCs had a statistically significant higher proportion of CD16+ NK cells when compared to protocol 5. The number of total NK cells was higher in protocol 5 when compared to protocol 4, but this difference was not statistically significant Figure. 2.

Expression of KIR2DL3, KIR3DL1/DL2, NKG2A/NKG2D at day zero and day 14 of culture is shown in Figure 3. There were no differences between culture conditions regarding these receptors.

CHROMIUM RELEASE ASSAY

Cytolytic activity of natural killer cells was tested with a 4 hours chromium release assay at day zero and day 14. As shown in Figure 4, protocol 2,3,4 and 5 NK cells had greater cytolytic activity when compared to NK cells that had not been cultured. Protocols 4 and 5 had superior cytotoxic activity when compared to the other protocols. Finally, cells cultured with IL-2 and aAPCs (protocol 5) had greater cytotoxic activity than cells cultured with IL-2, aAPCs, and UC-MSCs (protocol 4). Cytolytic activity was correlated with higher proportions of NK cells to target cells in protocols 1,2,4 and 5 (Figure. 4), but protocol 3 did not follow this trend, demonstrating similar cytotoxicity in 50:1, 25:1, 12.5:1, 6.5:1 and 3:1 proportions .

DISCUSSION

The main objective of this study was to evaluate an optimal protocol for the ex vivo expansion of NK cells from umbilical cord blood mononuclear cells. There is growing interest in cord blood as an alternative source of cellular material due to its availability. Natural killer cells typically comprise a higher percentage of lymphocytes in cord blood when compared to peripheral blood lymphocytes; yet, in absolute number NK cells are still limited in both

sources. Protocols for NK cell expansion and activation must be carefully evaluated in order to determine optimal strategies for developing clinical applications for this therapeutic approach.

In this study, we evaluated different culture conditions for UC-NK cells expansion. Conditions included were the use of aAPCs, a feeder layer of allogeneic irradiated MSCs derived from umbilical cord, and the presence of IL-2, IL-3, and IL-15. The choice of interleukins used in this study was based on previous studies that demonstrated the capacity of these interleukins to stimulate NK cell expansion (12,17,18). Previous studies also demonstrated the possible positive effect of MSC as feeder cells and that the combination of cytokines and MSCs can boost the expansion of CD34+ stem cells derived from cord blood (12,19,20).

Lee et al. (2012) explored the use of artificial antigen-presenting cells (aAPCs) for ex vivo expansion and activation of NK cells (13). Genetically-engineered aAPCs expressing membrane-bound IL-21 (mbIL-21) have been used to reliably expand NK cells for human trials with adoptive immunotherapy. Expanded cells maintain high levels of surface expression of KIR, activating receptors and CD16, while also having an activated phenotype.

It is known that the expression of CD16 on the surface of the NK cell is related to its maturation (21). This receptor is responsible for antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), the most potent NK cell activation mechanism, as a result of the recognition and binding of the Fc portion of an antibody, such as IgG (7). Protocols capable of expanding a higher proportion of CD16+ NK cells, such as the one demonstrated here might prove to be a potential way of increasing the efficacy of NK cell adoptive immunotherapy, particularly if infused with monoclonal or bi-specific antibodies.

During NK cells differentiation, different families of receptors are expressed in distinct maturity stages. The NKG2A receptor is one of the first molecules to be expressed whereas KIR molecules are typically expressed in a later stage of NK cell development (22). Natural killer cell maturation is also associated with progressively increased cytolytic activity, along with a gradual decrease in proliferative potential (22,23). We did not see any difference in KIR2DL3, KIR3DL1/DL2 and NKG2A/NKG2D receptors expression at day 14 amongst the 5 culture conditions.

CONCLUSION

Our study has shown effective methods for expansion and activation of UC-derived NK cells using mbIL-21 aAPCs and IL-2, with or without the presence of a feeder cell layer of UC-MSCs. We have also demonstrated that the presence of this feeder cell layer is associated with a higher proportion of CD16+ NK cells after 14 days of culture. Future

studies are needed to elucidate the role of MSCs as feeder cells for ex vivo expansion of NK cells for clinical use, as well as, the mechanisms underlying these interactions. However, this cell product could be ideal for adoptive immunotherapy in association of monoclonal or bi-specific antibodies in order to enhance ADCC.

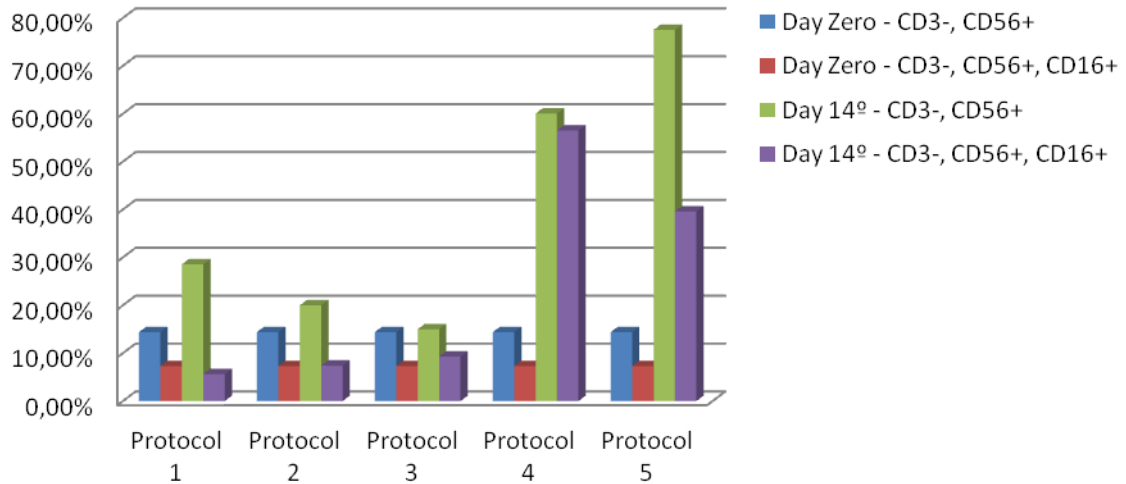


Figure 1: Percentage of NK cells.

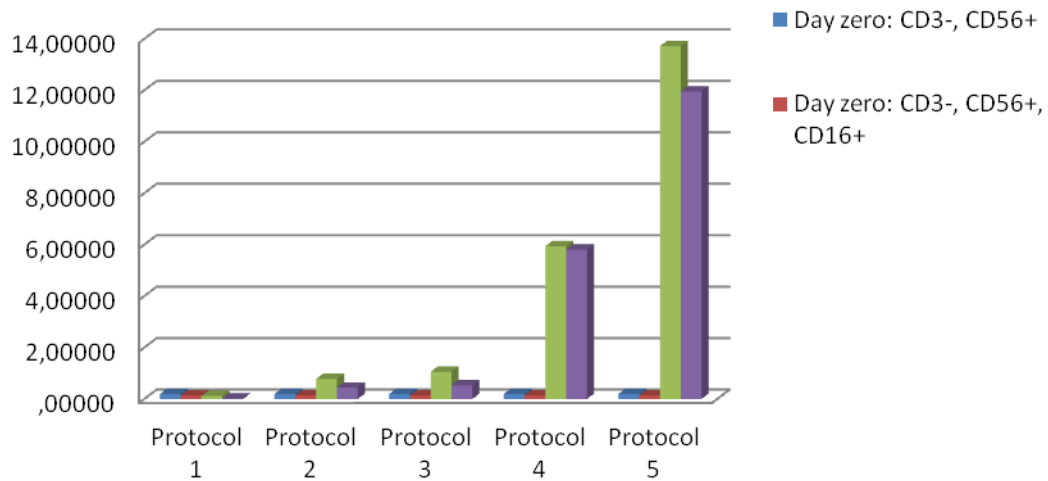


Figure 2: Total number of NK cells.

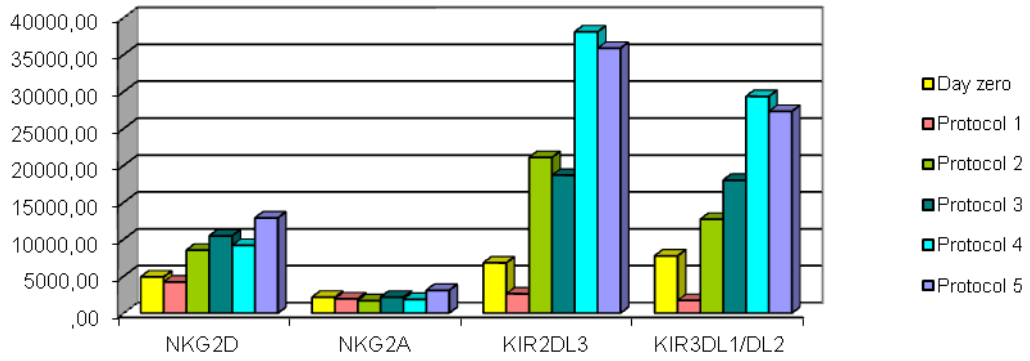


Figure 3. Expression of KIR2DL3, KIR3DL1/DL2, NKG2A/NKG2D at day zero and day 14 of culture

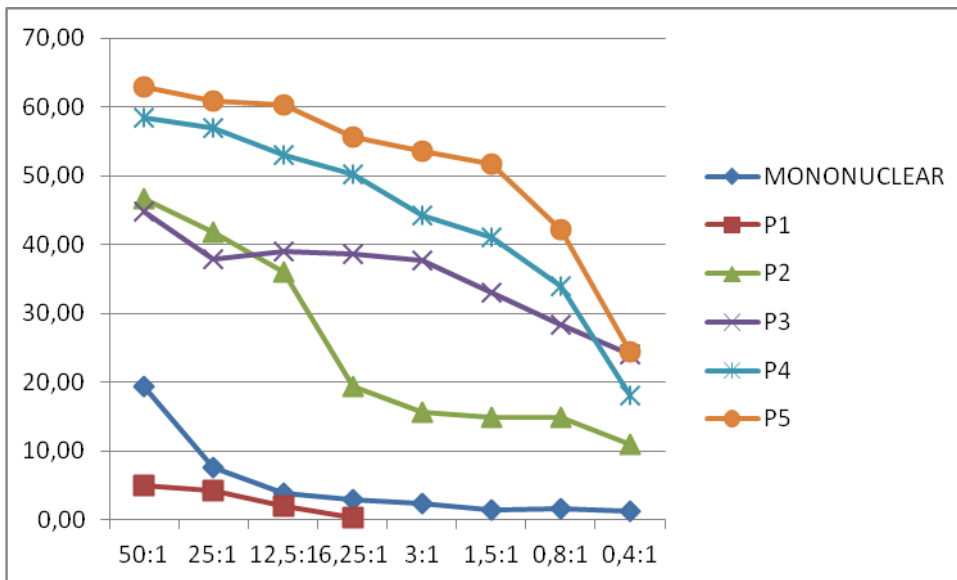


Figure 4. Cytolytic activity of natural killer cells was tested with a 4 hours chromium release assay at day zero (mononuclear) and day 14.

Table 1. Conditions for activation and expansion of CB-derived NK cells in the presence of cytokines, aAPCs, or UC-MSCs feeder cell layer.

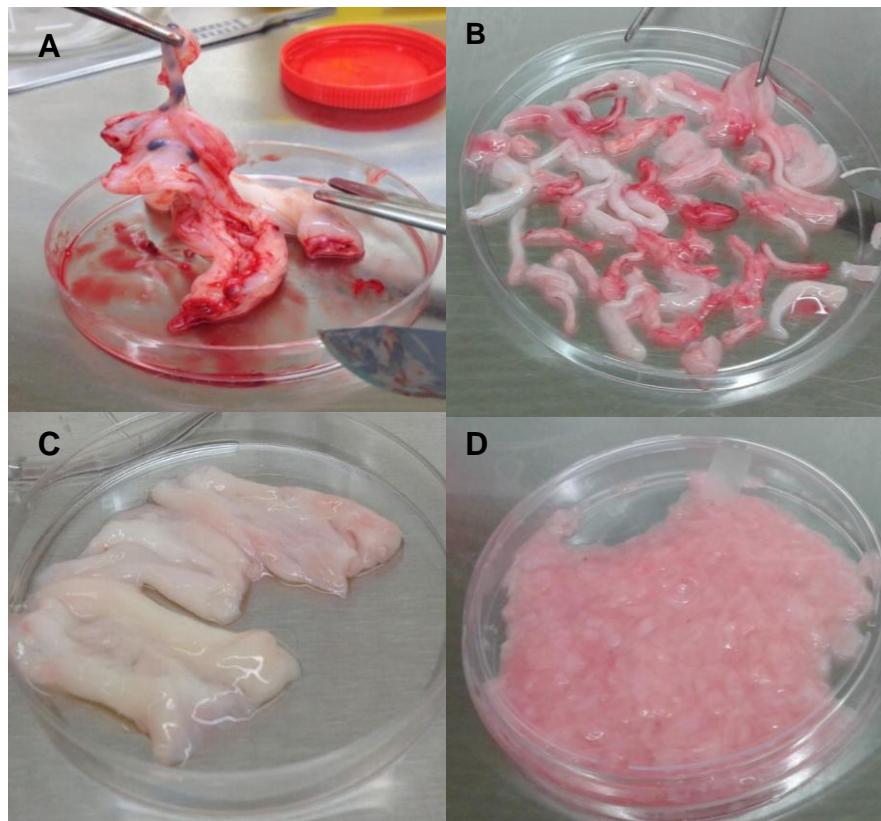
Protocol	Categories	Cytokine	Coculture
1	CB-MNC : UC-MSC	without	UC-MSC
2	CB-MNC + IL : UC-MSC	(IL- 2, IL-3, IL-15)	UC-MSC
3	CB-MNC + IL	(IL- 2, IL-3, IL-15)	without
4	CB-MNC + aAPC: UC-MSC	(IL- 2)	aAPC and UC-MSC
5	CB-MNC + aAPC	(IL- 2)	aAPC

Protocol 1 and 2 - MNC:MSC at a 10:1 ratio.

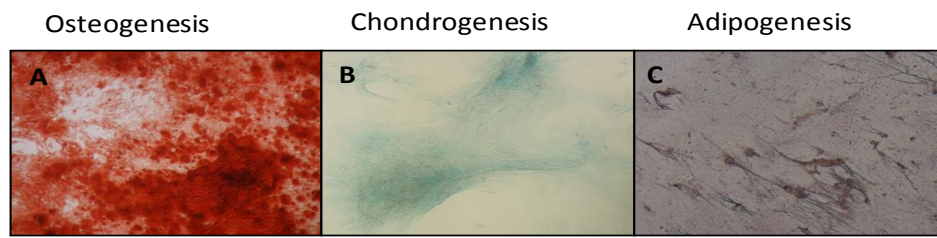
Cytokine concentration: IL-2 (1000 ng/mL), IL-3 (10 ng/mL), IL-15 (10 ng/mL)

All protocols had an incubation time of 14 days.

Protocols with aAPCs utilized a 1:2 MNC:aAPC ratio.



Supplementary Figure S1. Umbilical cord segments were processed to obtain MSCs. Cord segments were collected and transported to the laboratory. Segments were sectioned (A) and washed with saline, while also having the vessels removed (B,C). Afterward, cord was triturated (D) before enzymatic digestion.



Supplementary Figure S2. Representative images of differentiation assay of MSCs. Cells were exposed to differentiation conditions to induce osteogenesis, chondrogenesis, and adipogenesis. Cells were stained using Alizarin Red, Alcian Blue, and Oil Red, respectively. Original magnification 100x (A,B) and 200x (C).

Reference

1. Punt J, Owen J, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001;22(11):633–40.
2. Farag SS, VanDeusen JB, Fehniger T a, Caligiuri M a. Biology and clinical impact of human natural killer cells. *Int J Hematol* [Internet]. 2003;78(1):7–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12894845>
3. Montaldo E, Zotto G Del, Chiesa M Della, Mingari MC, Moretta A, Maria A De, et al. Human NK cell receptors/markers: A tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytom Part A.* 2013;83(8):702–13.
4. Alnabhan R, Madrigal A, Saudemont A. Differential activation of cord blood and peripheral blood natural killer cells by cytokines. *Culture.* 2015;(April 2014).
5. Becker PSA, Suck G, Nowakowska P, Ullrich E, Seifried E, Bader P, et al. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2016;65(4):477–84. Available at: "<http://dx.doi.org/10.1007/s00262-016-1792-y>
6. Lapteva N, Szmania SM, van Rhee F, Rooney CM. Clinical grade purification and expansion of natural killer cells. *Crit Rev Oncog* [Internet]. 2014;19(1-2):121–32. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4095851&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
7. Knorr DA, Bachanova V, Verneris MR, Miller JS. Clinical utility of natural killer cells in cancer therapy and transplantation. *Semin Immunol* [Internet]. 2014;26(2):161–72. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2014.02.002>
8. Spanholtz J, Tordoir M, Eissens D, Preijers F, Van Meer Der A, Joosten I, et al. High log-scale expansion of functional human natural killer cells from umbilical cord blood CD34-positive cells for adoptive cancer immunotherapy. *PLoS One.* 2010;5(2).
9. Shimasaki N, Coustan-smith E, Kamiya T. Expanded and armed natural killer cells for cancer treatment. *Cytotherapy* [Internet]. 2016;(March). Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.06.013>
10. Spanholtz J, Preijers F, Tordoir M, Trilsbeek C, Paardekooper J, de Witte T, et al. Clinical-grade generation of active NK cells from cord blood hematopoietic progenitor cells for immunotherapy using a closed-system culture process. *PLoS One.* 2011;6(6).
11. Introna M, Franceschetti M, Ciocca a, Borleri G, Conti E, Golay J, et al. Rapid and massive expansion of cord blood-derived cytokine-induced killer cells: an innovative proposal for the treatment of leukemia relapse after cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006;38(9):621–7.
12. Boissel L, Tuncer HH, Betancur M, Wolfberg A, Klingemann H. Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Increase Expansion of Cord Blood Natural Killer Cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14(9):1031–8.
13. Denman CJ, Senyukov V V., Somanchi SS, Phatarpekar P V., 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).
14. Batsali AK, Kastrinaki M-C, Papadaki H a, Pontikoglou C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2013;8(2):144–55. Available at: <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cscr/2013/00000008/00000002/art>

- 00005\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23279098
15. Mennan C, Wright K, Bhattacharjee A, Balain B, Richardson J, Roberts S. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
 16. Basford C, Forraz N, McGuckin C. Optimized multiparametric immunophenotyping of umbilical cord blood cells by flow cytometry. *Nat Protoc* [Internet]. 2010;5(7):1337–46. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.88>
 17. Khaziri N, Mohammadi M, Aliyari Z, Rad JS, Nasrabadi HT, Charoudeh HN. Cord blood mononuclear cells have a potential to produce NK cells using IL2Rg cytokines. *Adv Pharm Bull* [Internet]. 2016;6(1):5–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2016.002>
 18. Lin SJ, Huang YC, Cheng PJ, Lee PT, Hsiao HS, Kuo ML. Interleukin-15 enhances the expansion and function of natural killer T cells from adult peripheral and umbilical cord blood. *Cytokine*. 2015;76(2):348–55.
 19. de Lima M, McNiece I, Robinson SN, Munsell M, Eapen M, Horowitz M, et al. Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *N Engl J Med* [Internet]. 2012;367(24):2305–15. Available at: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=medl&NEWS=N&AN=23234514>
 20. Robinson SN, Ng J, Niu T, Yang H, McMannis JD, Karandish S, et al. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2006;37(4):359–66. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1705258>
 21. Lopez-vergès S, Milush JM, Pandey S, York V a, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dim CD16+ NK cell subset. *Blood* [Internet]. 2010;116(19):3865–74. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2981540&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 22. Moretta L, Pietra G, Vacca P, Pende D, Moretta F, Bertina A, et al. Human NK cells: From surface receptors to clinical applications. *Immunol Lett* [Internet]. 2016;178:15–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2016.05.007>
 23. Moretta L. dim human NK cells Dissecting. *Blood*. 2010;116(19)(2010 Nov 11):3689–91.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, foi possível estabelecer um protocolo de isolamento de células mononucleares do SCUP de unidades coletas na rotina do Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que normalmente são desprezadas por não atenderem os critérios de volume e/ou celularidade para processamento estabelecidos na RDC 56 (92). Foi também estabelecido/padronizado um protocolo de isolamento de células mesenquimais do tecido do cordão umbilical utilizando digestão enzimática associando colagenase tipo I e tripsina.

Corroborando com a bibliografia, foi possível o isolamento e a expansão das células NK de mononucleares do SCUP. Com base nos protocolos avaliados, foi possível estabelecer os protocolos mais vantajosos para expansão e ativação da célula NK.

10 PERSPECTIVAS

A terapia celular com células NK é uma promissora área em franca expansão, visto os muitos estudos clínicos em desenvolvimento e desenvolvidos. Neste contexto, o conhecimento da capacidade proliferativa e de ativação dessas células em diferentes condições de cultivo é uma importante estratégia para a escolha do melhor protocolo para a imunoterapia adotiva contra o câncer. Desta forma, pretende-se investigar e avaliar outras características das células NK isoladas, como: dosagem de citocinas no meio de cultivo; capacidade de citotoxicidade contra outros alvos tumorais. Quanto à ação das células tronco mesenquimais em condições de co-cultivo com a célula NK, pretende-se avaliar, o perfil de citocinas liberadas no meio celular e perfil imunomodulatório das CTMs *in vitro*.

11 ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, abaixo assinado, autorizo a equipe médica e assistentes, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a realizarem o procedimento de coleta das células do sangue do cordão umbilical e da placenta do meu bebê. Estas células serão armazenadas e poderão ser utilizadas para o tratamento de diversas doenças sangüíneas e/ou imunológicas em pacientes que não tem familiar em condições de doar. Este programa é parte da Rede Brasilcord, vinculado ao Ministério da Saúde, realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e não acarretará custo ou qualquer remuneração, compensação ou privilégio pela doação do sangue do cordão umbilical e placentário.

A equipe explicou-me de forma clara a natureza e o objetivo deste procedimento e me foi dada oportunidade de fazer perguntas, sendo todas elas respondidas completa e satisfatoriamente.

Estou ciente que a doação deste material biológico, que habitualmente é descartado, não trará qualquer risco ao meu bebê e além disso estarei ajudando no tratamento de pessoas portadoras de doenças graves, como leucemias e algumas anemias hereditárias, que em muitos casos podem ser fatais. O sangue do cordão umbilical e da placenta possui células que são capazes de desenvolver uma nova medula óssea nestes pacientes, que irá produzir sangue.

Fui informada que a coleta do sangue de cordão umbilical e placentário ocorre após o nascimento do bebê e a retirada da placenta, não tendo qualquer interferência no parto, nem no cuidado da mãe ou do bebê. Este material será coletado, processado e, quando considerado em condições de ser utilizado para tratamento, será armazenado no Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP) do HCPA, por longo período de tempo. Quando algum paciente necessitar destas células para tratamento, o material armazenado será utilizado.

Concordo que para participar deste programa, além da coleta do sangue do cordão umbilical e placentário, será necessário:

- consultar as informações contidas no meu prontuário e no do meu bebê;
- realizar uma entrevista breve com perguntas sobre minha gravidez e história clínica;

- coletar amostras do meu sangue, para fazer exames considerados necessários.

Fui informada também que no meu sangue e no sangue do cordão umbilical e placentário serão realizados testes para verificar a possibilidade de utilizar este material em pacientes que poderão se beneficiar com este tipo de tratamento. Estes testes incluem contagens de células e testes para verificar a presença de infecções e de anemias hereditárias graves, sendo que parte deste material será armazenada para testes futuros. Caso eu tenha interesse em saber os resultados dos exames, os mesmos estarão disponíveis no Banco de Sangue do HCPA. Os resultados destes testes serão mantidos de forma confidencial.

Caso o material biológico coletado não esteja em condições de ser utilizado para tratamento, eu () concordo () não concordo que ele possa ser utilizado em projetos de pesquisa, sem qualquer dado de identificação pessoal associado.

Estou ciente que a minha decisão em participar ou não deste programa não irá influenciar de forma alguma na qualidade do meu atendimento e do meu bebê e caso tenha aceitado e queira desistir da doação, estarei livre para fazê-lo até o momento da coleta. Em caso de dúvidas poderei ainda entrar em contato com o BSCUP, pelo telefone 33597654.

Data: / /

Nome (em letra de forma) do paciente ou responsável:

Documento de identificação:

Assinatura:

Responsável pela obtenção do Termo:

CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 150312

Data da Versão do Projeto: 03/07/2015

Pesquisadores:

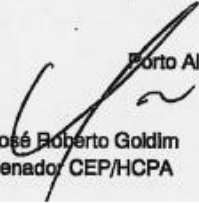
LUCIA MARIANO DA ROCHA SILLA
MARIA APARECIDA LIMA DA SILVA
MELISSA HELENA ANGELI
ANELISE BERGMANN ARAÚJO
ALVARO MACEDO LAUREANO
JULIANA MONTEIRO FURLAN
TISSIANA SCHMALFUSR
LIANE MARISE ROHSIG
GABRIELLE DIAS SALTON

Título: ESTUDOS SOBRE O ISOLAMENTO E EXPANSÃO DE CÉLULAS NATURAL KILLER (NK) DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO NA PRESENÇA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 07 de dezembro de 2015.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA