

Atividade Antileucêmica das Células *Natural Killer* (NK)

Antileukemic Activity of Natural Killer (NK) Cells

Aline Almeida-Oliveira¹, Hilda Rachel Diamond²

Resumo

As células *natural killer* (NK) são conhecidas desde a década de 1970 por sua capacidade de matar células tumorais e infectadas por vírus sem sensibilização prévia. Além disso, essas células têm conhecido papel antileucêmico, o que levou à possibilidade de uma aplicação clínica das células NK. No entanto os resultados iniciais não foram promissores. Recentemente, houve um grande progresso no entendimento da biologia das células NK, principalmente nos mecanismos de reconhecimento das células-alvo através de um repertório próprio de receptores. Esses avanços causaram impacto no estudo do papel antileucêmico das células NK. Os conceitos modernos, junto com progressos metodológicos, impulsionaram o estudo da imunoterapia com células NK, que hoje se encontra mais próxima da prática clínica. Nesta revisão, serão abordados alguns desses novos conceitos, enfatizando os mecanismos de reconhecimento da célula alvo no papel antileucêmico. Também serão discutidos os avanços recentes da imunoterapia com células NK e as dificuldades de sua aplicação na prática clínica.

Palavras-chave: Células matadoras naturais; Imunoterapia; Leucemia

¹Mestra pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Laboratório de Imunologia - Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO)/INCA

²Doutora pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) - Laboratório de Imunologia - CEMO/ INCA

Endereço para correspondência: Hilda Rachel Diamond. Praça da Cruz Vermelha, nº 23 - 6º andar - Divisão Laboratorial - Laboratório de Imunologia Rio de Janeiro (RJ), Brasil - CEP: 20230-130. E-mail: hdiamond@inca.gov.br

INTRODUÇÃO

As células *natural killer* (NK) foram caracterizadas há mais de 30 anos como componentes importantes do sistema imune inato, que têm a capacidade de lisar células alvo, além de fornecer citocinas imunorregulatórias. As células NK compreendem cerca de 10% dos linfócitos do sangue periférico e são identificadas pela expressão de CD56 e CD16 na ausência de CD3^{1,2}. Dois subtipos distintos de células NK podem ser identificados baseando-se na densidade de expressão de superfície de CD56. Mais de 90% das células NK pertencem ao subtipo CD56^{dim} que tem como principal função a citotoxicidade natural. O segundo subtipo, CD56^{bright}, é raro no sangue ($\pm 10\%$) e é responsável pela produção de citocinas³.

Desde a década de 1980, as células NK foram consideradas como a primeira linha de defesa contra células tumorais. Nessa época, foi demonstrado que essas células tinham atividade citotóxica contra diversos tipos de leucemias, tanto células primárias quanto linhagens estabelecidas⁴⁻⁶.

A partir do conhecimento desse papel antileucêmico, muitas pesquisas estudaram a manipulação das células NK para funções terapêuticas. Porém, durante anos, os maiores obstáculos para a aplicação clínica da imunoterapia adotiva de células NK foram relacionados à dificuldade de gerar um número suficiente de células *in vitro*, mantendo a sua capacidade antitumoral *in vivo*, e o fato de não se saber como as células NK reconhecem seus alvos. Na última década, os avanços dos conhecimentos de como as células NK reconhecem as células alvo e metodologias mais avançadas de purificação dessas células tornaram a imunoterapia de células NK (tanto para o tratamento de leucemias quanto outros tipos de tumor) mais próxima de atingir a prática clínica^{1,5,7}.

Nesta revisão, serão abordados os recentes avanços no conhecimento da biologia e do papel antileucêmico das células NK assim como sua aplicação na imunoterapia adotiva.

BIOLOGIA DAS CÉLULAS NK

As células NK foram primeiramente identificadas por sua habilidade em matar células tumorais e células infectadas por vírus sem sensibilização prévia². Elas parecem ter surgido evolutivamente antes dos linfócitos T e B, já que são encontradas em invertebrados que não possuem sistema imune adaptativo⁷.

A atividade citotóxica das células NK foi descrita pela primeira vez na década de 1970. Nessa época, foi observado que linfócitos recentemente isolados de indivíduos normais e não imunizados poderiam lisar

linhagens de células tumorais alogeneicas. Mais tarde, devido às características diferentes apresentadas por essas células, em comparação aos outros linfócitos, passaram a ser chamadas de células citotóxicas naturais (*natural killer* - NK). Foram descritas várias atividades dessas células *in vivo*, incluindo destruição de células tumorais, resistência a infecções virais e regulação da hematopoese⁷.

A determinação das células NK como uma população diferente de outros linfócitos foi feita através de microscopia e uso de anticorpos monoclonais. Morfologicamente elas são caracterizadas como linfócitos grandes e granulares. Os principais antígenos utilizados para identificar as células NK são o CD56 e o CD16. O antígeno CD56 parece ser idêntico à molécula de adesão de célula neural (NCAM). Até hoje, a função da molécula CD56 nas células NK é desconhecida. As células NK não fazem rearranjo gênico, por isso não expressam o TCR nem a molécula acessória CD3. A maioria das células NK expressa CD16, receptor para a porção Fc de IgG⁷.

A maior parte dos autores concorda que os linfócitos T, B e células NK se originam de um precursor comum. A medula óssea é considerada o sítio primário de geração das células NK porque possui todos os substratos celulares e fatores solúveis necessários para a maturação dessas células. Entretanto ainda não está claro se a medula óssea sozinha é suficiente para garantir a maturação completa das células NK. Existe a possibilidade de que as células NK sejam geradas na medula óssea e completem sua maturação em outro sítio. Foram encontrados precursores de células NK no fígado, baço e linfonodos, sustentando essa teoria⁸.

A principal função das células NK maduras é a atividade citotóxica. Essa citotoxicidade é considerada rápida, muito potente e possui múltiplas facetas. Dessa forma, a morte da célula alvo pode ocorrer em minutos, dificultando a atuação de mecanismos de resistência. A morte celular mediada pelas células NK ocorre através da exocitose de grânulos e a indução de apoptose através da sinalização via membros da família de receptores de morte celular do TNF⁹.

O primeiro passo para a citotoxicidade mediada por células NK é a adesão. Integrinas e outras moléculas de adesão têm um papel crucial na formação de conjugados entre a célula NK e a célula alvo. Uma das principais integrinas é a função linfóide associada ao antígeno-1 (LFA-1), que tem a função de induzir a polimerização de actina, rearranjos do citoesqueleto e aglomeração de vesículas lipídicas. Esses sinais mediados por LFA-1 sozinhos podem ser suficientes para ativar a citotoxicidade mediada por células NK¹⁰.

O processo de adesão à célula alvo induz alterações dinâmicas na morfologia das células NK, os grânulos

líticas são movidos em direção ao sítio de interação com a célula alvo. Esse movimento é realizado através de estruturas de citoesqueleto que são orquestradas pelo centro de organização de microtúbulos. Em seguida, a membrana externa do grânulo se funde com a membrana citoplasmática, liberando seu conteúdo no espaço sináptico (figura 1). Os principais conteúdos desses grânulos são moléculas de perforina e granzima^{9,10}.

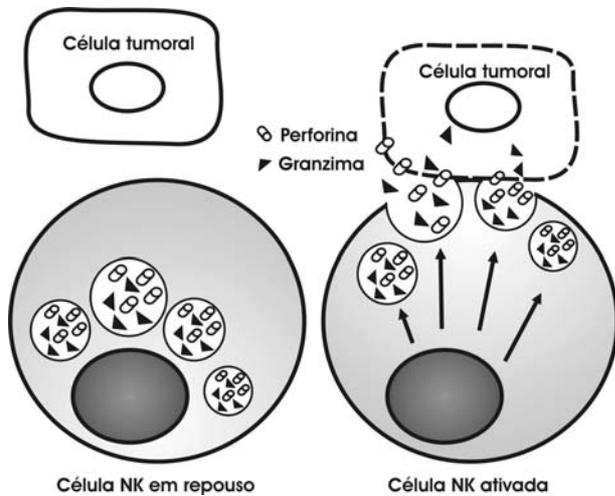


Figura 1. Liberação dos grânulos líticos pelas células NK no momento da interação com as células alvo

As perforinas são proteínas que formam poros na membrana das células alvo que podem alterar a permeabilidade e levar à lise osmótica, enquanto as granzimas são uma família de serina-proteases estruturalmente relacionadas com várias especificidades de substrato. Em humanos, há cinco tipos de granzimas (A, B, H, K e M). A granzima B é considerada o membro pró-apoptótico mais importante dessa família. A apoptose mediada por granzimas é auxiliada pela perforina^{9,10}.

O outro mecanismo de morte celular mediado por células NK é através da ligação de receptores específicos presentes nas células alvo com ligantes na superfície das células NK. Esses ligantes pertencem à superfamília do TNF e a sua ligação induz à apoptose da célula alvo. As células NK expressam dois membros dessa família, FasL (também conhecido como CD95L) e o ligante de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL). Muitas células tumorais não expressam Fas (receptor que se liga a FasL), mas as células NK podem diretamente induzir a expressão de Fas em células tumorais através da secreção de TNF. A atividade citotóxica mediada por TRAIL é relativamente seletiva porque mata linhagens celulares tumorais humanas e não causa efeito nas células normais⁹.

A citotoxicidade direta contra células tumorais ou infectadas por vírus é apenas um componente da resposta das células NK. Outro componente é a produção de citocinas liberadas por essas células, como IFN- γ , que também restringe a angiogênese tumoral e estimula a imunidade adaptativa⁹. Foi observado que dois subtipos distintos de células NK eram responsáveis por esses dois papéis³.

SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS NATURAL KILLER

Na década de 1980, foram identificados dois subtipos distintos de células NK através de diferenças na densidade de expressão de superfície de CD56. A maioria das células NK humanas tem baixa expressão de CD56 e alta expressão de CD16, e são conhecidas como células CD56^{dim}. A outra subpopulação é caracterizada por alta expressão de CD56 e expressão baixa ou negativa de CD16 e por isso é chamada de CD56^{bright}. Essas duas subpopulações também têm características funcionais distintas: a CD56^{dim} é a mais citotóxica, enquanto a CD56^{bright} é a maior responsável pela produção de citocinas³. As principais características que diferenciam essas células estão representadas na figura 2. O significado funcional *in vivo* desses subtipos distintos de células NK humanas e como eles podem interagir entre si ainda não estão completamente definidos.

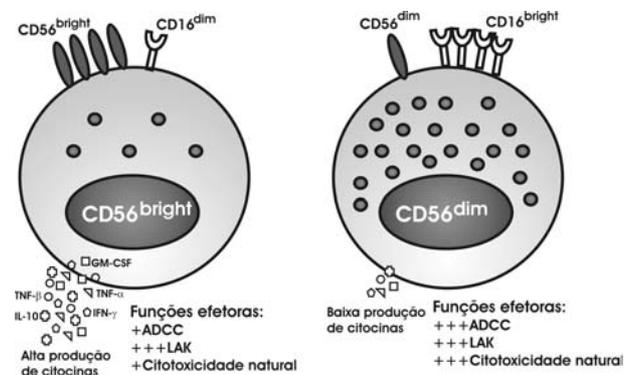


Figura 2. Duas subpopulações de células NK e as suas principais características fenotípicas e funcionais. À esquerda está representado o subtipo CD56^{bright} e à direita o CD56^{dim}

O subtipo CD56^{dim} é predominante no sangue periférico (cerca de 90%) e tem maior participação na citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) por possuir maior expressão de CD16 que, conforme dito anteriormente, é um receptor para a porção Fc de anticorpos. Além disso, esse subtipo tem maior citotoxicidade natural contra alvos sensíveis às células NK e respondem à interleucina 2 (IL-2) com uma potencialização dessa função. As células da subpopulação

CD56^{dim} têm maior concentração de grânulos do que as CD56^{bright}. Após o tratamento com IL-2 tanto *in vivo* quanto *in vitro*, os dois subtipos de células NK passam a apresentar níveis semelhantes de citotoxicidade³.

As células CD56^{bright} produzem citocinas imunorregulatórias, incluindo fator de necrose tumoral (TNF) alfa (a) e beta (b), interferon gama (IFN-g), fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago (GM-CSF), interleucina (IL) 10 e 13. Essa subpopulação expressa constitutivamente o receptor de IL-2 de alta afinidade e se expande *in vitro* e *in vivo* em resposta a baixas doses (picomolares) de IL-2, com pouca atividade citolítica. Em contraste, as CD56^{dim} só expressam o receptor de afinidade intermediária para IL-2 e proliferam pouco em resposta a altas concentrações (nanomolares) de IL-2. Embora o subtipo CD56^{bright} seja raro no sangue ($\pm 10\%$ das células NK), ele representa o subtipo predominante nos tecidos e linfonodos. Isto pode ser justificado pelo fato das células CD56^{bright} expressarem moléculas de adesão e receptores de quimiocinas diferentes das CD56^{dim}. O subtipo CD56^{bright} tem a expressão das moléculas necessárias ao tráfego para os linfonodos periféricos através de vênulas endoteliais. Nos linfonodos, essas células se localizam na mesma região onde estão os linfócitos T e as células dendríticas, o que é consistente com o seu potencial papel imunorregulatório da resposta adaptativa¹¹.

Ainda não está bem definido como esses dois subtipos de células NK interagem para gerar a resposta antileucêmica. A diferença no potencial citotóxico dos subtipos de células NK pode ser devido a padrões distintos de expressão de receptores de células NK importantes no reconhecimento e morte da célula alvo³.

RECONHECIMENTO DAS CÉLULAS ALVO

O mecanismo de reconhecimento das células alvo pelas células NK ficou desconhecido por muito tempo. Na década de 1980, foi observado que a susceptibilidade à atividade das células NK era inversamente proporcional à expressão de antígenos de histocompatibilidade principal (MHC) na célula alvo. Isso foi verificado em linhagens celulares alteradas com baixa expressão de MHC, tornando-as mais sensíveis quando comparadas com as suas linhagens parentais. No entanto a resistência à atividade NK podia ser restaurada pela introdução de genes normais de MHC. Além disso, "mascarar" os antígenos de MHC com anticorpos monoclonais aumentava a susceptibilidade à função efetora das células NK⁷.

A partir dessas e outras observações em modelos animais, foi proposto que, apesar de tolerantes com as células autólogas normais, as células NK conseguem reconhecer e atacar células que tenham baixa expressão de MHC classe I, como células infectadas por vírus e

células transformadas. Essa teoria ficou conhecida como hipótese do *missing-self*¹². Essa imunovigilância da perda ou alteração da expressão de moléculas de MHC-I mediada por células NK é uma tarefa essencial do sistema imune inato porque constitui um dos pontos falhos da resposta adaptativa. Isso ocorre porque as células T só reconhecem antígenos no contexto do MHC, portanto a perda da expressão de MHC representa um mecanismo de escape ao ataque das células T. Na última década, a teoria do *missing-self* foi confirmada através da identificação de vários receptores inibidores de células NK humanas que reconhecem especificamente moléculas do antígeno principal de histocompatibilidade clássicas, como HLA-A, B e C; ou não clássicas, como HLA-E e G¹.

Os receptores expressos por células NK podem gerar sinais inibidores ou ativadores e têm um papel crucial na regulação da atividade lítica e produção de citocinas. A atividade das células NK é regulada por um equilíbrio entre os sinais provocados por esses receptores (Figura 3). Se houver mais sinais inibidores do que ativadores, ocorrerá a predominância dos sinais inibitórios e a célula alvo será protegida da lise por células NK. Por outro lado, se houver mais sinais ativadores do que inibidores, ocorrerá a predominância dos sinais ativadores e a célula alvo será lisada. Acredita-se que se houver uma equivalência entre sinais inibidores e ativadores, o sinal inibidor prevaleça¹.

Três famílias principais de receptores são encontradas em células NK (tabela 1): a superfamília de receptores semelhantes à lectina tipo C, que reconhece moléculas de HLA classe I não clássicas e moléculas semelhantes à

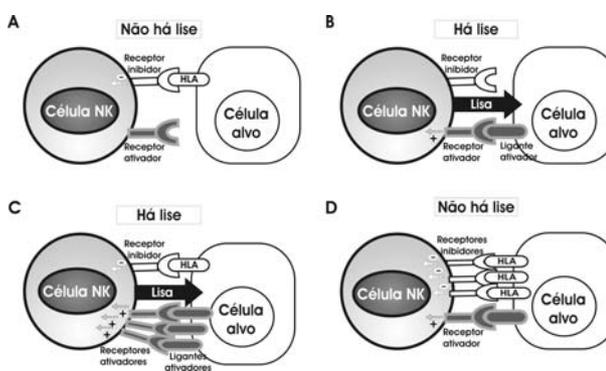


Figura 3. Regulação da atividade citotóxica das células NK por receptores ativadores e inibidores em diferentes situações: Em (A), o sinal inibidor prevalece por não haver ligação de nenhum receptor ativador. Em (B), há ligação de receptor ativador na ausência de sinais inibidores, de forma que ocorre lise da célula alvo. (C) e (D) representam situações mais complexas, em que ocorrem simultaneamente ligações de receptores ativadores e inibidores. Se houver mais sinais ativadores do que inibidores (C), ocorre lise da célula alvo. Por outro lado, se houver mais sinais inibidores do que ativadores (D), a célula alvo será protegida da lise por células NK

classe I; os receptores de citotoxicidade natural (NCR), cujos ligantes ainda estão mal definidos; e, por último, a superfamília *killer immunoglobulin-like receptor* (KIR), que reconhece moléculas clássicas de HLA classe I^{1,13}.

A primeira família de receptores de células NK é estruturalmente caracterizada pelos domínios extracelulares semelhantes à lectina do tipo C e seus receptores são expressos como heterodímeros compostos de uma subunidade comum (CD94). Os principais membros dessa família são: CD94/NKG2A/B, que reconhece HLA-E e fornece sinal inibidor; CD94/NKG2C, que também reconhece HLA-E, mas fornece sinal ativador; e CD94/NKG2E/H, que gera sinal ativador, mas cujo ligante é desconhecido¹. Esses receptores estão relacionados à teoria do *missing-self*, pois a expressão de HLA-E só ocorre se houver a expressão total das moléculas de HLA classe I (A, B e C) nas células¹³.

Outro receptor pertencente a essa família é o receptor ativador NKG2D, que tem relação distante com os outros receptores da família NKG2, apresentando apenas uma

pequena seqüência similar e não interagindo com o CD94. O NKG2D humano reconhece MICA e MICB, que são proteínas de transmembrana codificadas por genes que fazem parte do complexo do MHC. Diferente dos MHC convencionais, MICA e MICB são proteínas minimamente expressas nos tecidos normais, mas têm expressão aumentada em células submetidas a estresse e em células tumorais. Outras proteínas reconhecidas por NKG2D são: ULBP1, ULBP2 e ULBP3, inicialmente identificadas pela capacidade de se ligarem a uma proteína codificada pelo citomegalovírus humano (proteína UL16). O nível de expressão de NKG2D pode ser aumentado nas células NK pela exposição à IL-15. Esses achados sugerem que NKG2D possa ter uma participação importante na imunovigilância das células NK contra células tumorais e células infectadas por vírus¹³.

A segunda família de receptores de células NK é composta exclusivamente de receptores ativadores e é conhecida como NCR, sendo representada por NKp46, NKp44 e NKp30. Como a expressão de NCR é restrita às células NK, esses são os marcadores mais confiáveis

Tabela 1. Principais famílias de receptores de células NK

Família de receptores	Membros	Ligante(s)	Tipo de sinal
Semelhantes à lectina tipo C	CD94/NKG2A/B	HLA-E	inibidor
	CD94/NKG2C	HLA-E	ativador
	CD94/NKG2E/H	Ainda não foram identificados	ativador
	NKG2D	MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 e ULBP3	ativador
Receptores de citotoxicidade natural (NCR)	NKp46	Ainda não foram identificados	ativador
	NKp44	Ainda não foram identificados	ativador
	NKp30	Ainda não foram identificados	ativador
Killer immunoglobulin-like receptors (KIR)	KIR2DL1	HLA-C do grupo 2 (Cw2, 4, 5, 6 e outros)	inibidor
	KIR2DL2	HLA-C do grupo 1 (Cw1, 3, 7, 8 e outros)	inibidor
	KIR2DL3	HLA-C do grupo 1	inibidor
	KIR2DL5	Ainda não foram identificados	inibidor
	KIR3DL1	HLA-Bw4	inibidor
	KIR3DL2	A3, A11 e outros ainda não identificados	inibidor
	KIR3DL3	Ainda não foram identificados	inibidor
	KIR2DS1	HLA-C do grupo 2	ativador
	KIR2DS2	HLA-C do grupo 1	ativador
	KIR2DS3	Ainda não foram identificados	ativador
	KIR2DL4	HLA-G	ativador
	KIR2DS4	Ainda não foram identificados	ativador
	KIR2DS5	Ainda não foram identificados	ativador
KIR3DS1	Ainda não foram identificados	ativador	

para identificação dessas células. NKp46 e NKp30 são constitutivamente expressos nas células NK do sangue periférico, enquanto NKp44 é expresso apenas em células NK ativadas. NCR tem um papel principal na atividade citolítica mediada por células NK contra células tumorais. No entanto os ligantes desses receptores ainda não foram identificados. O NKp30 também é importante na interação com células dendríticas, ajudando na regulação da resposta imune adaptativa^{1,14}.

A terceira e última superfamília de receptores de células NK é conhecida como KIR. Esse receptor tem sido mais estudado e considera-se que ele tenha um papel importante na aplicação da imunoterapia de câncer, principalmente no transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) haploidêntico. Essas moléculas se apresentam como conjuntos de receptores ativadores e inibidores pareados que, primariamente, reconhecem moléculas de HLA-A, B e C nas células alvo^{1,15}.

Os receptores dessas três famílias (receptores semelhantes à lectina tipo C, NCR e KIR) têm uma participação importante no reconhecimento das células alvo pelas células NK, atuando na regulação de sua atividade antileucêmica.

ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA DAS CÉLULAS NATURAL KILLER

Os estudos iniciais sobre o potencial antileucêmico das células NK foram realizados contra linhagens leucêmicas estabelecidas, como a K562 (linhagem de eritroleucemia humana). Mais tarde, foi relatado que células leucêmicas primárias obtidas de pacientes podiam ser lisadas por células NK alogeneicas. Nessa época, foi demonstrado que a adição de IFN ou IL-2 aumentava o potencial antileucêmico, inclusive fazendo com que as células NK passassem a matar algumas células leucêmicas primárias resistentes à atividade citotóxica de células NK não ativadas. Foi observado que as células NK alogeneicas poderiam matar tanto leucemias agudas linfóides quanto mielóides^{4,16}. Também foi demonstrado que células NK autólogas ativadas poderiam matar células primárias de leucemia mielóide aguda (LMA) e leucemia linfóide aguda (LLA)^{17,18}.

Existem evidências de que nem todos os tipos de leucemias são igualmente susceptíveis à atividade NK. Yan *et al.* (1998)⁵ estudaram a susceptibilidade de diferentes tipos de leucemias, utilizando uma linhagem de células NK (NK-92). Essa linhagem é dependente de IL-2 e apresenta características de uma célula NK ativada. A NK-92 tem ausência de expressão de todos os KIR inibitórios e alta expressão de receptores ativadores, como NKG2D, NKp46, NKp30 e NKp44, possuindo, portanto, maior potencial citotóxico em comparação com as células NK obtidas a partir de doadores saudáveis. Por isso, a linhagem NK92 é utilizada em vários estudos de susceptibilidade/resistência à atividade NK^{5,19}.

No estudo de Yan *et al.* (1998)⁵, a sensibilidade de células leucêmicas primárias à citotoxicidade da NK-92 foi categorizada em três tipos: insensível, sensível e altamente sensível. Foi verificado que, em 46 amostras de pacientes, 24 foram sensíveis ou altamente sensíveis à atividade citotóxica. A susceptibilidade à atividade NK variou com o tipo de leucemia aguda: 6 em 12 das LMA, 7 em 7 das LLA T e 5 em 14 das LLA B foram sensíveis ou altamente sensíveis.

Outro estudo que mostrou sensibilidade distinta entre LMA e LLA foi realizado por Ruggeri *et al.* (1999)²⁰ em TCTH haploidêntico. Partindo da teoria do *missing-self*, foi proposto que a ausência de ligantes de HLA nos pacientes para os receptores KIR inibidores do doador, ou seja, incompatibilidade KIR, poderia gerar aloreatividade e levar à lise de células leucêmicas do paciente. Clones de células NK do doador foram preparados *in vitro* através da seleção por aloreatividade contra epítomos de HLA específicos. A partir desses clones, ensaios de citotoxicidade foram realizados contra células leucêmicas dos respectivos pacientes em 4 casos de LMA e 5 de LLA. Todas as amostras de LMA foram sensíveis a esse ensaio, enquanto apenas duas amostras de LLA foram sensíveis. Análises de imunofluorescência mostraram que todos os casos de LLA resistentes à atividade NK exibiram baixa expressão de superfície de LFA-1 quando comparadas com as amostras de LLA e LMA susceptíveis.

Outro estudo realizado por esse grupo demonstrou que a incompatibilidade KIR em pacientes com LMA submetidos ao TCTH haploidêntico levava a uma melhora na sobrevida e diminuição no risco de recaída. No entanto a incompatibilidade KIR não causou nenhum impacto em LLA, sugerindo que as células de LLA exibissem outros mecanismos de resistência à atividade NK além do envolvimento do KIR¹⁵.

Esses estudos mostraram que, muitas vezes, as LLA apresentam um alto grau de resistência à atividade citotóxica das células NK, mas os mecanismos envolvidos ainda não estão bem compreendidos. Romanski *et al.* (2005)¹⁹ estudaram a atividade citotóxica da linhagem NK-92 contra 12 linhagens estabelecidas de LLA e 16 amostras primárias obtidas a partir de pacientes com LLA com objetivo de verificar quais mecanismos de resistência estariam envolvidos. Quase todas as células de LLA comprometidas com linhagem B se mostraram resistentes à atividade citotóxica, enquanto os casos de LLA-T apresentaram susceptibilidade moderada. Para todos os tipos de LLA estudados, as células leucêmicas primárias foram mais resistentes quando comparadas às linhagens. Esse estudo demonstrou que as moléculas de adesão, como LFA-1, contribuem apenas parcialmente para a susceptibilidade das células alvo. Também foi observado que fatores solúveis derivados

de blastos de LLA resistentes não são capazes de diminuir o potencial lítico contra células sensíveis. Foi analisado o papel do receptor ativador NKG2D que, conforme citado anteriormente, reconhece MICA, MICB e ULBP. Ao analisar a expressão de MICA e MICB em linhagens de LLA, esses autores observaram que a expressão dessas moléculas só ocorria nas linhagens susceptíveis à atividade NK.

Outros autores estudaram a expressão de ligantes de receptores ativadores de células NK em leucemias. Salih *et al.* (2003)²¹ demonstravam que há expressão heterogênea de ligantes de NKG2D (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 e ULBP3) em leucemias. Foram estudados 25 pacientes, sendo 15 casos de LMA, 2 de LLA e 7 de outras leucemias. A expressão de ligantes de NKG2D ocorreu em 56% dos pacientes e não parecia se correlacionar com os subtipos de leucemia. Utilizando uma linhagem de células NK (NKL), que expressa altos níveis de NKG2D e baixos níveis de receptores ativadores da família NCR (NKp30, NKp44 e NKp46), foi realizada atividade citotóxica contra as células leucêmicas primárias e foi demonstrado que a expressão de NKG2D está correlacionada com a susceptibilidade à atividade NK.

Outro estudo demonstrou que uma baixa expressão de ligantes para os receptores ativadores NKG2D e da família NCR (NKp30, NKp44 e NKp46) está relacionada à resistência à atividade antileucêmica das células NK de células primárias de LMA. Foi também observado que a indução do aumento da expressão desses ligantes nas células leucêmicas aumentou a sua susceptibilidade à atividade NK²².

Sabendo que a expressão de HLA classe I na superfície de células leucêmicas também pode ter um papel importante na susceptibilidade dessas células à atividade NK, Pende *et al.* (2005)⁶ estudaram a expressão de HLA na superfície de células primárias de pacientes com LMA através de um anticorpo monoclonal que reconhece todas as moléculas de HLA classe I. Dos 24 casos de LMA estudados, 16 tiveram uma clara diminuição na expressão de HLA classe I e o restante manteve a expressão de HLA classe I normal ou aumentada. Houve, portanto, grande variabilidade na expressão de HLA entre as diferentes leucemias estudadas, mas não foi possível fazer uma correlação entre essa expressão e a subclassificação da leucemia. Foi demonstrado que a susceptibilidade das diferentes amostras de LMA à atividade NK foi mais facilmente detectada nas leucemias que tinham baixa expressão de HLA classe I. Esses autores também estudaram a expressão de HLA classe I em 14 casos de LLA. Apenas 3 casos de LLA tinham expressão de HLA classe I diminuída, enquanto 7 tinham expressão de HLA classe I aumentada e os outros 4 casos tinham expressão normal de HLA classe I. Esse aumento da expressão de HLA classe I em LLA pode estar relacionado

com a maior resistência dessa leucemia à atividade NK observada nesse estudo.

A capacidade das células NK de matar células leucêmicas *in vitro* e os estudos recentes da influência dos seus receptores no TCTH sugerem que essas células têm um papel central no controle e eliminação das leucemias. Diferentes mecanismos são utilizados por células leucêmicas para escapar à imunovigilância das células NK. Ainda não existe um consenso de quais subtipos de LLA e LMA são mais susceptíveis à atividade NK e quais mecanismos de resistência estão associados a cada subtipo de leucemia. A aquisição desse conhecimento é de extrema importância para o desenvolvimento de novas modalidades imunoterapêuticas no tratamento de leucemias agudas^{5,6,15,19,20}.

IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS NK

O estudo da atividade antileucêmica das células NK e seus receptores está fazendo com que cada vez mais seja percebida a importância dessas células para a imunovigilância antitumoral e imunoterapia. Na década de 1980, foi demonstrado que células NK ativadas administradas em modelos animais poderiam resultar em resistência à metástase e regressão de tumores estabelecidos. Porém, durante muitos anos, a dificuldade de gerar um número suficiente de células *in vitro*, mantendo a sua capacidade antitumoral *in vivo*, foi um dos maiores obstáculos para a aplicação clínica da imunoterapia adotiva de células NK. Entretanto, com os avanços da última década do processo de reconhecimento das células alvo pelas células NK e metodologias mais modernas de purificação dessas células, surgiram possibilidades de novos progressos na imunoterapia adotiva de células NK para o tratamento de leucemias e outros tipos de tumor^{1,5,7}.

O estudo do papel das células NK no TCTH haploidêntico levou à sugestão de que a alorreatividade de células NK poderia ter um impacto no desenvolvimento de novos procedimentos clínicos. As células NK alorreativas poderiam ser infundidas para prevenir recaídas, favorecer o enxerto e modular a doença enxerto contra o hospedeiro (DECH) no TCTH. As células NK alorreativas, de origem do mesmo doador do transplante ou de um doador diferente, poderiam ser infundidas antes do TCTH como parte de um regime de condicionamento de intensidade reduzida ou a infusão dessas células poderia ocorrer depois do transplante, numa tentativa de tratar recaídas, semelhante à imunoterapia de infusão de linfócitos do doador²³.

Alguns grupos têm investigado a preparação e infusão de células NK de doador purificada e depletada de células T com o objetivo de consolidar o enxerto e induzir o

efeito enxerto contra leucemia nos pacientes após TCTH haploidêntico ou com outros tipos de doador. No entanto ainda não há dados clínicos ou experimentais para ajudar a definir uma dose adequada de células NK²⁴.

Embora atualmente não exista nenhuma técnica disponível para mobilizar as células NK para o sangue periférico, uma estratégia que pode ser utilizada para imunoterapia de células NK consiste em fazer uma leucoférese e posteriormente separar as células NK. Uma forma de purificar células NK em larga escala é através do método imunomagnético em duas etapas, em que a primeira consiste de depleção de CD3⁺ e a segunda de enriquecimento de CD56⁺. Esse método obtém pureza de 90% de células NK com depleção eficiente de células T. A citotoxicidade natural das células NK purificadas aumenta aproximadamente em cinco vezes em comparação com as células NK misturadas às células mononucleares. Pode ser feita uma expansão *ex vivo* com objetivo de ativar as células CD56⁺ recém selecionadas (aumentando o potencial citotóxico dessas células) e amplificar o número total de células NK. Atualmente, tem sido possível a seleção, enriquecimento, ativação e expansão de células NK purificadas para aplicação clínica, porém o procedimento laboratorial é longo, caro e precisa de pessoal especializado²⁴.

Um grupo de pesquisadores explorou o uso de infusão de células NK alorreativas de doadores haploidênticos, sem realizar TCTH, como tratamento antitumoral após dois tipos de regime de condicionamento (alta e baixa intensidade) em 43 pacientes (10 com melanoma metastático, 13 com carcinoma renal metastático, 1 com doença de Hodgkin refratária e 19 pacientes com LMA de mau prognóstico). O objetivo principal desse estudo foi testar a segurança do procedimento. A dose de células NK infundida foi de $8,5 \times 10^6$ células/Kg, com forte depleção de células T, embora houvesse contaminação por células B e monócitos. Após a infusão, os pacientes receberam doses diárias de IL-2. Nesse estudo, foi demonstrado que, quando o regime de condicionamento foi de alta dose, as células NK infundidas podiam ser expandidas *in vivo*. A infusão de células NK foi realizada de forma segura, sendo bem tolerada, sem sinais de toxicidade. Apesar da resposta tumoral não ser o objetivo principal desse estudo, 5 dos 19 pacientes de LMA com mau prognóstico atingiram remissão completa com essa terapia, principalmente quando havia incompatibilidade KIR²⁵.

CONCLUSÃO

As células NK possuem uma atividade antileucêmica importante, que foi demonstrada tanto *in vitro* quanto *in vivo* contra diferentes tipos de leucemia. Portanto essas células podem ser utilizadas no tratamento de

pacientes com leucemia. Apesar dos avanços recentes no conhecimento da biologia das células NK e de novos métodos de purificação, ainda são necessários novos estudos para que a imunoterapia de células NK possa atingir a prática clínica. Ainda existem várias questões em aberto, como a dose de células NK, o momento da infusão e seleção apropriada de doadores e pacientes para esse procedimento. Ainda não está claro em quais pacientes e que tipos de leucemia seriam mais beneficiados por esse tratamento. Por isso, é de extrema importância definir melhor quais tipos de leucemias são mais susceptíveis à atividade NK e o papel dos receptores das células NK, como os KIR, na atividade antileucêmica dessas células. Além disso, seria importante conhecer o papel das diferentes subpopulações de células NK na atividade antileucêmica, assim como os mecanismos de resistência das leucemias à morte celular por atividade citotóxica.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dra. Vivian M. Rumjanek pelo incentivo para escrever esta revisão, à Dra. Maria Helena Ornellas de Souza e à Dra. Karen Wagner de Souza pela leitura crítica deste artigo. Agradecemos também à CAPES, FAPERJ e ao Instituto Nacional de Câncer (INCA) - Ministério da Saúde (MS) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*. 2002;100(6):1935-47.
2. Dines I, Rumjanek VM, Persechini PM. What is going on with natural killer cells in HIV infection? *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;133(4):330-9.
3. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22(11):633-40.
4. Oshimi K, Oshimi Y, Motoji T, Kobayashi S, Mizoguchi H. Lysis of leukemia and lymphoma cells by autologous and allogeneic interferon-activated blood mononuclear cells. *Blood*. 1983;61(4):790-8.
5. Yan Y, Steinherz P, Klingemann HG, Dennig D, Childs BH, McGuirk J, et al. Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clin Cancer Res*. 1998;4(11):2859-68.
6. Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, Martini S, Rivera P, Capobianco A, et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood*. 2005;105(5):2066-73.

7. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990;76(12):2421-38.
8. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:287-320.
9. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*. 2005;42(4):501-10.
10. Tassi I, Klesney-Tait J, Colonna M. Dissecting natural killer cell activation pathways through analysis of genetic mutations in human and mouse. *Immunol Rev*. 2006;214:92-105.
11. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, et al. 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;101(8):3052-7.
12. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990;11(7):237-44.
13. Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, Moretta A. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol*. 2006;18(3):151-8.
14. Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, Lanier LL. NK cell regulation of T cell-mediated responses. *Mol Immunol*. 2005;42(4):451-4.
15. 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(5562):2097-100.
16. Pattengale PK, Sundstrom C, Yu AL, Levine A. Lysis of fresh leukemic blasts by interferon-activated human natural killer cells. *Nat Immun Cell Growth Regul*. 1983-1984;3(4):165-80.
17. Torelli GF, Guarini A, Palmieri G, Breccia M, Vitale A, Santoni A, et al. Expansion of cytotoxic effectors with lytic activity against autologous blasts from acute myeloid leukaemia patients in complete haematological remission. *Br J Haematol*. 2002;116(2):299-307.
18. Torelli GF, Guarini A, Maggio R, Alfieri C, Vitale A, Foa R. Expansion of natural killer cells with lytic activity against autologous blasts from adult and pediatric acute lymphoid leukemia patients in complete hematologic remission. *Haematologica*. 2005;90(6):785-92.
19. Romanski A, Bug G, Becker S, Kampfmann M, Seifried E, Hoelzer D, et al. Mechanisms of resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity in acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol*. 2005;33(3):344-52.
20. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1999;94(1):333-9.
21. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG, et al. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*. 2003;102(4):1389-96.
22. Nowbakht P, Ionescu MC, Rohner A, Kalberer CP, Rossy E, Mori L, et al. Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood*. 2005;105(9):3615-22.
23. Velardi A, Ruggeri L, Moretta A, Moretta L. NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends Immunol*. 2002;23(9):438-44.
24. Passweg JR, Koehl U, Uharek L, Meyer-Monard S, Tichelli A. Natural-killer-cell-based treatment in haematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19(4):811-24.
25. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltzis-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(8):3051-7.

Abstract

Since the 1970s, natural killer (NK) cells have been known for their ability to kill virus-infected and tumor cells without prior sensitization. Because of their antileukemic potential, NK cells held great promise for clinical application. However, the initial results fell short of expectations. More recently, important progress has been made in NK cell biology, mainly in the field of target cell recognition through a unique repertoire of receptors. These advances have impacted the study of the antileukemic role of NK cells. Modern concepts, together with methodological progress, have shed new light on NK cell immunotherapy, which now is closer to clinical practice. This review discusses some of these new concepts, emphasizing mechanisms of target cell recognition in the antileukemic role. It also discusses recent advances in NK cell immunotherapy and difficulties for the clinical application of this therapy.

Key words: Killer cells, natural; Immunotherapy; Leukemia