



<b>Evento</b>	Salão UFRGS 2013: SIC - XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
<b>Ano</b>	2013
<b>Local</b>	Porto Alegre - RS
<b>Título</b>	Obtenção e expansão de células Natural Killer para tratamento de Leucemia Mielóide Aguda
<b>Autor</b>	LETÍCIA BAGGIO
<b>Orientador</b>	LUCIA MARIANO DA ROCHA SILLA

**Introdução:** As células *Natural Killer* (NK) vem sendo usadas em ensaios clínicos para o tratamento de doenças como: leucemia mielóide aguda (LMA), linfoma, mieloma e neuroblastoma. As células NK são linfócitos citotóxicos, tipicamente definidos pela expressão de CD56/CD16 e a ausência do receptor de célula T CD3 com atividade citotóxica inata, dependente de receptores que reconhecem a expressão de ligantes de classe I do antígeno leucocitário humano (HLA), que geralmente tem sua expressão diminuída em células tumorais. O principal obstáculo para a imunoterapia com células NK é a obtenção de número suficiente de células, visto que estas células representam uma pequena fração de células brancas no sangue periférico, propagam-se mal *ex vivo* e possuem expectativa de vida limitada *in vivo*. Células apresentadoras de antígeno artificiais (aAPC) foram desenvolvidas a partir da linhagem celular K562 - eritroleucemia humana -, geneticamente modificada para expressar CD86, 4-1-BBL e IL-21 ligada à membrana. A proliferação de células NK humanas em presença de aAPCs foi padronizada por grupo do *M.D. Anderson Cancer Center* da Universidade do Texas (EUA) em cooperação com nosso grupo. **Objetivo:** Investigar a expansão das células NK em resposta a aAPC, validando métodos para cultivo e controle de qualidade de acordo com as boas normas de manufatura (*GMP*) para sua aplicação em ensaio clínico para o tratamento de LMA. **Metodologia:** Células NK são obtidas através de sangue periférico de doadores haploidênticos após consentimento. Primeiramente realiza-se o isolamento das células da camada mononuclear de sangue periférico (PBMC) através de separação por gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque). PBMC obtidas são co-cultivadas com aAPC irradiadas na proporção de 2:1 (aAPC:PBMC). As culturas são mantidas em RPMI1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100 UI/mL de IL-2 humana recombinante, com reposição de meio conforme necessário. As culturas são mantidas em incubadora sob condições controladas de temperatura (37 °C) e pressão de CO<sub>2</sub> (5 %). Após 7 dias, as células CD3<sup>+</sup> remanescente são removidas através do sistema Miltenyi, utilizando-se esferas imunomagnéticas anti CD3. As culturas purificadas são reestimuladas com aAPC em uma proporção de 1:1 nos dias 7 e 14. O controle de qualidade compreende testes de viabilidade, imunofenotipagem (citometria de fluxo), citotoxicidade contra alvo HLA-I<sup>neg</sup> (ensaio de liberação de cromo) e testes para verificar a presença de microrganismos e contaminantes (BacT/Alert, Micoplasma, Endotoxina). Células aprovadas em todos os testes de controle de qualidade são criopreservadas para posterior infusão de acordo com protocolos clínicos. **Resultados:** Utilizando esse método, obtivemos uma expansão numérica de 10.000 vezes (n=5), variando de 3500 a 77000, em 21 dias. As células cultivadas apresentaram um fenótipo de >95% CD3<sup>-</sup> e CD56/CD16<sup>+</sup>. No teste de citotoxicidade as NK lisaram, em média, 50.2% (±6,02) dos alvos. **Considerações:** Há uma grande variabilidade na capacidade de expansão das células NK de diferentes doadores, porém essa variação também pode ser devido ao processo de produção. Nosso grupo vem trabalhando para otimizar procedimentos operacionais padrão, a fim de diminuir a variabilidade operador-dependente. O uso das aAPC nos permite a expansão de números clinicamente significativos de células NK puras e ativas. Com base nesses dados preliminares, nosso grupo começou a criação de um banco de aAPC de grau clínico que serão utilizadas na expansão de células NK para tratamento de LMA.