

PAULO CÉSAR MARTINS ALVES

**EXPANSÃO E CITOTOXICIDADE DE CÉLULAS
NATURAL KILLER DE PACIENTES COM
NEOPLASIA DE OVÁRIO.**

**UNICAMP
2010**

PAULO CÉSAR MARTINS ALVES

**EXPANSÃO E CITOTOXICIDADE DE CÉLULAS
NATURAL KILLER DE PACIENTES COM
NEOPLASIA DE OVÁRIO.**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do Título de Mestre em Tocoginecologia, área de
Ciências Biomédicas*

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Petta

Co-orientador: Dr. Fernando Guimarães

**UNICAMP
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Alves, Paulo César Martins
Al87e Expansão e citotoxicidade de células *natural killer* de pacientes
com neoplasia de ovário / Paulo César Martins Alves.
Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores : Carlos Alberto Petta; Fernando Guimarães
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Células NK. 2. Ovários-Câncer. 3. Imunoterapia.
I. Petta, Carlos Alberto. II. Guimarães, Fernando.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. IV. Título.

Título em inglês : *Ex vivo expansion and cytotoxicity of NK cell from patients with ovarian neoplasia*

Keywords:

- NK cells
- Ovary
- Immunotherapy

Titulação: Mestre em Tocoginecologia

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Petta

Profª. Drª. Ana Maria Moro

Profª. Drª. Joana Froes Bragança Bastos

Data da defesa: 12-08-2010

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: PAULO CÉSAR MARTINS ALVES

Orientador: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO PETTA

Co-Orientador: Prof. Dr. FERNANDO GUIMARÃES

Membros:

1.

2.

3.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 12/08/2010

Dedico este trabalho...

À minha mãe Jandira, pelo cuidado, carinho e amor dedicados por todos estes anos e que, em meio à dor da despedida e talvez ainda incrédula, me abençoou e me enviou para a realização deste sonho.

Aos meus familiares pelo apoio e compreensão.

À minha esposa Suiellen, por ter acreditado em mim e ter resgatado o que até outrora parecia perdido. Pelo incentivo, amor, companheirismo e por ser a minha porção nesta vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser fonte de vida, sabedoria, amor, misericórdia, graça, força e pela obra perfeita e transformadora.

Ao Prof. Dr. Fernando Guimarães, pela amizade, paciência, disposição, conselhos, incentivos e colaboração essencial para a realização deste trabalho, além do perfeito modo de orientar.

Ao Prof. Dr. Carlos Petta, pela oportunidade do ingresso na pós-graduação.

À Dra. Tereza Cavalcanti, pelos conselhos e incentivos.

À Dra. Juliana Heinrich, pelas considerações e disponibilização do espaço para a realização deste trabalho.

À Profa. Sirlei Moraes, pelo apoio estatístico, disponibilidade e colaboração.

À Profa. Dra. Sophie Derchain, pela colaboração intelectual, incentivo e conselhos preciosos.

À Dra. Liliana Andrade, pela cooperação, disponibilidade e considerações.

Ao Prof. Dr. Luiz Otávio, pela excepcional disposição, considerações e colaboração com os objetivos deste trabalho.

À equipe dos Laboratórios Clínicos Especializados: Mara, Lúcia, Lucilene, Denise, Elizabete, Fernanda, Alex, Alexandre, Sr. Hamilton, Cássia e Renata, pelo apoio, compreensão e colaboração para o bom andamento da pesquisa em meio às rotinas laboratoriais.

À equipe de enfermagem do Ambulatório de Oncologia e Pronto Atendimento do CAISM, pelo auxílio técnico, disponibilidade e excelência.

Aos médicos e residentes da Oncologia do CAISM, pela cooperação e colaboração com os objetivos da pesquisa.

À equipe do Laboratório de Marcadores Celulares do Hemocentro: Dra. Irene, Fernanda, Suiellen e Rosângela, pela disponibilidade, paciência e socorro em momentos oportunos.

Aos meus amigos do Banco de Sangue, pelos bons momentos e conhecimentos compartilhados, pelo apoio e incentivo.

Aos amigos especiais: Dr. Fabrício, Liliane e Janaína, pela parceria excepcional, pelo carinho, pelo apoio e experiências compartilhadas em tão pouco tempo.

Aos amigos mais chegados que irmãos, por serem parte essencial da minha vida em Campinas, verdadeiro cuidado de Deus.

À minha mãe Jandira e meu pai por adoção Rilberth, por todo cuidado, apoio e confiança, em mim depositados. O que vocês semearam está dando frutos.

Ao meu pai Julio e a Ingrid, pelo apoio e compreensão.

Aos meus irmãos Bárbara, Brenda e Adrian, pelo amor, carinho e saudade.

À minha esposa Suiellen, pelo amor, carinho e auxílio constante, por repreender, aconselhar, dar suporte e incentivo. O teu cuidado me foi inspirador e o teu amor me faz empenhar a minha honra para cuidar dos nossos sonhos.

À todos os meus familiares, pelo incentivo.

À FAPESP, pelo apoio financeiro que resultou no desenvolvimento deste estudo

“A verdadeira sabedoria habitará no coração do homem, enquanto que o conhecimento lhe será agradável a alma. Bem aventurado aquele que encontra a sabedoria e adquire o conhecimento.”

Pv. 2 - 3

RESUMO

A possibilidade de se gerar preparações de células efetoras enriquecidas com células *natural killer* (NK) de pacientes com câncer tem sido foco de estudos que buscam fontes de células efetoras autólogas para o tratamento de tumores humanos. **Objetivos:** O objetivo neste estudo foi avaliar a possibilidade de se expandir células NK a partir do sangue de pacientes com neoplasia de ovário, assim como o potencial citotóxico destas células. **Sujeitos e métodos:** Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de 13 pacientes voluntárias com neoplasia de ovário, Grupo Benigno (n=7) e Grupo Maligno (n=6), foram cultivados em meio CellGro suplementado com anti-CD3 (20ng/ml, adicionado aos primeiros 10 dias), IL-2 (1000 UI / ml) e SFB (10%) por 21 dias. A ação citotóxica das preparações de células efetoras foi avaliada por citometria de fluxo utilizando como células alvo linhagens tumorais K562 e OVCAR3. **Resultados:** No Grupo Benigno, as células cultivadas por 21 dias apresentaram variação percentual positiva dos subtipos de linfócitos NK ($17,1 \pm 5,2\%$) e NK-T ($10,4 \pm 3,1\%$) associados à variação percentual negativa das células T ($-6,2 \pm 6,2\%$). No Grupo Maligno, as células cultivadas por 21 dias apresentaram variação percentual positiva para todos os subtipos (NK $12,5 \pm 6,0\%$, NK-T $4,2 \pm 0,7\%$ e T $15,3 \pm 5,6\%$). As preparações de células enriquecidas com células NK, de ambos os grupos, foram citotóxicas contra as linhagens de células tumorais. A citotoxicidade foi significativamente ($p < 0,05$) maior quando utilizadas células efetoras cultivadas por 21 dias, em comparação com células efetoras obtidas no dia 14 da cultura.

Também foi observado maior ação citotóxica ($p < 0,05$) nas frações, separadas magneticamente, contendo células CD56⁺ em comparação com as frações CD56⁻.

Conclusões: Preparações de células efetoras ricas em células NK podem ser expandidas *in vitro* a partir de CMSP de pacientes com neoplasia de ovário. Estas células são providas de função citolítica, indicando o sistema de cultivo empregado como uma fonte viável de células efetoras autólogas.

Palavras Chave: Células NK, câncer de ovário, imunoterapia.

ABSTRACT

The possibility of generating natural killer (NK) enriched cell preparations from cancer patients has been focused on studies seeking for autologous effector cell source for treatment of human malignancies. The objective of the present work was to evaluate the possibility of expanding NK cells from peripheral blood of patients with ovarian neoplasia, and to evaluate their cytotoxic function. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 13 volunteer patients with ovarian neoplasia, 7 benign and 6 malignant tumors, were cultured in CellGro medium supplemented with anti-CD3 (20ng/ml, for the 9-10 initial days), IL-2 (1000 UI/ml) and FBS (10%) for 21 days. The cytotoxic capacity of NK cells was evaluated using a flow cytometry-based cytotoxicity assay. The K562 and the OVCAR3 cell lines were used as target cells. Day-21 cultured cells of the benign neoplasia patients resulted in positive percentual variation of NK (+17.1±5.2%) and NK-T (+10.4±3.1%) lymphocyte subtypes associated with negative percentual variation of T cells (-6.2±6.2%). Differently, day-21 cultured cells of the malignant neoplasia patients presented positive percentual variation for all of the lymphocyte subtypes (NK +12.5±6.0%, NK-T +4.2±0.7% and T +15.3±5.6%). NK enriched effector cell preparations from both, benign and malignant ovarian neoplasia patients, were cytotoxic against the K562 and OVCAR3 cell lines. Cytotoxicity was significantly ($p<0.05$) higher using effector cells from day-21 cultures, compared with effector cells from day-14. Cytotoxicity was significantly ($p<0.05$) higher using magnetically separated effector cell fractions containing CD56⁺ cells compared with effector cell

fractions deprived of these cells. The present study demonstrated that NK enriched effector cell preparations can be expanded *in vitro* from PBMC of ovarian neoplasia patients. These cells are provided with cytolytic function, indicating the culture system employed as a feasible source for autologous effector cells that should be evaluated for the NK-based adoptive therapy of cancer.

Key words: NK cells, ovarian neoplasms, immunotherapy.

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD - Composto 7-aminoactinomicina D

CAISM - Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher

CD – Cluster de Diferenciação

cél./ml – Células por mililitro

CFSE - Composto *Carboxyfluorescein-Succinimydil-Ester*

CMSP - Células Mononucleares do Sangue Periférico

CNS – Conselho Nacional de Saúde

DMSO - Dimetil Sulfóxido

E – *Effector*

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FBS – *Fetal Bovine Serum*

FIGO - *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*

FITC - Isotiocianato de Fluoresceína

FOSP - Fundação Oncocentro de São Paulo

g – Força Centrífuga Relativa

GM-CSF – *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*

GPI – Glicofosfatidilinositol

°C – *Graus Celsius*

h – horas

HLA – *Human Leukocyte Antigen*

IL – Interleucina

INF – Interferon

K562 – Linhagem Tumoral Eritromieloblastóide Humana

KIR - *Killer Immunoglobuline-Like Receptors*

LAK - *Lymphokine-activated killer*

LCE – Laboratórios Clínicos Especializados

MAbs – *Monoclonal Antibodies*

MIC - *MHC class I Related Chain Protein*

µl – Microlitro

µM – Micromolar

ml – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

min – Minutos

NCR - *Natural Citotoxic Receptors*

neg - negativa

ng – Nanograma

NK – *Natural Killer*

NK-T – *Natural Killer like-T*

OVCAR3 – Linhagem Tumoral de Carcinoma de Ovário Humano

PBMC - *Peripheral blood mononuclear cells*

PBS - *Phosphate-Buffered Saline*

PE – Ficoeritrina

PE-Cy7 - Ficoeritrina / Cianina 7

pos – Positiva

rhIL - *Recombinant Human Interleukin*

SAS – *Statistical Analysis Software*

SCGM – *Stem Cell Growth Medium*

SEM - *Standard Error Mean*

SFB – Soro Fetal Bovino

SSC/ FSC – *Side Scater / Foward Scater*

T – *Target*

TNF – *Tumor Necrosis Factor*

TRAIL - *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*

UI – Unidades Internacionais

ULBP - *UL16-Biding Protein*

Unicamp – Universidade Estadual de Campinas

WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	vi
AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	21
2.OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. SUJEITOS E MÉTODOS	33
3.1 Desenho do estudo.....	33
3.2 Tamanho amostral	33
3.3 Sujeitos	33
3.4 Critérios de inclusão	34
3.5 Coleta das amostras de sangue	34
3.6 Expansão das células NK a partir das CMSP	35
3.7 Cultura de linhagens de células tumorais	36
3.8 Imunofenotipagem das CMSP e preparações de células efetoras	37
3.9 Avaliação da citotoxicidade das preparações de células efetoras	38
3.10 Seleção positiva de células CD56 ⁺ através de coluna magnética	39
3.11 Marcação das células alvo e ensaio de citotoxicidade celular	39
3.12 Criopreservação	41
3.13 Análise Estatística	41

4. PUBLICAÇÃO	44
5. CONCLUSÃO.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
7. ANEXOS	86
7.1 Anexo 1 Estadiamento do carcinoma de ovário 2000 (FIGO).....	86
7.2 Anexo 2 Características hematológicas das amostras	87
7.3 Anexo 3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	88
7.4 Anexo 4 Protocolo da Comissão de Pesquisa do Departamento de Tocoginecologia/CAISM	90

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Nas duas últimas décadas foram realizadas diversas tentativas no sentido de desenvolver a imunoterapia para o tratamento do câncer. Um obstáculo significativo para o uso da imunoterapia baseada em células *natural killer* (NK) tem sido a dificuldade em se obter quantidades suficientes de células citotóxicas para aplicação clínica. *Lymphokine activated killer cells* (células LAK) foi a primeira terapia baseada em células citotóxicas utilizadas no tratamento de tumores em ensaios clínicos e modelos experimentais murinos.^{1, 2, 3, 4, 5} Entretanto, a dificuldade em se gerar células LAK em quantidades suficientes, associado a sua baixa atividade anti-tumoral *in vivo*,⁴ impediu o seu uso terapêutico. As células LAK são compostas por populações heterogêneas de linfócitos, principalmente T policlonais, mas são as células *natural killer*, presentes em menor número (< 5%), que retêm a função anti-tumoral.^{6, 7}

As células NK constituem 10-15% dos linfócitos presentes no sangue periférico humano, sendo identificadas pela expressão do marcador CD56 e ausência do CD3 (CD3⁻CD56⁺). O nome *natural killer* foi utilizado pela primeira vez por Rolf Kiessling e colaboradores,^{8, 9} há mais de 30 anos, após isolarem e observarem a capacidade destas células em eliminar células tumorais sem a necessidade de um estímulo prévio.¹⁰

As células NK produzem citocinas pró-inflamatórias como interferon- γ (INF- γ), fator de necrose tumoral- α (*tumor necrosis factor- α* , TNF- α) e fator estimulador

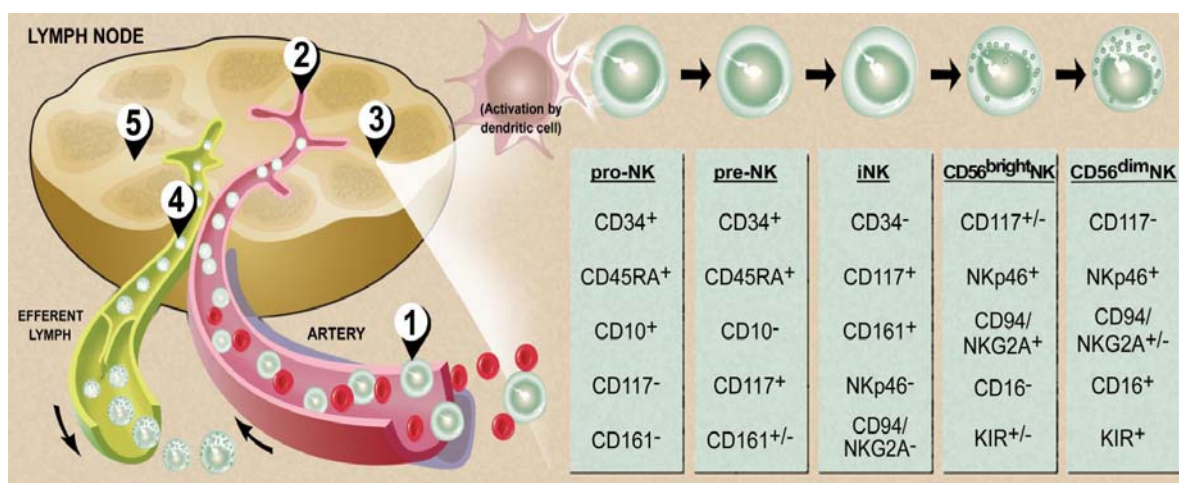
de colônia de granulócitos e macrófagos (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) que regulam a resposta imune inata e contribuem para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa.¹¹ A ação citotóxica das células NK ocorre após o contato com a célula alvo e é proporcionada pela secreção de perforina e granzima-B ou indução da apoptose através dos ligantes FasL e TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*).^{11, 12, 13, 14, 15}

As células NK podem ser agrupadas em dois subtipos funcionais considerando a expressão do marcador CD56. A maioria (90%) das células NK humanas encontradas no sangue periférico expressa baixa densidade deste marcador, sendo chamadas de CD56^{dim}, enquanto a minoria delas (10%) expressa alta densidade de CD56 e são chamadas de CD56^{bright}.^{16, 17} As células CD56^{dim} podem ser encontradas na medula óssea, sangue periférico e baço, expressam níveis elevados do receptor CD16 (FcγRIIIA), possuem grande potencial citolítico e produzem menor variedade de citocinas, enquanto que, células CD56^{bright} são encontradas principalmente nos tecidos linfóides periféricos, expressam níveis baixos de CD16, possuem menor capacidade citolítica e produzem maior variedade de citocinas imunoreguladoras.^{18, 19, 20}

Foi proposto que células CD56^{bright} são menos maduras que as CD56^{dim}, uma vez que há aumento na expressão de receptores característicos do subtipo “*dim*” (como os receptores de ativação e o CD16⁺) quando o subtipo “*bright*” é estimulado por IL-2.^{16, 21} Outra evidência que suporta a idéia de que células CD56^{bright} são menos maduras que as CD56^{dim} é a existência de grandes quantidades de células CD56^{bright} associadas a linfócitos CD34⁺CD45RA⁺,

precursores das células NK, nos tecidos linfóides secundários. Nestes tecidos há, ainda, abundância de células apresentadoras de antígenos que expressão a interleucina 15 (IL-15) ligada a sua superfície, citocina conhecida pela importância na maturação das células NK (Figura 1).^{21, 22, 23, 24} Dessa forma, o desenvolvimento das células NK não ocorreria totalmente na medula óssea, mas incluiria estágios nos tecidos linfóides secundários.²¹

Figura 1: Modelo proposto para o desenvolvimento das células NK: (1) as células derivadas da medula ($CD34^+CD45RA^+$) migrariam para os linfonodos, (2) onde extravasariam o tecido endotelial até o espaço parafolicular. (3) As células precursoras das NK passam por vários estágios de maturação tornando-se “*bright*” ou “*dim*”. (4) As células $CD56^{dim}$ retornariam a circulação, enquanto que (5) as $CD56^{bright}$ permaneceriam no tecido linfóide, interagindo com as células dendríticas. Figura de Debra Dartz.²¹



A ação citolítica das células NK é determinada pelo balanço de sinais inibidores e ativadores resultantes da interação dos receptores presentes nas células NK com seus ligantes sobre a célula alvo.^{25, 26, 27} Diversos receptores, inibidores e ativadores, têm sido caracterizados nas células NK (Tabela 1). Entre os principais receptores inibidores encontram-se os receptores KIR (“killer

immunoglobuline-like receptors”), que reconhecem moléculas do complexo antigênico leucocitário humano (HLA) de classe I dos grupos A, B e C e o receptor CD94-NKG2A que reconhece o HLA de classe I do grupo E e G.^{18, 29, 30}

Tabela 1. Receptores e coreceptores envolvidos na regulação das células NK:^{26, 27, 28}

<i>Gene</i>	<i>Localização Cromossomal</i>	<i>Nome do receptor</i>	<i>Ligante</i>	<i>Tipo de sinal</i>
KIR2DL1	19q13.4	p58.1	HLA-Cw2, 4, 5, 6	Inibidor
KIR2DL2	19q13.4	p58.2	HLA-Cw1, 3, 7, 8	Inibidor
KIR3DL1	19q13.4	p70	HLA-Bw4	Inibidor
KIR3DL2	19q13.4	p140	HLA-A3, A11	Inibidor
KIR2DL4	19q13.4	p49	HLA-G	Inibidor
LIR1/ILT2	19q13.4	CD85j	HLA-A, B, C, E, F, G, CMV-UL18	Inibidor
LIR2/ILT4	19q13.4	LIR2/ILT4	HLA-F	Inibidor
CD94/NKG2A	12p12.3-p13.2	CD94/NKG2A	HLA-E, G	Inibidor
LAIR1	19q13.4	p40/LAIR1	Desconhecido	Inibidor
IRC1	17	IRp60	Desconhecido	Inibidor
AIRM1	19q13.3	p75/AIRM1	Desconhecido	Inibidor
CMRF35	17q24	CMRF35	Desconhecido	Desconhecido
KIR2DS1	19q13.4	p50.1	HLA-Cw2, 4, 5, 6	Ativador
KIR2DS2	19q13.4	p50.2	HLA-Cw1, 3, 7, 8	Ativador
KIR2DS4	19q13.4	p50.3	Desconhecido	Ativador
CD94/NKG2C	12p12.3-p13.2	CD94/NKG2C	HLA-E	Ativador
NKp46	19q13.4	NKp46	Desconhecido	Ativador
IC7/NKA1	6p21.3	NKp30	Desconhecido	Ativador
NKp44	6p21.1	NKp44	Desconhecido	Ativador
NKG2D	12p12.3-p13.2	NKG2D	MIC-A, B, ULBP	Ativador
2B4	1q22	CD244	CD48	Ativador
KLRF1	12p12.3-p13.2	NKp80	Desconhecido	Ativador
FcγRIII	1q23	CD16	IgG	Ativador
DNAM-1	18q22.3	CD226	CD155 e CD112	Ativador
CD2	1p13.1	CD2	CD58	Ativador

O HLA de classe I é expresso por praticamente todas as células nucleadas de um indivíduo, desempenhando papel fundamental para que o sistema imune reconheça as células do organismo como próprias. Uma vez comprometido com HLA de classe I próprio, os receptores inibidores KIR sinalizam de forma dominante sobre qualquer sinal proveniente dos receptores de ativação, impedindo a ação citolítica da célula NK.^{21, 31, 32} Dessa forma, as células NK poupam células autossômicas que expressam níveis normais de HLA de classe I, enquanto eliminam células alteradas, como as células tumorais e infectadas por vírus que, freqüentemente, perdem a expressão do HLA I.^{33, 34}

Entre os receptores ativadores destacam-se os receptores citotóxicos naturais (*natural cytotoxic receptors*, NCR) NKp46 e NKp30, expressos constitutivamente nas células NK, e o receptor NKp44, expresso após a ativação das células NK pela interleucina 2 (IL-2).^{10, 35} Estes receptores também auxiliam no reconhecimento de células tumorais, infectadas por vírus e na regulação da maturação de células dendríticas. Todavia, a identidade dos seus ligantes ainda permanece desconhecida.^{36, 37} A densidade na expressão dos NCR varia entre indivíduos e correlaciona-se diretamente com a capacidade das células NK eliminar células alteradas.^{38, 39}

Outro importante receptor ativador é o NKG2D cuja expressão, diferente dos NCR, não é restrita as células NK, sendo também expresso por linfócitos T citotóxicos (γ/δ T e α/β T-CD8). O NKG2D reconhece como ligantes moléculas homólogas ao HLA de classe I representadas por proteínas transmembrana como o MIC (*MHC class I related chain protein*, MIC/A e MIC/B) e o ULBP4 (*UL16-binding*

protein) e proteínas ancoradas à superfície celular pelo glicofosfatidilinositol (GPI) como os ULBPs 1, 2 e 3.^{27, 40, 41, 42, 43}

Em humanos, o aumento da expressão de MIC e ULBP está relacionado a diferentes formas de estresse celular, como a infecção viral e a transformação maligna.^{40, 42, 44} De fato, a expressão de MICA/B tem sido observada na maioria dos tumores epiteliais humanos, incluindo carcinomas de mama, ovário, cólon, rins e pulmão,^{27, 45} contribuindo para a idéia de que estes tumores seriam suscetíveis a ação de células imunes citotóxicas como as NK.

Observações clínicas implicaram as células NK no restabelecimento de pacientes submetidos ao transplante haploidêntico de células tronco-hematopoiéticas para o tratamento da leucemia mielóide.^{46, 47} Foi também observado que pacientes com neoplasias epiteliais com infiltrados linfocitários ricos em células citotóxicas, linfócitos T CD8 e NK, apresentam melhor prognóstico.^{48, 49, 50, 51} Tais observações combinadas com a melhor compreensão de como as interações receptor-ligante influenciam na ação citotóxica das células NK contra as células tumorais tem fomentado estudos abordando seu potencial uso terapêutico, tanto para o tratamento autólogo como alogênico do câncer. Adicionalmente, tem se tornado tecnicamente possível obter preparações celulares ricas ou puras em células NK, em quantidade suficiente para uso clínico.

^{17, 52, 53, 54}

Neste sentido, o efeito anti-leucêmico das células NK foi observado tanto em pacientes tratados com células NK alogênicas purificadas ⁵⁵ quanto em camundongos imunodeficientes enxertados com células leucêmicas humanas e tratados com células NK expandidas *in vitro*. ⁵⁶ Células NK de pacientes com mieloma múltiplo, expandidas *ex vivo*, apresentaram ação citotóxica contra células tumorais autólogas mantendo sua tolerância contra células autólogas normais. ⁵⁷ Carlsten e colaboradores ⁵⁸ observaram que células NK alogênicas não estimuladas foram capazes de reconhecer e lisar células tumorais primárias de ovário com baixa expressão do HLA de classe I, indicando o carcinoma de ovário como alvo potencial para terapia baseada no transplante de células NK.

O carcinoma de ovário é o mais letal entre os cânceres ginecológicos, ocupando o quinto lugar entre as causas de morte de mulheres norte americanas. ^{59, 60} A letalidade do carcinoma de ovário é atribuída ao estágio avançado que a doença freqüentemente se encontra no momento do diagnóstico. Quando a enfermidade está limitada ao ovário, a cirurgia pode ser curativa, beneficiando 90% das pacientes tratadas. Entretanto, na ocasião do diagnóstico, 67% das pacientes já apresentam comprometimento de outros tecidos além dos ovários e, apesar dos avanços terapêuticos, somente 31% das pacientes em estágio avançado da doença estarão vivas cinco anos após o diagnóstico. ⁵⁹ No Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher (CAISM) o câncer de ovário é o terceiro tipo mais freqüente seguindo o câncer de mama e útero, com aproximadamente 45 novos casos por ano (Secretaria de Estado da Saúde Fundação Oncocentro de São Paulo-FOSP ⁶¹).

O epitélio responde por 90% dos cânceres de ovário, os quais podem se originar do epitélio simples que constitui a superfície do ovário ou dos cistos de inclusão presentes na região cortical.⁶² Um aspecto amplamente conhecido do comportamento do câncer de ovário é a capacidade deste tumor de semear a cavidade peritoneal com células tumorais. A disseminação intraperitoneal está associada à formação de ascite e permite que células tumorais possam, através do fluido peritoneal, atingir órgãos adjacentes. Células tumorais também podem se espalhar através de vasos linfáticos que drenam os ovários para os linfonodos pélvicos e paraortícos.^{60, 63}

Os fatores prognósticos associados incluem o estágio FIGO (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*⁶⁴ – Anexo 1), tumor residual pós-cirúrgico, grau do tumor, subtipo histológico, *performance status* e intervalo livre da doença após primeira linha de tratamento.⁶⁵ Atualmente, o tratamento de tumores em grau avançado baseia-se na cirurgia acompanhada pela quimioterapia com agentes derivados de platina (carboplatina e cisplatina) em combinação com taxanos (paclitaxel e docitaxel).⁶⁶ Contudo, a maioria das pacientes (60-70%) que recidivam entre 2 e 5 anos após a primeira linha de tratamento, evoluem para óbito.⁶⁷

A origem epitelial do carcinoma de ovário sugere que as células tumorais expressam ligantes para o receptor ativador NKG2D das células NK. De fato a presença destes ligantes vem sendo confirmada por estudos recentes.^{58, 68} Além disso, alterações da expressão do HLA de classe I nas células do carcinoma de ovário favorecem a ação citotóxica mediada pelas células NK.^{69, 70} A natureza

difusa do câncer de ovário e a rápida disseminação metastática através da cavidade peritoneal limitam a eficiência da terapia tradicional. Há, portanto, a necessidade de novas abordagens terapêuticas visando eliminar células tumorais e prevenir a recidiva.

Neste sentido, estratégias terapêuticas utilizando células NK parecem particularmente interessantes para o tratamento do carcinoma, uma vez que se atribui a estes linfócitos da resposta imune inata o papel de prevenir a disseminação de células tumorais e eliminar metástases. Atualmente, o maior obstáculo para a realização de estudos clínicos que utilizem células NK está relacionado ao seu baixo percentual periférico que impede a obtenção de um grande número de células.¹⁷ Entretanto, estudos recentes têm demonstrado a possibilidade técnica em obter preparações celulares ricas ou puras em células NK a partir do sangue periférico de doadores saudáveis,⁵² de pacientes com leucemia linfocítica crônica⁵³ e mieloma múltiplo.⁵⁷

Não há, no entanto, relatos na literatura sobre tentativas de expansão seletiva de células NK de pacientes com neoplasia de ovário. Sabe-se que a neoplasia de ovário está relacionada à produção de um ambiente imunossupressor impedindo a resposta imune e eliminação das células tumorais.⁶⁵ Assim, a possibilidade de se obter células NK por expansão *ex vivo* a partir de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com neoplasia de ovário constituiria uma importante fonte de células efectoras autólogas que poderiam ser utilizadas para o tratamento do câncer como vem sendo preconizado nos últimos anos.^{17, 71, 72}

Objetivos

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial da expansão seletiva *ex vivo* como fonte autóloga de células NK de pacientes com câncer de ovário.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a possibilidade de se obter células NK pela expansão seletiva *ex vivo* de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com neoplasia benigna e maligna de ovário.

Avaliar a atividade anti-tumoral das preparações de células efetoras ricas em células NK contra as linhagens K562 (eritromieloblastóide humana) e OVCAR3 (carcinoma de ovário humano).

Avaliar a contribuição dos subtipos de linfócitos, presentes nas preparações de células efetoras, na atividade citotóxica.

Sujeitos e Métodos

3. SUJEITOS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Estudo experimental do comportamento biológico de células imunes humanas, com ênfase na resposta proliferativa e a atividade anti-tumoral quando estimuladas dentro de condições adequadas de cultura.

3.2 Tamanho amostral

Por se tratar de um estudo inédito do comportamento biológico de células imunes de pacientes com de câncer de ovário frente a estímulos para ativação e expansão *ex vivo*, associado às poucas informações existentes na literatura, não foi possível calcular-se o tamanho amostral previamente.

3.3 Sujeitos

Foram convidadas a participar do estudo pacientes assistidas no Ambulatório de Oncologia Pélvica e no Pronto Atendimento do Hospital da Mulher Professor Doutor José Aristodemo Pinotti - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) com diagnóstico clínico sugestivo de neoplasia de ovário e indicação cirúrgica para diagnóstico e tratamento da doença (16 pacientes), e ainda, pacientes submetidas à paracentese de alívio (1 paciente). Dessa forma, concluiu-se o período de 24 meses do estudo (novembro de 2007 a outubro de 2009) com um total de 17 pacientes amostradas das quais 13 foram incluídas,

baseado no diagnóstico anátomo patológico. A anuência das pacientes para a coleta das amostras se deu pela assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo 3), após serem informadas quanto aos objetivos da pesquisa e procedimentos a que seriam submetidas. Os procedimentos adotados foram previamente estabelecidos e homologados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (489/2005, pareceres 18/11/2005, 23/1/2007 e 25/8/2009 – Anexo 4) e respeitaram os princípios enunciados na Declaração de Helsinque e na resolução CNS 196/96 do Ministério da Saúde.

3.4 Critérios de inclusão

Foram incluídas no estudo pacientes com neoplasia primária de ovário cuja origem histológica correspondesse ao epitélio ou ao estroma ovariano, segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* – WHO⁷³).

3.5 Coleta das amostras de sangue

As amostras de sangue foram colhidas através de punção venosa utilizando sistema de coleta a vácuo e tubos com capacidade para 9ml contendo heparina sódica (Vacurette, Campinas, Brasil). Todas as amostras de sangue foram obtidas por ocasião da internação das pacientes para cirurgia diagnóstica, exceto a amostra de sangue da paciente 8 que foi obtida no momento da paracentese de alívio realizada no Pronto Atendimento do CAISM. As características hematológicas das amostras podem ser visualizadas no anexo 2.

3.6 Expansão das células NK a partir das CMSP

Logo após a coleta, as amostras de sangue foram encaminhadas ao setor de Laboratórios Clínicos Especializados do CAISM (LCE), onde foram mantidas a temperatura de 8-12°C até o momento do início da cultura celular, o que ocorreu dentro do prazo de 24h pós coleta. As preparações de células efectoras ricas em células NK foram obtidas pelo cultivo *in vitro* das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) das pacientes, empregando-se método baseado no descrito por Carlens e colaboradores.⁵² Inicialmente, CMSP foram isoladas por centrifugação em (515g/35min) gradiente de Ficoll-Paque (Ficoll, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) segundo orientações do fabricante. Depois da separação e lavagem das CMSP com meio Hanks (LCG Biotecnologia Ltda, Cotia, Brasil) o precipitado celular foi suspenso em 2ml do meio CellGro SCGM (CellGenix, Freiburg, Alemanha) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, LCG Biotecnologia Ltda, Cotia, Brasil).

As células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade determinada pelo método de exclusão do azul tripan (MERCK Chemicals, Frankfurt, Alemanha). Depois da contagem, as células foram lançadas em placas de cultura (35x10mm) a densidade de 1×10^6 células/ml e o meio de cultivo foi suplementando com 1000UI/ml de IL-2 (BD Pharmigen, San Diego, USA) e 20ng/ml de anti-CD3 (BD Pharmigen, San Diego, USA). As placas permaneceram incubadas à temperatura de 37°C com atmosfera contendo 5% CO₂ por 5-6 dias. Depois deste período, as placas foram raspadas e o número e a viabilidade das

células foram avaliados. Foi adicionado à suspensão celular volume suficiente do meio CellGro SCGM suplementado com SFB (10%), IL-2 (1000UI/ml) e anti-CD3 (20ng/ml) para se obter a densidade de 1×10^6 células/ml. A suspensão de células foi distribuída em garrafas (T25) e, novamente, permaneceram incubadas ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$) por 5 dias.

A partir do décimo dia da cultura celular o anti-CD3 foi retirado do meio de cultura, lavando-se as células por centrifugação e passando-se a utilizar meio CellGro SCGM suplementado com SFB (10%) e IL-2 (1000UI/ml). O número e a viabilidade celular foram avaliados nos dias 12-13 e 15-16, quando, aproximadamente 70% do meio de cultura foram substituídos por meio novo e, novamente, no dia 18-19, com a substituição de 50% do meio de cultura. Ainda na ocasião da manutenção das culturas celulares as células foram repicadas no sentido de manter a densidade de 1×10^6 células/ml.

3.7 Cultura de linhagens de células tumorais

As linhagens tumorais humanas K562 (eritromieloblastoide) e OVCAR3 (carcinoma de ovário) foram utilizadas neste estudo como células alvo nos ensaios para avaliação da citotoxicidade celular. Ambas as linhagens tumorais foram mantidas em meio RPMI-1640 (LCG Biotecnologia Ltda, Cotia, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, LCG Biotecnologia Ltda, Cotia, Brasil) e 2mM L-glutamina (Gibco, Tóquio, Japão). A manutenção das linhagens tumorais ocorreu a cada 48-72h, quando foram supridas com meio de cultura novo

e as células repicadas sempre que necessário (K562 mantidas com a densidade entre $0,3-0,4 \times 10^6$ cél./ml a $1-1,2 \times 10^6$ cél./ml e OVCAR3 repicadas na confluência).

3.8 Imunofenotipagem das CMSP e preparações de células efetoras

Todas as amostras de CMSP e preparações de células efetoras foram avaliadas quanto à presença de marcadores específicos de superfície celular, permitindo determinar a porcentagem de cada subtipo de linfócito presente no início da cultura (dia 0) e nos dias subsequentes (dias 14 e 21). Para esta avaliação foram utilizadas misturas de anticorpos monoclonais, com marcação de até três cores, diretamente conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou os *tandem* proteína de e ficoeritrina / cianina 7 (PE-Cy7). Os anticorpos monoclonais utilizados neste estudo estão relacionados na tabela 2.

Tabela 2: Anticorpos monoclonais utilizados na imunofenotipagem de CMSP.

Marcadores	Fluorocromos	Clones	Fabricante
CD3	FITC	HIT3a	BD Pharmingen
CD45	FITC	HI30	BD Pharmingen
CD14	PE	M5E2	BD Pharmingen
CD19	PE	HIB19	BD Pharmingen
CD56	PE	B159	BD Pharmingen
CD45	PE-Cy7	HI30	BD Pharmingen
CD16	PE-Cy7	3G8	BD Pharmingen

Para a marcação das células, foram misturadas 200µl de suspensão de células a 1×10^6 cél/ml com 3µl de anticorpos monoclonais, em combinações utilizando até três cores, e incubadas por 30 minutos no escuro a temperatura de 8-12°C. Após o período de incubação as células foram centrifugadas (652g/5min), o sobrenadante descartado e o precipitado suspenso em HANKS (LGC Biotecnologia, Brasil) para subsequente aquisição por citometria de fluxo utilizando-se um FACSCan™ da Becton Dickson – San Jose – Califórnia-USA. Para a análise das aquisições foram utilizados os programas CellQuest™ (Becton Dickson – San Jose – Califórnia-USA) e FlowJo™ (Treestar, Ashland, OR, USA).

Foram adquiridos 10.000 eventos de cada combinação de cores após o ajuste apropriado dos canais SSC/ FSC, permitindo localizar a população de linfócitos e a otimização da aquisição feita através dos detectores, amplificadores e da compensação das fluorescências, eliminando as sobreposições. O número absoluto de cada subtipo de linfócito presente na suspensão celular foi calculado multiplicando-se o resultado, em valor percentual, fornecido pelo citômetro pelo número total de células dividido por 100.

3.9 Avaliação da citotoxicidade das preparações de células efetoras

A ação citotóxica das preparações de células efetoras ricas em células NK foi avaliada por citometria de fluxo utilizando-se as linhagens celulares humanas K562 (eritromieloblastóide) e OVCAR3 (epitelial de ovário) como células alvo. Para a avaliação da citotoxicidade celular contra a linhagem K562 foram utilizadas células efetoras frescas, tomadas no décimo quarto e vigésimo primeiro dias das

culturas celulares. Além disso, as preparações de células efetoras foram avaliadas depois do isolamento da população CD56⁺, através da seleção positiva em coluna magnética, com o intuito de se estabelecer a contribuição das células NK e NK-T para a ação citotóxica. Com o sentido de se prevenir variações entre experimentos, a avaliação da citotoxicidade celular contra a linhagem OVCAR3 foi realizada com preparações de células efetoras criopreservadas ao término do período de cultura celular (dia 21).

3.10 Seleção positiva de células CD56⁺ através de coluna magnética

Ao término do período de cultura para expansão seletiva das células NK, tomou-se volume suficiente da suspensão celular para conter 25-100x10⁶ células e procedeu-se a separação, em coluna magnética, por seleção positiva para o marcador CD56 (NK, CD3negCD56pos; e NK-T, CD3posCD56pos), segundo as recomendações do fabricante do sistema de separação (sistema MidiMacs, Miltenyi Biotec com colunas LD e anticorpo monoclonal anti-CD56 conjugado a micro-esferas, Alemanha).

3.11 Marcação das células alvo e ensaio de citotoxicidade celular

Para a avaliação da citotoxicidade celular, as células alvo mortas foram diferenciadas das células vivas, ou mesmo, das células efetoras pelo uso de marcadores fluorescentes diferentes. As células alvo foram marcadas, previamente ao ensaio de citotoxicidade, com o composto *carboxyfluorescein-succinimidy-ester* (CFSE, Molecular Probe, Invitrogen, Burlington, Canada). Para

isso, as células alvo (suspensão de células isoladas) foram incubadas (15min, 37°C) à densidade de $2,5 \times 10^5$ células/ml na solução de CFSE 0,2-0,4µM preparada em PBS. A suspensão de células OVCAR3 foi obtida pelo tratamento das células em cultura com Tripsina (5min/ 37°C, LCG Biotecnologia Ltda, Cotia, Brasil).

Depois de marcadas com o CFSE, as células alvo (T) foram misturadas às células efetoras (E) nas proporções (E:T) de 1:1, 3:1 e 10:1 e incubadas por 4h à temperatura de 37°C. Foram realizadas triplicatas das misturas E:T. O marcador de morte celular 7-aminoactinomicina D (7-AAD, BD Biosciences, San Diego, USA) foi adicionado à preparação ao término das 4h de incubação. Dez minutos após a adição do 7-AAD os tubos contendo as misturas de células alvo e células efetoras foram resfriados em banho de gelo e as células avaliadas através da citometria de fluxo. As misturas de células efetoras e células alvo foram analisadas após o ajuste apropriado dos canais SSC/ FSC, permitindo localizar cada uma destas populações celulares, com aquisição de 30.000 eventos. Os controles de morte espontânea e morte máxima foram obtidos pela aquisição de amostras contendo exclusivamente células alvo e células alvo tratadas com triton X100 respectivamente.^{74, 75, 76} A citotoxicidade foi calculada segundo a fórmula: $\text{porcentagem de células mortas} = [(\text{morte tubo teste} - \text{morte basal}) / (\text{morte máxima} - \text{morte basal})] \times 100$.

3.12 Criopreservação

As suspensões de células (leucócitos, células efetoras ou linhagens neoplásicas) foram centrifugadas (600g/ 10min), tendo o sobrenadante desprezado e o precipitado suspenso com 1ml de SFB (LGC Biotecnologia, Brasil) contendo 10% de Dimetil sulfóxido (DMSO – SIGMA, St. Louis, USA). As suspensões foram transferidas para frascos próprios para congelação e armazenadas à -80°C pelo período de 24-48 horas. Após este período, os frascos foram transferidos para nitrogênio líquido.

3.13 Análise Estatística

Foi realizada análise descritiva para obtenção da média, mediana, percentual, valores mínimos e máximos e erro padrão da média (SEM) para as variáveis: subtipos de linfócitos, variação relativa dos subtipos de linfócitos e morte de células alvo. O teste t Student pareado e Wilcoxon foram utilizados para comparações intra grupo, t Student e Mann-Whitney para comparações entre dois grupos. Para correlações foram empregados regressão linear e regressão linear Stepwise. Consideraram-se valores significativos quando o $p < 0,05$. Para todas as análises foi utilizado o programa estatístico SAS versão 9.1.

Publicação

Ms. No.: GYN-10-688

Title: Ex vivo expansion and cytotoxicity of NK cells from patients with ovarian neoplasia

Corresponding Author: Dr Fernando Guimarães

Authors: Paulo César M Alves, B.Sc.; Liliana Aparecida L Andrade, Ph.D.; Carlos Alberto Petta, Ph.D.; Irene Lorand-Metze, Ph.D.; Sophie F Derchain, Ph.D.;

Dear Dr Guimarães,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: GYN-10-688

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author: <http://ees.elsevier.com/ygyno/>

Thank you for submitting your work to Gynecologic Oncology.

Kind regards,

Editorial Office

Gynecologic Oncology

Elsevier 525 B Street, Suite 1800

San Diego, CA 92101-4495 USA

4. PUBLICAÇÃO

***EX VIVO* EXPANSION AND CYTOTOXICITY OF NK CELLS FROM PATIENTS WITH OVARIAN NEOPLASIA**

Authors

Paulo César Martins Alves^a,

Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade^b,

Carlos Alberto Petta^{ac},

Irene Lorand-Metze^d,

Sophie Françoise Maureicette Derchain^{ac},

Fernando Guimarães^{a*}

^a Hospital da Mulher Professor Doutor José Aristodemo Pinotti – Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, Campinas University (UNICAMP), Campinas, Brazil.

^b Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas University (UNICAMP), Campinas, Brazil.

^c Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas University (UNICAMP), Campinas, Brazil.

^d Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas University (UNICAMP), Campinas, Brazil.

***Corresponding author:**

Rua Alexandre Fleming 101, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Telephone: +55 19 35219462, FAX: +55 19 35219433

fernando.guimaraes@caism.unicamp.br

Key words: NK cells, ovarian neoplasms, immunotherapy.

Abstract

The possibility of generating natural killer (NK) enriched cell preparations from cancer patients has been focused on studies seeking for autologous effector cell source for treatment of human malignancies. The objective of the present work was to expand NK cells from peripheral blood of patients with ovarian neoplasia, and to evaluate their cytotoxic function. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 13 volunteer patients with ovarian neoplasia, 7 benign and 6 malignant tumors, were cultured in CellGro medium supplemented with anti-CD3 (20ng/ml, for the 9-10 initial days), IL-2 (1000 UI/ml) and FBS (10%) for 21 days. Day-21 cultured cells of the benign neoplasia patients resulted in positive percentual variation of NK ($+17.1 \pm 5.2\%$) and NK-T ($+10.4 \pm 3.1\%$) lymphocyte subtypes associated with negative percentual variation of T cells ($-6.2 \pm 6.2\%$). Differently, day-21 cultured cells of the malignant neoplasia patients presented positive percentual variation for all of the lymphocyte subtypes (NK $+12.5 \pm 6.0\%$, NK-T $+4.2 \pm 0.7\%$ and T $+15.3 \pm 5.6\%$). NK enriched effector cell preparations from both, benign and malignant ovarian neoplasia patients, were cytotoxic against the K562 and OVCAR3 cell lines. Cytotoxicity was significantly ($p < 0.05$) higher using effector cells from day-21 cultures, compared with effector cells from day-14. Cytotoxicity was significantly ($p < 0.05$) higher using magnetically separated effector cell fractions containing CD56⁺ cells compared with effector cell fractions deprived of these cells. The present study demonstrated that NK enriched effector cell preparations can be expanded *in vitro* from PBMC of ovarian carcinoma patients. These cells are provided with cytolytic function, indicating the culture system

employed as a feasible source for autologous effector cells that should be evaluated for the NK-based adoptive therapy of cancer.

Introduction

The possibility of using natural killer (NK) cells in treatment of human malignancies has increased in recent years. This is a consequence of a better understanding of how NK receptor-ligand matching influences lysis of target cells. Additionally, new methods for *ex vivo* generation of NK cells have allowed obtaining enough numbers of human NK cells for clinical trials [1]. However, the evaluation of the methods for *ex vivo* expansion of the NK cells has been mostly limited to hematological malignancies.

NK cells constitute 10–15% of the lymphocytes in human peripheral blood. NK cells are known for their capacity of killing cells infected by certain viruses, intracellular bacteria and a wide variety of tumor cells. Their cytolytic activity and secretion of cytokines and chemokines are crucial components of the innate immune defense [2-6]. NK cell cytotoxic function is regulated by a balance between activating and inhibitory signals transmitted by specific cell-surface receptors upon interaction with their ligands on target cells. NK cell activation involves a diverse array of molecules [7,8], including NKG2D receptor which is able to recognize cellular stress-inducible molecules such as MICA, MICB and ULBP [9-12]. NK cell activation is counteracted by inhibitory signals mediated by killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) and/or CD94/NKG2A that recognize human leukocyte antigen (HLA) class I molecules on target cells [5,13,14]. Consequently,

NK cells spare HLA class I expressing cells, whereas they can kill cells that have lost the expression of HLA class I molecules provided by the target cell expression of ligands for the activation receptors. This process is often seen in malignant transformation and/or virus infection [15].

Clinical observations demonstrated that NK cells have anti-leukemia effects, thus improving survival in patients undergoing haploidentical stem cell transplantation [16, 17]. These observations combined with a better understanding of how NK receptor-ligand interaction influences lysis of target cells, including tumor cells, has prompted studies to approach the potential use of NK cells in human immunotherapy, regardless of haploidentical or autologous settings. Additionally, the possibility of generating enriched or pure NK cell preparations constitute an important cellular resource for the NK-based adoptive therapy of cancer. Currently, it has become technically feasible to expand and purify NK cells in sufficient numbers for manipulation and clinical trials [18-21]. Accordingly, anti-leukemia effects were observed after adoptive transfer of human NK cells to patients [22] and to mice previously grafted with human tumor cells [23]. *Ex vivo* expanded NK cells showed significant cytotoxicity against primary autologous multiple myeloma cells, yet retaining their tolerance against nonmalignant cells [24]. In another study, resting allogeneic NK cells were able to recognize and kill freshly isolated ovarian carcinoma cells with low expression of HLA class I [25], indicating ovarian carcinoma as a potential target for adoptive NK cell-based immunotherapy.

Ovarian cancer is the leading cause of death from gynecologic malignancies. Surgery benefits most of the patients while the disease is restricted to the organ. However, at the time of diagnosis, 67% of patients usually present advanced disease with distant metastasis, implying a 5-year survival rate of 31% of all patients diagnosed [26]. Surgery and chemotherapy are the usual approaches employed in treatment of advanced-stage ovarian cancer [27]. Considering the use of autologous NK cells for ovarian carcinoma treatment, the present study aimed at evaluating the possibility of generating NK cells by *ex vivo* expansion from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with ovarian carcinoma. PBMC from patients with benign ovarian neoplasia were also evaluated. Resulting NK enriched effector cell preparations were assessed for cytolytic function against tumor cell lines. The contribution of the NK cells for target cell killing was evaluated after magnetically separation of the CD56⁺ cells.

Patients and methods

Patients and blood samples

In this study 13 patients with ovarian neoplasia were included, 7 benign and 6 malignant tumors (Table 1). The patients were admitted to the “Hospital da Mulher – Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - Centro de Atenção Integral à Saúde Mulher”, the women’s hospital of Campinas University (UNICAMP), Campinas, Brazil. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences and informed consent was obtained from all patients in accordance with the Declaration of Helsinki. Patient characteristics at the time of

blood sampling are provided in table 1. Blood was collected by using 9ml vacuum blood-sampling tubes containing sodium heparin (Vacuette, Campinas, Brazil). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by gradient centrifugation, using Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). PBMC were washed twice with balanced salt solution (BBS, LCG Biotecnologia Ltda, Cotia, Brazil). The resulting cell pellet was suspended in CellGro SCGM (CellGenix, Freiburg, Germany) containing 10% of fetal bovine serum (FBS, LCG Biotecnologia Ltda, Cotia, Brasil) and cell viability was assessed by trypan blue exclusion.

PBMC cultures

The *in vitro* culture conditions for the expansion of NK cells from PBMC were based on the method described by Carlens et al. (2001). PBMC were cultured in dishes (35x10mm, Corning, New York, USA) at a concentration of 1.0×10^6 cells/ml in CellGro SCGM medium (CellGenix, Freiburg, Germany) with the addition of 10% of FBS (LCG Biotecnologia Ltda, Cotia, Brasil) and 1000 U/ml of rhIL-2 (BD Pharmingen, San Diego, USA). For the first 10 days, the medium was further supplemented with 20ng/ml of anti-CD3 antibody (BD Pharmingen, San Diego, USA). The maintenance of the culture cells was performed on days 5, 10, 14-15, 17-18 and 21. On these days cells were scrapped off, the total cell numbers and cell viability assessed by trypan blue exclusion and fresh medium was provided. On day 5 the cells were replenished with sufficient volume of fresh medium to restore the initial cell concentration (1.0×10^6 cells/ml) and transferred to

T25 flasks (TPP, Trasadingen, Switzerland). On day 10 of culture, the anti-CD3 containing medium was washed out, and fresh medium with IL-2 (1000 U/ml) and FBS (10%) was added. On days 14-15 and 17-18, 70% of the total medium volume was replaced by fresh medium supplemented with IL-2 (1000 U/ml) and FBS (10%). Besides, in order to prevent contact inhibition of cell growth, the cells were transferred into new T25 flasks (TPP, Trasadingen, Switzerland).

Flow cytometry-based cell phenotyping

The cell phenotype was analyzed by flow cytometry on days 0, 14–15, and 21. Three-color combinations were used according to standard procedures. Briefly, cells were mixed with appropriate concentrations of fluorochrome-conjugated monoclonal-antibodies (MAbs) to CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD45, and CD56. All antibodies were obtained from Becton Dickinson (BD, Mountain View, CA, USA). After the addition of primary antibody and incubation for 30 min at room temperature, cells were washed with PBS. For data acquisition and analysis, a FACSCan (BD) was used with Cell Quest software (BD). For each sample, a minimum of 10 000 cells was acquired. All samples were analyzed by setting appropriate SSC/FSC gates on the lymphocyte population. Absolute cell counts were calculated by multiplying the total number of viable cells in each subset with the percentage of these subsets determined by flow cytometry.

Tumor cell cultures

The K562 (human erythromyeloblastoid) and the OVCAR3 (human ovarian carcinoma) cell lines were grown *in vitro* in RPMI-1640 medium supplemented with

10% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine. The cultures were replenished with fresh medium every 2–3 days throughout the culture period and the OVCAR3 cell line was treated with trypsin solution (0.25%, LCG Biotecnologia Ltda, Cotia, Brazil) for *in vitro* passage. Cell line cultures were replaced by new cells from the frozen stock after 8–10 *in vitro* passages.

Cell-mediated cytotoxicity assay

The cytotoxic capacity of NK cells was evaluated using a flow cytometry-based cytotoxicity assay. The K562 and the OVCAR3 cell lines were used as target cells. Target cells were labeled with carboxyfluorescein-succinimidyl-ester (CFSE, Molecular Probe, Invitrogen, Burlington, Canada). For target cell labeling, single cell suspensions of K562 and OVCAR3 were incubated in 3 μ M CFSE-PBS at a density of 2.5×10^5 cells/ml for 15 minutes at 37°C.

Cultured cells on days 14 and 21 were used as effector cells. To evaluate the contribution of the NK cells for the cytotoxic function, day-21 cultured cells were magnetically separated, resulting in the cell fractions CD56_{pos} (with NK and NK-T cells) and CD56_{neg} (without NK and NK-T cells), both fractions also used as effector cells. The MidiMacs separation system with LD columns was employed for magnetic separation of cells labeled with anti-CD56 MicroBeads according to the manufacturer's instructions (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany).

For the flow cytometry-based cytotoxicity assay, day-14 and day-21 cultured cells were coincubated with K562 CFSE-labeled cells in triplicate at ratios of 1:1, 3:1 and 10:1 (effector:target) in a final concentration of 2×10^5 cells/200 μ l for 4h at

37°C and 5%CO₂. Day-21 cultured cells were also coincubated with OVCAR3 CFSE-labeled cells in triplicate at a ratio of 10:1 (effector:target) in a final concentration of 2x10⁵ cells/200µl for 4hours at 37°C and 5%CO₂. Day-21 magnetic separated CD56_{pos} and CD56_{neg} cell fractions were coincubated with K562 CFSE-labeled cells in triplicate at a ratio of 3:1 (effector:target) in a final concentration of 2x10⁵ cells/200µl for 4hours at 37°C and 5%CO₂. At the end of incubation period test tubes were added with 5µg of 7-aminoactinomycin D (7-AAD; BD Bioscience, San Diego, USA) and incubated for an additional 10 minutes at room temperature before data acquisition by flow cytometry. During analysis of the flow cytometric data, targets cells were isolated from the effector cells by CFSE positivity and the percentage of live or dead cells was determined using 7-AAD staining on this CFSE-population. Cytotoxicity was assessed according to the following formula: percentage killing = [(experimental death - spontaneous death)/(maximum death -spontaneous death)] X 100.

Statistical analysis and calculation

Data were expressed as mean and standard error of the mean (SEM). Cell expansion (fold) was calculated based on viable cells. Comparisons of variables between groups were performed by Student's t-test or Mann-Whitney test and within groups by Student's t test for dependent samples. Stepwise linear regression was performed to evaluate the effect of variables on target cells death. The level of significance was set at p-value <0.05.

Results

NK cells expansion from ovarian carcinoma patients PBMC

To study whether NK cells from ovarian carcinoma patients can be expanded *ex vivo*, cultures of PBMC from ovarian carcinoma patients (malignant group, n=6) were established and compared to the cultures of PBMC from patients with benign ovarian neoplasia (benign group, n=7). At the start of the culture (day 0), PBMC from ovarian carcinoma and benign ovarian neoplasia patients comprised similar amounts of lymphocyte subtypes, except for B lymphocytes, which was significantly ($p<0.05$) lower in PBMC from ovarian carcinoma patients (Table 2). During the 21 days period of culture, PBMC from patients with benign neoplasia had expanded on average 56.7-fold (range: 2- to 169.6-fold); of these, NK cells had expanded on average 139.6-fold (range: 3.6- to 474.7-fold), T cells 58.3-fold (range: 1.4- to 176.9-fold) and NK-T cells 106.6-fold (range: 8.9- to 224.7-fold) (Figura 1). In the patients with carcinoma, cells cultured for 21 days had expanded on average 44.5-fold (range: 9- to 83.5-fold). Among these, NK cells had expanded on average 82.7-fold (range: 15.7- to 175.5-fold), T cells 65.7-fold (range: 9.6- to 127.2-fold) and NK-T cells 140.0-fold (range: 17.9- to 501.4-fold) (Figura 1). In general, cells cultured for 21 days resulted in enriched NK and NK-T cells preparations (Table 2). Nevertheless, as a consequence of the unequal expansion within the lymphocyte subtypes, day-21 cultured cells of the benign group presented a relative increase (% day-21 - % day-0) of NK (+17.1 $\pm$ 5.2%) and NK-T cells (+10.4 $\pm$ 3.1%) associated with a decrease of T cells (-6.2 $\pm$ 6.2%), while

in the malignant group there was a relative increase of NK ($+12.5\pm6.0\%$), NK-T ($+4.2\pm0.7\%$) and T lymphocyte subtypes ($+15.3\pm5.6\%$) (Figure 2).

Cytotoxic function of NK enriched cell preparations

NK enriched effector cell preparations from both groups, benign and malignant ovarian neoplasia patients, were cytotoxic against the standard NK-cell target K562 (Figure 3). Cytotoxicity was significantly ($p<0.05$) higher using effector cells from day-21 cultures, compared with effector cells from day-14 as assessed by 7-AAD binding to DNA in lysed target cells. At a 10:1 effector to target cell ratio, the average death rate of K562 cells co-incubated with day-21 cultured cells from benign ovarian neoplasia patients was $47.0\pm7.5\%$ and with the day-21 cultured cells from malignant ovarian neoplasia patients was $39.3\pm4.1\%$. Day-14 cultured cells on average killed only $23.4\pm6.2\%$ and $7.9\pm1.1\%$ of K562 targets, respectively. Day-21 effector cells from both groups (benign and malignant ovarian neoplasia), had also cytotoxic functional against the cell target OVCAR3 (Figure 3). At a 10:1 effector to target cell ratio, the average death percentage of the OVCAR3 co-incubated with the cultured effector cells from benign ovarian neoplasia patients was $27.8\pm3.5\%$ and with with the cultured effector cells from malignant ovarian neoplasia patients was $17.3\pm3.0\%$.

Cytotoxicity was significantly ($p<0.05$) higher using magnetically separated CD56_{pos} effector cell fractions, compared with CD56_{neg} effector cell fractions (Table 3). At a 3:1 effector to target cell ratio, CD56_{pos} and CD56_{neg} cell fractions sorted from day-21 cultured cells of benign ovarian neoplasia group killed the K562 target

cells on average $9.1 \pm 1.5\%$ and $4.3 \pm 0.5\%$ respectively. CD56_{pos} and CD56_{neg} cell fractions sorted from cells cultured for 21 days of patients with malignant ovarian neoplasia killed $16.3 \pm 4.5\%$ and $5.9 \pm 1.4\%$ respectively of the K562 target cells. Besides, in a stepwise linear regression evaluating the effect of variables: lymphocyte subtypes, day of the cell culture, ratio E:T and tumor characteristics, on target cells death, the NK cells of the 21 day cultures presented the most effective anti-tumor function ($r^2=0.47$ and $p<0.0001$). Among the lymphocyte subtypes, the number of NK cells was the variable presenting the highest positive correlation with the percentage of target cell death (benign group $r=0.68$, malignant group $r=0.77$) and trend lines better adjusted to the data dispersion (Figure 4).

Discussion

In the present study, NK enriched effector cell preparations provided with anti-tumor function were obtained by *ex vivo* expansion of PBMC from patients with ovarian neoplasia. Since NK cells were first described, more than 30 years ago, there is intent to develop new therapies of cancer based on their capacity to recognize and lysis tumor cells. Lymphokine-activated killer (LAK) cells, resulting from the short-term treatment of PBMC with IL-2 (500-1000 IU/ml, 3-5 days), was the first cell-based immunotherapy used for treatment of tumors in clinical and murine models [28-32]. However, the difficult in generating LAK cells in large numbers associated with their low anti-tumor activity *in vivo* [31] have hampered their therapeutic use. Interestingly, LAK cells contain a heterogeneous population

of lymphocytes mostly of polyclonal T cells, but the NK cells, present in low numbers (~5%), are those cells retaining anti-tumor functions [32,34].

Currently, *ex vivo* expansion of NK cells has been focused on studies seeking for the effector cell source for treatment of human malignancies. Sutlu and Alici [21] compared the different methods used for this proposal in a review recently published. In the present study, the culture conditions for NK cell expansion was based on the method previously described by Carlens et al [18], which employ CellGro SCGM medium supplemented with anti-CD3 and IL-2. As a consequence, NK enriched effector cell preparations were successfully obtained from PBMC of patients with ovarian carcinoma and benign ovarian neoplasia. The culture conditions enabled cells of the malignant and benign groups to expand similarly, reaching on day 21 of culture average expansions of 44.5-fold and 56.7-fold respectively. The variability observed in the data for the final cell expansion suggested that differences in cell expansion performance were rather a consequence of the individual variability than an effect of the characteristics of the ovarian neoplasia. Individual variability affecting cell expansion performance has been also observed in previous studies using similar culture conditions, even when PBMC taken from normal donors were employed for NK cell expansion [18,19,23,24]. Nevertheless, the unequal expansion observed within the lymphocyte subtypes (NK, NK-T and T) was associated with the characteristics ovarian neoplasia. In the one hand, cell cultures from PBMC of the benign group progressed as expected, resulting at the end of the culture period in relative increase of the CD56⁺ subtypes (NK and NK-T cells) together with a relative

decrease of the CD3⁺CD56⁻ cells (T lymphocytes). On the other hand, cultures from PBMC of the malignant group progressed differently since T lymphocytes also presented a relative increase significantly higher as the benign group (Figure 2).

NK cells from ovarian carcinoma patients has been reported to display none or poor cytotoxic function against ovarian cell line, fresh ovarian tumors, and even against the prototype NK cell target K562 [35-38]. Similarly to other cancers, ovarian cancer exploits an array of immunological ways to create a suppressive environment to prevent being eliminated by the immune response [39]. However, lytic activity against ovarian tumor cells could be induced in effector cells of normal donors or cancer patients after *in vitro* stimulation with recombinant IL-2 [25,35,36] or after enrichment of large granular lymphocyte in the effector cell preparation [36]. Correspondingly, the culture system employed in the present study enable to generate NK enriched effector cell preparations from PBMC of ovarian neoplasia patients. Such effector cell preparations were provided with anti-tumor function, showing the feasibility of overcoming the immune impairment, often inferred to cancer patients, by *ex vivo* expansion from PBMC. Additionally, the *ex vivo* expanded NK cells were CD16⁺ (data not shown), indicating their activation status and their potential cytotoxicity mediated by antibodies (ADCC) [6,40]. The anti-tumor function detected in our study correlated positively with the content of NK cells in the final cell preparations, being these cells, within the day-21 cultured cell populations, the lymphocyte subtype retaining the most effective anti-tumor function. In conclusion, the present study demonstrated that NK enriched effector cell preparations can be expanded *in vitro* from PBMC of ovarian carcinoma

patients. These cells are provided with cytolytic function, indicating the culture system employed as a feasible source for autologous effector cells that should be evaluated for the NK-based adoptive therapy of cancer.

Acknowledgment

The project is funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – Project n. 2006/04600-2.

References

- [1] Barkholt L, Alici E, Conrad R, Sutlu T, Gilliam M, Stellan B, Christensson B, Guven H, Bjorkstrom NK, Soderdahl G, Cederlund K, Kimby E, Aschan J, Ringden O, Ljunggren HG, Dilber MS. Safety analysis of ex vivo-expanded NK and NK-like T cells administered to cancer patients: a Phase I clinical study. *Immunotherapy* 2009;1:753-764.
- [2] Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. What is a natural killer cell? *Nat Immunol* 2002;3:6–8.
- [3] Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 2003;90:127–156.
- [4] French AR, Yokoyama WM. Natural killer cells and viral infections. *Curr Opin Immunol* 2003;15:45–51.
- [5] Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 2001;1:41–49.

- [6] Caligiuri MA Human natural killer cells. *Blood* 2008;112:461-469.
- [7] Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 2006;107:159-166.
- [8] Malmberg KJ, Bryceson YT, Carlsten M, Andersson S, Björklund A, Björkström NK, Baumann BC, Fauriat C, Alici E, Dilber MS, Ljunggren HG. NK cell-mediated targeting of human cancer and possibilities for new means of immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:1541–1552.
- [9] Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004;10:909–915.
- [10] Overwijk WW, Theoret MR, Finkelstein SE, Surman DR, de Jong LA, Vyth-Dreese FA et al. Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells. *J Exp Med* 2003;198:569–580.
- [11] Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ et al. Cancer regression and autoimmunity. *Science* 2002;298:850–854.
- [12] Eberlein TJ, Rosenstein M, Rosenberg SA. Successful systemic adoptive immunotherapy of a disseminated solid syngeneic murine tumor with long-term cultured T cells. *Transp Proc* 1983;15:396–398.
- [13] Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* 2004;23:255–259.

- [14] Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005;23:225–274.
- [15] Ljunggren HG, Karre K. In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990;11:237–244.
- [16] Jiang YZ, Barrett AJ, Goldman JM, Mavroudis DA. Association of natural killer cell immune recovery with a graft-versus-leukemia effect independent of graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol* 1997;74:1–6.
- [17] 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* 2002; 295: 2097–2100.
- [18] Carlens S, Gilljam M, Chambers BJ, Aschan J, Guven H, Ljunggren HG et al. A new method for in vitro expansion of cytotoxic human CD3_CD56+ natural killer cells. *Hum Immunol* 2001;62:1092–1098.
- [19] Guven H, Gilljam M, Chambers BJ, Ljunggren HG, Christensson B, Kimby E et al. Expansion of natural killer (NK) and natural killerlike T (NKT)-cell populations derived from patients with B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a potencial source for cellular immunotherapy. *Leukemia* 2003;17:1973–1980.
- [20] Klingemann HG, Martinson J. Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy* 2004;6:15-22.

- [21] Sutlu T, Alici E Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *Journal of Internal Medicine* 2009;266:154-181.
- [22] Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 2005; 105:3051–3057.
- [23] Guimarães F, Guven H, Donati D, Christensson B, Ljunggren HG, Bejarano MT, Dilber MS. Evaluation of ex vivo expanded human NK cells on antileukemia activity in SCID-beige mice. *Leukemia* 2006;20:833-839.
- [24] Alici E, Sutlu T, Björkstrand B, Gilljam M, Stellan B, Nahi H, Concha H, Gahrton G, Ljunggren HG, Dilber MS. Autologous antitumor activity by NK cells expanded from myeloma patients using GMP-compliant components. *Blood* 2008;111:3155-3162.
- [25] Carlsten M, Björkström NK, Norell H, Bryceson Y, van Hall T, Baumann BC, Hanson M, Schedvins K, Kiessling R Ljunggren HG, Malmberg KJ. DNAX Accessory Molecule-1 Mediated Recognition of Freshly Isolated Ovarian Carcinoma by Resting Natural Killer Cells. *Cancer Res* 2007;67:1317-1325.
- [26] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.* 2009;59:225-249.
- [27] Herrin VE, Thigpen JT Chemotherapy for Ovarian Cancer: Current Concepts. *Seminars in Surgical Oncology* 1999;17:181–188.

- [28] Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. J Exp Med 1982;155:1823-1841.
- [29] Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin RT, Seipp CA, Simpson CG, White DA. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high dose interleukin 2 alone. N Engl J Med 1987;316:889-897.
- [30] Lafreniere R, Rosenberg SA. Successful immunotherapy of murine experimental hepatic metastases with lymphokine killer and recombinant interleukin 2. Cancer Res 1985;45:3735-3741.
- [31] Takahashi H, Nakada T, Puisieux I. Inhibition of human colon cancer growth by antibody-directed human LAK cells in SCID mice. Science 1993;259:1460-1463.
- [32] Rosenberg SA. Progress in human tumor immunology and immunotherapy. Nature 2001;411:380-384.
- [33] Ramsdell FJ, Golub SH. Generation of lymphokine-activated killer cell activity from human thymocytes. J Immunol 1987;139:1446-1453.
- [34] Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Mehta BA, Fernandez LP, Huhn D, Blume KG, Weissman IL, Negrin RS. Phenotypic characterization and identification of

effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells. *Exp Hematol* 1993;21:1673.

- [35] Lotzova E, Savary CA, Freedman R, Bowen JM. Natural immunity against ovarian tumors. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1986;9:269–75.
- [36] Lotzova E, Savary CA, Freedman RS, Edwards CL, Wharton JT. Recombinant IL-2-activated NK cells mediate LAK activity against ovarian cancer. *Int J Cancer* 1988;42:225–31.
- [37] Roszkowski PI, Hyc A, Malejczyk J. Natural killer cell activity in patients with ovarian tumors and uterine myomas. *Eur J Gynaecol Oncol* 1993;14 Suppl:114–7.
- [38]. Malmberg KJ. Effective immunotherapy against cancer: a question of overcoming immune suppression and immune escape? *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:879–92.
- [39] Yigit R, Massuger LFAG, Figdor CG, Torensma R. Ovarian cancer creates a suppressive microenvironment to escape immune elimination. *Gynecol Oncol* 2010; doi:10.1016/j.ygyno.2010.01.019
- [40] Borghaei H, Smith MR, Campbell KS. Immunotherapy of cancer. *Eur J Pharmacol* 2009;625:41-54.

Table 1. Patient characteristics (benign n=7 and malignant n=6) at the time of blood sampling for this study. Staging classifications followed FIGO Committee on Gynecologic Oncology guidelines.

Patient	Age (years)	Stage (FIGO)	Histological classification
1	57		Serous cystadenoma associated with Brenner tumor
2	62		Mucinous cystadenoma associated with Brenner tumor
3	47		Serous cystadenoma
4	51		Serous cystadenofibroma
5	33		Serous borderline tumor associated with endometriosis
6	62		Fibroma
7	62		Fibroma
8	51	IIIC	Adenocarcinoma
9	52	IV	Endometrioid carcinoma with squamous differentiation
10	43	IIIB	Endometrioid carcinoma
11	60	IIA	Endometrioid carcinoma
12	42	IIIC	Serous papillary adenocarcinoma
13	56	IIIB	Serous adenocarcinoma and undifferentiated carcinoma

Table 2. Percentage of lymphocyte subtypes (NK, NK-T T and B) on day 0 and day 21 of the culture from PBMC of the patients with benign (Benign group, n=7) and malignant (Malignant group, n=6) ovarian neoplasia. Values are presented as average $\pm$ standard error. Comparisons between groups were performed by Student's t test and within groups by Student's t test for dependent samples. Averages in the same line labeled with different letters ^{a,b,c} were significantly different ($p < 0,05$).

Lymphocyte subtypes	Benign group n=7		Malignant group n=6	
	Day 0	Day 21	Day 0	Day 21
NK (CD3 ⁺ CD56 ⁺)	10.1 $\pm$ 1.8 ^a	27.2 $\pm$ 6.6 ^b	10.0 $\pm$ 1.7 ^a	22.6 $\pm$ 5.9 ^a
NK-T (CD3 ⁺ CD56 ⁺)	7.5 $\pm$ 1.8 ^a	17.9 $\pm$ 3.7 ^b	5.0 $\pm$ 1.7 ^a	9.2 $\pm$ 2.1 ^b
T (CD3 ⁺ CD56 ⁻)	51.9 $\pm$ 4.6 ^a	45.7 $\pm$ 4.9 ^a	48.0 $\pm$ 7.6 ^a	63.3 $\pm$ 6.4 ^b
B (CD3 ⁺ CD19 ⁺)	20.0 $\pm$ 3.7 ^a	0.0 ^b	8.2 $\pm$ 0.8 ^c	0.0 ^b

Table 3. Comparison of cytotoxic activity of magnetically separated effector cells (E) against K562 cell line (T). Day-21 cultured cells of the patients with benign (n=3) and malignant (n=4) ovarian neoplasia were magnetically separated in CD56 positive (CD56_{pos}) and CD56 negative (CD56_{neg}) cell fractions. Cytotoxicity was significantly higher using magnetically separated CD56_{pos} effector cell fractions, compared with CD56_{neg} effector cell fractions at a E:T ratio of 3:1. Values are presented as average $\pm$ standard error. Values labeled with different letters ^{a,b} were significantly different (Mann-Whitney; $p < 0.05$).

Specific killing (K562 %) E:T-3:1	CD56 _{pos}	CD56 _{neg}
Benign (n=3)	9.0 $\pm$ 1.5 ^a	4.5 $\pm$ 0.5 ^b
Malignant (n=4)	16.3 $\pm$ 4.5 ^a	5.9 $\pm$ 1.4 ^b

Figure 1. Fold expansion of lymphocyte subtypes (NK, NK-T and T) throughout the 21 days period of culture from PBMC of the patients with benign (Benign group, n=7) and malignant (Malignant group, n=6) ovarian neoplasia. Values are presented as average $\pm$ standard error.

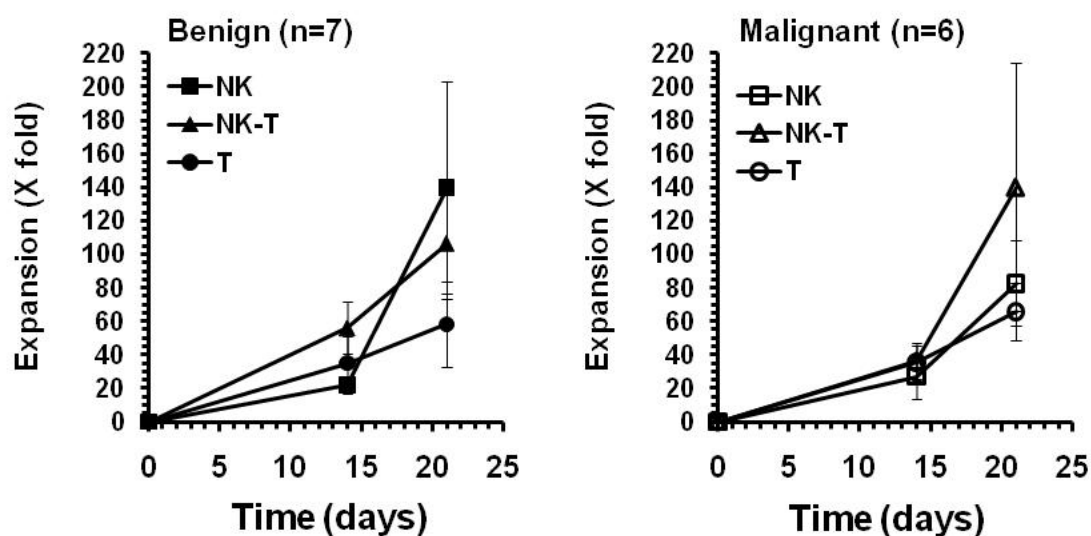


Figure 2. A: FACS profiles of cultured PBMC at day 0, 14 and 21, showing how lymphocyte subtypes (NK, CD3⁻CD56⁺; NK-T, CD3⁺CD56⁺; T-cells, CD3⁺CD56⁻) modify over time. Data representative of one patient with benign ovarian neoplasia and one patient with malignant ovarian neoplasia are shown. PBMC were cultivated in CellGro SCGM medium supplemented with anti-CD3 (20ng/ml, for the 10 first days), IL-2 (1000U/ml) and 10% FBS. **B:** Relative variation of lymphocyte subtypes (NK, NK-T and T) between day 21 and day 0 of the culture from PBMC of the patients with benign (n=7) and malignant (n=6) ovarian neoplasia. Values are presented as average $\pm$ standard error. Student's t test; * significantly different (p<0,05).

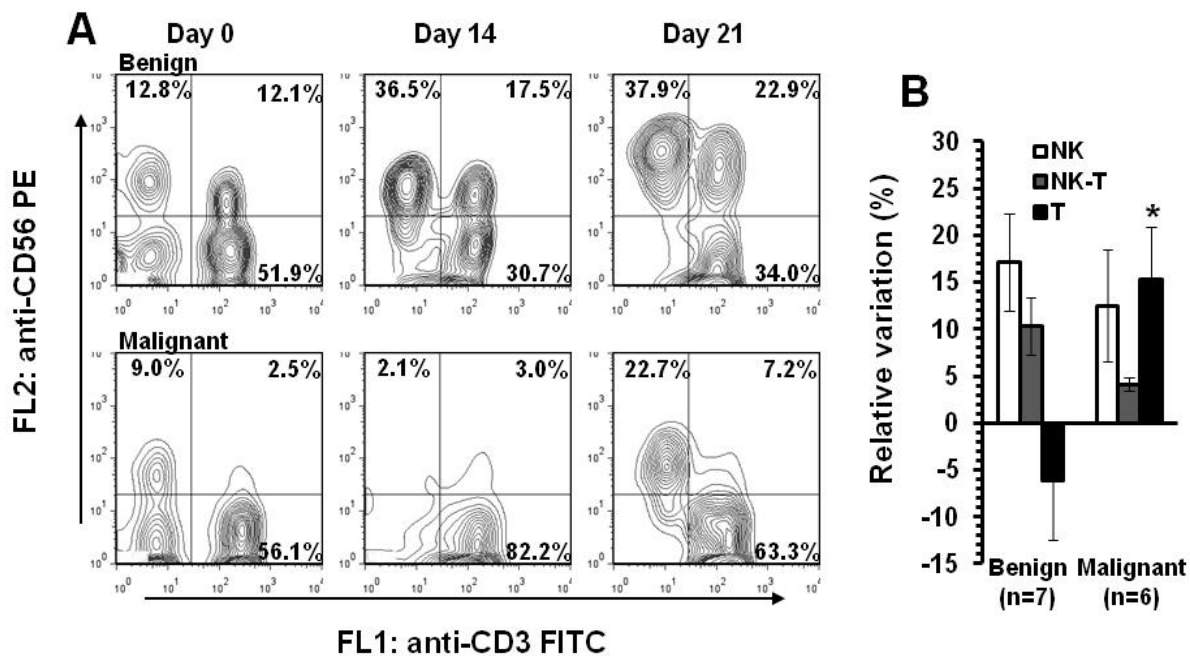


Figure 3. A: Comparison of cytotoxic activity against K562 cell line at day 14 (triangles) and 21 (circles) of the cultures from PBMC of the patients with benign (black) and malignant (white) ovarian neoplasia. Mann-Whitney; curves labeled with different letters ^{a,b} were significantly different ($p < 0,05$). **B:** Comparison of cytotoxic activity against OVCAR3 cell line at day 21 of the cultures from PBMC of the patients with benign (black bar, $n=4$) and malignant (white bar, $n=5$) ovarian neoplasia. Values are presented as average $\pm$ standard error.

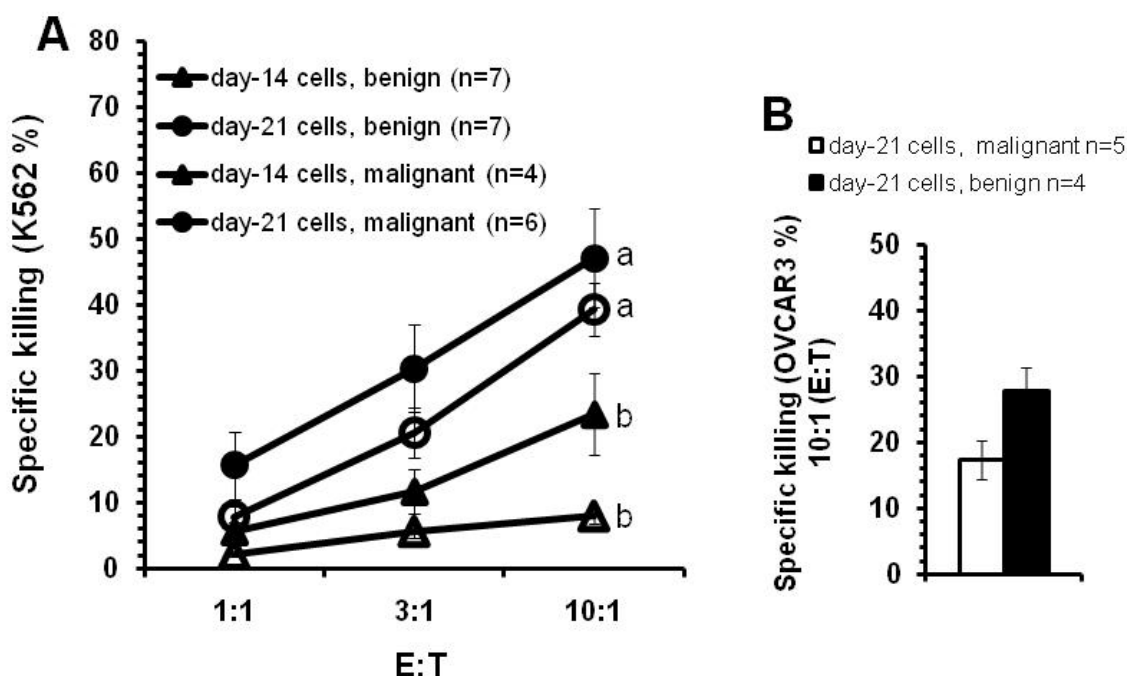
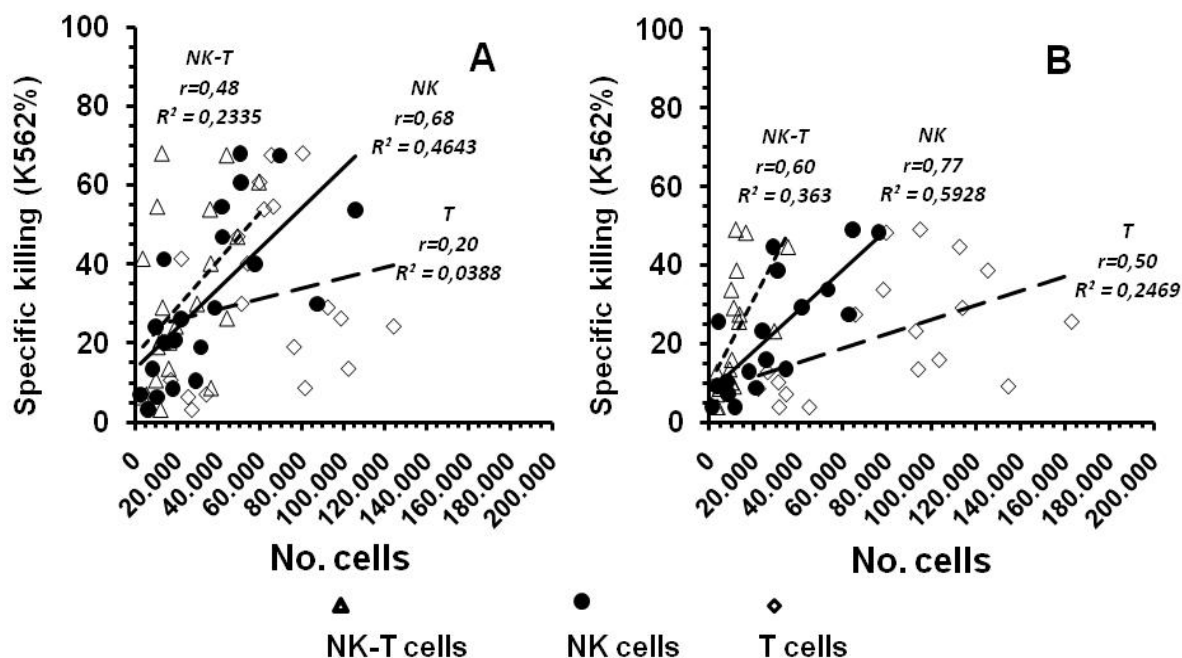


Figure 4. Correlation between the absolute numbers (n cells) of each lymphocyte subtype (NK black-circle; NK-T white-triangle; T white-diamond) and the percentage of K562 cells killed in the mixtures Effector : Target cells (E:T). **A:** Cell cytotoxic assay using day-21 cultured cells of the patients with benign ovarian neoplasia and **B:** using day-21 cultured cells of the patients with malignant ovarian neoplasia. Stepwise linear regression evaluating the effect of variables: lymphocyte subtypes, day of the cell culture, ratio E:T and tumor characteristics on target cells death indicated that NK cells of the day-21 cultures presented the most effective anti-tumor function ($r^2=0.47$ and $p<0.0001$).



Conclusão

5. CONCLUSÃO

- Preparações de célula efetoras ricas em NK podem ser obtidas a partir da expansão *in vitro* de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com neoplasia de ovário.

- As células efetoras expandidas são providas de função citotóxica, além de expressarem marcadores de ativação celular, indicando a viabilidade do sistema de cultivo empregado como fonte de células efetoras autólogas, que poderiam ser avaliadas para terapia do câncer baseada em células NK.

- O número de células CD56 positivas presentes ao término da cultura contribuiu de forma determinante para o aumento da citotoxicidade, sendo as células NK o subtipo com maior atividade antitumoral.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. J Exp Med 1982;155:1823-1841.
- [2] Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin RT, Seipp CA, Simpson CG, White DA. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high dose interleukin 2 alone. N Engl J Med 1987;316:889-897.
- [3] Lafreniere R, Rosenberg SA. Successful immunotherapy of murine experimental hepatic metastases with lymphokine killer and recombinant interleukin 2. Cancer Res 1985;45:3735-3741.
- [4] Takahashi H, Nakada T, Puisieux I. Inhibition of human colon cancer growth by antibody-directed human LAK cells in SCID mice. Science 1993;259:1460-1463.
- [5] Rosenberg SA. Progress in human tumor immunology and immunotherapy. Nature 2001;411:380-384.
- [6] Ramsdell FJ, Golub SH. Generation of lymphokine-activated killer cell activity from human thymocytes. J Immunol 1987;139:1446-1453.
- [7] Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Mehta BA, Fernandez LP, Huhn D, Blume KG, Weissman IL, Negrin RS. Phenotypic characterization and identification of

effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells. Exp Hematol 1993;21:1673.

- [8] Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. Eur J Immunol. 1975 Feb;5(2):112-7.
- [9] Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. Eur J Immunol. 1975 Feb;5(2):117-21.
- [10] Arnon TI, Markel G, Mandelboim O. Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors. Semin Cancer Biol. 2006 Oct;16(5):348-58.
- [11] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol. 2001 Nov;22(11):633-40.
- [12] Wiltout RH. Regulation and antimetastatic functions of liver-associated natural killer cells. Immunol Rev. 2000 Apr;174:63-76.
- [13] Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. Adv Cancer Res. 2003;90:127-56.
- [14] French AR, Yokoyama WM. Natural killer cells and viral infections. Curr Opin Immunol. 2003 Feb;15(1):45-51.
- [15] Hayakawa Y, Screpanti V, Yagita H, Grandien A, Ljunggren HG, Smyth MJ, Chambers BJ NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. J Immunol. 2004 Jan 1;172(1):123-9.

- [16] Lanier LL, Phillips JH, Hackett J Jr, Tutt M, Kumar V. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. J Immunol. 1986 Nov 1;137(9):2735-9.
- [17] Sutlu T, Alici E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. J Intern Med. 2009 Aug;266(2):154-81.
- [18] Farag SS, Fehniger T, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cells: biology and application in stem-cell transplantation. Cytotherapy. 2002;4(5):445-6.
- [19] Di Santo JP. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. Annu Rev Immunol. 2006;24:257-86.
- [20] Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. Blood Rev. 2006 May;20(3):123-37.
- [21] Caligiuri MA. Human natural killer cells. Blood. 2008 Aug 1;112(3):461-9.
- [22] Mattei F, Schiavoni G, Belardelli F, Tough DF. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. J Immunol. 2001 Aug 1;167(3):1179-87.
- [23] Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. Blood. 2003 Apr 15;101(8):3052-7.
- [24] Freud AG, Becknell B, Roychowdhury S, Mao HC, Ferketich AK, Nuovo GJ, Hughes TL, Marburger TB, Sung J, Baiocchi RA, Guimond M, Caligiuri MA. A

- human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity*. 2005 Mar;22(3):295-304.
- [25] Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2001 Oct;1(1):41-9.
- [26] Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:225-74.
- [27] Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, Bottino C, Moretta A. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev*. 2001 Jun;181:203-14.
- [28] Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, Cantoni C, Grassi J, Marcenaro S, Reymond N, Vitale M, Moretta L, Lopez M, Moretta A. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med*. 2003 Aug 18;198(4):557-67.
- [29] Caligiuri MA, Velardi A, Scheinberg DA, Borrello IM. Immunotherapeutic approaches for hematologic malignancies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:337-53.
- [30] Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* 2004; 23:255-259.
- [31] Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*. 2006 Dec;214:73-91.
- [32] Lanier LL. A renaissance for the tumor immunosurveillance hypothesis. *Nat Med*. 2001 Nov;7(11):1178-80.

- [33] Ljunggren HG, Karre K In search of the missing self. MHC molecules and NK cells recognition. *Immunology today* 1990; 11:273-244.
- [34] Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol.* 2003 Jun;195(3):346-55.
- [35] Fuchs A, Cella M, Kondo T, Colonna M. Paradoxic inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood.* 2005 Sep 15;106(6):2076-82.
- [36] Cooper MA, Caligiuri MA. Isolation and characterization of human natural killer cell subsets. *Curr Protoc Immunol.* 2004 May;Chapter 7:Unit 7.34.
- [37] Arnon TI, Achdout H, Levi O, Markel G, Saleh N, Katz G, Gazit R, Gonen-Gross T, Hanna J, Nahari E, Porgador A, Honigman A, Plachter B, Mevorach D, Wolf DG, Mandelboim O. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol.* 2005 May;6(5):515-23.
- [38] Sivori S, Pende D, Bottino C, Marcenaro E, Pessino A, Biassoni R, Moretta L, Moretta A. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol.* 1999 May;29(5):1656-66.
- [39] Pende D, Cantoni C, Rivera P, Vitale M, Castriconi R, Marcenaro S, Nanni M, Biassoni R, Bottino C, Moretta A, Moretta L. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors

- and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. Eur J Immunol. 2001 Apr;31(4):1076-86.
- [40] Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science. 1999 Jul 30;285(5428):727-9.
- [41] Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. Nat Rev Immunol. 2003 Oct;3(10):781-90.
- [42] Cosman D, Müllberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. Immunity. 2001 Feb;14(2):123-33.
- [43] Coudert JD, Held W. The role of the NKG2D receptor for tumor immunity. Semin Cancer Biol. 2006 Oct;16(5):333-43.
- [44] Onda H, Ohkubo S, Shintani Y, Ogi K, Kikuchi K, Tanaka H, Yamamoto K, Tsuji I, Ishibashi Y, Yamada T, Kitada C, Suzuki N, Sawada H, Nishimura O, Fujino M. A novel secreted tumor antigen with a glycosylphosphatidylinositol-anchored structure ubiquitously expressed in human cancers. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Jul 13;285(2):235-43.
- [45] Diefenbach A, Raulet DH. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. Immunol Rev. 2002 Oct;188:9-21.
- [46] Jiang YZ, Barrett AJ, Goldman JM, Mavroudis DA. Association of natural killer cell immune recovery with a graft-versus-leukemia effect independent of graft-

- versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol* 1997;74:1–6.
- [47] 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* 2002; 295: 2097–2100.
- [48] Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer*. 2000 Feb 1;88(3):577-83.
- [49] Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jiménez R, Chillón MJ, Jareño J, Zuñil M, Callol L. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002 Jan;35(1):23-8.
- [50] Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jan 16;348(3):203-13.
- [51] Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnajatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 20;102(51):18538-43.

- [52] Carlens S, Gilljam M, Chambers BJ, Aschan J, Guven H, Ljunggren HG, Christensson B, Dilber MS. A new method for in vitro expansion of cytotoxic human CD3-CD56+ natural killer cells. *Hum Immunol*. 2001 Oct;62(10):1092-8.
- [53] Guven H, Gilljam M, Chambers BJ, Ljunggren HG, Christensson B, Kimby E, Dilber MS. Expansion of natural killer (NK) and natural killer-like T (NKT)-cell populations derived from patients with B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a potential source for cellular immunotherapy. *Leukemia*. 2003 Oct;17(10):1973-80.
- [54] Klingemann HG, Martinson J. Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy*. 2004;6(1):15-22.
- [55] Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 2005; 105:3051–57.
- [56] Guimarães F, Guven H, Donati D, Christensson B, Ljunggren HG, Bejarano MT, Dilber MS. Evaluation of ex vivo expanded human NK cells on antileukemia activity in SCID-beige mice. *Leukemia*. 2006 May;20(5):833-9.
- [57] Alici E, Sutlu T, Björkstrand B, Gilljam M, Stellan B, Nahi H, Quezada HC, Gahrton G, Ljunggren HG, Dilber MS. Autologous antitumor activity by NK cells expanded from myeloma patients using GMP-compliant components. *Blood*. 2008 Mar 15;111(6):3155-62.

- [58] Carlsten M, Björkström NK, Norell H, Bryceson Y, van Hall T, Baumann BC, Hanson M, Schedvins K, Kiessling R, Ljunggren HG, Malmberg KJ. DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells. *Cancer Res.* 2007 Feb 1;67(3):1317-25.
- [59] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009 Jul-Aug;59(4):225-49.
- [60] Naora H, Montell DJ. Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nat Rev Cancer.* 2005 May;5(5):355-66.
- [61] São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Fundação Oncocentro de São Paulo – FOSP. Mortalidade por Câncer no Estado de São Paulo: Estudo de 10 anos. São Paulo: FOSP, 2002 [online]. Disponível em <URL: http://www.fosp.saude.sp.gov.br/html/fr_dados.html [02 de Junho 2008].
- [62] Feeley KM, Wells M. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology.* 2001 Feb;38(2):87-95.
- [63] Sonoda Y. Management of early ovarian cancer. *Oncology (Williston Park).* 2004 Mar;18(3):343-56; discussion 358, 361-2.
- [64] Benedet JL, Bender H, Jones H 3rd, Ngan HY, Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet.* 2000 Aug;70(2):209-62.

- [65] Yigit R, Massuger LF, Figdor CG, Torensma R. Ovarian cancer creates a suppressive microenvironment to escape immune elimination. *Gynecol Oncol*. 2010 May;117(2):366-72.
- [66] Bookman MA. Standard treatment in advanced ovarian cancer in 2005: the state of the art. *Int J Gynecol Cancer*. 2005 Nov-Dec;15 Suppl 3:212-20.
- [67] Nelson BH. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev*. 2008 Apr;222:101-16. Review
- [68] Conejo-Garcia JR, Benencia F, Courreges MC, Gimotty PA, Khang E, Buckanovich RJ, Frauwirth KA, Zhang L, Katsaros D, Thompson CB, Levine B, Coukos G. Ovarian carcinoma expresses the NKG2D ligand *Letal* and promotes the survival and expansion of CD28- antitumor T cells. *Cancer Research* 2004; 64(6): 2175-82.
- [69] Vitale M, Pelusi G, Taroni B, Gobbi G, Micheloni C, Rezzani R, Donato F, Wang X, Ferrone S. HLA class I antigen down-regulation in primary ovary carcinoma lesions: association with disease stage. *Clin Cancer Res*. 2005 Jan 1;11(1):67-72.
- [70] Shehata M, Mukherjee A, Deen S, Al-Attar A, Durrant LG, Chan S. Human leukocyte antigen class I expression is an independent prognostic factor in advanced ovarian cancer resistant to first-line platinum chemotherapy. *Br J Cancer*. 2009 Oct 20;101(8):1321-8.
- [71] Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol*. 2007 May;7(5):329-39.

- [72] Malmberg KJ, Bryceson YT, Carlsten M, Andersson S, Björklund A, Björkström NK, Baumann BC, Fauriat C, Alici E, Dilber MS, Ljunggren HG. NK cell-mediated targeting of human cancer and possibilities for new means of immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2008 Oct;57(10):1541-52.
- [73] Kaku T, Ogawa S, Kawano Y, Ohishi Y, Kobayashi H, Hirakawa T, Nakano H. Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc*. 2003 Mar;36(1):9-17. Review.
- [74] Godoy-Ramirez K, Franck K, and Gains H. A novel method for the simultaneous assessment of natural killer cell conjugate formation and cytotoxicity at the single-cell level by multi-parameter flow cytometry. *J Immunol Methods* 2000; 239: 35-44.
- [75] Lecoeur H, Fevrier M, Garcia S, Riviere Y, and Gougeon ML. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 2001; 253: 177-87.
- [76] Jedema I, van der Werff NM, Barge RM, Willemze R and Falkenburg JH. New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population. *Blood* 2004; 103: 2677-82.

Anexos



7. ANEXOS

7.1 Anexo 1 Estadiamento do carcinoma de ovário 2000 (FIGO).

FIGO	CARACTERÍSTICAS
O	Sem evidência de tumor primário
I	Tumor confinado aos ovários
IA	Tumor limitado a um ovário, cápsula intacta, sem tumor na superfície ovariana, sem citologia positiva (células malignas) em líquido ascítico ou lavado peritoneal
IB	Tumor limitado a ambos os ovários, cápsula intacta, sem tumor na superfície ovariana, sem citologia positiva (células malignas) em líquido ascítico ou lavado peritoneal
IC	Tumor limitado a um ou ambos os ovários, com qualquer um dos achados: ruptura de cápsula, tumor na superfície ovariana, citologia positiva (células malignas) em líquido ascítico ou lavado peritoneal
II	Tumor envolvendo um ou ambos os ovários com extensão pélvica
IIA	Extensão e/ou implantes no útero e/ou implantes nas tubas uterinas, sem citologia positiva (células malignas) em líquido ascítico ou lavado peritoneal
IIB	Extensão para outros órgãos pélvicos, sem citologia positiva (células malignas) em líquido ascítico ou lavado peritoneal
IIC	Extensão e/ou implantes no útero e/ou implantes nas tubas uterinas e/ou implantes em outros órgãos pélvicos, com citologia positiva (células malignas) em líquido ascítico ou lavado peritoneal
III	Tumor envolvendo um ou ambos os ovários com microscopia confirmando metástase peritoneal além da pélvis e/ou linfonodo regional
IIIA	Microscopia confirmando metástase além da pélvis
IIIB	Metástase peritoneal macroscópica além da pélvis, 2cm ou menos em sua maior dimensão
IIIC	Metástase peritoneal além da pélvis, com mais de 2cm em sua maior dimensão e/ou metástase em linfonodo regional
IV	Metástase além da cavidade peritoneal

Nota: Metástase em região de cápsula hepática (estádio 3), em região de parênquima hepático (estádio 4). Efusão pleural deve ter citologia positiva.⁵⁷

7.2 Anexo 2 Características hematológicas das amostras

Variáveis Mediana / variação	Benigno (n=6)	Maligno (n=4)
Hb (g/dl)	13,9 (8,9 – 15,2)	14 (11,6 – 16,1)
Hct (%)	42,4 (26,4 – 44,5)	42,6 (37,2 – 48,4)
Mcv (fl)	84,7 (82,8 – 91,9)	87,2 (83,8 – 89,0)
Leucócitos (x10³/μl)	5,6 (2,7 – 6,7)	8,1 (4,6 – 10,6)
Linfócitos (%)	30,3 (19,6 – 55,5)	23,6 (7,6 – 27,6)

Abreviações - Hb: hemoglobina Hct: Hematócrito Mcv: Volume corpuscular médio

7.3 Anexo 3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto: **Potencial terapêutico das células NK expandidas *ex vivo* no tratamento do câncer de ovário**

Pesquisador responsável: **Fernando Guimarães**

Objetivo da pesquisa:

Fui informada que o objetivo deste trabalho é o de estudar se as células “killer” (células imunes presentes no sangue e no líquido ascítico coletados) conseguem destruir células do câncer de ovário. Para que este estudo seja realizado as células “killer” serão submetidas a um processo laboratorial que resultará no aumento do número destas células.

Descrição dos procedimentos:

Minha participação neste estudo é voluntária, sem nenhum ganho financeiro por participar.

Não existem riscos para a minha saúde se eu doar sangue ou líquido ascítico para realização do estudo.

A quantidade de sangue doado será de aproximadamente 9ml.

Parte deste material será usado e parte será guardado para exames especiais e estudos futuros.

O sangue e o líquido ascítico coletados serão utilizados apenas no laboratório para o estudo.

O sangue coletado não será usado em programas de doação de células, tecidos ou órgãos.

O sangue coletado, bem como, células ou produtos derivados da amostra de sangue ou de ascite não serão comercializados em nenhuma situação.

Benefícios:

Minha participação no estudo é voluntária sem nenhum benefício imediato. Entretanto, os resultados obtidos com esta pesquisa poderão ajudar no entendimento da resposta imune contra o câncer e auxiliar na elaboração de novos tratamentos para esta doença.

Transtornos ou riscos:

Fui informada que não estão previstos transtornos ou riscos, a não ser os riscos comuns inerentes da colheita de sangue ou drenagem do líquido ascítico.

Sigilo das informações:

Todas as informações sobre minha pessoa serão mantidas em segredo e minha privacidade será mantida. Os resultados da pesquisa serão mantidos em sigilo pelos pesquisadores e, mais tarde, publicados sem que minha identidade seja revelada para isso.

Em qualquer momento, em caso de dúvida ou reclamações poderei procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (telefone: 3521-8936), ou o pesquisador responsável: Dr Fernando Guimarães (telefone:3521-9462).

Declaro que li as informações neste documento e concordo em participar da pesquisa

Nome:.....RG.....Data:.....

Endereço:.....Telefone:.....

Assinatura da doadora

Assinatura do pesquisador

7.4 Anexo 4 Protocolo da Comissão de Pesquisa do Departamento de Tocoginecologia/CAISM

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**
✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP
☎ (0_19) 3788-8936
FAX (0_19) 3788-7187
🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 18/11/05.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: N° 489/2005

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS NK EXPANDIDAS *EX VIVO* NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE OVÁRIO”
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fernando Guimarães
INSTITUIÇÃO: CAISM -UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 05/09/05
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 25/10/06

II - OBJETIVOS

Avaliar o potencial terapêutico de preparações de células efetoras ricas em células NK pela expansão *ex vivo* a partir de células mononucleares de pacientes com câncer de ovário para o tratamento desta doença.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um estudo descritivo do comportamento biológico de células imunes humanas de pacientes humanos portadoras de câncer de ovário, frente a estímulos para ativação e expansão *ex vivo*, as informações existentes na literatura são insuficientes para estimativa do tamanho amostral. Espera-se um total de 12 pacientes amostrados. Será coletado sangue pelo serviço de Enfermagem do CAISM após o diagnóstico clínico e antes do início do tratamento da patologia. O volume de sangue colhido será de 25 ml. O líquido ascítico (100ml) será obtido através de punção por ocasião do procedimento médico da drenagem da cavidade peritoneal ou no momento da cirurgia. Os fragmentos do tumor serão fornecidos pelo Serviço de anatomia patológica a partir das peças removidas das pacientes durante a intervenção cirúrgica. Com os materiais biológicos em mãos serão processados conformes técnicas descritas, realizados testes com cultura primária das células, da linhagem das células tumorais, o fenótipo das preparações de células efetoras ricas em NK, citotoxicidades mediada por células e avaliada pela liberação de Cr.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo é complexo, está justificado e é pertinente, sem causar prejuízos ao paciente, que já estará recebendo tratamento na Instituição. O orçamento está descrito para obtenção de aquisição de insumos necessários para o estudo. O recurso financeiro virá do CNPq. (descrição detalhada em anexo). O TCLE está adequado, com linguagem simples e clara.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

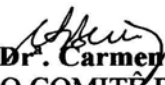
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de outubro de 2005.


Prof. Dr. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

CEP, 23/01/07.

(**PARECER PROJETO:** Nº 489/2005)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS NK EXPANDIDAS *EX VIVO* NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE OVÁRIO”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fernando Guimarães

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a Adendo que amplia os critérios para inclusão de sujeitos: passar a obter amostras de sangue de pacientes recebendo quimioterapia para tratamento do câncer de ovário, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de janeiro de 2007.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

Comissão de Pesquisa 2005

Campinas, 10 de novembro de 2005

O protocolo de pesquisa "POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS NK EXPANDIDAS *EX VIVO* NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE OVÁRIO" do pesquisador Fernando Guimarães, foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do DTG/FCM/UNICAMP.

Atenciosamente,


Prof. Dra. Lúcia Helena Costa Paiva
Presidente da Comissão de Pesquisa
Departamento de Tocoginecologia - DTG/FCM/UNICAMP

Comissão de Pesquisa-FCM-DTG-UNICAMP
Rua Alexander Flemming, 101 - Cidade Universitária Zeferino Vaz - Campinas/SP
Fones: (019) 3788-9402/3788-9403