

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**O IMPACTO DA HIPÓXIA NA EXPANSÃO *IN VITRO* DE  
CÉLULAS T E NATURAL KILLER (NK)**

MARIA APARECIDA LIMA DA SILVA

Porto Alegre, Brasil

2012

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

**O IMPACTO DA HIPÓXIA NA EXPANSÃO *IN VITRO* DE  
CÉLULAS T E NK**

MARIA APARECIDA LIMA DA SILVA

**Orientador: Profa Dra Lúcia Mariano da Rocha Silla**  
**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em**  
**Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito**  
**para obtenção do título de Doutor.**

Porto Alegre, Brasil

2012

### CIP - Catalogação na Publicação

da Silva, Maria Aparecida Lima

O Impacto da Hipóxia na Expansão in vitro de Células T e Natural Killer (NK) / Maria Aparecida Lima da Silva. -- 2012.

92 f.

Orientadora: Lúcia Mariano da Rocha Silla.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Imunoterapia Celular. 2. Hipóxia. 3. Células NK. 4. Células T. I. Silla, Lúcia Mariano da Rocha, orient. II. Título.

*Ao meu pai Andris Luis da Silva (in memoriam)  
e ao meu irmão Flávio Luis da Silva (in memoriam)  
amores que estarão sempre presentes em meu coração...*

## **AGRADECIMENTOS**

Será difícil exprimir a beleza que foi esse movimento de energias e impulsos que foram chegando ao longo dessa caminhada. Destaca-se, ainda, a formação de uma rede de solidariedade e de muito, muito afeto!

Para maior percepção desse sentido, devo contar que não foi uma caminhada breve, mas uma travessia que parecia sem fim, principalmente pelas intercorrências pessoais, de toda ordem, que me atropelaram. Esses percalços, longe de obscurecerem o trajeto, aumentaram-lhe o brilho. E, ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força.

A conclusão desse trabalho só foi possível porque fui alimentada pelo carinho dos amigos e pelo do amor da minha família.

Quero agradecer a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, aliviaram as dores da caminhada, auxiliando-me a chegar até aqui:

À grande Força do Universo por me oportunizar e conduzir ao crescimento;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, professores, colegas e funcionários pela oportunidade e incentivo;

À Profa Dra Lúcia Mariano da Rocha Silla, minha orientadora, pela amizade, carinho, apoio, confiança, por acreditar no meu trabalho e pelas diversas oportunidades ao longo desses 10 anos;

A Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - e ao Centro de Terapia Celular do Rio Grande do Sul, pelo incentivo financeiro na forma de bolsa de estudo através da parceira Capes/UT;

Ao Prof. Dr. Laurence J. N. Cooper e Helen Huls do Laboratório de Imunologia do MDAnderson Cancer Center, pela paciência com a minha dificuldade de adaptação, pelos ensinamentos e apoio na realização deste trabalho;

A todos os amigos de Houston que, de um jeito ou de outro, ajudaram a aliviar as saudades de casa;

Às minhas queridas amigas Dra. Claudia Astigarraga e Lia Timming Brasil pelo carinho e apoio durante a minha estada em Houston;

À Associação dos Amigos da Hematologia do HCPA, pelos recursos financeiros concedidos;

Aos meus colegas da ETS-HCPA pelo carinho e pela torcida;

Aos meus queridos amigos Edison e Edina pelas orações e energizações positivas;

À minha mamãe, D<sup>a</sup> Engracia, que é o grande tesouro da nossa família;

Aos meus irmãos: Isa, Vera, Sônia, Beto; cunhados, cunhada e sobrinhos que estiveram o tempo todo ao meu lado, mesmo quando uma grande distância nos separava;

E o meu agradecimento especial à minha irmã Noêmia, que sempre me apoiou, mas nesses últimos meses tem me carregado no colo...

*“Conheça todas as teorias,  
domine todas as técnicas,  
mas ao tocar uma alma humana,  
seja apenas outra alma humana.”*

*Carl G. Jung*

## RESUMO

Infusões de células T e células NK (Natural Killer) de sangue periférico estão sendo realizadas para tratamento de malignidades. Os linfócitos propagados *ex vivo*, em normóxia (20% O<sub>2</sub>), são intravenosamente infundidos e precisam sobreviver a hipóxia associada a circulação venosa, da medula óssea (5% O<sub>2</sub>) e do microambiente tumoral (1% O<sub>2</sub>). O objetivo principal deste estudo foi determinar a capacidade proliferativa das células humanas T e NK em normóxia (20% O<sub>2</sub>) versus hipóxia (1% O<sub>2</sub>), por 28 dias, utilizando uma célula apresentadora de antígeno artificial (aAPC) para propagação em grau clínico. As células T expostas a hipóxia cresceram 100 vezes menos que as células T cultivadas em normóxia, enquanto que houve uma diminuição de 1000 vezes na taxa proliferativa das células NK hipóxicas, que exibiram um aumento na apoptose bem como um prejuízo na citotoxicidade. Hipóxia também induziu uma diminuição na expressão dos receptores KIR, NCR e NKG2D das células NK. Nesta mesma condição, a produção de IL-2 e IFN $\gamma$  nas células T estavam diminuídas, sendo que nas células NK esse efeito foi mais acentuado. Hipóxia aumentou a expressão de genes relacionados com apoptose, angiogênese e metabolismo glicolítico, os quais estavam moderadamente aumentados nas células T, mas profundamente super-regulados nas células NK. Os níveis de ATP nas células T foram muito similares em ambas as condições de oxigênio, mas intensamente diminuídos nas células NK cultivadas em hipóxia. Também se observou, que a expressão do miR-210 induzido por hipóxia, estava super regulada nas células NK hipóxicas correlacionando com



a perda da expressão da molécula NCAM/CD56. Em conjunto, os resultados deste estudo demonstram um maior impacto da hipóxia sobre as atividades proliferativas e citotóxicas das células NK estimuladas por aAPCs. Estudos adicionais são necessários para o entendimento do impacto deste comportamento das células NK em condições hipóxicas sobre a imunoterapia celular adotiva.

**Palavras-Chave:** hipóxia, células T, células NK, imunoterapia adotiva

## ABSTRACT

Infusions of T cells and natural killer (NK) cells from peripheral blood (PB) are being undertaken for the treatment of malignancies. Lymphocytes are propagated *ex vivo* in normoxia (20% O<sub>2</sub>) and intravenously infused and must survive hypoxia associated with venous blood and bone marrow (5% O<sub>2</sub>), and the tumor environment (1% O<sub>2</sub>). The objective this study was to determine the ability of T and NK cells to proliferate under normoxia (20% O<sub>2</sub>) versus hypoxia (1% O<sub>2</sub>) over 28 days using an artificial antigen presenting cells (aAPC) to propagate clinical-grade lymphocytes. T cells continuously exposed to 4 weeks of hypoxia grew at a rate of 100-fold less than T cells cultured in normoxia while the proliferative rate of NK cells lagged by 1,000-fold, behind normoxic conditions. Hypoxic cultured NK cells exhibit an increase in apoptosis as well as a correspondent impairment in cytotoxicity. In low oxygen tension the expression of KIR, NCR, and NKG2D receptors were decreased in NK cells. In hypoxia, the production of IL-2 and IFN $\gamma$  were decreased in T cell and more so in NK cell. Chronic hypoxia increased the expression of related apoptosis, glycolytic metabolism and angiogenesis genes which were moderately increased in T cells but profoundly upregulated in NK cells. ATP levels in T cell were very similar in both oxygen conditions, but profoundly diminished in NK cells under hypoxia. We also noted that hypoxia inducible miR-210 levels are up regulated in hypoxic NK cells correlating with loss of CD56 expression. Taken together, this data show that a greater impact of hypoxia on proliferative and cytotoxic activity of NK cells activated by

artificial antigen-presenting cells. More studies are needed to understand the impact of this behavior on the cell adoptive immunotherapy.

**Keywords:** hypoxia, T cells, NK cells, adoptive immunotherapy

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais famílias de receptores das células NK .....	26
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ativação das células NK .....	25
Figura 2.	Receptores das células NK e seus ligantes .....	27
Figura 3.	Subpopulações das células NK .....	28
Figura 4.	Regulação do fator de transcrição HIF 1 $\alpha$ .....	32
Figura 5.	Modelo de proteção das células tumorais mediada por hipóxia .....	42
Figura 6.	Processos celulares modulados pelo mir-210 .....	46
Figura 7.	As três principais isoformas da molécula NCAM .....	48

## ARTIGO EM INGLÊS

Figura 1.	Schematic of manufacturing process .....	83
Figura 2A.	Kinetics of expansion of polyclonal T cells and NK cells grown in hypoxic and normoxic condition .....	84
Figura 2B	The percentage comparison between CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> and CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>-</sup> cells in normoxia and hypoxia measured by flow cytometry at Days 0 and 28	84
Figura 2C	The percentage comparison between CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> and CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> cells in normoxia and hypoxia measured by flow cytometry at Days 0 and 28.	85
Figura 2D	Percentage of apoptotic cells in NK cells culture measured by Propidium Iodide (PI) and Annexin V-FITC determined by flow cytometry at Days 0 and 28 for both conditions.	85
Figura 2E	NK cells expanded under normoxia and hypoxia condition were stained with NKG2D, KIR and NCR antibodies and analyzed by flow cytometry at Days 0 as a control and 28	86
Figura 3.	Functional assays .....	87
Figura 4.	Gene Expression profile analysis .....	88
Figura 5.	Mitochondria enumeration, cellular ATP content and VEGF-ELISA .	89
Figura 5C	VEGF levels.....	89
Figura 6.	mir-210 and NCAM/CD56 expression .....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>aAPC</b>	Célula Apresentadora de Antígeno Artificial
<b>AcetilCoA</b>	Acetil coenzima A
<b>ADCC</b>	Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (Citotoxicidade Celular Mediada por Anticorpo)
<b>ADP</b>	Difosfato de Adenosina
<b>AICD</b>	<i>Activation-induced cell death</i> (Morte Celular Induzida por Ativação)
<b>ARNT</b>	Translocador Nuclear do Receptor Aril
<b>A2AR</b>	Receptor de Adenosina A2A
<b>A2BR</b>	Receptor de Adenosina A2B
<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina
<b>CAR</b>	Receptor Quimérico de Antígeno
<b>CD</b>	Agrupamento de Diferenciação
<b>cDNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
<b>Con A</b>	Concanavalina A
<b>Cr</b>	Cromo
<b>CTL</b>	Linfócito T Citotóxico
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

<b>ROS</b>	Espécies Oxigênio Reativas
<b>EPO</b>	Eritropoetina
<b>FADH</b>	Hidrogenio Dinucleotideo de Flavina e Adenina
<b>FITC</b>	Isotiocianato de Fluoresceina
<b>FDA</b>	Food Drug Administration
<b>GMP</b>	Boas Práticas de Manufatura
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Fator induzido por hipóxia 1 alfa
<b>HRE</b>	Elementos responsivos a hipóxia
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IMF</b>	Intensidade média de fluorescência
<b>PI</b>	Iodeto de propídeo
<b>KIR</b>	Killer immunoglobulin-like receptor
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex
<b>mIL-15</b>	Interleucina-15 ligada a membrana
<b>mIL-21</b>	Interleucina-21 ligada a membrana
<b>miRNA</b>	Micro ácido ribonucleico
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>NADH</b>	Hidrogênio dinucleotideo de nicotinamida adenina
<b>NCAM</b>	Molécula de adesão das células neurais

<b>NCR</b>	Receptor de citotoxicidade natural
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangue periférico
<b>PDH</b>	Piruvato desidrogenase
<b>PHD</b>	Protil Hidroxilase de Domínio 2
<b>PDK1</b>	Piruvato desidrogenase quinase 1
<b>TCA</b>	Ciclo dos ácidos tricarboxílico
<b>TCR</b>	Receptor de célula T
<b>Th</b>	Célula T helper - auxiliar
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral alfa
<b>VEGFA</b>	Fator de crescimento vascular endotelial A
<b>VHL</b>	Von Hippel Lindau



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1 Imunoterapia Celular Adotiva</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2 Uma Visão Geral do Sistema Imune</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3 O Paradoxo Hellstrom</b> .....	<b>29</b>
<b>2.4 Mecanismos Mediadores de Adaptação Celular à Hipóxia</b> .....	<b>31</b>
<b>2.5 Hipóxia e Metabolismo Energético</b> .....	<b>34</b>
<b>2.6 Espécies Oxigênio Reativas (<i>reactive oxygen species</i> – ROS)</b> .....	<b>38</b>
<b>2.7 Hipóxia e Apoptose</b> .....	<b>39</b>
<b>2.8 Impacto da Hipóxia sobre as Células Imunes</b> .....	<b>41</b>
<b>2.9 Micro-RNAs e Hipóxia</b> .....	<b>45</b>
<b>2.10 Moléculas de Adesão das Células Neurais</b> .....	<b>47</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>50</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>52</b>
<b>4.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>52</b>
<b>4.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>52</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>6. ARTIGO EM INGLÊS</b> .....	<b>62</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>90</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Imunoterapia adotiva tem sido considerada uma terapia promissora para pacientes com certos tipos de neoplasias. Esta abordagem terapêutica consiste na estimulação e expansão *ex vivo* das células imunes T ou NK (Natural Killer), autólogas ou alogênicas, seguidas pela infusão em pacientes (1). A transferência adotiva de células T, geneticamente modificadas, é uma modalidade terapêutica interessante para aumento da especificidade e consequente resposta imune antitumoral (2,3,4) e, a possibilidade das células NK autólogas ou alogênicas serem também utilizadas como uma modalidade terapêutica efetiva para a destruição de tumores sólidos tem sido considerada há muito tempo (5,6,7). Um importante aspecto das células NK é que sua capacidade de lisar as células alvo pode ser potencializada por citocinas como interferon gama (IFN-gama) e interleucina 2 (IL-2). Contudo, apesar da atividade citotóxica das células NK contra linhagens de células tumorais *in vitro* estar razoavelmente bem estabelecida, os atuais protocolos imunoestimuladores para tratamento de tumores sólidos *in vivo*, não são completamente satisfatórios. Devido a sua capacidade de lise não restrita ao MHC (Principal Complexo de Histocompatibilidade), as células NK também proporcionam um modelo experimental útil para imunoterapia adotiva (7). Entretanto, o estabelecimento desta modalidade terapêutica é dificultado pelo pequeno número de células NK que pode ser obtido do sangue periférico e pelas dificuldades associadas à produção em larga escala de células NK citolíticas de acordo com as Boas Práticas de Manufatura (GMP-

Good Manufacturing Practices) (5). Para atingir e manter um efeito terapêutico, os linfócitos propagados *ex vivo*, em normóxia e infundidos intravenosamente, precisam de mecanismos para adaptação a hipóxia associada à circulação venosa, à medula óssea e ao microambiente tumoral, todos em diferentes tensões de oxigênio.

As células imunes T ou NK utilizadas na imunoterapia adotiva precisam ainda superar desafios importantes para exercerem as suas funções efetoras, incluindo a adaptação ao microambiente tumoral imunossupressivo que pode dificultar o papel antitumoral destas células, acentuando a resistência das células tumorais (7,8,9). Entre os muitos fatores que contribuem para o estabelecimento de um ambiente imunossupressivo está a hipóxia. O entendimento do impacto do microambiente hipóxico sobre a biologia das células imunes T e NK, poderá contribuir para o sucesso da imunoterapia adotiva na eliminação do tumor.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 IMUNOTERAPIA CELULAR ADOTIVA

Apesar de múltiplas abordagens terapêuticas e prevenção, o câncer permanece sendo a principal causa de morte no mundo todo. Terapias convencionais visando células em divisão, como a quimioterapia e a radioterapia, também podem afetar as células normais e frequentemente falham na prevenção da disseminação da metástase da doença. Portanto, a imunoterapia adotiva é uma modalidade alternativa de tratamento que tenta aproveitar a especificidade do sistema imune para impedir a propagação do tumor sem prejudicar as células normais. Estratégias imunoterapêuticas baseadas na transferência celular adotiva envolvem a estimulação e expansão *ex vivo* de células T antitumorais ou células NK, autólogas ou alogênicas, que são, então, infundidas no paciente, muitas vezes com fatores de crescimento adequados para estimular a sobrevivência e expansão *in vivo* (10,11).

Progressos significativos no entendimento das bases moleculares da resposta imune ao câncer, bem como dos mecanismos básicos da imunologia celular, têm proporcionado novas oportunidades para o desenvolvimento de uma terapia efetiva para pacientes com câncer (12).

Atualmente, a efetividade da imunoterapia para o tratamento de câncer em humanos ainda é limitada. A recente habilidade de modificar os linfócitos geneticamente tem aberto possibilidades para a criação *in vitro* de linfócitos com propriedades

terapêuticas apropriadas. Receptores de célula T de alta afinidade podem ser introduzidos nos linfócitos normais dos pacientes e a administração destas células tem demonstrado ser capaz de mediar a regressão do câncer (10,13,14,15). Um dos principais obstáculos em estudos clínicos com transferência adotiva de células imunes são o pequeno número que pode ser obtido do sangue periférico e as dificuldades associadas à produção em larga escala de células imunes citolíticas de acordo com as Boas Práticas de Manufatura (GMP-Good Manufacturing Practices) (5,16).

Para superar as dificuldades na obtenção de quantidades suficientes de células imunes para a transferência adotiva, vários grupos têm desenvolvido estratégias baseadas no uso de células apresentadoras de antígenos artificiais para a expansão e enriquecimento de células T e células NK. A linhagem de célula leucêmica K562, MHC classe I negativa, tem sido utilizada como uma plataforma para o desenvolvimento de uma célula apresentadora de antígeno artificial, através da transfecção de moléculas co-estimuladoras, como por exemplo, 4-1BBL, um membro da família do fator de necrose tumoral (TNF). A ligação do 4-1BBL com o seu receptor 4-1BB, leva a diminuição da apoptose, aumento da expansão e produção de IL-2, dessa forma contribuindo para um crescimento celular sustentado (17, 18).

Trabalhos recentes demonstraram que os sinais que as células T recebem das células apresentadoras de antígenos (APC) durante e após seu encontro inicial com os antígenos tumorais podem influenciar sua programação e subsequente eficácia terapêutica (7). A incapacidade para regular com exatidão os sinais e interações fornecidos pela APC tem estimulado o interesse no uso das células apresentadoras de antígenos artificiais (aAPC) para fornecer maior controle sobre a sinalização da célula T e facilitar a eficiente

geração de células T efetivas para a imunoterapia adotiva (15,19). Citocinas como IL-2, IL-15 e IL-21 são importantes na ativação, maturação e proliferação das células NK. Denmann et al., 2012 relatam o uso de uma célula K562 apresentadora de antígeno artificial geneticamente modificada para expressar IL-21 ligada à membrana, promovendo uma proliferação sustentada e evitando a necessidade de produção de citocinas, além da IL-2, para uso em grau clínico. Para os autores, o potencial de expansão aumentado proporcionado pela IL-21, ligada à membrana, eliminaria a necessidade de aférese do doador, uma vez que células suficientes podem ser obtidas de uma única punção venosa para uso em ensaios clínicos. Permitiria ainda, a criopreservação e testes para liberação de um único lote de alíquotas para múltiplas infusões (18).

## **2.2 UMA VISÃO GERAL DO SISTEMA IMUNE**

A resposta imune a agentes infecciosos ou danosos é comumente categorizada em inata ou adaptativa. A resposta imune inata envolve tanto moléculas solúveis como moléculas associadas à superfície que reconhecem um finito conjunto de padrões associados com dano tecidual e certos patógenos. Uma marca da imunidade inata é que, repetida exposição ao mesmo antígeno, não altera substancialmente a natureza da resposta subsequente. Contrariamente, a resposta imune adaptativa a um antígeno encontrado previamente, é qualitativamente e/ou quantitativamente acentuada comparada ao primeiro encontro. Além disso, a versatilidade da resposta adaptativa é quase ilimitada em relação à diversidade do antígeno (20). Embora o sistema imune adaptativo forneça

uma imunidade específica e duradoura, a primeira linha de defesa contra patógenos é o sistema imune inato (21).

Os linfócitos são células que reconhecem e respondem especificamente a antígenos estranhos sendo, portanto, considerados os mediadores da imunidade humoral e celular. Existem populações distintas de linfócitos que diferem na sua função e na forma como reconhecem antígenos. Os linfócitos B são as únicas células capazes de produzir anticorpos. Eles reconhecem antígeno extracelular e se diferenciam em células plasmáticas secretoras de anticorpos, funcionando desta maneira como mediadores da imunidade humoral. As células T, mediadoras da imunidade celular, reconhecem antígenos de micróbios intracelulares e funcionam destruindo-os ou as células por eles infectadas. As células T não produzem anticorpos, mas o seu receptor de antígeno é uma molécula de membrana estruturalmente relacionada aos anticorpos. As células T têm uma especificidade restrita para antígenos, elas reconhecem apenas antígenos peptídicos ligados a proteínas hospedeiras que são codificadas por genes do MHC e que são expressas na superfície de outras células. As classes diferentes de linfócitos podem ser distinguidas pela expressão de proteínas de superfície denominadas CD (Cluster Differentiation). As células T consistem de populações funcionalmente distintas, as células T helper (Th)  $CD4^+$  e as citotóxicas (CTLs)  $CD8^+$ . Em resposta a uma estimulação antigênica, as células Th secretam proteínas chamadas citocinas, cujas funções são: estimular a sua própria proliferação e diferenciação, ativar outras células, incluindo as células B, macrófagos e outros leucócitos. As CTLs matam as células que produzem antígenos estranhos, tais como as células infectadas por vírus e as células tumorais. Alguns linfócitos T, que são chamados células T regulatórias, exercem suas funções,

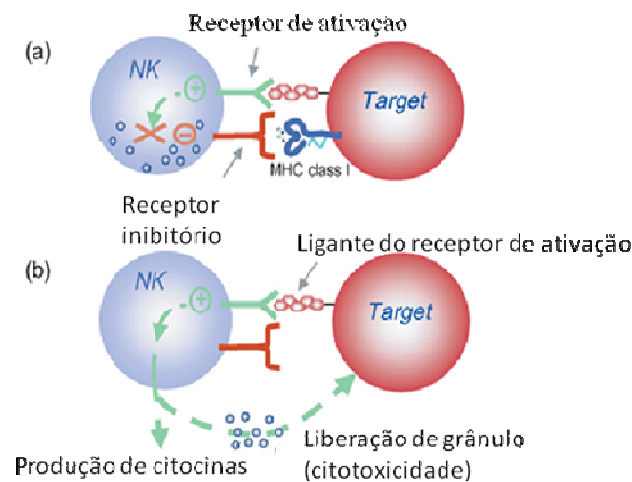
principalmente, inibindo a resposta imune. Uma terceira classe de linfócitos, as células natural killer (NK), estão envolvidos na imunidade inata contra células infectadas por vírus e células tumorais. O início e desenvolvimento da resposta imune adaptativa requer que antígenos sejam capturados e apresentados a linfócitos específicos. As células que realizam esta função são chamadas Células Apresentadoras de Antígenos (APCs). As APCs mais especializadas são as células dendríticas, sendo que outros tipos celulares também podem exercer este papel como, por exemplo, o macrófago (22,23).

As células natural killer (NK) são grandes linfócitos granulares da imunidade inata com funções efetoras tais como citotoxicidade dependente de perforina e secreção de IFN-gama. Estas células correspondem entre 10-15% de todos os linfócitos do sangue periférico, sendo as células NK maduras definidas fenotipicamente pela expressão da molécula CD56 (uma isoforma da molécula de adesão da célula neural) e a ausência de expressão da molécula CD3. Funcionalmente, as células NK são importantes fontes de citocinas imunorreguladoras e estão implicadas no controle inicial da infecção viral e na imunovigilância tumoral (21, 24, 25). Além disso, as células NK têm a habilidade de lisar diretamente as células alvo, bem como mediar a *Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity* (ADCC) através da ligação de receptores de membrana à porção Fc do anticorpo IgG, FcγRIII (CD16), expresso na maioria destas células (25).

Células NK maduras expressam uma ampla variedade de receptores de superfície que as capacitam para reconhecer alvos que expressem baixas ou nenhuma molécula MHC classe I, ou altas quantidades de moléculas de superfície induzidas por estresse ou moléculas microbianas (24). A ligação entre o MHC classe I próprio e os receptores inibitórios da célula NK evita que as mesmas lisem as células normais. Cada célula NK



expressa seu próprio repertório de receptores de ativação e inibição, e a citotoxicidade é regulada pelo equilíbrio entre os sinais desses receptores que interagem com o MHC classe I ou moléculas semelhantes ao MHC classe I presentes na superfície das células alvo (Fig. 1) (21, 25, 26,).



**Figura 1. A ativação das células NK.** (a) Receptores inibitórios da célula NK reconhece o MHC classe I próprio e reprime a ativação da célula NK (b) Quando livre dos receptores inibitórios a ligação dos receptores de ativação das células NK aos seus ligantes sobre as células alvo resulta na estimulação das células NK. Na ausência ou na baixa expressão do MHC classe I sobre as células alvo, estes sinais estimulatórios não são suprimidos resultando na resposta da célula NK incluindo produção de citocina e liberação de grânulo levando a citotoxicidade. As células matam quando a inibição MHC classe I está ausente. (Adaptado de French e Yokoyama. *Arthritis Res Ther* 2004; 6:8)

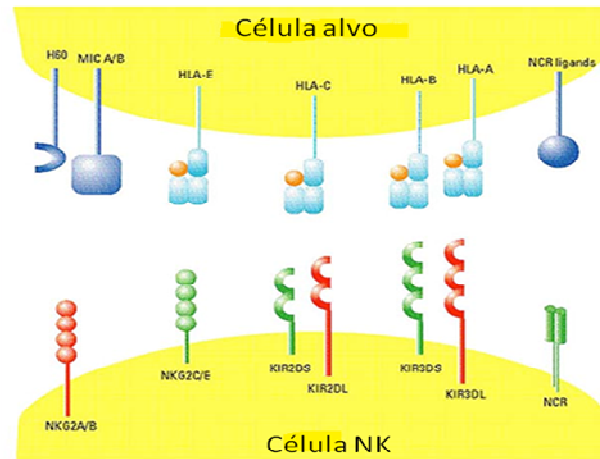
Três superfamílias principais de receptores de células NK foram descritas (Tabela 1): a superfamília *killer immunoglobulin-like receptor* (KIR) que reconhece moléculas clássicas de MHC classe I; a superfamília de receptores semelhantes à lectina do tipo C que reconhece moléculas HLA classe I não clássicas e moléculas semelhantes à classe I;

os receptores de citotoxicidade natural (NCR) cujos ligantes permanecem pobremente definidos (Fig.2) (25).

**Tabela 1. Principais famílias de receptores de células NK**

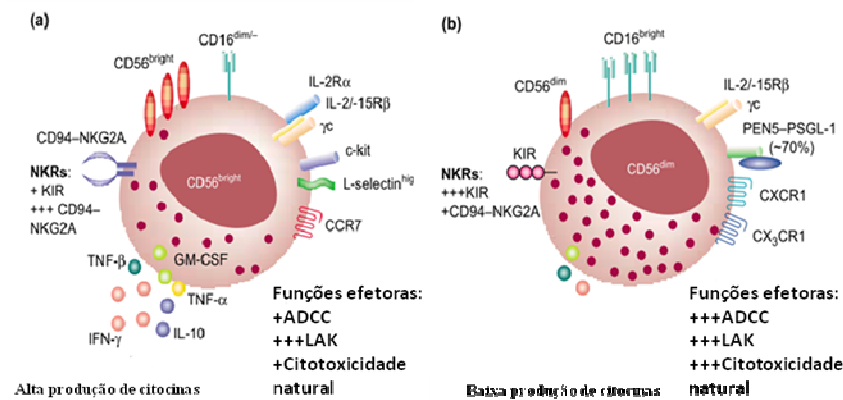
Família de receptores	Membros	Ligante(s)	Tipo de sinal
Semelhantes à lectina tipo C	CD94/NKG2A/B	HLA-E	inibidor
	CD94NKG2C	HLA-E	ativador
	CD94/NKG2E/H	Ainda não foram identificados	ativador
	NKG2D	MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 e ULBP3	ativador
Receptores de citotoxicidade natural (NCR)	NKp46	Ainda não foram 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

Adaptado de Almeida-Cliveira A e Diamond HR. Revista Brasileira de Cancerologia 2008; 54(3): 297-305.



**Figura 2. Receptores das células NK e seus ligantes.** A figura mostra as três principais classes de receptores e seus respectivos ligantes sobre uma célula alvo. Os receptores inibitórios estão representados em vermelho e os receptores de ativação estão representados em verde. (Adaptado de Alter e Altfeld. IAVI Report 2006;10:3)

As células NK são heterogêneas em relação ao seu fenótipo, função e distribuição anatômica. Em humanos, foram identificadas e bem caracterizadas duas subpopulações de células NK que diferem na densidade da expressão da molécula CD56. Aproximadamente, 10% das células NK humanas expressam CD56 de alta ( $CD56^{\text{bright}}$ ) e CD16 de baixa densidade ( $CD16^{\text{dim}}$ ), sendo encontradas principalmente em órgãos linfoides e tecidos. Estas células apresentam baixa expressão de KIR, são pouco citolíticas, mas proliferam vigorosamente após interação com células dendríticas ativadas. Contrariamente, 90% das células NK são  $CD56^{\text{dim}}$  e tem altos níveis de CD16, sendo mais efetivas para intermediar a ADCC. Elas predominam no sangue periférico, expressando altos níveis de moléculas KIR e apresentam uma potente função citolítica (Fig.3) (24,25).



**Figura 3. Subpopulações das células NK humanas.** (a) Células NK CD56<sup>bright</sup> produzem altos níveis de citocinas, expressam CD16 de baixa densidade, exibem baixa citotoxicidade natural e citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC), mas potente atividade de morte ativada por linfoquina (LAK). (b) Células NK CD56<sup>dim</sup> produzem baixos níveis de citocinas, são potentes mediadores de ADCC, atividade LAK e citotoxicidade natural, tem uma morfologia mais granular que as células NK CD56<sup>bright</sup>. (Adaptado de Cooper MA et al. TRENDS in Immunology 2001;22:11)

O significado destas expressões diferenciais dos receptores de células NK pelas suas subpopulações não está completamente esclarecido, mas provavelmente, contribui para as propriedades funcionais dessas células (25).

A capacidade das células NK de lisar células tumorais sem a necessidade de sensibilização prévia ou reconhecimento de antígenos tumor-específicos, fazem delas células efetoras interessantes para estratégias imunes no tratamento do câncer, sendo que estudos clínicos tem reforçado a importância antitumoral dessas células na imunoterapia (25,26). Células NK intratumoral tem sido identificadas em carcinoma colorretal, gástrico, em câncer de células escamosas de pulmão e, em geral, pacientes cujos tumores têm os mais altos níveis de células NK apresentam uma melhor

sobrevivência (27). A interleucina 15 (IL-15) desempenha um papel importante para a sobrevivência, proliferação e ativação das células NK (21, 25,27).

### 2.3 O PARADOXO HELLSTROM

Ao longo de mais de três décadas, tem surgido muitas especulações para tentar explicar a coexistência de células tumorais com células imunes potencialmente antitumorais, tanto em pacientes como em camundongos, como foi demonstrado por Hellstrom em 1966 - o Paradoxo Hellstrom (28,29). A efetividade da imunoterapia adotiva utilizando células T é limitada por vários mecanismos imunes de escape do tumor (29), dentre eles, a baixa persistência das células imunes transferidas para o receptor (30). Resultados promissores têm sido obtidos em vários modelos animais utilizando esta abordagem, mas raramente tem se alcançado um efeito antitumor persistente em pacientes com câncer (31-34). É possível, que as células imunes cultivadas *in vitro*, não estejam programadas para se adaptar a um microambiente muito diferente *in vivo*. Devido às respostas clínicas limitadas nas atuais estratégias imunoterapêuticas, existe a necessidade de aperfeiçoar modelos para estudar a imunoterapia mediada por células imunes para tratamento de pacientes com câncer (30).

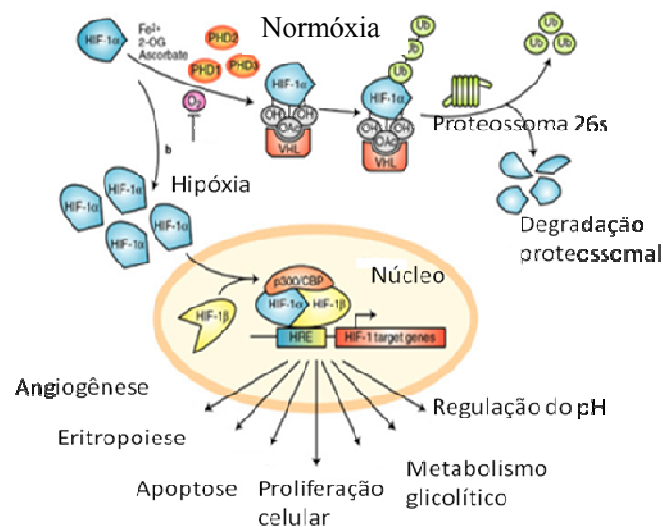
Por que as células T citotóxicas falham na sua tarefa de destruir tumores *in vivo*, mesmo quando retêm a habilidade (*in vitro*), para o reconhecimento de tumores sólidos e mesmo quando altos números de células T antitumor, altamente líticas, são infundidos em pacientes com câncer? (12) O que existe no microambiente tumoral *in vivo*, que impede a destruição do tumor por células T CD8+ tumor específicas, altamente líticas e com

atividade antitumoral *in vitro*? (29) Entre as várias possibilidades levantadas para responder estas questões, está a imunossupressão do microambiente tumoral (8). Dentre os fatores que contribuem para imunossupressão do microambiente estão: baixo pH, baixos níveis de nutrientes e baixa tensão de oxigênio. Nichos hipóxicos são encontrados em condições fisiologicamente normais, bem como em tecidos inflamados e neoplásicos (8,35,36). Essas áreas hipóxicas resultam quando o suprimento de oxigênio da corrente sanguínea é insuficiente para corresponder à demanda celular nos tecidos. No entanto, no baço e linfonodos de camundongos normais, a tensão média de oxigênio está abaixo de 5% (36). No corpo humano, as células imunes, ao circularem pelos diversos compartimentos, encontram diferenças significativas nas tensões de oxigênio, variando de 14% no sangue arterial a 5-6% ou até menos, no interstício tecidual (37) e < 5% nos linfonodos (38). Células tumorais também emergem nestes compartimentos, no entanto, a rápida proliferação faz com que o centro desses tumores se encontre em condições de hipóxia severa ou até mesmo anóxica. Estudos têm demonstrado que a hipóxia tumoral não apenas influencia o nicho tumoral (regulação do pH, angiogênese) como a produção local de ligantes/fatores de crescimento, modificando a capacidade metastática, e uma variedade de funções celulares como a instabilidade genética, imortalização e apoptose. (36-42). Estudos recentes demonstraram que hipóxia aumenta o potencial antiapoptótico em células tumorais pela regulação das moléculas envolvidas nas vias de sinalização de apoptose (39,42). Esses efeitos da hipóxia severa conferem às células tumorais resistência para várias terapias facilitando a sua sobrevivência (39,43,44,45). Dessa forma, a resposta da célula tumoral à hipóxia é importante para a progressão do tumor e para a terapia antitumoral.

## 2.4 MECANISMOS MEDIADORES DE ADAPTAÇÃO CELULAR À HIPÓXIA

A resposta celular para adaptação à hipóxia é mediada pela ativação e inibição da expressão de diferentes genes dependentes de oxigênio para suprir as necessidades angiogênicas, energéticas e proliferativas. Os fatores de transcrição primariamente responsáveis por mediar as respostas adaptativas a hipóxia são os fatores induzidos por hipóxia (HIFs). Os HIFs são membros de uma família de proteínas que se ligam a sequências de DNA (hypoxia regulated elements- HREs) nos promotores de genes alvos (46). Os HIFs são fatores de transcrição heterodiméricos composto pelas subunidades  $\alpha$  (HIF- $\alpha$ ) e  $\beta$  (HIF- $\beta$ ) [ou Aryl Hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)] (47-52) que ativam a expressão de pelo menos 150 genes codificantes de proteínas que regulam o metabolismo celular, sobrevivência, motilidade, integridade da membrana basal, angiogênese, hematopoiese e outras funções (46). A subunidade HIF- $\beta$  é constitutivamente expressa enquanto que a expressão da subunidade HIF- $\alpha$  é dependente da concentração de oxigênio. A regulação da atividade do HIF é mediada primariamente através da estabilidade da subunidade  $\alpha$ . Em condições aeróbicas (>8–10%), HIF- $\alpha$  é sintetizado e submetido à hidroxilação dependente de oxigênio sobre o resíduo de prolina 402 e/ou 564 em seu altamente conservado domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD), pela proteína de domínio prolil hidroxilase 2 (PHD2), que usa o oxigênio e  $\alpha$ -cetoglutarato como substrato e contém  $\text{Fe}^{2+}$  em seu centro catalítico. Essa modificação cria uma interface para interação do HIF- $\alpha$  hidroxilado com a proteína supressora de tumor von

Hippel–Lindau (VHL), que recruta uma proteína ligase ubiquitina E3 que cataliza a poli ubiquitinação do HIF- $\alpha$  direcionando-o para uma rápida degradação proteossomal (50-52). Quando os níveis de oxigênio diminuem abaixo de 8-10%, as reações de hidroxilação são inibidas, e as proteínas HIF- $\alpha$  tornam-se estabilizadas, acumulando-se rapidamente e dimerizando-se com a subunidade constitutiva HIF- $\beta$ , recrutando os co-ativadores p300/CBP. O heterodímero é então, deslocado para o núcleo, ligando-se especificamente a elementos responsivos a hipóxia (HREs) controlando a transcrição de vários genes que são fundamentais para o funcionamento celular em baixas tensões de oxigênio (49-52) como, por exemplo, o VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) e a EPO (erythropoietin) ( Fig. 4).



**Figura 4. Regulação do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$ .** Em condições aeróbicas, HIF-1 $\alpha$  é submetido à hidroxilação dependente de oxigênio sobre o resíduo de prolina 402 e/ou 564 pela proteína de domínio prolil hidroxilase 2 (PHD2). Essa modificação cria uma interface para interação do HIF-1 $\alpha$  hidroxilado com a proteína supressora de tumor von Hippel–Lindau (VHL), que recruta uma proteína ligase ubiquitina E3 que cataliza a poli ubiquitinação do HIF-1 $\alpha$  direcionando-o para uma rápida degradação proteossomal. Em hipóxia, as reações de hidroxilação são inibidas, e HIF-1 $\alpha$  acumula-se rapidamente dimerizando-se com a subunidade constitutiva HIF-1 $\beta$ , recrutando os co-ativadores p300/CBP. O heterodímero é então, deslocado para o núcleo, ligando-se especificamente a elementos responsivos a hipóxia (HREs) controlando a transcrição de vários genes que são fundamentais para o funcionamento celular em baixas tensões de oxigênio. (Adaptado de Tyagi MG et al. World Journal of Science and Technology 2011; 1(11): 17-22.



Existem duas subunidades  $\alpha$ , referidas como HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$ , que compartilham um alto grau de sequencias identificadoras, ressaltado pela habilidade de heterodimerizar-se com HIF- $\beta$  (formando HIF-1 ou HIF-2) e de ligar-se aos HRE, para ativar a transcrição de comuns, bem como a genes alvos específicos para cada HIF (53). Considerando que HIF-1 $\alpha$  é expressa de uma forma aparentemente ubíqua, a expressão de HIF-2 $\alpha$  é restrita a tipos celulares particulares, incluindo células do endotélio vascular, derivados de células da crista neural, pneumócitos pulmonar tipo II, parênquima hepático e células intersticiais dos rins (54). Experimentos em camundongos *knockout* demonstraram que todas as subunidades testadas são essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência embrionária. A falta de habilidade para organizar uma resposta transcricional apropriada para a hipóxia fisiológica em embriões deficientes de HIF resultou em um retardo no desenvolvimento e morte. Os fenótipos específicos, observados em embriões mutantes, diferem dependendo de qual subunidade está mutada, mas alterações na sobrevivência celular, diferenciação e angiogênese têm sido relatadas em camundongos onde faltam a subunidade  $\beta$ , HIF-1 $\alpha$ , ou HIF-2 $\alpha$  (55).

O suprimento vascular altamente desorganizado de tumores sólidos produz regiões tipicamente de hipóxia severa ou anóxia estreitamente adjacentes a áreas bem oxigenadas (56). Acredita-se que a conseqüente estabilização de proteínas HIF em células tumorais hipóxicas promova a progressão do tumor, em grande parte pela expressão localizada de genes alvos específicos que codificam (VEGF), enzimas glicolíticas,

transportadores de glicose, proteínas reguladoras de motilidade e metástases, entre outras (57).

Além disso, HIF-1 pode ainda desempenhar as suas atividades regulatórias diminuindo, indiretamente, a expressão de mRNA através da repressão da regulação transcricional e micro RNAs (52).

## **2.5 HIPÓXIA E METABOLISMO ENERGÉTICO**

Como referido acima, as células imunes não podem evitar os microambientes tissulares hipóxicos e anóxicos para executarem a sua função de imunovigilância. Portanto, essas células necessitam de energia suficiente para manter a integridade celular, o metabolismo basal e funções imunes específicas, tais como, produção de citocinas, proliferação e funções efetoras (58). Sendo assim, as células precisam de um mecanismo de adaptação metabólico que permita a elas gerar energia para sobreviverem em condições deficientes de oxigênio e serem capazes de executarem funções citotóxicas. Entre estas adaptações metabólicas está a transição da produção de energia celular de um processo de fosforilação oxidativa, oxigênio dependente, para glicólise anaeróbica regulada pelo HIF-1 $\alpha$  (59).

Em condições aeróbicas, a fonte de energia celular é a glicólise acoplada à fosforilação oxidativa, processo esse conhecido por respiração celular. O processo de glicólise consiste na conversão da glicose em piruvato. A enzima piruvato desidrogenase (PDH) converte o piruvato em acetil-CoA, que é oxidada a CO<sub>2</sub> no ciclo dos ácidos

tricarboxílicos (TCA), também chamado ciclo de Krebs, dentro da mitocôndria, com transferência de elétrons para o dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADH) e dinucleotídeo de flavina adenina (FADH<sub>2</sub>). O NADH e o FADH<sub>2</sub> são, então, reoxidados nos complexos mitocondriais I e II, respectivamente, da cadeia transportadora de elétrons. O fluxo destes elétrons pelos complexos III e IV está associado à transferência de H<sup>+</sup> e consequente formação do gradiente eletroquímico (60). O oxigênio é o acceptor final dos elétrons transferidos ao longo da cadeia respiratória formando água. O gradiente de H<sup>+</sup> acoplado ao transporte de elétrons gera uma força próton motriz permitindo a síntese de ATP pela ação da ATP sintetase (52,59,61).

Quando o fornecimento de oxigênio é insuficiente, ocorre a glicólise anaeróbica, onde o piruvato é convertido em lactato pela enzima lactato desidrogenase (LDH). Isso ocorre porque a enzima piruvato quinase inativa a PDH, direcionando o piruvato para a formação de lactato. Para cada molécula de glicose convertida a lactato, apenas duas moléculas de ATP são geradas na glicólise anaeróbica (59).

Em condições aeróbicas, durante a respiração celular, o rendimento total de energia de uma molécula de glicose é de 30-38 moléculas de ATP, das quais só duas destas moléculas de ATP vêm da glicólise (59). Mesmo que a glicólise anaeróbica seja muito menos eficaz que a respiração celular, há muito se sabe que as células tumorais não usam a fosforilação oxidativa, mas mantêm um metabolismo aumentado de glicose para a produção de lactato levando a altas taxas deste composto, mesmo em condições aeróbicas, sendo esse processo conhecido por efeito Warburg (59,62). Esse fenômeno, descrito por Otto Warburg em 1924, é uma das questões fundamentais da bioquímica de tumores ainda não totalmente entendida. Inúmeras investigações em uma variedade de

células tumorais confirmaram a alta taxa de produção de lactato a partir da glicose, apesar da presença de oxigênio e mitocôndria. No entanto, a *glicólise anaeróbica em presença de oxigênio* não é uma característica única de células tumorais porque também é encontrada em células não transformadas, em proliferação, quando glicose e oxigênio suficientes estão disponíveis. Ainda não está claro porque as células tumorais e algumas células normais em proliferação atendem sua acentuada necessidade de energia através da glicólise anaeróbica mesmo que esta via seja menos efetiva para produção de ATP do que a fosforilação oxidativa (63).

Linfócitos em repouso têm baixas necessidades energéticas, no entanto, a maior parte do seu ATP deriva da fosforilação oxidativa, paradoxalmente quando ativados retiram sua energia preferencialmente pela super-regulação da glicólise anaeróbica (58).

Na verdade, as células imunes podem utilizar com sucesso a glicólise anaeróbica como fonte de energia, tendo sido demonstrado que os leucócitos dependem deste tipo de metabolismo energético como sua principal estratégia de síntese de ATP (64-65). Além disso, tanto em normóxia como em hipóxia, as células mieloides preferem mais a glicólise anaeróbica a fosforilação oxidativa (66), enquanto as células T que em repouso utilizam a fosforilação oxidativa podem mudar para glicólise anaeróbica após a ativação ou em baixas condições de oxigênio (67).

Há muito tempo se sabe que os leucócitos polimorfonucleares são células primariamente glicolíticas com poucas mitocôndrias e produzem pouca energia através da fosforilação oxidativa. Acredita-se que o metabolismo, predominantemente glicolítico, garanta que essas células possam exercer suas funções em baixa tensão de oxigênio ou até mesmo em anóxia, associados com lesões inflamatórias profundas (68).

Dziurlo *et al.*, 2010 (58) demonstraram que a hipóxia acentua a atividade glicolítica em células T CD4<sup>+</sup> de sangue periférico quando ativadas e comparadas às em normóxia, resultando em um aumento significativo da taxa de glicólise anaeróbica, como demonstrado pela diminuição da glicose e subsequente aumento dos níveis de lactato no meio de cultivo. Neste estudo, também foi detectada uma clara indução do principal regulador da resposta celular adaptativa a hipóxia, o HIF-1 $\alpha$  nas células humanas CD4<sup>+</sup> em condições hipóxicas. Os autores concluíram que as células T CD4<sup>+</sup> são altamente adaptativas em termos energéticos e que isto garante seu funcionamento apropriado, como por exemplo, produção de citocinas, mesmo em disponibilidade reduzidas de oxigênio como encontrado em condições fisiológicas e patofisiológicas (58).

HIF-1 $\alpha$  induz enzimas glicolíticas que aumentam a produção de energia quando as mitocôndrias estão privadas de oxigênio como um substrato para a fosforilação oxidativa. Papandreou *et al.*, 2006 (69), verificaram que HIF-1 $\alpha$  também regula ativamente a demanda de oxigênio nos tecidos pela inibição do metabolismo do piruvato para acetilCoA no ciclo do TCA. Condições hipóxicas ativam a enzima PDK1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase) reduzindo, assim, a atividade do principal consumidor celular de oxigênio, a mitocôndria. PDK1 é uma proteína responsiva a hipóxia, regulando, ativamente, as funções da mitocôndria pela redução da entrada do piruvato no ciclo TCA (69). Em células de carcinoma renal, a perda de função da proteína supressora de tumor VHL aumenta a atividade do HIF-1 que contribui para a redução do metabolismo mitocondrial e da respiração celular (62).

Estudos prévios têm demonstrado que hipóxia induz apoptose através de uma via mitocondrial envolvendo a liberação do citocromo c e subsequente ativação de caspase.

Nestes estudos, o suprimento de glicose ou a superexpressão dos transportadores de glicose, inibiram a liberação do citocromo c e evitaram a apoptose em miócitos cardíacos e em uma linhagem celular de músculo vascular liso (70).

## **2.6 ESPÉCIES OXIGÊNIO REATIVAS (*reactive oxygen species* - ROS)**

Para as células se adaptarem a condições hipóxicas, elas devem ser capazes de detectar mudanças no oxigênio e responder adequadamente. Os mecanismos, pelos quais as células detectam mudanças nos níveis de oxigênio e iniciam a estabilização da proteína HIF-1 $\alpha$ , não estão completamente entendidos (71-73). Quatro mecanismos de detecção de tensão de oxigênio têm sido propostos como mediadores da resposta transcricional em hipóxia. Dois desses modelos postulam o envolvimento de uma unidade contendo ferro na forma de um grupo heme ou um cluster ferro/sulfúrico que sofre uma mudança na atividade durante hipóxia desencadeando a resposta transcricional (74). Dois outros modelos envolvem a geração de ROS pela NADPH ou pela mitocôndria, desencadeando a resposta transcricional à hipóxia (74). A geração de ROS resulta em sua entrada no citosol e leva à estabilização do HIF-1 $\alpha$  (71, 74,75,76). Na verdade, ainda não está claro como os oxidantes mitocondriais participam da detecção de oxigênio e a literatura sugere que mais estudos precisam ser realizados para elucidar o mecanismo básico deste processo (71).

Dziurla *et al.*, 2010 demonstraram em seu estudo que a morte celular de células T foi dramaticamente atenuada pela exposição das células a hipóxia, e os autores sugerem a participação de ROS neste evento (58).

## 2.7 HIPÓXIA E APOPTOSE

Apoptose e necrose são dois tipos fundamentais de morte celular com diferentes aspectos morfológicos. Apoptose é caracterizada pela geração de núcleo fragmentado com cromatina altamente condensada, protrusão do citoplasma e formação de corpos apoptóticos. Necrose é definida pelo citoplasma brilhante, aumento da mitocôndria e aparente núcleo intacto. A morte celular apoptótica geralmente ocorre de uma forma fortemente regulada e a necrose tem sido considerada um fenômeno degenerativo passivo, induzido por lesões químicas ou físicas. Os resultados do tratamento com hipóxia de uma linhagem celular de ratos induziu tanto necrose como apoptose (77). Os dados dos autores sugerem que hipóxia ativa a via apoptótica concomitante com a via necrótica, embora não esteja claro o que determina um modo ou outro.

Hipóxia e reoxigenação são causas bem conhecidas de lesão e morte celular em vários tipos celulares. Com o passar dos anos, tem se tornado claro que hipóxia e reoxigenação podem desencadear morte celular apoptótica bem como necrose em muitos tipos celulares. Em células Jurkat, uma linhagem celular linfoblástica, hipóxia desencadeou duas vias apoptóticas distintas: uma via apoptótica mitocondrial, envolvendo a liberação do citocromo c e a ativação da caspase 9, regulada pela captação e metabolismo da glicose e outra via pela ligação dos receptores de morte celular ao seus ligantes apropriados (70).

Hipóxia pode induzir a apoptose por causar a hiperpermeabilidade da membrana mitocondrial interna que leva à liberação do citocromo c. A mais direta indução de apoptose, causada por hipóxia, é a inibição da cadeia de transporte de elétrons na

membrana interna da mitocôndria. Além da privação de energia, a geração de ROS e, conseqüente, estabilização do HIF-1 $\alpha$ , pode resultar em apoptose por dois mecanismos, dentre os quais, a superexpressão da proteína pró apoptótica BNIP3. O promotor do gene BNIP3 contém um HRE para que HIF-1 $\alpha$  possa induzir a expressão desse gene. Como já ressaltado, o HIF-1 $\alpha$  não só induz, mas também pode evitar a apoptose embora o mecanismo exato deste equilíbrio ainda não tenha sido completamente compreendido (78).

Um processo apoptótico denominado *activation-induced cell death* (AICD), desencadeado por repetidas exposições a um antígeno através do complexo TCR/CD3, parece ser um mecanismo para eliminação de células T ativadas. Makino *et al.*, 2003 descreveram que AICD de células T de sangue periférico, desencadeada pela ligação TCR/CD3, foi suprimida em condições hipóxicas pela expressão do HIF-1 $\alpha$ , que controla a viabilidade das células T ativadas, pelo receptor de antígeno, participando da manutenção das células T no microambiente hipóxico, nesse contexto, o HIF-1 $\alpha$  desempenha uma função anti apoptótica (37).

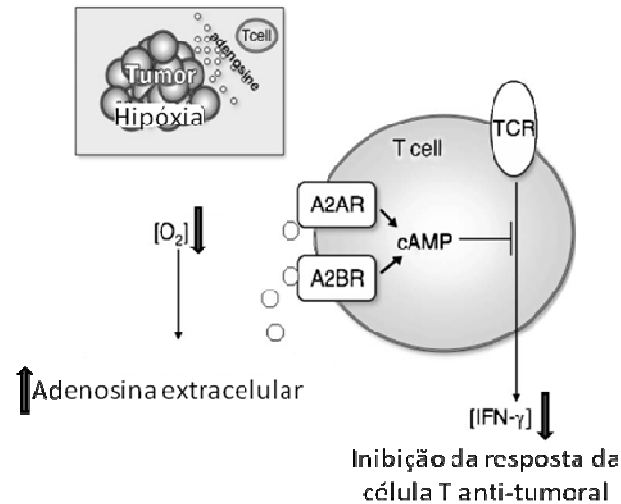
Estudos demonstram que a hipóxia aumenta o potencial anti apoptótico nas células tumorais pela regulação de moléculas envolvidas nas vias de sinalização de apoptose (40, 41). Esses efeitos da hipóxia conferem resistência para várias terapias, facilitando a sobrevivência das células tumorais. Sendo assim, as respostas da célula tumoral a hipóxia são importantes para a progressão do tumor e terapia antitumoral (39).



## 2.8 IMPACTO DA HIPÓXIA SOBRE AS CÉLULAS IMUNES

Nos últimos anos, tem crescido as tentativas de esclarecer o impacto do microambiente tumoral imunossupressivo sobre as funções das células imunes. Como já referido, as células T estão expostas a diferentes níveis de tensão de oxigênio uma vez que se diferenciam, maturam, migram e exercem suas funções efetoras em diferentes microambientes tissulares (49). Estudos prévios têm demonstrado que a ativação, função e sobrevivência das células T são profundamente afetadas pelos baixos níveis de oxigênio (37,38). Para autores como Lukashev *et al.*, 2007 (8), um dos obstáculos para o sucesso da imunoterapia adotiva pode ser a inibição das células T antitumorais por células T supressoras “passageiras” e/ou citocinas anti inflamatórias. Foi demonstrado que, a adenosina extracelular produzida pelo microambiente tecidual e por tumores hipóxicos, pode impedir a destruição destes últimos pelas células T antitumorais, através da atividade do receptor de adenosina A2A, nelas expresso. Os receptores de adenosina são conhecidos por serem imunossupressores. As células T CD8+, incluindo as células T CD8+ tumor específicas, expressam predominantemente os receptores A2AR e A2BR (Fig. 5) (8,29). Os autores sugerem que, junto ao receptor de adenosina A2AR, HIF-1 $\alpha$  pode representar parte do mecanismo anti-inflamatório que atenua a resposta da célula T. Isto pode também indicar que, enquanto a via mediada por hipóxia/HIF-1 $\alpha$  e A2AR desempenha papel importante na proteção de tecidos normais, os tumores também podem se utilizar desse mecanismo para escape do sistema imune (49,80). Portanto, é de se esperar que as células imunes, infiltradas em tumores sólidos hipóxicos, encontrem altas

concentrações de adenosina imunossupressiva além de um ambiente hipóxico desfavorável.



**Figura 5. Modelo de proteção das células tumorais mediada por hipóxia.** A adenosina extracelular produzida pelo microambiente tecidual e reforçada pela contribuição da adenosina produzida por tumores hipóxicos, podem impedir a destruição das células tumorais pelas células T antitumor através da atividade do receptor de adenosina A2A expresso nas células T. (Adaptado de Lukashev D et al. Purinergic Signalling (2007) 3:129 – 134)

Células T ativadas apresentam uma expressão do HIF-1 $\alpha$  aumentada o que, por sua vez, fornece um importante sinal de sobrevivência para as células T impedindo a morte celular induzida por ativação em contextos hipóxicos (37).

Em um estudo, foi comparada a proliferação de células T obtidas de sangue periférico em resposta a diferentes estimuladores para culturas em normóxia (oxigênio atmosférico - 20%) e em dois níveis mais baixos de oxigênio (5% e 10%). Os autores encontraram que a resposta proliferativa para o mitógeno Con A (Concanavalin A) foi significativamente maior a 20% do que a 5% e 10% e a resposta ao mitógeno PHA

(Fitohemaglutinina) foi minimamente afetada (81). Além disso, os autores demonstraram que a proliferação dos linfócitos a partir das células mononucleares de sangue periférico, em resposta a ligação entre os receptores de células T, CD3/CD28 e de moléculas ativadoras do linfócito T quando em presença de células apresentadoras de antígenos, foi significativamente maior em normóxia do que em hipóxia (5% e 10% de oxigênio). Os autores também descrevem que em todas as condições diferentes de estimulação, a comparação entre os números de células T CD4+ com os números de células T CD8+ indicou que essas últimas proliferaram mais e sobreviveram melhor em todas as condições de oxigênio do que as células T CD4+ (81).

Em outro estudo, demonstrou-se que embora em menor número que as células TCD4+, as células T CD8+ que proliferaram sob hipóxia tiveram uma maior capacidade lítica (36). Em um modelo murino, por outro lado, Neumann *et al.*, 2005 (38) demonstraram que a estabilização do HIF-1 $\alpha$  em hipóxia regula negativamente a sinalização de Ca<sup>2+</sup> da ligação do receptor de célula T (TCR). Além disso, hipóxia pode também regular negativamente a expressão funcional de Kv1.3 (canais de potássio dependente de voltagem) nas células T. A inibição dos canais Kv1.3 induz a despolarização da membrana e a supressão da ativação das células T (82).

Embora existam poucas investigações a respeito do efeito da hipóxia sobre as células NK, Fink *et al.*, 2003 (7), reportaram que a citotoxicidade da célula NK contra células alvo K562 e células tumorais do fígado está diminuída sob condições de hipóxia e baixo pH, sendo esses o marco da quimioresistência dos tumores sólidos. Em outro estudo, Loeffler *et al.*, 1991 (83) observaram uma grave redução na lise das células alvo quando a reação de citotoxicidade ocorreu combinada com alta acidez (pH 6.7), baixa glicose e

baixa concentração de oxigênio (1%) e que condições anóxicas são deletérias para a atividade das células NK. É possível que existam outros fatores envolvidos nesta imunomodulação, como por exemplo, citocinas anti-inflamatórias. Citocinas são proteínas regulatórias bem conhecidas por suas ações pleiotrópicas incluindo vários efeitos sobre as células imunes. Um aspecto importante das citocinas é a sua capacidade para estimular ou inibir a produção de outras citocinas, a proliferação de células T e outros tipos celulares. A hipóxia local pode controlar a liberação de citocinas que são fisiologicamente relevantes para este contexto. Uma mudança na expressão de uma citocina específica no microambiente pode ser relevante no controle da proliferação das células imunes (84). Os efeitos da produção de citocinas em ambientes hipóxicos não estão claros. Dziurla *et al.*, 2010 (58) investigaram a secreção de citocinas induzidas pela ativação para avaliar a funcionalidade das células T CD4+ de sangue periférico em condições hipóxicas e observaram que a disponibilidade reduzida de oxigênio acentuou a secreção das interleucinas IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-1 $\beta$ , mas diminuiu a secreção de TNF- $\alpha$  (58). Caldwell *et al.*, 2001 encontraram uma inibição na secreção de IL-2 e IFN- $\gamma$  (36) sob a condição de hipóxia, enquanto para Roman *et al.*, 2010 a inibição ocorre para secreção de IL-4 e IFN- $\gamma$  na mesma condição (85). Os mecanismos pelos quais as células imunes respondem e se adaptam a hipóxia, ainda são muito pouco compreendidos (82, 86).

Uma resposta imune bem sucedida frente a um antígeno depende de uma rápida mobilização e expansão de células T da circulação periférica. Subsequentemente, à medida que os antígenos são eliminados, as células T acumuladas precisam desaparecer para evitar uma resposta exacerbada e nociva ou mesmo para a preservação da

homeostase dentro do compartimento das células T. Makino *et al.*, 2003 demonstraram que esse processo é suprimido em um ambiente hipóxico (37).

## 2.9 MICRO-RNAs E HIPÓXIA

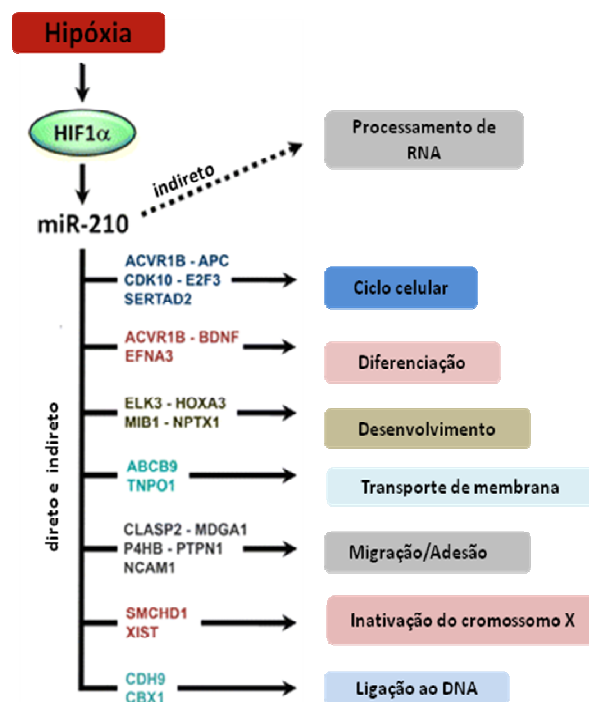
Micro RNAs (mirRNAs) são moléculas de RNA (~21-23 nucleotídeos) não codificantes que regulam genes e, aparentemente, o genoma como um todo. Essa regulação pode ocorrer em importantes níveis de função incluindo estrutura da cromatina, segregação cromossômica, transcrição, processamento de RNA, estabilidade e tradução do RNA mensageiro alvo (87-89). MicroRNAs maduros são carregados dentro de um complexo indutor de silenciamento de RNA e, de uma maneira geral, promovem a inibição translacional do mRNA alvo (88-89), embora alguns exemplos opostos já tenham sido descritos. Os mecanismos das interações entre miRNA-mRNA são bastante complexos e ainda estão sendo investigados (88).

Dados resultantes de estudos demonstram que hipóxia deixa uma marca específica sobre os perfis de micro-RNA em uma variedade de tipos celulares, com uma importante contribuição do HIF-1 $\alpha$  (90).

MicroRNAs tem estado implicados na regulação de ambas vias de sinalização upstream e downstream do HIF-1 $\alpha$  e, dentre os vários miRNAs regulados por hipóxia, o miR-210 é o mais consistentemente e robustamente induzido, estando envolvido em funções relacionadas a diferenciação, regulação do ciclo celular, anti-apoptose, entre outras (88-90). O miR-210 é regulado por HIF-1 $\alpha$  que liga-se diretamente ao elemento responsivo a hipóxia no promotor proximal deste microRNA, super regulando-o (88-89).

Em um estudo envolvendo queratinócitos, a estabilização do HIF-1 $\alpha$  induziu a expressão do miR-210 que por sua vez comprometeu a proliferação celular (91).

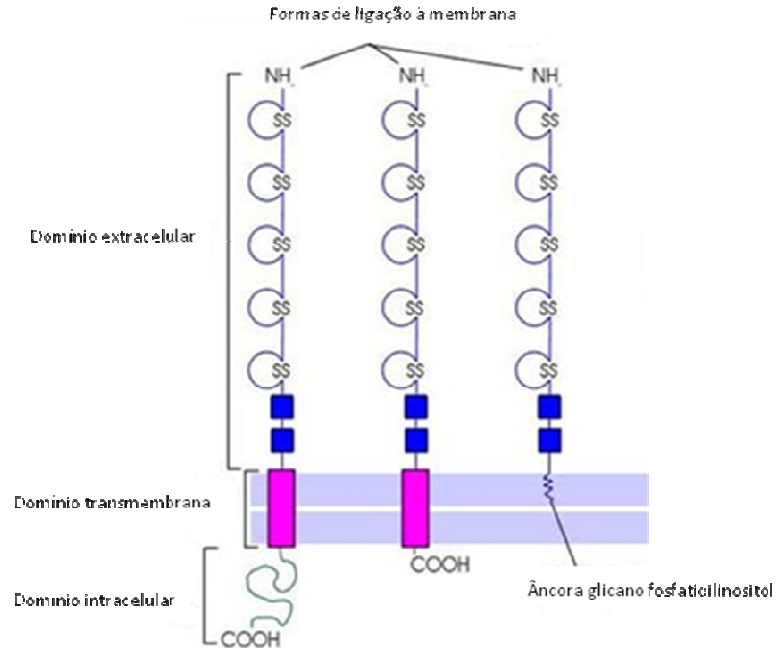
Estudos sobre alvos potenciais do miR-210 tem demonstrado que direta ou indiretamente a molécula NCAM/CD56, amplamente utilizada como marcador da célula NK, é afetada pelo miR-210, envolvendo dessa forma a adesão celular (Fig. 6) (88). Além disso, análises por sequenciamento revelam que o miR-210 pode ligar-se a 3'UTR (Untranslated Regions) do mRNA NCAM/CD56, direcionando-o para degradação.



**Figura 6. Processos celulares modulados pelo miR-210.** miR-210 é induzido por hipóxia através do HIF1 $\alpha$ . O diagrama resume os processos celulares afetados diretamente e indiretamente pelo miR-210. (Adaptado Fasanaro P et al. J. Biol. Chem. 2009;284:35134-35143)

## **2.10 MOLÉCULAS DE ADESÃO DAS CÉLULAS NEURAIS (NCAM)**

A molécula de adesão das células neurais (NCAM) é uma glicoproteína de membrana expressa no estágio inicial do fechamento do tubo neural e parece estar envolvida nos processos morfogênicos durante o desenvolvimento do sistema nervoso tais como, proliferação celular, migração, diferenciação, sobrevivência, neuritogênese e sinaptogênese (92-93). As moléculas NCAM estão ainda envolvidas nas interações das células neurais, incluindo a formação do contato sináptico e a modulação da atividade sináptica (94). O gene que codifica a molécula NCAM está localizado no cromossomo 11q23.1 pertencendo a uma superfamília de imunoglobulina (Ig) de moléculas de adesão celular. Três principais isoformas da NCAM (180,140,120) surgem do processamento do transcrito de RNA a partir de uma única cópia do gene, através de splicing alternativos e poliadenilação diferencial. As duas principais isoformas da NCAM, as de 180 e 140 kDa são proteínas transmembrana, já a isoforma 120-kDa falta o domínio citoplasmático e transmembrana estando a molécula ancorada à membrana através de uma ligação glicano fosfatidilinositol (Fig. 7) (95-98). Os sinais da NCAM são traduzidos pela acentuação do contato célula-célula promovendo a adesão por mecanismos de ligação homofílica entre moléculas NCAM e heterofílica com heparan sulfato (93, 96, 97).



**Figura 7. Três principais isoformas da NCAM.** As três principais isoformas da molécula NCAM surgem do processamento do transcrito de RNA a partir de uma única cópia do gene, através de splicing alternativos e poliadenilação diferencial. As duas principais isoformas da NCAM de 180 e 140 kDa são proteínas transmembrana, enquanto que na isoforma 120-kDa, falta o domínio intracelular e transmembrana estando a molécula ancorada à membrana através de uma ligação glicano fosfatidilinositol. (Adaptado de <http://www.erin.utoronto.ca/~w3bio315/lecture5.htm>)

Pouco é conhecido sobre a função da molécula CD56 que é amplamente utilizada como um marcador representativo para identificar células NK, assim como sobre o ligante para esta molécula que permanece elusivo. O maior conhecimento existente é sobre a molécula de adesão da célula neural (NCAM), cuja uma das isoformas é a molécula CD56, também conhecida por Leu-19 e NKH1. Análises bioquímicas realizadas por Lanier *et al.*, 1989 demonstraram que as células NK expressam exclusivamente a isoforma transmembrana de NCAM de 140kDa idêntica aquela presente nos tecidos neurais (98) e que esta molécula também se encontra expressa em uma subpopulação de células T



(Células NKT) (93,96,98,99). O Ácido Polisiálico compreende até um terço da massa dessa molécula e esse conteúdo é regulável. A remoção do ácido polisiálico aumenta a função adesiva da molécula NCAM (98,100). A ativação da célula NK leva a expressão de NCAM/CD56 com baixos níveis de ácido polisiálico contribuindo para o aumento da adesão celular e a ação da célula efetora sobre a célula alvo (96). No entanto, o papel da NCAM/CD56 expressa pelas células NK ainda é controverso.

### 3. JUSTIFICATIVA

Imunoterapia adotiva tem sido considerada uma terapia eficaz para pacientes com certos tipos de câncer. Esta abordagem terapêutica envolve a estimulação e expansão *ex vivo* de células T ou NK autólogas ou alogênicas e sua infusão em pacientes (1). O uso das células imunes na imunoterapia celular tem enfrentado desafios significativos, incluindo um microambiente tumoral imunossupressivo que parece proteger o tumor da destruição pelas células T e células NK, favorecendo a células tumorais (7,8,9). Rosenberg SA, 2008 (11) demonstrou que a imunossupressão, particularmente a supressão de linfócitos do receptor, imediatamente antes da infusão de células imunes ativadas, é essencial para a efetividade da terapia, dessa forma, impulsionado o ressurgimento da imunoterapia adotiva. O impacto da baixa tensão de oxigênio sobre as características e funções das células NK ainda não é bem conhecido, bem como suas possíveis implicações no sucesso da terapia celular.

Estratégias recentes tem se baseado na ativação e expansão das células T e células NK, estimuladas por células apresentadoras de antígenos artificiais. O uso de aAPCs permite a propagação de células T e NK de acordo com as boas práticas de manufatura, em números clinicamente significativos a partir de uma única punção venosa, bem como minimiza a dependência de citocinas de fontes externas que não preenchem os critérios GMP. No presente estudo, foi avaliado o impacto da hipóxia sobre a proliferação, sobrevivência e funções efetoras das células T e células NK estimuladas por células

apresentadoras de antígenos artificiais. Também foram estudados aspectos da produção de energia, expressão gênica, imunofenotipagem e atividade anti-tumoral, que interessam ao campo da imunoterapia adotiva.

## **4.OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

O presente estudo teve o objetivo principal de analisar a capacidade funcional (proliferativa e citotóxica) das células T e células NK derivadas de sangue periférico de indivíduos normais, em normóxia (20% O<sub>2</sub>) e hipóxia (1% O<sub>2</sub>), utilizando uma tecnologia de expansão *ex vivo* baseada no uso de células apresentadoras de antígeno artificiais (aAPC) que apresentam moléculas co-estimulatórias e interleucinas associadas à membrana, para estimulação e propagação de linfócitos em grau clínico.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Entre os objetivos específicos, este estudo pretendeu:

- a. Comparar a proliferação das células T e NK em normóxia (20% O<sub>2</sub>) e hipóxia (1% O<sub>2</sub>);
- b. Avaliar a expressão de genes relacionados a apoptose, angiogênese e metabolismo glicolítico em células T e NK cultivadas em normóxia e hipóxia;
- c. Comparar o metabolismo energético das células T e NK expandidas em normóxia e hipóxia;

- d. Analisar a capacidade funcional das células T e NK cultivadas em normóxia e hipóxia;
- e. Avaliar a influência do miR-210 sobre a expressão da molécula NCAM/CD56 nas células NK.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

1. Paulos CM, Suhoski MM, Plesa G, Jiang T, Basu S, Golovina TN et al. Adoptive immunotherapy: good habits instilled at youth have long-term benefits. *Immunol Res* 2008; 42: 182-196.
2. Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* 2010; 116(20):4099-4102.
3. Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ et al. Reprogramming CD19-specific T cells with IL-21 signaling can improve adoptive immunotherapy of B-Lineage Malignancies. *Cancer Res* 2011; 71(10): 1 – 12.
4. Davies JK, Singh H, Huls H et al. Combining CD19 redirection and alloanergization to generate tumor-specific human T cells for allogeneic cell therapy of B-cell malignancies. *Cancer Res* 2010; 70(10): 3915–3924.
5. Voskens CJ, Watanabe R, Rollins S et al. Ex-vivo expanded human NK cells express activating receptors that mediate cytotoxicity of allogeneic and autologous cancer cell lines by direct recognition and antibody directed cellular cytotoxicity. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2010, 29(134): 1-13.
6. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. 2005; 105:3051-3057.
7. Fink T, Ebbesen P, Koppelhus U, Zachar V. Natural Killer cell-mediated basal and interferon-enhanced cytotoxicity against liver cancer cells is significantly impaired under *in vivo* oxygen conditions. *Scandinavian Journal of Immunology* 2003; 58: 607-612.
8. Lukashev D, Ohta A, Sitkovsky M. Hypoxia-dependent anti-inflammatory pathways in protection of cancerous tissues. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 273-279.
9. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D et al. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res* 2011; 71(16):5412-5422.
10. Al-Khami AA, Mehrotra S, Nishimura MI. Adoptive immunotherapy of cancer. *Self/Nonsel* 2011, 2(2):80-84.

11. Rosenberg SA, Restifo N, Yang JC et al. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2008, 8(4):299-308.
12. Rosenberg SA. Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *Journal of Internal Medicine* 2001, 250:462-475.
13. Rosenberg SA. Overcoming obstacles to the effective immunotherapy of human cancer. *PNAS* 2008, 105(35):12643-12644.
14. Davies JK, Singh H, Huls H. et al. Combining CD19 redirection and alloanergization to generate tumor-specific human T cells for allogeneic cell therapy of B-cell malignancies. *Cancer Res* 2010, 70(10): 3915-3924.
15. Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ et al. Reprogramming CD19-specific T cells with IL-21 signaling can improve adoptive immunotherapy of B-lineage malignancies. *Cancer Res* 2011, 71(10): 3516-3527.
16. Sutlu T, Alici E. Natural Killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J. Intern Med* 2009, 266(2): 154-181.
17. Oelke M, Krueger C, Schneck JP. Technological advances in adoptive immunotherapy. *Drugs of Today* 2005, 41(1): 13-21.
18. Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS et al. Membrane-Bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS ONE* 2012, 7; 1;1-13.
19. Turtle CJ, Ridell SR. Artificial antigen presenting cells for use in adoptive immunotherapy. *Cancer J* 2010, 16(4): 374-381.
20. O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL et al. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nature Immunology* 2006; 7(5): 507-516.
21. Cooper MA, Elliot JM, Keyel PA et al. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *PNAS* 2009; 106(6):1915-1919.
22. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 6a Edição/2007. Ed. Saunders/Elsevier.
23. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4a Edição/2002. Ed. Garland Science.
24. Chiossone L, Chaix J, Fuseri N et al. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* 2009; 113(22): 5488-5496.
25. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Reviews* 2006; 20: 123-137.
26. Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A et al. Natural Killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2005; 81: 13-17.

27. Wu Z, Xu Y. IL-15R $\alpha$ -IgG1 – Fc Enhances IL-2 and IL-15 anti-tumor action through NK and CD8<sup>+</sup> T cells proliferation and activation. *Journal of Molecular Cell Biology* 2010; 2: 217-222.
28. Hellstrom I, Hellstrom KE, Pierce GE et al. Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasm. *Nature*, 1968; 220: 1352-1354.
29. Lukashev D, Sitkovsky M, Ohta Akio. From “Hellstrom Paradox” to anti-adenosinergic cancer immunotherapy. *Purinergic Signalling*, 2007; 3: 129-134.
30. Bai A, Higham E, Eisen HN et al. Rapid tolerization of virus-activated tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells in prostate tumors of TRAMP mice. *PNAS* 2008, 105(35):13003-13008.
31. Allison JP, Hurwitz AA, Leach DR. Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T-cell responses. *Curr Opin Immunol*, 1995; 7(5):682–686.
32. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004; 10(9):909–915.
33. Spiotto MT, Yu P, Rowley DA et al. Increasing tumor antigen expression overcomes “ignorance” to solid tumors via cross presentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity* 2002; 17:737–747.
34. Bai XF, et al. Local co stimulation reinvigorates tumor-specific cytolytic T lymphocytes for experimental therapy in mice with large tumor burdens. *J Immunol* 2001; 167(7):3936–3943.
35. Kim H, Peng G, Hicks JM et al. Engineering human tumor-specific cytotoxic T cells to function in a hypoxic environment. *Molecular Therapy* 2008; 16: 599-606.
36. Caldwell CC, Kojima H, Lukashev D. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. *The Journal of Immunology* 2001; 167: 6140-6149.
37. Makino Y, Nakamura H, Ikeda E et al. Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T cells. *The Journal of Immunology*, 2003; 171: 6534-6540.
38. Neumann AK, Yang J, Biju MP et al. Hypoxia inducible factor 1  $\alpha$  regulates T cell receptor signal transduction. *PNAS* 2005; 47: 17071-17076.
39. Kim M, Park SY, Pai HS et al. Hypoxia inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by blocking Bax translocation. *Cancer Research* 2004;64 (15), 4078–4081.
40. Harris AL. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:38–47.
41. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:8104–8109.



42. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, et al. Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; 394:485–90.
43. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 2001; 18(4):243–259.
44. Teicher BA. Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 1994; 13:139–168.
45. Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrón CM et al. Tumour hypoxia, chemo-therapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev* 2003; 29:297–307.
46. Keith B, Simon CM, Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* 2007; 129(3): 465-472.
47. Liao D, Corle C, Seagroves TN et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res* 2007; 67: 563-572.
48. Noman MZ, Buart S, Pelt JV et al. The cooperative induction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and STAT3 during hypoxia induced an impairment of tumor susceptibility to CTL-mediated cell lysis. *The Journal of Immunology* 2009; 182: 3510-3521.
49. Lukashev D, Klebanov B, Kojima H et al. Cutting edge: hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and its activation-inducible short isoform I.1 negatively regulate functions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *The Journal of Immunology* 2006; 177: 4962-4965.
50. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology* 2009; 24:97-106.
51. Semenza GL. Defining the role of hypoxia inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 2010; 29; 625-634.
52. Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis and disease. *The New England Journal of Medicine* 2011; 365; 537-547.
53. Raval RR, Lau KW, Tran MG. et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* 2005, 25: 5675-5686.
54. Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 2003, 17: 271-273.
55. Ramirez-Bergeron DL, Simon MC. Hypoxia-inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system. *Stem Cells* 2001, 19: 279-286.
56. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signaling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006, 441: 436-443.

57. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003, 3:721-732.
58. Dziurla R, Gaber T, Fangradt M et al. Effects of hypoxia and/or lack of glucose on cellular energy metabolism and cytokine production in stimulated human CD4 + T lymphocytes. *Immunology Letters* 2010, 131: 97–105.
59. Sitkovsky M, & Lukashev D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1alpha and adenosine receptors. *Nature Reviews Immunology* 2005, 5: 712 – 721.
60. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger – Princípios de Bioquímica*, 2006 4ª Edição. Editora Salvier.
61. Nouette-Gaulian K, Malgat M, Rocher C et al. Time course of differential mitochondrial energy metabolism adaptation to chronic hypoxia in right and left ventricles. *Cardiovascular Research* 2005; 66: 132-140.
62. Zhang H, Gao P, Fukuda R et al. HIF-1 Inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell*, 2007; 11: 407-420.
63. Brand KA, Hermfisse U. Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J* 1997; 11: 388-395.
64. McKeehan W L. Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. *Cell Biol Int Rep* 1982, 6: 635 – 650.
65. Levene PA, Meyer GM. The action of leukocytes on glucose. *Journal of Biological Chemistry* 1912, 11: 361 – 370.
66. Borregaard N, Herlin T. Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *Journal of Clinical Investigation* 1982, 70: 550 – 557.
67. Rathmell JC, Vander Heiden M G, Harris M H et al. In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Molecular Cell* 2000, 6: 683 – 692.
68. Kominsky DJ, Campbell EL, Colgan SP. Metabolic shifts in immunity and inflammation. *The Journal of Immunology* 2010, 184: 4062–4068.
69. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L et al. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism* 2006; 3: 187-197.
70. Malhotra R, Lin Z, Vincenz C et al. Hypoxia induces apoptosis via two independent pathways in Jurkat cells: differential regulation by glucose. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: 1596-1603.
71. Chandel NS, Schumacker PT. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol* 2000; 88: 1880-1889.

72. Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function and disease. *Genes & Development* 2004; 18: 2183-2194.
73. Klimova T, Chandel NS. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death and Differentiation* 2008; 15: 660-666.
74. Chandel NS, Maltep E, Goldwasser E et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1998; 55: 11715-11720.
75. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol* 2006; 91(5): 807-819.
76. Bell EL, Klimova TA, Eisenbart J et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-inducible factor-dependent extension of the replicative life span during hypoxia. *Mol Cell Biol* 2007; 27(16): 5737-5745.
77. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W et al. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub>. *Cancer Research* 1996; 56: 2161-2166.
78. Greijer AE, Wall ED. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*, 2004; 57: 1009-1014.
79. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ et al. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: Molecular mechanisms and functional significance. *Advances in Immunology* 2000; 74: 181 – 273.
80. Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ et al. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103: 13132 – 13137.
81. Atkuri KR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Culturing at atmospheric oxygen levels impacts lymphocyte function. *PNAS* 2005; 10: 3756-3759.
82. Conforti L, Petrovic M, Mohammad D et al. Hypoxia regulates expression and activity of Kv1.3 channels in T lymphocytes: a possible role in T cell proliferation. *J Immunol* 2003; 170: 695-702.
83. Loeffler DA, Juneau PL, Heppner GH. Natural Killer-cell activity under conditions reflective of tumor micro-environment. *Int J Cancer* 1991; 48: 895-899.
84. Naldine A, Carraro F, Silvestri S et al. Hypoxia affects cytokine production and proliferative responses by human peripheral mononuclear cells. *Journal of Cellular Physiology* 1997; 173: 335-442.
85. Roman J, Rangasamy T, Guo J et al. T cell activation under hypoxic conditions enhances interferon- $\gamma$  secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; 42: 123-128.

86. Kojima H, Sitkovsky MV, Cascalho M. HIF-1 $\alpha$  deficiency perturbs T and B cell functions. *Current Pharmaceutical Design* 2003; 9: 1827-1832.
87. Carthew RW and Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009; 136 (20):642-655.
88. Fasanaro P, Greco S, Lorenzi M et al. An integrated approach for experimental target identification of hypoxia-induced miR-210. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284(50):35134-35143.
89. Huang X, Le QT, Giaccia AJ. MiR-210 – micromanager of the hypoxia pathway. *Trends in Molecular Medicine* 2010; 16(5): 230-237.
90. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE et al. A microRNA signature of hypoxia. *Molecular and Cellular Biology* 2007; 27(5): 1859-1867.
91. Biswas S, Roy S, Banerjee J et al. Hypoxia inducible microRNA 210 attenuates keratinocyte proliferation and impairs closure in a murine model of ischemic wounds. *PNAS* 2010; 107(15): 6976-6981.
92. Nitta T, Yagita H, Sato K et al. Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 Antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J Exp Med* 1989; 170: 1757-1761.
93. Takasaki S, Hayashida K, Morita C et al. CD56 directly interacts in the process of NCAM-positive target cell-killing by NK cells. *Cell Biology International* 2000; 24 (2): 101-108.
94. Kleene R, Cassens C, Bähring R et al. Functional consequences of the interactions among the neural cell adhesion molecule NCAM, the receptor tyrosine kinase TrkB, and the inwardly rectifying K<sup>+</sup>Channel KIR3.3. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; 285(37): 28968–28979.
95. Atz ME, Rollins B, Vawter MP. NCAM1 association study of bipolar disorder and schizophrenia: polymorphisms and alternatively spliced isoforms lead to similarities and differences. *Psychiatr Genet* 2007; 17 (2): 55-67.
96. Kos JF, Chin CS. Costimulation of T cell receptor-triggered IL-2 production by Jurkat T cells via fibroblast growth factor receptor 1 upon its engagement by CD56. *Immunology and Cell Biology* 2002; 80: 364-369.
97. Jarahian M, Waltz C, Issa Y et al. Blockade of natural killer cell-mediated lyses by NCAM140 expressed on tumor cells. *Int J Cancer* 2007; 120: 2625-2634.
98. Lanier LL, Testi R, Bindl J et al. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 1989; 169: 2233-2238.
99. Lanier LL, Chang C, Azuma Miyuki et al. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (NCAM/CD56). *The Journal of Immunology* 1991;146 (12):4421-4426.

100. Rutishauser U, Acheson A, Hall AK et al. The neural cell adhesion molecule (N-CAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* 1988; 240: 53-57.

## 6. ARTIGO EM INGLÊS

### **T cells, but not NK cells proliferate in hypoxia: Implications for adoptive immunotherapy**

Maria A. Lima da Silva<sup>1,3</sup>, Sonny O. Ang<sup>1</sup>, Margaret Dawson<sup>1</sup>, Matthew Figliola<sup>1</sup>, Sourindra Maiti<sup>1</sup>, Helen Huls<sup>1</sup>, Lucia Silla<sup>3</sup>, Dean A. Lee<sup>1</sup>, Richard E. Champlin<sup>2</sup>, Laurence J.N. Cooper<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Division of Pediatrics, Children's Cancer Hospital, The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

<sup>2</sup>Department of Stem Cell Transplantation and Cellular Therapy, University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA

<sup>3</sup>Cellular Therapy Center, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

**Key words:** Hypoxia, T cells, NK cells, adoptive immunotherapy

**Running Title:** Effect of hypoxia on T and NK cells

This work was taken place at University of Texas MD Anderson Cancer Center.

**Acknowledgments:** Support from Cancer Center Core Grant (CA16672); RO1 (CA124782, CA120956); R21 (CA129390, CA116127); DOD PR064229; The Alliance for Cancer Gene Therapy; The Alex Lemonade Stand Foundation; The Carl C. Anderson, Sr. and Marie Jo Anderson Charitable Foundation; The Gillson Longenbaugh Foundation; The J.P. McCarthy Fund Developmental Grant Program The Leukemia and Lymphoma Society; The Lymphoma Research Foundation; The Miller Foundation, The National Foundation for

Cancer Research; The National Marrow Donor Program; The Pediatric Cancer Research Foundation; The UT-CAPES program; The CNPq-Brazil; The Hemoamigos-HCPA/Brazil.

**Correspondence:**

Dr. Laurence J.N. Cooper,

U.T. MD Anderson Cancer Center

Pediatrics - Research, Unit 907

1515 Holcombe Blvd.

Houston, TX 77030

Phone: (713) 563-3208; Fax: (713) 792-9832.

E-mail: [ljncooper@mdanderson.org](mailto:ljncooper@mdanderson.org)

## Abstract

Infusions of T cells and natural killer (NK) cells from peripheral blood (PB) are being undertaken for the treatment of malignancies. To achieve and sustain a therapeutic effect lymphocytes are propagated *ex vivo* in normoxia (20% O<sub>2</sub>) and intravenously infused and must survive hypoxia associated with venous blood and bone marrow (5% O<sub>2</sub>), and the tumor environment (1% O<sub>2</sub>). The main objective this study was to determine the ability of human T and NK cells to proliferate under normoxia (20% O<sub>2</sub>) versus hypoxia (1% O<sub>2</sub>) over 28 days using an artificial antigen presenting cells (aAPC) to propagate clinical-grade lymphocytes. We found that T cells continuously exposed to 4 weeks of hypoxia grew at a rate of 100-fold less than T cells cultured in normoxia while the proliferative rate of NK cells lagged by 1,000-fold, behind normoxic conditions. Hypoxic cultured NK cells exhibit an increase in apoptosis as well as a correspondent impairment in cytotoxicity as revealed by chromium release assay. In low oxygen tension the expression of KIR, NCR, and NKG2D receptors were decreased in NK cells. In hypoxia, the production of IL-2 and IFN $\gamma$  were decreased in T cell and more so in NK cell. Chronic hypoxia increased the expression of related apoptosis, glycolytic metabolism and angiogenesis genes which were moderately increased in T cells but profoundly upregulated in NK cells. ATP levels in T cell were very similar in both oxygen conditions, but profoundly diminished in NK cells under hypoxia. In addition to the poor proliferative capacity of NK cells under hypoxia we also noted that hypoxia inducible miR-210 levels are up regulated in hypoxic NK cells correlating with loss of CD56 expression. Taken together, this data show a greater impact of hypoxia on proliferative and cytotoxic activity of NK cells activated by artificial antigen-presenting cells.



More studies are needed to understand the impact of this behavior on the adjuvant immunotherapy.

## **Introduction**

Adoptive immunotherapy has been reevaluated in the last few years as an effective approach for cancer therapy after Rosenberg et al. (1) showed the importance of immunodepletion just before the adoptive transfer of activated lymphocytes. Of the multiple forms of cellular immunotherapy (2, 3), adoptive transfer of T lymphocytes has perhaps been the most successful. For example, unmanipulated donor lymphocyte infusions (DLI) have been widely used to treat patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) (4), while antitumor responses post HSCT correlate with development of a diverse T cell response specific for minor histocompatibility (5) or tumor-associated antigens such as WT1(6). Moreover, ex vivo expanded donor derived cytotoxic specific T lymphocytes (CTLs) have proved highly effective in preventing or treating viral infections and Epstein-Barr virus (EBV) lymphomas developing post-transplant (7,8,9). In the autologous setting clinical responses have been observed following T cell therapies in patients with melanoma, lymphoma and nasopharyngeal cancer (10,11) providing insights into requirements for effective immunotherapy. Hematopoietic stem cell transplantation appears to be excellent scenery for T cell transfer, allowing the in vivo expansion of highly cytotoxic immune effector cells (12). Natural Killer (NK) cells are also being tested as adoptive antitumor effectors and their role in the treatment of acute myeloid leukemia has been well established (13,14).

However, the use of T and NK cell-based immunotherapy faces significant challenges, including immunosuppressive tumor microenvironment that prevents tumor destruction by T and NK cells, enhancing the resistance of the tumor cells (15,16). Among the factors that contribute to immunosuppression are low pH, low nutrient levels, and low oxygen tension. In recent years, there is growing interest to try to elucidate the impact of the immunosuppressive tumor microenvironment on immune cells functions. Previous studies have shown that activation, function and survival of T cells are profoundly affected by low oxygen levels (17, 18, 19), and NK cells were described to have diminished cytotoxic activity under hypoxic and low pH conditions (20), both hallmarks of chemoresistant solid tumors.

Cellular responses to hypoxia are mediated through oxygen-dependent different expression of activation and inhibition genes in order to adapt to the different hypoxic niches found in physiologically normal as well as inflamed and cancerous tissues (16, 21,22). Adaptation of mammalian cells to hypoxia is coordinated by hypoxia inducible factors (HIFs), that specifically binds to hypoxia response elements (HREs) controlling the transcription of many genes that are critical for cellular function under hypoxia (23, 24, 25,26). Among its functions, HIFs promotes the anaerobic production of energy, activates PDK1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase) switching off oxygen consumption by the mitochondria (27), and upregulate the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) for angiogenesis (28). HIFs also regulated the expression of genes related to apoptosis (BNIP3), glucose transporter (SLC2A1/Glut-1), pyruvate to lactate conversion (LDHA), and prolyl hydroxylases production (PHD also called EGLN) (29,30,31,32,33).

Micro-RNA (miRNA) have been implicated in regulating both upstream and downstream signaling of the HIF pathways, and of the several miRNAs regulated by hypoxia, miR-210 is the most consistently induced (34,35). Studies of potential miR-210 targets have found that directly or indirectly, NCAM-1 (CD56) is affected by miR-210 (36). Also, sequence analysis reveals that miR-210 can bind to the 3'UTR of CD56 mRNA, targeting it for degradation.

A recently described technology based on artificial antigen presenting cells (aAPC) has been applied for the in vitro expansion of clinical grade T and NK cells. This technology exploit the potential of K562 aAPCs genetically modified with membrane-bound IL-15 and/or IL-21 and to express co-stimulatory molecules as 4-1BBL (CD137L) (37,38). Here we present studies on the characterization of T and NK cells activities under normoxia (20% O<sub>2</sub>) and hypoxia (1% O<sub>2</sub>). Proliferation, cytotoxicity, molecular and gene expression, cytokine production, ATP production and mitochondrial function were measured and compared in T and NK cells cultured under different oxygen conditions.

## **Materials and Methods**

### **Isolation of PBMC**

After written consent, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from three healthy human donors by centrifugation over Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus (GE Healthcare Bio-Sciences), and cultured in RPMI-1640 (Hyclone, Logan, UT) supplemented with Glutamax-1 200nM (Life Technologies-Invitrogen), and 10% heat-inactivated FCS (Hyclone), referred to as culture medium.

### **Generation of aAPCs**

The artificial antigen presenting cells(aAPCs) K562 were developed as previously described (37,38) to express CD19, CD64, CD86, CD137L, and membrane bound IL-15 (mIL-15) (Clone 4), and CD19, CD64, CD86, CD137L (Clone 9). The latter were further modified to express membrane bound IL-21 (mIL-21).

### **Expansion of T cell**

T cells were stimulated and expanded from PBMC ( $5 \times 10^6$  cells) co-cultured with anti-CD3 (OKT3) loaded on irradiated (100cGy) K562 aAPC (clone 4) at a ratio of 1:1 (PBMC:aAPC) over 28 days. rhIL-2 (50U/mL) and IL-21 (30ng/mL) were added every 48hr on a Monday-Wednesday-Friday schedule. At the end of each stimulation cycle (7days) the cells were counted and analyzed.

### **Expansion of NK Cell**

NK cells were expanded from PBMCs ( $5 \times 10^6$  cells) co-cultured with  $\gamma$ -irradiated (100cGy) mIL-21 K562 aAPC (clone 9) at a ratio of 1:2 (PBMC:aAPC) over 28 days. rhIL-2 (50U/mL) was added every 48hr as described for T cell cultures.

### **Normoxic and Hypoxic cell culture conditions**

The experiments were performed in normoxic (5%CO<sub>2</sub>, 20%O<sub>2</sub>) and hypoxic (5%CO<sub>2</sub>, 1%O<sub>2</sub>) conditions created in separate incubators (Thermo Scientific) which were

maintained at 37°C. The O<sub>2</sub> tension was set and maintained at 1% by injecting N<sub>2</sub> into the incubator. The incubators were monitored for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> levels by Fyrite gas analyzers.

### **Cell viability**

Cell viability was determined by 0.2% Trypan blue staining and counted using a CelloMeter™ (Nexcelom) automatic cell counter or propidium iodide (PI) staining and flow cytometry, as indicated.

### **Flow Cytometry**

Fluorochrome-conjugated reagents were obtained from BD Biosciences (San Jose, CA): anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD16, anti-CD56, anti-NKG2D and anti-NCR. Anti-CCR7, KIR2DL1, KIR3DL1 from R&D systems (Minneapolis, MN) and KIR3DL1 from Miltenyi Biotec (Auburn, CA). A minimum of 10000 events were acquired using on a FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA) using CellQuest™ Pro version 5.2.1 (BD Biosciences, San Jose, CA).

### **Intracellular cytokine staining**

Intracellular IL-2 and IFN- $\gamma$  were assayed using PMA-Ionomycin. In short,  $1 \times 10^5$  T cells or NK cells were incubated 10 $\mu$ L of Phorbol myristate acetate (PMA) and 10 $\mu$ L Ionomycin in 200 $\mu$ L culture medium with protein transport inhibitor (BD Golgi Plug) in a 96 plate and incubated at 37°C for 4- to 6-h, the cells were staining for CD3 and CD56 at 4° C for 30 min. After washing, the cells were fixed and permeabilized (100 $\mu$ L Cytofix/Cytoperm buffer)

and anti-IL-2 and anti-IFN- $\gamma$  was added. The cells were further washed and analyzed by FACSCalibur.

### **NanoString nCounter Expression Analysis**

The mRNA content of cell lysates was analyzed by NanoString methodology according to published procedures (Geiss et al, Nat Biotech 2008). All custom probe design and synthesis were carried out by Nanostring Technologies (Seattle, WA) as part of the nCounter Gene Expression Assay Kit.

### **Mitochondrial activity by FACS**

The mitochondria were labeled using the MitoTracker® Deep Red FM probe (Catalog number M22426, Invitrogen, La Jolla, CA). Briefly, one million cells per mL were pelleted then incubated with pre warmed 50 nM MitoTracker® probe, which passively diffuse across the plasma membrane and accumulate in active mitochondria. After staining for 40 minutes at 37°C, cells were washed twice at room temperature in Dulbecco's modified PBS (without calcium or magnesium) and re-suspended in culture medium before analysis by flow cytometry.

### **ATP measurement**

The ATP Bioluminescence Assay Kit HS II assay kit (Catalog number 11 699 709 001, Roche, Mannheim, Germany) was used to determine the ATP content of cultured cells. T or NK cells ( $1 \times 10^6$ ) were pelleted and promptly frozen at -80°C, quickly thawed in a 37°C water bath and immediately subjected to cell lysis with the supplied lysis buffer, incubating

for 5 minutes at room temperature. For each sample, 25  $\mu$ L of the supernatant was transferred to wells in a 96-well microtiter plate. Luciferase reagent was added to each well and measurements were taken using Perkin-Elmer TopCount NXT Luminescence Counter (Downer's Grove, IL) with a 1 sec delay and 10 sec integration of resultant light signal.

### **VEGF (vascular endothelial growth factor) ELISA**

The human VEGF Immunoassay kit (catalog number QVE00B, R&D Systems, Minneapolis, MN) was used to quantitative VEGF concentrations in cell culture supernatant. Supernatants were harvested at specific intervals from T and NK lymphocyte cultures and promptly frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Samples and VEGF working standards (20,000 pg/mL to 32 pg/mL) were prepared as recommended by the manufacturer. The relative light unit (RLU) generated was determined by Perkin-Elmer TopCount NXT Luminescence Counter (Waltham, MA).

### **miRNA-210 quantification**

Human miRNA-210 was quantified using Taqman<sup>®</sup> Q-PCR from Applied Biosystems (Foster City, CA). RNA extraction (miRNeasy kit, QIAGEN) and reverse transcription of total RNA were performed to generate cDNA representing levels of mature miRNA molecules (MicroRNA Assay Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA). Owing to the stem loop structures of the miRNA primers, only mature miRNA molecules were amplified into cDNA. cDNA was amplified via fluorescently labeled Taqman probe and primer sets using an Applied Biosystems Real Time PCR device.

### **Transfection of NK cells from day 28 grown in normoxia with miR-210 plasmid**

To evaluate if miR-210 is implicated in the CD56 expression, NK cells from day 28 grown in normoxia condition were sorted by FACS and resuspended in 100µl of Amaxa Nucleofector solution (human CD34<sup>+</sup> cell Nucleofector kit, cat. No. VPA-1003; Lonza, Basel, Switzerland, mixed with 10µg of plasmids pCMV-miR-210 and pCMV-miR blunt blank (10µg each), transferred to a cuvette, electroporated (Program U-14), cultured by 3 days and then staining for anti-CD3 and anti-CD56.

### **Chromium release assay**

The cytolytic activity of NK cells was determined by 4-h chromium release assay. NK cells from day 28, in either normoxia or hypoxia (1% O<sub>2</sub>), were incubated with 5 x 10<sup>3</sup> <sup>51</sup>Cr-labeled target cells (K562, Daudi B2m, 721.221) in a V-bottomed 96-well plate (Costar; Corning Life Sciences, Lowell, MA). The percentage of specific cytolysis was calculated from the release of <sup>51</sup>Cr, as described earlier, using a TopCount NXT (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Downers's Grove, IL).

## **Results**

### **T cell and NK cell proliferation is affected by hypoxia**

The ability of T and NK cells to proliferate under low oxygen tensions was determined by adapting our current *ex vivo* expansion technology which uses artificial antigen presenting cells (aAPC) to propagate clinical-grade lymphocytes. We numerically expanded matched sets of T and NK cells by weekly addition of  $\gamma$ -irradiated aAPC over 28 days in 20% versus



1% O<sub>2</sub> (Fig.1). Figure 2A.i shows that T cells (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) continuously exposed to chronic hypoxia (1% O<sub>2</sub>) exhibited sustained proliferation but grew at a rate of 100-fold less than T cells cultured in normoxia. On the other hand, the growth rate of NK cells (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) subjected to chronic hypoxia lagged by 1,000-fold compared to those propagated under normoxia (Fig. 2A.ii). These results show that the effects of hypoxia were much higher on NK cells than T cells proliferation. When we compared the percentage of CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> and CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> cells we found that CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> cells number are increased and CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells decreased in NK cells culture under hypoxia condition (Fig. 2B). When we evaluated the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells numbers expanded under normoxia 20% O<sub>2</sub> and hypoxia 1% O<sub>2</sub> at day 28 we found a decreased CD8<sup>+</sup> T cells numbers under hypoxia. Differently, CD4<sup>+</sup> T cells showed a tendency to increased numbers in hypoxia compared to normoxia (Fig. 2C). Hypoxia induced a high number of apoptotic cells in NK cell culture at Day 28 as measured by Propidium Iodide (PI) and Annexin V-FITC, analyzed by flow cytometry (Fig. 2D). It is important to note that hypoxic NK cells can recover the proliferation ability when reoxygenated (data not shown). NK cells grown under hypoxia showed decreased expression of KIR, NCR and NKG2D receptors compared to normoxia (Fig. 2E).

### **NK cells have reduced cytokine production and decreased lytic activity under hypoxia**

Intracellular cytokine production and chromium release assays were utilized to test NK cells activity. Hypoxia affected IL-2 and IFN- $\gamma$  production in T and NK cells (Fig. 3A), and impaired NK cytotoxicity (4 weeks in 1% O<sub>2</sub>), as well (Fig. 3B). T cell cytotoxic assays were not performed.

### **Differential gene expression in T cells and NK cells by nString analysis**

The evaluation of expression profile gene by mRNA quantification showed that, when propagated under hypoxia, transcripts of BNIP3, EGLN1, EGLN3, LDHA, PDK1, SLC2A1 and VEGFA were moderately increased in T cells (3.5x, 1.5x, 3.0x, 1.2x, 2.4x, 1.1x, 4.5x, respectively) (Fig.4A), while profoundly upregulated in NK cells (138x, 9.9x, 52x, 11.5x, 16.8x, 30.8x, 286x, respectively) (Fig. 4B). The expression profiles of these hypoxia-inducible genes involved in apoptosis, glycolysis, and angiogenesis further underscored the relative ability of T and NK cells to sustain proliferation under normoxia versus hypoxia. The higher expression of BNIP3, a pro apoptotic gene, seems support the increased apoptotic cell number in NK cell culture after chronic hypoxia for 28 days.

### **NK cells lack mitochondrial activity and decrease ATP production under hypoxia (1% O<sub>2</sub>)**

While mitochondrial activity measured by MitoTracker for Red dye, was increased in T cells, under hypoxia, the Mean Fluorescence Intensity (MFI) was decreased in NK cells paralleling its lower proliferative activity (Fig. 5A). Hypoxia downregulate ATP production in NK cells and comparatively less so in T cells (Fig. 5B). A diminished mitochondrial activity is consistent with the shift to anaerobic metabolism.

### **VEGF levels inducible by hypoxia differs in T cell and NK cell**

VEGF levels as measurement by ELISA increased in the first 3 days in T and NK cells cultures, and gradually decrease afterwards. VEGF levels in normoxia are higher in T cells,

as compared to NK cells. On the other hand, NK cells promptly produce VEGF when in hypoxia (1%O<sub>2</sub>), and keeps its production active and higher than normoxia by the 28<sup>th</sup> day of culture (Fig.5C).

### **miR-210 is expressed in NK cells under hypoxia and down regulate CD56.**

The Q-PCR showed that in hypoxic NK cells, the level of miR-210 is upregulated compared to normoxic NK cells. As under hypoxia the poor proliferative activity of NK cells (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) was accompanied by an increased CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> cell population (Fig.2B). Transfection of normoxic NK cells at day 28<sup>th</sup>, using a miR-210 plasmid, led to the loss of CD56 expression (Fig. 6A and 6B).

## **Discussion**

In a model of T cell proliferation in the presence of an artificial antigen presenting cells (aAPC) we were able to show that T cells sustained proliferation and viability under hypoxia (1% O<sub>2</sub>) condition, over 28 days. In our hands, hypoxia favored a shift to CD4<sup>+</sup> cells, diminishing CD8 cytotoxic cells (Fig. 2C ) as it was showed by Caldwell et al. (17). Using mouse splenocytes they showed a dramatic decrease in the numbers of T cells and in its differentiation at 1%O<sub>2</sub> and 2.5%O<sub>2</sub> with a shift to CD4<sup>+</sup> cells. They did show, however, that although fewer under hypoxic conditions, CD8<sup>+</sup> T cells were more lytic on a per se cell basis (17). On the other hand, Atkuri et al. (39), evaluating the influence of physiological (5%O<sub>2</sub>) and atmospheric oxygen (20%O<sub>2</sub>) levels on human PBMCs derived T lymphocyte proliferation demonstrated that CD8<sup>+</sup> T cells proliferate more or survive better

than CD4<sup>+</sup> T cells for all conditions. In our hands the production of cytokines (IL-2 and INF $\gamma$ ) was also affected in T cells under hypoxia although to a lesser extent than in NK cells.

In our model, NK cell proliferation was profoundly affected by low oxygen tension. aAPCs expanded NK cells in 1%O<sub>2</sub> during 28 days, had a lower proliferation activity as compared to normoxia (Fig 2A). As for receptors, after 28 days in hypoxia, NK cell exhibit a decreased expression of KIR, NCR and NKG2D thus diminishing both activation and inhibitory receptors (Fig 2E). Intra-cellular staining for IL-2 and INF $\gamma$  showed a marked reduced production on NK cells under hypoxia (Fig 3A) and a reduction on <sup>51</sup>Cr –release assay cytotoxic activity (Fig 3B) was observed as well. Taken together these data shows that hypoxia affect NK cells compromising its functional activity.

Utilizing nanoString methodology we were able to show that hypoxia upregulates the expression of hypoxia inducible genes BNIP3, EGLN1, EGLN3, LDHA, PDK1, SLC2A1 and VEGFA related to *apoptosis, glycolysis and angiogenesis* which were increased in both T and NK cells cultures, affecting significantly more NK cells (Fig 4). Furthermore, we found a high number of apoptotic NK cells in chronic hypoxia as shown in Fig.2C, which is supported by the higher BNIP3 expression as seen in nanoString data (Fig. 4).

In solid tumors where hypoxia is common, the cells adapt to this environment through HIF-1 $\alpha$  stabilization and selects cells adapted to hypoxia resisting to apoptosis (32). Little is known about the mechanism by which hypoxia regulates apoptosis. Perhaps, the NK cells still alive on the 28<sup>th</sup> day of cultures under hypoxic condition are apoptotic resistant NK cells. Interestingly, NK cells can recover the proliferation ability and viability when reoxygenated (data do not shown). Next, we measured the ATP production and mitochondrial activity, and found both profoundly diminished in NK cells under hypoxia (Fig.

5A and 5B). Of note the ATP levels in T cells were similar in both conditions while for CD8+ T cells which mitochondrial activity was affected under hypoxia apparently to the same extent as NK cells (Data do not shown). Although glycolysis yields less ATP, it is known that tumor cells do not use oxidative phosphorylation but glycolysis with a high rate of lactate production, even under aerobic conditions (Warburg effect). The same might be true for other rapidly proliferating cells, such as immune cells, that shift to glycolysis as the main source of energy (40).

As noted above, in our hands and culture strategy, CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells would profoundly diminish its proliferation activity under hypoxia, and kept thereafter a relatively constant rate of proliferation over time. We were also able to demonstrate that overtime under hypoxia a population of CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> cells overgrew NK cells (Fig 2B). Since miR-210 is the most consistently miRNA induced by hypoxia (34,35), and can bind to the 3'UTR of CD56 mRNA, targeting it for degradation (36) we quantify miR-210 in our cultures and found that hypoxia up-regulate miR-210 and that this increment occurs along with the loss of CD56 expression (Fig. 6B). Recently, Chen et al. (41) demonstrated that in cancer cell line under hypoxia, miR-210 trigger the metabolic shift from aerobic respiration to glycolysis and slow the proliferation rate without increasing cell death. They also found that miR-210 negatively regulates mitochondrial respiration activity and activates ROS (Reactive Oxygen Species) generation. We were able to show that, in normoxic NK cells the miR-210 transfection was accompanied by a loss in CD56/NCAM cell expression (Fig. 6). Finally, since we didn't test the CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells cytotoxicity on a per cell basis, and utilized as effectors all cells present in culture, it is possible that the CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> population might have had a negative impact on final cytotoxicity. Although the role of CD56/NCAM

adhesion molecule on NK cells is unknown, on NKT cells it was demonstrated as been a possible marker for cytotoxicity. Pittet et al. (42) showed that  $CD56^+CD8^+$  T cells, from normal donor peripheral blood, have higher lytic activity then  $CD56^-CD8^+$  T cells. Our observation on down regulation of NK receptors, low cytokine production and lack  $CD56$  molecule expression could all be involved on the observed diminished cytotoxicity.

In summary, we were able to show a profound impact of hypoxia on NK cells proliferation and function. The proliferative activity of  $CD3^-CD56^+$  cells was significantly diminished and chronic hypoxia induced an increased apoptotic cell number in the NK cell culture. Despite this important finding, hypoxic NK cells can recover the proliferation ability and viability when reoxygenated. Of interest, and supporting miR-210 role, a population of  $CD3^-CD56^-$  cells expands, suggesting degradation of that molecule and its possible role on cytotoxicity. In order to better understand these effects, flow sorting and functional assays on  $CD3^-CD56^+$  and  $CD3^-CD56^-$  purified populations grown under different oxygen concentrations are necessary. In studies on adoptively transferred immune cells immune reconstitution, a different expression on membrane molecules based on  $CD56^+$  molecule expression could underestimate a particular subset of NK cells. Finally, targeting miR210 at the tumor site might be a way of modulating the activity of NK cells. Taken together, this data show a greater impact of hypoxia on proliferative and cytotoxic activity of NK cells activated by artificial antigen-presenting cells. More studies are needed to understand the impact of this behavior on the adoptive cellular immunotherapy

## References

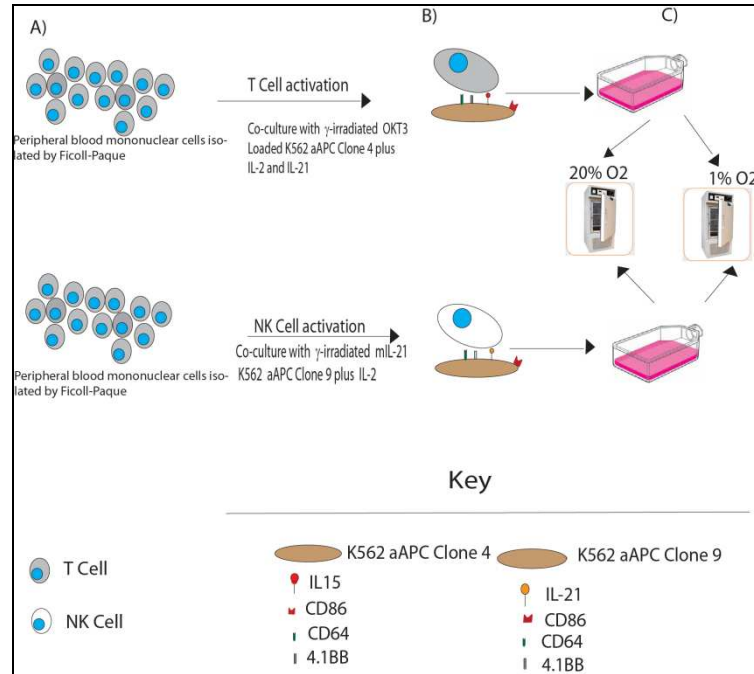
1. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC et al. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2008, 8:299-308.
2. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC et al. Adoptive Cell Transfer Therapy Following Non-Myeloablative but Lymphodepleting Chemotherapy for the Treatment of Patients With Refractory Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 2005, 23:2346-2357.
3. Disis ML, Bernhard H, Jaffee EM. Use of tumour-responsive T cells as cancer treatment. *Lancet* 2009, 373:673-683.
4. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 2008, 112:4371-4383.
5. Nishida T, Hudecek M, Kostic A et al. Development of tumor-reactive T cells after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplant for chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2009, 15:4759-4768.
6. Rezvani K, Yong AS, Savani BN et al. Graft-versus-leukemia effects associated with detectable Wilms tumor-1 specific T lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007, 110:1924-1932.
7. Heslop HE, Slobod KS, Pule MA et al.: Long term outcome of EBV specific T cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* 2010, 115:925-935.
8. Leen AM, Myers GD, Sili U et al. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med* 2006, 12:1160-1166.
9. Louis CU, Straathof K, Bollard CM et al.: Enhancing the in vivo expansion of adoptively transferred EBV-specific CTL with lymphodepleting CD45 monoclonal antibodies in NPC patients. *Blood* 2009, 113:2442-2450.
10. Hunder NN, Wallen H, Cao J et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med* 2008, 358:2698-2703.
11. Bollard CM, Gottschalk S, Leen AM et al.: Complete responses of relapsed lymphoma following genetic modification of tumor-antigen presenting cells and T lymphocyte transfer. *Blood* 2007, 110:2838-2845.

12. Wrzesinski C, Paulos CM, Gattinoni L et al. Hematopoietic stem cells promote the expansion and function of adoptively transferred antitumor CD8<sup>+</sup> T cells. *J Clin Invest* 2007, 117(2):492-501.
13. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood* 2005, 105:4878-4884.
14. Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, Pui CH, Leung W. NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010 Feb 20;28(6):955-9.
15. Fink T, Ebbesen P, Koppelhus U, Zachar V. Natural Killer Cell-mediated basal and interferon-enhanced cytotoxicity against liver cancer cells is significantly impaired under *in vivo* oxygen conditions. *Scandinavian Journal of Immunology* 2003; 58: 607-612.
16. Lukashev D, Ohta A, Sitkovsky M. Hypoxia-dependent anti-inflammatory pathways in protection of cancerous tissues. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 273-279.
17. Caldwell CC, Kojima H, Lukashev D, Armstrong J, Farber M, Aposov SG. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. *The journal of Immunology* 2001; 167: 6140-6149.
18. Makino Y, Nakamura H, Ikeda E et al. Hypoxia-Inducible Factor Regulates Survival of Antigen Receptor-Driven T Cells. *The Journal of Immunology*, 2003;171: 6534-6540.
19. Neumann AK, Yang J, Biju MP, Joseph S, Johnson RS, Haase VH et al. Hypoxia inducible factor 1  $\alpha$  regulates T cell receptor signal transduction. *PNAS* 2005; 47: 17071-17076.
20. Fink T, Ebbesen P, Koppelhus U, Zachar V. Natural Killer Cell-mediated basal and interferon-enhanced cytotoxicity against liver cancer cells is significantly impaired under *in vivo* oxygen conditions. *Scandinavian Journal of Immunology* 2003; 58: 607-612.
21. Kim H, Peng G, Hicks JM, Weiss H, Van Meir EG, Brenner MK et al. Engineering human tumor-specific cytotoxic T cells to function in a hypoxic environment. *Molecular Therapy* 2008; 16: 599-606.
22. Caldwell CC, Kojima H, Lukashev D, Armstrong J, Farber M, Aposov SG. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. *The journal of Immunology* 2001; 167: 6140-6149.

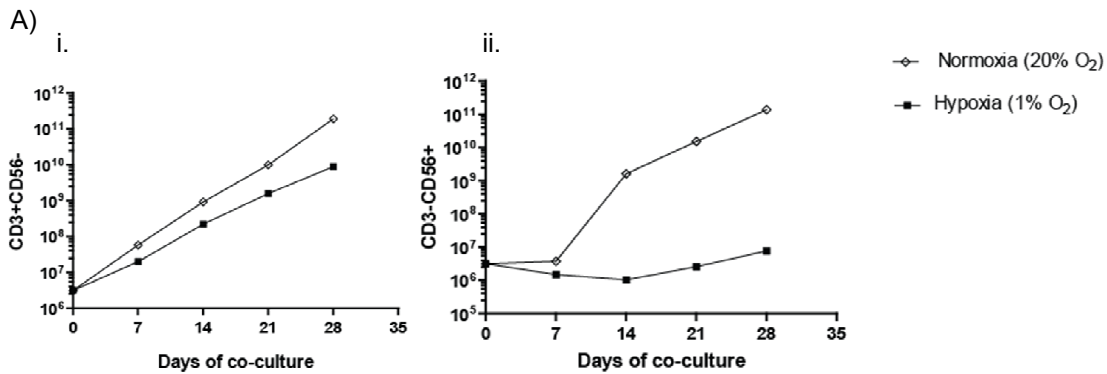


23. Liao D, Corle C, Seagroves TN, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res* 2007; 67: 563-572.
24. Noman MZ, Buart S, Pelt JV, Richon C, Hasmin M, Leleu N et al. The cooperative induction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and STAT3 during hypoxia induced an impairment of tumor susceptibility to CTL-mediated cell lysis. *The Journal of Immunology* 2009; 182: 3510-3521.
25. Semenza GL. Defining the Role of Hypoxia Inducible Factor 1 in Cancer Biology and Therapeutics. *Oncogene*, 2010; 29; 625-634.
26. Semenza GL. Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease. *The New England Journal of Medicine*, 2011; 365; 537-547.
27. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L et al. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism*, 2006; 3: 187-197.
28. Semenza, G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3, 721–732.
29. Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ (2008) Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 30: 393–402.
30. Hogel H, Rantanen K, Jokilehto T et al. Prolyl Hydroxylase PHD3 Enhances the Hypoxic Survival and G1 to S Transition of Carcinoma Cells. *Plos One* 2011, 6 (11);1-12.
31. Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Hypoxia and Mitochondrial Inhibitors Regulate Expression of Glucose Transporter-1 via Distinct Cisacting Sequences. *The Journal of Biological Chemistry* 1995, 270, 49,( 8); 29083–29089.
32. Greijer AE, Wall ED. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*, 2004; 57: 1009-1014
33. Semenza GL., Jiang BH, Leung SW. et al. Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-inducible Factor 1. *The Journal of Biological Chemistry* 1996, 271;51(20) 32529 –32537.
34. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE et al. A MicroRNA Signature of hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*, 2007; 27(5): 1859-1867.
35. Huang X, Le QT, Giaccia AJ. MiR-210 – micromanager of the hypoxia pathway. *Trends in Molecular Medicine*, 2010;16(5): 230-237.

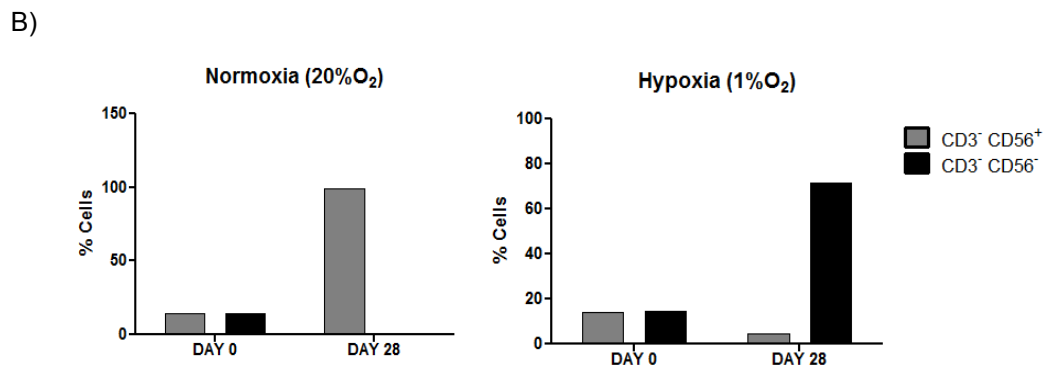
36. Fasanaro P, Greco S, Lorenzi M et al. An Integrated Approach for Experimental Target identification of Hypoxia-induced miR-210. *Journal of Biological Chemistry*, 2009;284(50):35134-35143.
37. Singh H, Figliola MJ., Dawson MJ et al. Reprogramming CD19-Specific T Cells with IL-21 Signaling Can Improve Adoptive Immunotherapy of B-Lineage Malignancies. *Cancer Res* 2011; 71(10); 3516 – 27.
38. Denman CJ., Senyukov VV, Somanchi SS et al. Membrane-Bound IL-21 Promotes Sustained Ex Vivo Proliferation of Human Natural Killer Cells. *PLoS ONE* 2012, 7 ;1;1-13.
39. Atkuri KR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Culturing at atmospheric oxygen levels impacts lymphocyte function. *PNAS* 2005; 10: 3756-3759.
40. Sitkovsky M, Dmitriy Lukashev. Regulation of Immune Cells by Local Tissue Oxygen Tension: HIF1 $\alpha$  and Adenosine Receptors. *Nature*, 2005 (5):712-721.
41. Chen Z, Li Y, Zhang H, Huang P, Luthra R. Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression. *Oncogene*, 2010; 29 (30):4362-4368.
42. Pittet MJ, Speiser DE, Valmori D, et al. Cutting Edge: Cytolytic Effector Function in Human Circulating CD8<sup>+</sup> T cells Closely Correlates with CD56 Surface Expression. *J Immunol*, 2000; 164:1148-1152.



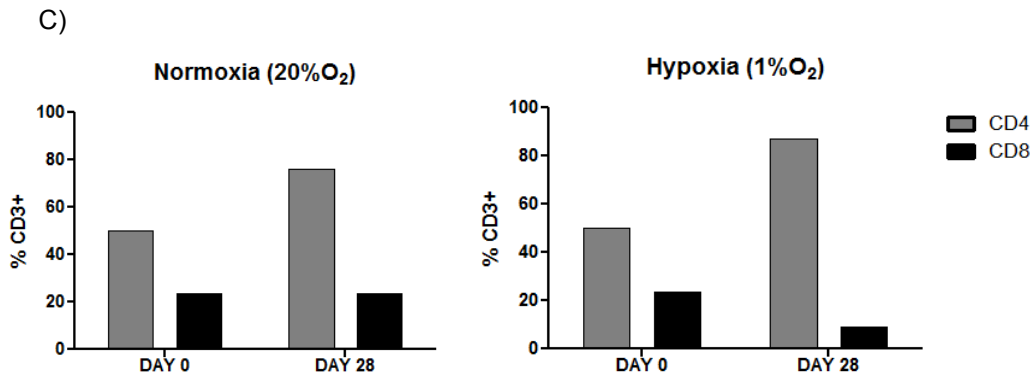
**Figure 1. Schematic of manufacturing process.** (A) PBMCs Isolation from normal donor PB by Ficoll-Paque Plus. (B) T cells were activated with irradiated OKT3 loaded K562 aAPC clone 4 along with exogenous addition of IL-2 (50U/mL) and IL-21 (30ng/mL); NK cells were activated with mIL-21 K562 aAPC clone 9 with exogenous IL-2 (50U/mL). (C) The co-cultures were incubated in normoxia 20%O<sub>2</sub> and hypoxia 1%O<sub>2</sub> for 28 days.



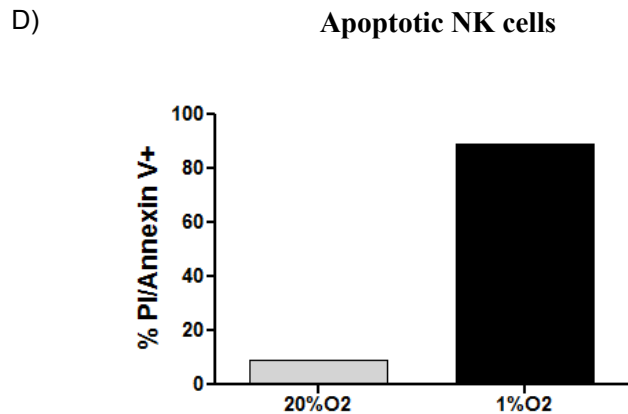
**Figure 2A.** Growth kinetics of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> T cells and CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells grown in hypoxia (1% O<sub>2</sub>) and normoxia (20% O<sub>2</sub>).



**Figure 2B.** The percentage comparison between CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> and CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> cells in normoxia and hypoxia measured by flow cytometry at Days 0 and 28.

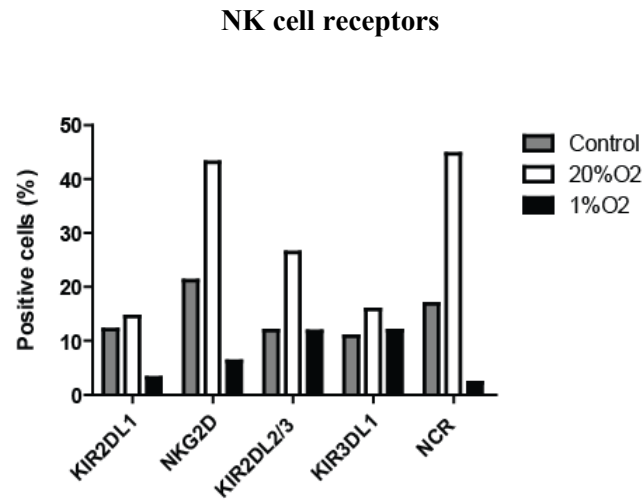


**Figure 2C.** The percentage comparison between CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells in normoxia and hypoxia measured by flow cytometry at Days 0 and 28.

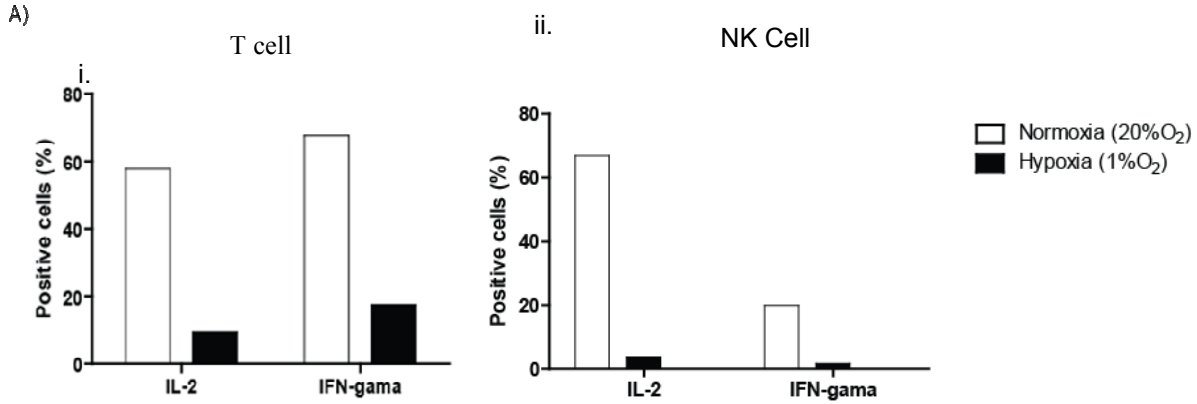


**Figure 2D.** Percentage of apoptotic cells in NK cells culture measured by Propidium Iodide (PI) and Annexin V-FITC determined by flow cytometry at Days 0 and 28 for both conditions.

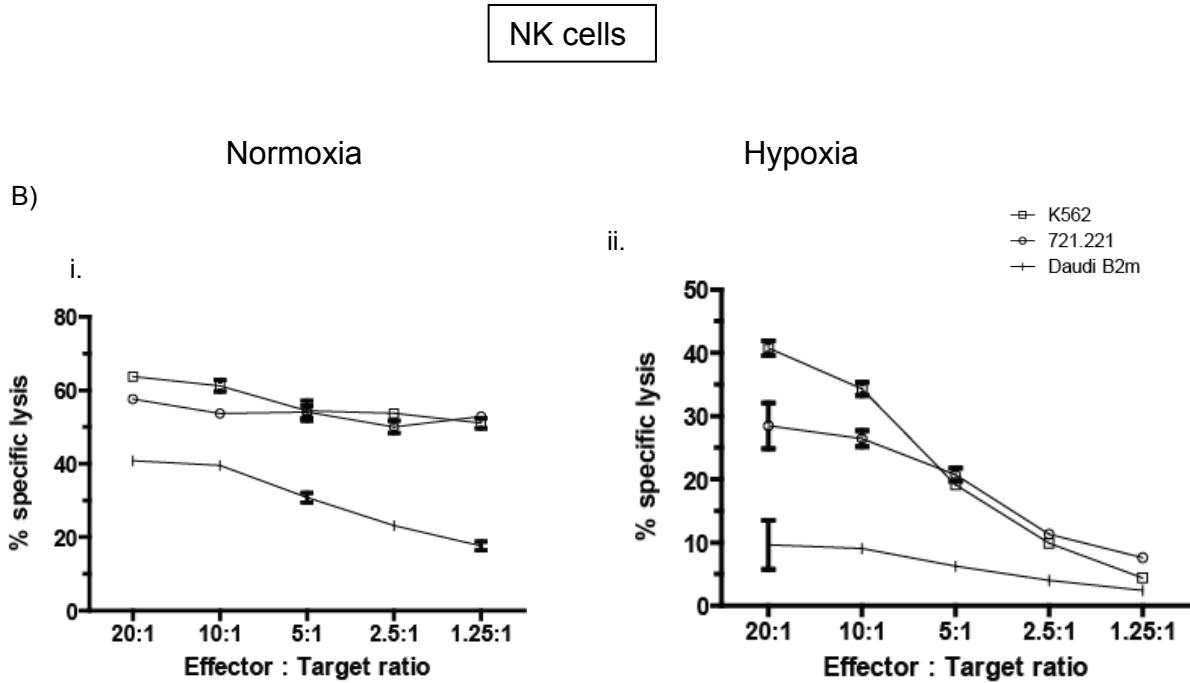
E)



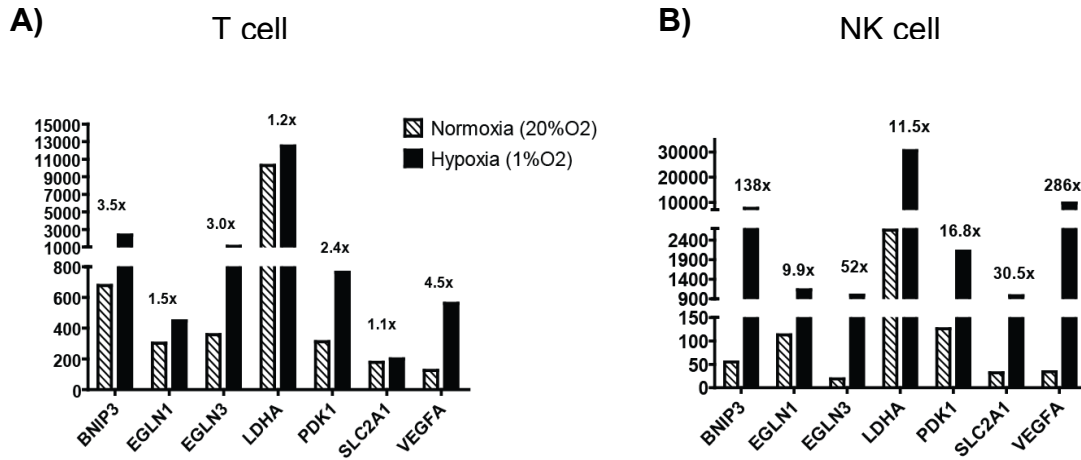
**Figure 2E.** NK cells expanded under normoxia and hypoxia condition were stained with NKG2D, KIR and NCR antibodies and analyzed by flow cytometry at Days 0 as a control and 28. The cells were counted using trypan blue and phenotyped every 7 days. Results are expressed as the percentage of positive cells under normoxia and hypoxia.



**Figure 3. Cytokine production.** (A) T cells and NK cells were stimulated with PMA-Ionomycin to evaluate the intracellular IL-2 and IFN-gama production in normoxia and hypoxia at Day 28 according to described in *Materials and Methods*.

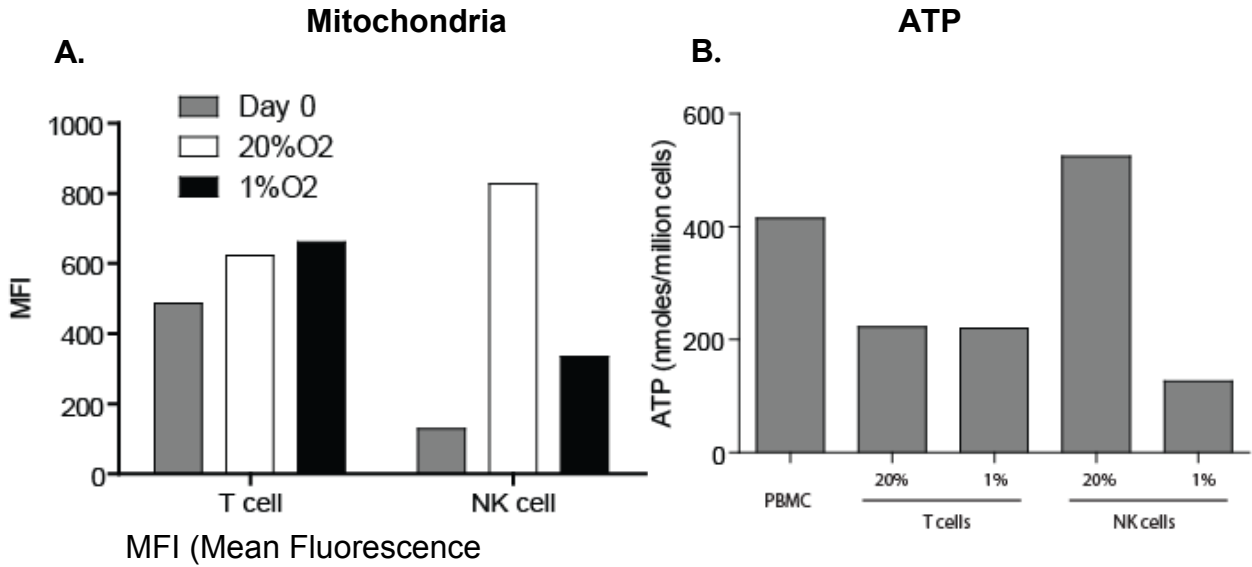


**(B) Chromium release assay.** The cytolytic activity of NK cells was determined by 4-h chromium release assay at day 28 in normoxia and hypoxia. This assay is representative from three different experiments.

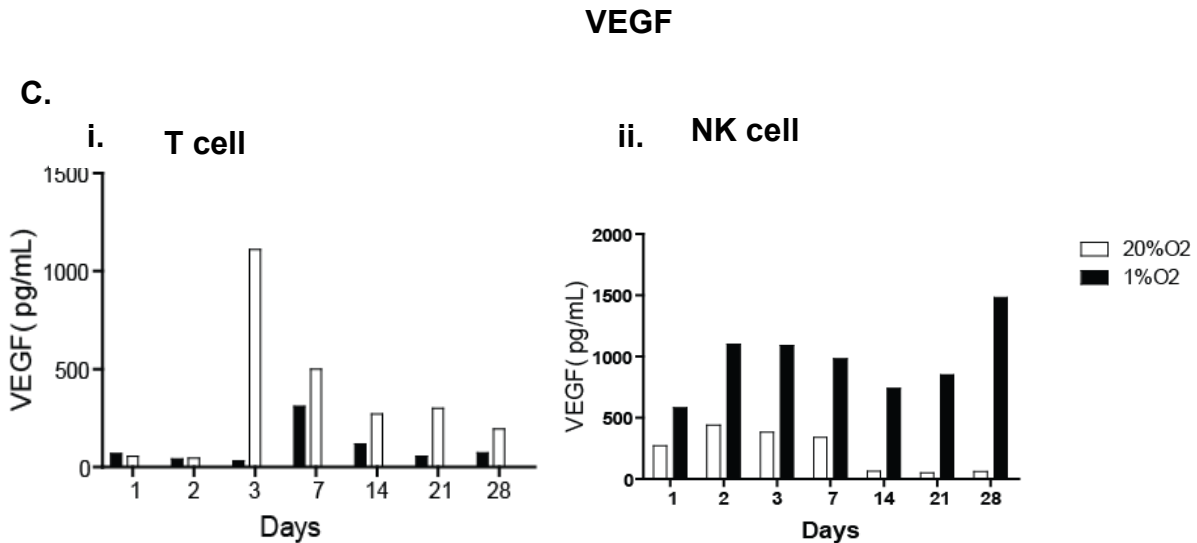


**Figure 4. NanoString nCounter Expression Analysis.** The mRNA content of cell lysates was analyzed by NanoString methodology according to described in *Materials and Methods* (A) The evaluation of expression profile gene by mRNA quantification showed transcripts of BNIP3, EGLN1, EGLN3, LDHA, PDK1, SLC2A1 and VEGFA moderately increased in T cells at same condition (3.5x, 1.5x, 3.0x, 1.2x, 2.4x, 1.1x, 4.5x, respectively) and upregulated in NK cells in hypoxia O<sub>2</sub> (138x, 9.9x, 52x, 11.5x, 16.8x, 30.8x, 286x, respectively) (B). N-string, Nano-string.





**Figure 5. ATP and Mitochondria assays.** (A) Mitochondria content measured by MitoTracker for Red dye for T cells (CD3+) and NK cells (CD3-CD56+) cultures showing difference in T cell and NK cell staining at Day 0 and Day 28. (B) The cellular ATP content measurement of T cells and NK cells cultured in normoxia and hypoxia showing increased ATP production in NK cells grown in normoxia compared to hypoxia.



**Figure 5.C VEGF levels.** VEGF levels measurement by ELISA showing a peak at Day 3 for all conditions and at hypoxia 1%O<sub>2</sub> levels higher mainly in NK cells culture by Day 28.



## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, foi avaliado o impacto da hipóxia sobre a proliferação, sobrevivência e funções efetoras das células T e células NK, bem como estudados aspectos da produção de energia, expressão gênica, características fenotípicas e atividade funcional, que são aspectos que podem impactar na imunoterapia adotiva. A imunoterapia adotiva tem sido considerada uma promissora abordagem terapêutica para tratamento de pacientes com certos tipos de câncer. Esse procedimento terapêutico consiste na estimulação e expansão *ex vivo* em normóxia de células T ou células NK autólogas ou alogênicas, seguidas de infusão intravenosa em pacientes. Para que esta terapia seja efetiva, as células imunes cultivadas precisam enfrentar um ambiente microambiental tumoral imunossupressivo que parece contribuir para o escape das células tumorais das células imunes. Entre os diversos fatores que contribuem para esse ambiente imunossupressivo está a baixa tensão de oxigênio. O impacto da baixa tensão de oxigênio sobre as características e funções das células NK ainda não é bem conhecido, bem como suas possíveis implicações no sucesso da terapia celular.

O processo de adaptação a hipóxia é mediado pela ativação e inibição da expressão de diferentes genes dependentes de oxigênio para suprir as necessidades angiogênicas, glicolíticas e proliferativas, sendo que o principal mecanismo mediador de respostas adaptativas a hipóxia é orquestrado pelo fator de transcrição HIF-1 que regula genes relacionados ao metabolismo energético, angiogênese, proliferação e apoptose,

além de diminuir indiretamente a expressão de mRNA através da repressão da regulação transcricional e micro RNAs.

Este é o primeiro estudo que avalia a capacidade proliferativa das células T e NK, estimuladas por uma célula apresentadora de antígeno artificial, em condições de hipóxia severa. Apesar das limitações referentes ao *n*, este estudo experimental trouxe importantes observações sobre a biologia das células T e NK em condições hipóxicas. O achado mais marcante é a maior sensibilidade da capacidade proliferativa e funcional d células NK a hipóxia crônica comparada as células T. A diminuída capacidade proliferativa da célula NK em hipóxia severa reforçada pela baixa expressão dos receptores de ativação e inibição, baixa produção de citocinas e diminuída citotoxicidade podem comprometer o papel da célula na atividade antitumoral, uma vez que a citotoxicidade da célula NK é regulada pelo equilíbrio entre os sinais desses receptores que interagem com o MHC classe I presente na superfície das células alvo. Realçando as deficientes respostas da célula NK à hipóxia severa crônica citadas anteriormente, está uma muito inferior produção de ATP em adição a diminuída atividade mitocondrial demonstrando que diferente das células T, a glicólise anaeróbia não parece ser tão efetiva para as células NK, o que pode contribuir para a apoptose em adição a expressão do gene pró apoptose BNIP3. Não menos importante é o aparecimento de uma população de células CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> proliferando ao longo de todo o período de cultivo. Essa população talvez seja o resultado da degradação da molécula de adesão NCAM/CD56 pelo mir-210, considerado o micro-RNA mais consistentemente induzido pela hipóxia conforme observado neste estudo. O papel da molécula NCAM/CD56 na atividade funcional da célula NK ainda não é claro, mas poderíamos especular que a ausência

desta molécula dificultaria a adesão à célula-alvo, contribuindo em adição à baixa expressão dos receptores e diminuída produção de citocinas para o prejuízo da capacidade citotóxica da célula NK. Novas pesquisas são necessárias para o esclarecimento destas questões.

Nós não avaliamos a capacidade funcional da célula T através de um ensaio de citotoxicidade, mas pudemos observar que essas células parecem se adaptar melhor à baixa tensão de oxigênio, conforme observado na pequena diferença entre a capacidade proliferativa entre as células T cultivadas em normóxia e as células T cultivadas em hipóxia. Essa adaptação à hipóxia pode ser também vista no metabolismo energético demonstrado pela igual produção de ATP em normóxia e hipóxia. Apesar de parecer que as células T se adaptam melhor do que as células NK a ambientes hipóxicos, ainda faltam respostas para questões como: Porque as células T citotóxicas falham na sua tarefa de destruir tumores *in vivo* mesmo quando retêm a habilidade (*in vitro*) para o reconhecimento de tumores sólidos e mesmo quando altos números de células T antitumor altamente líticas são infundidos em pacientes com câncer? O que existe no microambiente tumoral *in vivo* que impede a destruição do tumor por células T CD8+ tumor específicas altamente líticas e com atividade antitumoral *in vitro*?

Mais estudos que elucidem o comportamento biológico das células imunes T e NK em condições que simulem o ambiente tumoral contribuirão para a efetividade da imunoterapia adotiva.