

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE CÉLULAS *NATURAL KILLER* (NK) E EXPRESSÃO DE ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO G solúvel (sHLA-G) NA MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA AO DIAGNÓSTICO

Filipe Sehn

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE CÉLULAS *NATURAL KILLER* (NK) E EXPRESSÃO DE ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO G SOLÚVEL (SHLA-G) NA MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA AO DIAGNÓSTICO

Filipe Sehn

Orientadora:

Prof^a Dr^a Lucia Mariano da Rocha Silla

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

Porto Alegre

2017

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Avaliação do Perfil Fenotípico de Células Natural Killer (NK) e Expressão de Antígeno Leucocitário Humano G solúvel (sHLA-G) na Medula Óssea de Pacientes com Leucemia Mieloide Aguda ao Diagnóstico* elaborada por Filipe Sehn, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina: Ciências Médicas.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dra. Maria Lúcia Scroferneker – PPGCM/UFRGS

Prof. Dr. Ricardo Xavier – PPGCM/UFRGS

Prof^a. Dra. Bruna Amorin - UNIRITTER

Dra. Ana Paula Alegretti – HCPA/UFRGS

Resumo

As células *Natural Killer* (NK) são células efetoras imunes inatas envolvidas, principalmente, na vigilância imunológica e eliminação espontânea, sem necessidade de sensibilização prévia de células malignamente transformadas que exibem receptores de estresse ou baixa expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I. Diversos estudos clínicos exploram a expressão de receptores e a atividade citotóxica de células NK em malignidades hematológicas, visando estabelecer o potencial citotóxico destas células e maximizar a elucidação de seus mecanismos de ativação e inibição em ambientes imunossupressores. Descobertas recentes na biologia molecular e celular das células NK apontam diferentes receptores de superfície relacionados a ligantes imunossupressores, dentre os quais destaca-se o Antígeno Leucocitário Humano G solúvel (sHLA-G), uma molécula de MHC classe I não clássica cuja atividade supressora de células efetoras imunitárias é exercida devido a interações com receptores ILT2, ILT4 e KIR2DL4. Estes receptores são expressos principalmente em células NK, linfócitos T CD8+ e monócitos. O sHLA-G desempenha um papel importante no desenvolvimento de tolerância em transplantes de órgãos e medula óssea, estando também envolvido na modulação da resposta imune durante a carcinogênese. Neste contexto, esse estudo teve como objetivo avaliar o nível de sHLA-G na medula óssea (MO) de pacientes ao diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda (LMA), estabelecer o perfil de expressão fenotípica das células NK com ênfase em receptores para sHLA-G e estudar aspectos relacionados à imunomodulação a partir da dosagem de citocinas. Os resultados mostraram uma frequência significativamente menor de células NK na medula óssea dos pacientes com LMA em comparação com doadores saudáveis (4,25% vs 7,18%, $p < 0,001$). Quando comparada a MO normal com a medula de pacientes com LMA, nesta última houve uma maior frequência de células NK CD56^{dim} CD16⁺ (90,47% vs 78,71%, $p = 0,007$), menor frequência dos subconjuntos de células NK CD56^{dim} CD16⁻ (7,51% vs 17,24%, $p < 0,010$) e células NK CD56^{Bright} (2,00% vs 4,93%, $p < 0,014$). Quanto aos níveis de IL-6, IL10 e TNF- α , na MO dos pacientes com LMA, estes foram significativamente maiores em comparação com doadores saudáveis. Tal conhecimento permite estabelecer e identificar processos biológicos relevantes para a patogênese da LMA de acordo com a influência sobre o potencial citotóxico de células NK. A caracterização molecular do microambiente permissivo ao desenvolvimento da LMA pode contribuir para a construção de moléculas modificadoras deste ambiente tornando-o adverso ao desenvolvimento da neoplasia.

Palavras chave: Células NK, sHLA-G, LMA, Imunomodulação, Microambiente Tumoral, Citocinas.

Abstract

Natural Killer (NK) cells are innate immune effector cells mainly involved in immunosurveillance and spontaneous elimination of malignantly transformed cells exhibiting low expression of the major histocompatibility complex (MHC) Class I, without prior sensitization. Several clinical studies explore the expression of receptors and the cytotoxic activity of NK cells in hematologic malignancies, to establish the cytotoxic potential of these cells and maximize the elucidation of their mechanisms of activation and inhibition in immunosuppressive environments. Recent discoveries in the molecular and cellular biology of NK cells point to different surface receptors related to immunosuppressive ligands, such as soluble human leukocyte antigen G (sHLA-G), a non-classic MHC class I molecule with suppressive activity immune effector cells and exerted due to interactions with ILT2, ILT4 and KIR2DL4 receptors. These receptors are expressed primarily in NK cells, CD8⁺ T lymphocytes and monocytes. sHLA-G plays an important role in the development of tolerance in organ and bone marrow transplants and is also involved in the modulation of the immune response during carcinogenesis. In this context, this study aimed to evaluate the level of sHLA-G in the bone marrow (BM) of patients at diagnosis of acute myeloid leukemia (AML), to establish the NK cells phenotypic expression profile of NK cells with emphasis on sHLA-G receptors, and to study aspects related to immunomodulation from the cytokine dosage. The results showed a significantly lower frequency of NK cells in the bone marrow (BM) of AML patients when compared to the healthy bone marrow donors (4.25% vs. 7.18%, $p < 0.001$). When comparing the normal BM with AML BM, in the latter there was a higher frequency of CD56^{dim} CD16⁺ NK cells (90.47% vs. 78.71%, $p = 0.007$); lower frequency of CD56^{dim} CD16⁻ NK cells (7.51% vs. 17.24%, $p < 0.010$) and CD56^{Bright} NK cells subsets (2.00% vs. 4.93%, $n = 10$, $p < 0.014$). As for IL-6, IL10 and TNF- α levels, in AML BM, they increased significantly compared with healthy donors. Such knowledge allows to establish and identify relevant biological processes to the pathogenesis of AML according to the influence on the cytotoxic potential of NK cells. The molecular characterization of the permissive microenvironment to the development of AML may contribute to the construction of modifying molecules of this environment, making it adverse to the development of neoplasia.

Keywords: NK cells, sHLA-G, AML, Immunomodulation, Tumor microenvironment, Cytokines.

*“There is no greatness where there is no simplicity, goodness and truth”.
(Liev Nikoláievich Tolstói)*

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos...

Primeiramente a Deus, por tudo.

Aos meus pais, Carlos e Ionice, e a minha irmã, Letícia, pelo amor, apoio e compreensão.

À minha namorada Cláudia, pelo amor, apoio, paciência e compreensão.

À Professora Lucia Silla, por todos os ensinamentos e orientação.

Aos meus amigos do “eterno” Laboratório de Cultura e Análise Molecular de Células Humanas, especialmente, Vanessa Valim e Alice Dahmer, pela ajuda e companheirismo nesta jornada.

Aos profissionais do Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por contribuírem para realização deste trabalho.

Aos profissionais da Unidade de Diagnóstico Personalizado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente, Fabiane Spagnol, por toda paciência e boa vontade nos ensinamentos sobre citometria de fluxo.

Aos profissionais do Laboratório de Criobiologia e Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Hospital de clínicas de Porto Alegre, especialmente, Juliana Furlan, pelo fundamental apoio na aquisição de amostras.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, pela contribuição para a minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução	1
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	5
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	5
2.2 Leucemias Agudas	6
2.2.1 Fisiopatologia e Epidemiologia	6
2.2.2 Leucemia Mieloide Aguda: Alterações Citogenéticas e Moleculares.....	8
2.3 Célula <i>Natural Killer</i>	9
2.3.1 Ontogenia	9
2.3.2 Fisiologia e Função.....	11
2.3.3 Fenótipo.....	12
2.3.4 Receptores.....	13
2.3.5 Receptores de Ativação	14
2.3.6 Receptores de Inibição	16
2.3.7 “Licenciamento” (Licensing)	17
2.3.8 Genotipagem KIR	18
2.4 Antígeno Leucocitário Humano G solúvel (sHLA-G).....	21
2.4.1 Caracterização	21
2.4.2 Receptores de sHLA-G	23
2.4.3 Ação do HLA-G em células NK	26
2.5 Microambiente Medular	27
2.5.1 Medula Óssea e Hematopoese.....	27
2.5.2 Microambiente em Neoplasias Hematológicas.....	28
2.5.3 Microambiente e Células NK	29
Capítulo 3 – Justificativa	32
Capítulo 4 – Objetivos	34
4.1 Objetivo Primário	34
4.2 Objetivos Secundários.....	34
Referências	36
Capítulo 5 – Artigo Científico	48
Capítulo 6 – Considerações Finais	68
Capítulo 7 – Perspectivas Futuras	70
Anexos	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Resultados de buscas nas bases de dados SciELO e PubMed.	6
Figura 2.2. Representação esquemática dos estágios celulares intermediários no desenvolvimento de células NK humana (Yu <i>et al.</i> , 2013).	11
Figura 2.3. Subtipos de células NK humanas. Fonte: (Cooper <i>et al.</i> , 2001).	12
Figura 2.4. Receptores de superfície e os seus ligantes.	14
Figura 2.5. Genótipo KIR e a função do receptor.	21
Figura 2.6. Funções imunes inibitórias do HLA-G.	23
Figure 7. Percentages of CD56 ⁺ NK cells among the CD45 ^{bright} cells in the bone marrow of AML patients and healthy donors (HDs) are shown. Each dot represents a single AML patient or HD. Lines indicate the median and interquartile range of positive cells detected in all patients and donors analyzed ($p < 0.001$).	55
Figure 8. Expression of NKG2D, CD160 and KR2DL1 receptors in terms of surface density by median fluorescence intensity (MFI) on NK cells from bone marrow blood samples of AML patients and HDs ($p < 0.05$).	55
Figure 9. CD8 ⁺ NK cells frequency detected by flow cytometry. Significant difference in CD8 ⁺ expression on NK cells between AML patients and HDs ($p = 0,019$).	56
Figure 10. Soluble sHLA-G levels in the BM plasma samples of AML patients (closed circles) and HDs (open circles). The concentration of sHLA-G (shed HLA-G1 and HLA-G5) was evaluated using specific sandwich ELISA. Results are expressed as arbitrary units (U)/mL of sHLA-G. Mann-Whitney U test reveals no significant difference in sHLA-G levels between patients and controls ($p = 0.153$).	58
Figure 11. Plasma levels of IL-6 in the bone marrow of AML patients compared with those of HDs. The concentration was expressed in pg/mL and for healthy donors the values are related to the secondary axis. A significant increase of IL-6 level on AML patients was established ($n = 6$) compared to that in controls ($n = 4$), according to Mann-Whitney U test ($p = 0.008$).	59
Figure 12. Plasma levels of IL-10 in the bone marrow of AML patients compared with those of HDs. The concentration was expressed in pg/mL and for healthy donors the values are related to the secondary axis. A significant increase of IL-10 level on AML patients was established ($n = 5$) compared to that in controls ($n = 4$), according to Mann-Whitney U test ($p = 0.011$).	59
Figure 13. Plasma levels of TNF- α in the bone marrow of AML patients compared with those of HDs. The concentration was expressed in pg/mL and for healthy donors the values are related to the secondary axis. A significant increase of TNF- α level on AML patients was established ($n = 6$) compared to that in controls ($n = 4$), according to Mann-Whitney U test ($p = 0.010$).	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Classificação da Organização Mundial da Saúde, 2016, para as leucemias mieloides agudas. ¹	8
Tabela 2.2: Receptores de HLA-G e Funções Associadas. ¹	24

NOTAÇÃO E SIMBOLOGIA

ADCC	citotoxicidade celular dependente de anticorpos (antibody-dependent cellular cytotoxicity)
Alo-TCTH	transplante de células-tronco hematopoéticasallogênico
APC	célula apresentadora de antígenos (antigenpresentingcell)
CD	cluster of differentiation
CLP	célula progenitora comum da linhagem linfóide (common lymphoid progenitor)
CMP	célula progenitora comum da linhagem Mieloide (CMP, commonmyeloid progenitor)
CT	célula-tronco
CTA	célula-tronco adulta
CTE	célula-tronco embrionária
CTH-CP	células-tronco hematopoéticas de curto prazo
CTH-LP	células-tronco hematopoéticas de longo prazo
CTH	célula-tronco hematopoética
CTM	célula-tronco mesenquimal
DC	célula dendrítica (dendriticcell)
DECHa	doença do enxerto-contra-hospedeiro aguda
DLA	antígeno leucocitário canino (dogleucocyteantigen)
EVL	efeito enxerto-versus-leucemia
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1
G-CSF	fator de estimulação de colônia de granulócito (<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>)
GM-CSF	fator de estimulação de colônia de macrófago e granulócito (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HLA	antígeno leucocitário humano (<i>human leukocyte antigen</i>)
IFN- γ	interferon gama
IL-3	interleucina3
IL-6	interleucina6
IL-1 β	interleucina1 beta
KIR	receptor KIR (killer immunoglobulin-like receptor)
LMA	leukemia Mieloide aguda
MHC	complexo de histocompatibilidade principal (major histocompatibilitycomplex)
MHC-I	complexo de histocompatibilidade principal classe I
MO	medula óssea
NK	células <i>Natural Killer</i>
PCR	polymerase chain reaction
STR	short tandem repeat
TCTH	transplante de células-tronco hematopoéticas
TGF- β	fator de transformação de crescimento beta (transforminggrowthfactor beta)
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa (tumor necrosisfactor alpha)

Capítulo 1 – Introdução

O sistema imunológico tem sido intensamente estudado há muitos anos em diferentes neoplasias, por desempenhar um papel fundamental na eliminação de células malignas, de acordo com a hipótese de imunovigilância do microambiente tumoral (Burnet, 1957; Green e Anthony, 1963; Dunn *et al.*, 2004).

Diferentes estudos demonstraram padrões infiltrativos específicos de linfócitos, macrófagos e granulócitos em carcinomas de mama, pulmão, trato gastrointestinal e ovário, bem como sarcomas e câncer de pele. Em muitos casos, estas infiltrações estão associadas com prognósticos específicos em pacientes (Gajewski *et al.*, 2013; Wu, 2017).

Estes achados, correlacionados com outros estudos, apoiam uma íntima inter-relação entre subconjuntos celulares do sistema imunológico e o desenvolvimento e progressão do câncer. Estudos funcionais em modelos murinos, bem como terapias imunomoduladoras em humanos, também apoiam estas observações (Swann e Smyth, 2007; Zitvogel, 2008; Alcasid *et al.*, 2017).

Em neoplasias hematológicas, a compreensão do papel do sistema imunológico é uma área de contínua pesquisa. Estudos recentes sobre linfomas mostram que células T, macrófagos e células *Natural Killer* (NK) podem desempenhar um importante papel funcional de imunovigilância em linfoma folicular, linfoma de Hodgkin clássico e linfoma difuso de grandes células B (Carreras *et al.*, 2009; Muenst *et al.*, 2009; Wada *et al.*, 2012; Danielou-Lazareth *et al.*, 2013; Shafer *et al.*, 2013).

Na leucemia aguda e, em particular, no caso da Leucemia Mieloide Aguda (LMA), foi dada especial atenção às células NK com vários estudos que identificam as ligações funcionais entre a atividade de células NK e a progressão da LMA (Fauriat *et al.*, 2007; Lion *et al.*, 2012; Khaznadar *et al.*, 2014; Sullivan *et al.*, 2014).

As células NK, como agentes centrais do sistema imune inato, podem exercer efeitos antitumorais diretos no microambiente neoplásico, através da sua capacidade citotóxica ou também através da secreção de citocinas, que indiretamente contribui para o controle do tumor, apoiando o desenvolvimento de um sistema antitumoral adaptativo (Lion *et al.*, 2012; Ansell e Vonderheide, 2013).

Não obstante, as células leucêmicas podem escapar da vigilância imune de células NK através de uma série de mecanismos, que contribuem para uma resposta imune antileucêmica disfuncional: (1) anormalidades das células NK; (2) propriedades imunossupressoras e evasivas das células tumorais; (3) interações com outras células imunossupressoras; e (4) imunomoulação por agentes integrantes do microambiente tumoral. (Lowdell *et al.*, 2002; Lion *et al.*, 2012; Alcasid *et al.*, 2017)

Entretanto, as interações entre os vários componentes do microambiente tumoral configuram o mais representativo dos elementos envolvidos no crescimento e manutenção de células neoplásicas, bem como na interferência dos mecanismos de imunovigilância, onde células imunes que integram o microambiente sofrem um processo de imunomodulação favorável à progressão tumoral (Lion *et al.*, 2012).

Foram descritos três estágios para imunomodulação exercida pelo microambiente tumoral: (1) recrutamento das células imunes via produção de citocinas (proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e interleucina-8 (IL-8)); (2) imunomodulação via secreção de citocinas que regulam a diferenciação de células imunes no sentido de proteger o tumor (mediadores pró-inflamatórios tais como IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fator inibitório da migração de macrófagos (MIF)) e proteínas supressoras solúveis atuantes como mediadores anti-inflamatórios, tais como antígeno leucocitário humano G solúvel (sHLA-G, do inglês, *soluble Human Leukocyte Antigen G*), IL-10 e prostaglandina E2 (PGE2); (3) resposta imune, em que as células imunes

diferenciadas geram citocinas, hormônios e fatores de crescimento, agentes promotores de proliferação tumoral e tolerância imune ao tumor (Coussens e Werb, 2002; Chen *et al.*, 2007; Whiteside, 2008; Cruz e Balkwill, 2015).

Dentre os diferentes elementos presentes no microambiente, o HLA-G vem sendo amplamente avaliado no contexto da imunomodulação tumoral onde atua como um regulador negativo da resposta imune através de diferentes mecanismos, incluindo inibição da angiogênese, restrição do reconhecimento de antígenos e da migração de células T e supressão da citotoxicidade de células T e NK (Rouas-Freiss *et al.*, 2003; Rouas-Freiss *et al.*, 2007; Amiot *et al.*, 2011; Locafaro *et al.*, 2014).

O HLA-G é um antígeno do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I não-clássico, de distribuição restritiva e baixo polimorfismo. Por *splicing* alternativo, o gene codificante do HLA-G gera sete isoformas de transcrição que codificam quatro isoformas de proteínas ligadas à membrana (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 e HLA-G4) e três isoformas solúveis (sHLA-G5, sHLA-G6 e sHLA-G7) (Ramos *et al.*, 2014; Carosella *et al.*, 2015). As isoformas de HLA-G solúvel são encontradas nos fluidos corporais, tais como plasma, fluido cerebrospinal, ascites malignas, derrame pleural e esperma (Hunt e Geraghty, 2005; Ivanova-Todorova *et al.*, 2009; Zilberman *et al.*, 2012; Morandi *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2014). Tanto as isoformas solúveis quanto às ligadas à membrana podem ser detectadas em patologias tumorais como melanomas, câncer de mama, carcinomas pulmonares, renais, gliomas, linfomas e leucemias (Ibrahim *et al.*, 2001; Urosevic *et al.*, 2001; Lefebvre *et al.*, 2002; Urosevic *et al.*, 2002; Wiendl *et al.*, 2002; Rouas-Freiss *et al.*, 2007).

O papel imunomodulador do HLA-G é bem conhecido no contexto da gravidez, bem como durante reações imunes através de interações com receptores inibitórios. O HLA-G1 demonstrou inibir a atividade citotóxica de células NK, bem como por células T CD8+ através de interações diretas com receptores ILT-2 e KIR2DL4 ou através de interações indiretas com CD94/NKG2A após a indução da expressão de HLA-E (Rouas-Freiss, Goncalves, *et al.*, 1997; Rouas-Freiss, Marchal, *et al.*, 1997; Rouas-Freiss *et al.*, 2005; Locafaro *et al.*, 2014). Além disso, as isoformas de sHLA-G parecem ser capazes de induzir apoptose de células T CD8+ através da ligação com receptores CD8, uma característica compartilhada com moléculas solúveis de HLA de classe I clássicas, de acordo com alguns autores (Contini *et al.*, 2003; Le Rond *et al.*, 2004; Amiot *et al.*, 2011; Biedron *et al.*, 2015).

O HLA-G1 e o HLA-G5 também são capazes de inibir a proliferação alogênica de células T e interferir na ativação de células T CD8+ imaturas. As proteínas solúveis parecem ser mais frequentemente expressas do que isoformas ligadas à membrana em malignidades hematológicas, como demonstrado para distúrbios linfoproliferativos (Le Friec *et al.*, 2003; Sebti *et al.*, 2003; Le Rond *et al.*, 2004; Gros *et al.*, 2006; Carosella *et al.*, 2015).

Mais recentemente, demonstrou-se que a expressão de HLA-G por blastos circulantes na LMA e Leucemia Mieloide Crônica (LMC), foi fortemente associada a desfecho desfavorável da doença (Nuckel *et al.*, 2005; Rebmann *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2008). Além disso, correlações prognósticas entre os níveis plasmáticos de HLA-G solúvel e LMA, Leucemia Linfóide Aguda (LLA) e Leucemia Linfóide Crônica (LLC) foram propostas. (Gros *et al.*, 2006; Polakova *et al.*, 2013; Locafaro *et al.*, 2014).

Diante do que foi exposto, este estudo busca contribuir para a elucidação de aspectos relacionados ao fenótipo de células NK e à presença de sHLA-G no microambiente medular da LMA.

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

Este capítulo contém uma abordagem teórica dos principais tópicos necessários como base para o desenvolvimento deste trabalho. O capítulo está subdividido em 5 seções que abordam os aspectos relevantes em leucemias agudas, medula óssea, a célula *Natural Killer*, o sHLA-G e o microambiente tumoral.

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura está focada nos efeitos imunológicos do Antígeno Leucocitário Humano G solúvel no microambiente tumoral da leucemia mielóide aguda e especialmente sobre células NK. Também focou-se na ontogenia e perfil imunofenotípico de células NK, receptores para sHLA-G e interleucinas imunomodulatórias. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: SciELO e PubMed. Foram realizadas buscas através dos termos “*Natural Killer*”, “*soluble HLA-G*”, “*Acute Myeloid Leukemia*”, “*Tumour Microenvironment*”, “*Immunomodulatory Interleukins*” e suas combinações, como apresentadas na Figura 2.1.

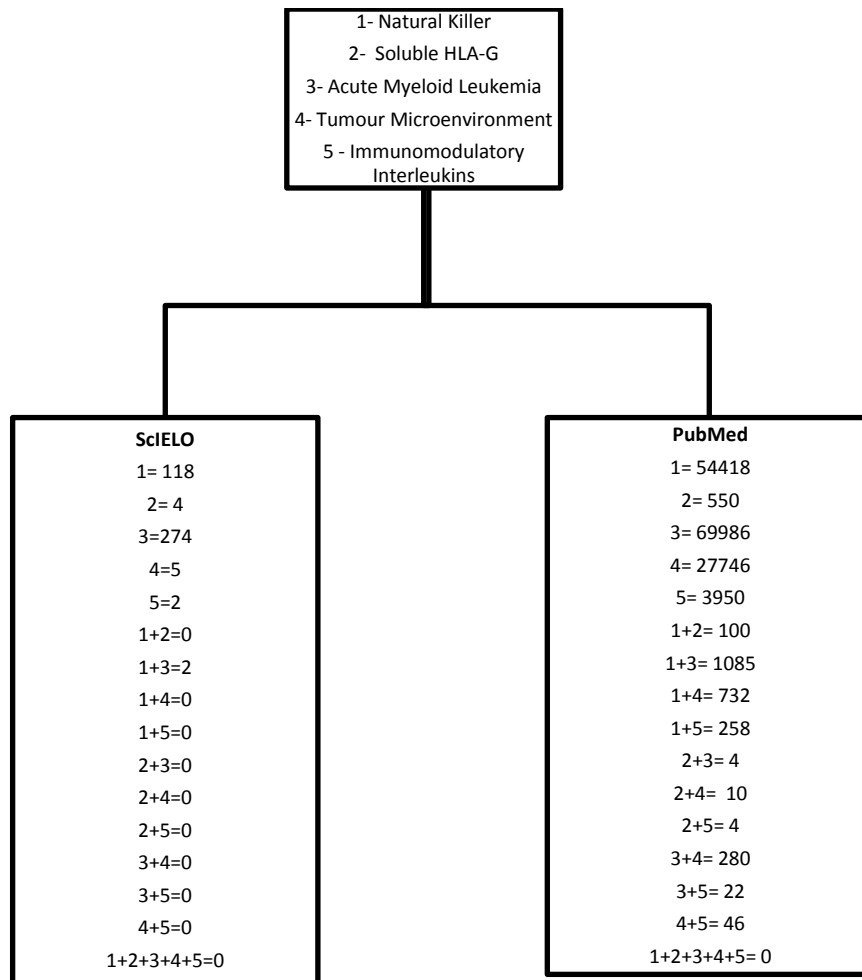


Figura 2.1. Resultados de buscas nas bases de dados SciELO e PubMed.

2.2 Leucemias Agudas

2.2.1 Fisiopatologia e Epidemiologia

Clínica e patologicamente, a leucemia é subdividida em duas formas: aguda e crônica. A leucemia aguda é caracterizada por uma ampliação rápida do número de células imaturas do sangue, ocasionada pelo aumento da velocidade de produção, diminuição da apoptose e bloqueio na diferenciação celular em células-tronco da hematopoese ou em progenitores primitivos. Juntos, estes eventos fazem com que a medula óssea (MO) seja incapaz de produzir células sanguíneas saudáveis, causando um acúmulo de células hematopoiéticas primitivas e neoplásicas, chamadas células blásticas ou apenas blastos (Hoffbrand e Moss, 2016).

A leucemia aguda, de acordo com o tipo celular afetado é classificada em Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), causada pelo acúmulo de linfoblastos na MO, e Leucemia Mieloide Aguda (LMA), que tem origem nas células granulocíticas e monocíticas. A LLA é o tipo de câncer mais comum na infância (Hoffbrand e Moss, 2016).

A mieloide é a forma mais comum de leucemia aguda em adultos e sua incidência aumenta com a idade, com mediana aos 65 anos. Constitui uma fração pequena (10 a 15%) das leucemias na infância. As anomalias citogenéticas e a resposta ao tratamento inicial têm grande influência no prognóstico (Hoffbrand e Moss, 2016).

Nas últimas décadas, houve uma significativa avanço no tratamento das leucemias, porém, em virtude das diferenças no acesso ao tratamento, observa-se uma considerável diferença entre populações com relação à sobrevida. Para os adultos, as maiores sobrevidas relativas em cinco anos (cerca de 60%) são observadas em países da América do Norte, Oeste da Ásia, Europa e Oceania. Já para as leucemias infantis, a sobrevida é bem maior, chegando a mais de 90% em lugares como Áustria, Bélgica, Canadá, Alemanha e Noruega. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, foram estimados cerca de 352 mil novos casos e 265 mil óbitos por leucemia no mundo para o ano de 2012 (Ervik *et al.*, 2017).

No Brasil, para o período de 2000 a 2005, a sobrevida relativa em cinco anos de leucemia em adultos foi de 20%. Para as leucemias infantis, a sobrevida, no mesmo período, chega a 70% (Inca, 2015). Segundo estimativa de incidência de leucemia no Brasil, no ano de 2016, houve 5.540 novos casos em homens e 4.530 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,63 casos novos para cada 100 mil homens e 4,38 para cada 100 mil mulheres (Inca, 2015).

No Brasil, sem considerar os tumores de pele não melanoma, a leucemia em homens é a sexta neoplasia mais frequente na Região Norte (3,81/100 mil). Nas Regiões Sudeste (6,03/100 mil) e Nordeste (4,41/100 mil), ocupa a nona posição. Na Região Sul (8,55/100 mil), ocupa a décima posição. Na Região Centro-Oeste (4,38/100 mil), ocupa a 11ª posição. Para as mulheres, é o sétimo mais frequente na Região Norte (3,01/100 mil) e o oitavo na Região Sul (6,62/100 mil). Na Região Nordeste (3,71/100 mil), ocupa a décima posição. É o 11º mais frequente na Região Centro-Oeste (3,62/100 mil), e, na Região Sudeste (4,45/100 mil), ocupa a 12ª posição (Inca, 2015).

2.2.2 Leucemia Mieloide Aguda: Alterações Citogenéticas e Moleculares

As leucemias mieloides agudas (LMAs) são um grupo heterogêneo de doenças neoplásicas com grande variabilidade no curso clínico e resposta terapêutica, assim como em sua base genética e molecular, onde mais de 300 translocações cromossômicas e mutações gênicas já foram descritas (Hoffbrand e Moss, 2016). Estima-se que mais de um evento mutagênico seja necessário para a gênese da doença, envolvendo mecanismos de proliferação celular (mutações de classe I, como por exemplo, BCR-ABL, FLT3, RAS, c-Kit, PTPN11, NF1, TEL-PDGR β) e bloqueio da diferenciação (mutações de classe II, como por exemplo, CBF β -MYH11, AML1-ETO, TEL-AML1, PML-RARA, MLL, NUP98-HOXA9, PU.1, C/CEP α , AML1, AMLAMP19, CEBPA, NPM1) (Reilly, 2005; Renneville *et al.*, 2008; Arber *et al.*, 2016).

Estudos têm demonstrado que as LMAs com cariótipo normal e mutação nos genes NPM1 e/ou CEBPA possuem prognósticos favoráveis, enquanto que mutações no gene FLT3 possuem prognóstico desfavorável. Já os casos em que ocorrem mutações simultâneas nos genes FLT3 e NPM1, possuem prognóstico intermediário (Velloso *et al.*, 2011; Dovey *et al.*, 2017).

Baseando-se nesses conhecimentos, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2016, na atualização da quarta edição do “*WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*”, classificou a LMA em vários grupos, incluindo as LMAs com anormalidades genéticas recorrentes, que abrangem onze subtipos sendo dois deles entidades ainda provisórias, como exposto na Tabela 2.1 (Arber *et al.*, 2016).

Tabela 2.1: Classificação da Organização Mundial da Saúde, 2016, para as leucemias mieloides agudas.¹

Leucemia mieloide aguda (LMA) e neoplasias relacionadas
LMA com anormalidades genéticas recorrentes
LMA com t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1
LMA com inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11
LPA com PML-RARA
LMA com t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A
LMA com t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214
LMA com inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
LMA (megacariótica) com t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1
Entidade Provisória: LMA com BCR-ABL1

LMA com NPM1 mutado
LMA com mutações bialélicas de CEBPA
Entidade Provisória: LMA com RUNX1 mutado
LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia
Neoplasmas mieloides relacionados à terapia
LMA, não especificada
LMA com mínima diferenciação
LMA sem maturação
LMA com maturação
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monoblástica/monocítica aguda
Leucemia eritróide pura
Leucemia megacariótica aguda
Leucemia basofílica aguda
Panmielose Aguda com Mielofibrose
Sarcoma mieloide
Proliferações mieloides relacionadas à síndrome de Down
Síndrome Mieloproliferativa Transitória (SMT)
Leucemia mieloide associada à síndrome de Down

¹Adaptado de Arber et al. (2016).

2.3 Célula *Natural Killer*

2.3.1 *Ontogenia*

Durante o desenvolvimento intra-uterino, a hematopoiese ocorre no saco vitelino. No entanto, durante a vida pós-natal, passa a ocorrer na MO e, tradicionalmente, pensava-se que a diferenciação e maturação das células NK também ocorresse principalmente neste mesmo sítio, pois a ablação seletiva da MO de camundongos interrompia o desenvolvimento de células NK (Fraser e Baron, 2009).

Embora subconjuntos de células estromais e células progenitoras derivadas da MO possam produzir as citocinas necessárias e apoiar o desenvolvimento de células NK a partir de Células Tronco Hematopoéticas (CTHs) humanas, não há evidência definitiva que exclua a possibilidade de maturação de células NK extramedulares (Yu *et al.*, 2013).

De fato, as citocinas que podem suportar o desenvolvimento de células NK *in vitro*, incluindo FL (*flt3 ligand*), KL (*c-kit ligand*), IL-7 e IL-15, são produzidas por células estromais derivadas de fígado humano, baço e órgãos linfóides secundários (Drexler e Quentmeier, 2004; Link *et al.*, 2007; Freud *et al.*, 2014). Além disso, monócitos, células dendríticas e células T também podem produzir IL-15 e/ou IL-2 (Dubois *et al.*, 2002; Budagian *et al.*, 2004; Miranda-Carus *et al.*, 2005). Assim, cada uma dessas populações celulares, normalmente presentes em órgão e tecidos extramedulares, podem atuar no

desenvolvimento de células NK *in vivo*. Curiosamente, dados recentes sugerem que neutrófilos também podem ser necessários para o desenvolvimento de células NK (Jaeger *et al.*, 2012).

As células NK apresentam diferentes estágios de desenvolvimento, com perfis fenotípicos específicos. Diferentes células NK, em estágios intermediários de maturação, foram identificadas em órgãos linfóides secundários humanos com evidência de que a maturação contínua de células NK *in situ* provavelmente ocorre de forma progressiva com aquisição e perda de antígenos, semelhante ao observado no desenvolvimento de células B e T na MO e timo, respectivamente. Esses dados fornecem um forte suporte para um modelo pelo qual células em estágios intemediários de maturação, oriundas da MO, iniciem um tráfego precoce através do sangue e se desenvolvam em células NK maduras dentro de órgãos linfóides secundários (Freud e Caligiuri, 2006; Freud *et al.*, 2014)

Com base na expressão dos marcadores CD34, CD94 e CD117, a maturação das células NK humanas pode ser dividida em cinco estágios e um sexto estágio representativo de células NK de memória, as quais compõem um possível estágio terminal de maturação, como ilustrado na Figura 2.2 (Yu *et al.*, 2013). O desenvolvimento de células NK de memória até o momento apresenta pelo menos três rotas distintas de formação conforme descritas por Min-Oo *et al* (2013).

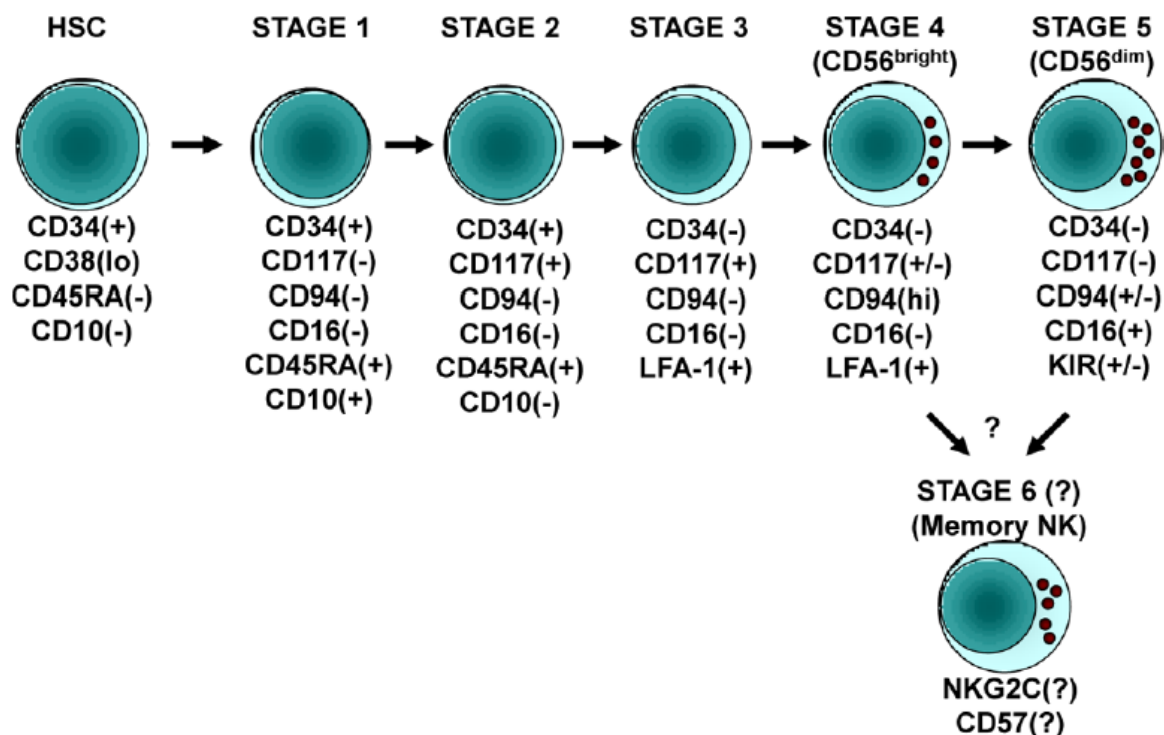


Figura 2.2. Representação esquemática dos estágios celulares intermediários no desenvolvimento de células NK humana (Yu *et al.*, 2013).

2.3.2 Fisiologia e Função

As células NK são linfócitos efetores inatos que reconhecem e eliminam, através de lise celular, células infectadas por vírus e células neoplásicas sem sensibilização prévia ou restrição de MHC (Bodduluru *et al.*, 2015). Como todas as populações de leucócitos, as células NK derivam de células tronco hematopoiéticas que residem na MO. Funcionalmente, as células NK são uma fonte importante de citocinas imunorreguladoras e interagem com outras células do sistema imunológico para desencadear uma resposta imune adaptativa ou antígeno-específica (Leung, 2014).

As células NK humanas são uma população heterogênea. Embora todas as células NK humanas de sangue periférico expressem o receptor de ativação CD161 (NKR-P1A), há a identificação de duas populações distintas de células NK humanas baseadas na densidade de expressão de receptores de superfície CD56 (Figura 2.3)(Farag e Caligiuri, 2006).

Cerca de 5% a 15% dos linfócitos no sangue humano são células NK (CD56+, CD3/14/19-), 90% dos quais são CD56^{dim}, com a maioria deles sendo CD16+, que são responsáveis pela imunidade inata precoce e pela citotoxicidade celular dependente de anticorpo (CCDA), sendo células essencialmente citotóxicas e com baixos níveis de produção de citocinas (Ames e Murphy, 2014).

Aproximadamente 10% das células NK de sangue humano são $CD56^{bright}$ e participam na resposta inflamatória tardia (> 16 horas) através da secreção de interferon gama (IFN γ), TNF α , fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e IL-3, caracterizadas pela imunomodulação e elevada produção de citocinas (Leung, 2014).

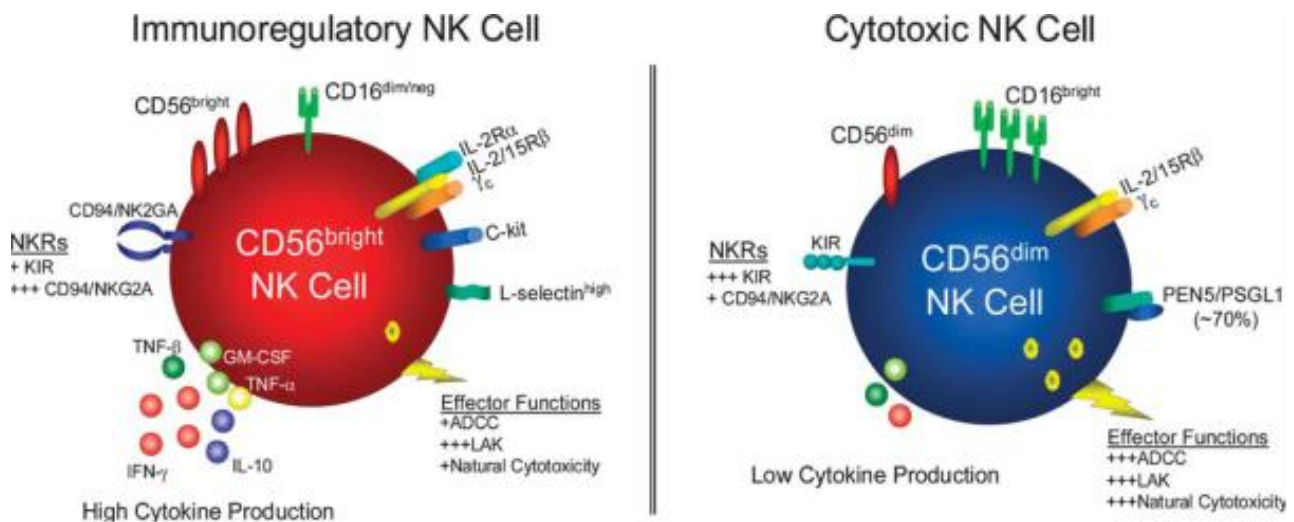


Figura 2.3. Subtipos de células NK humanas. Fonte: (Cooper *et al.*, 2001).

2.3.3 Fenótipo

As células NK humanas são positivamente identificadas pela sua expressão de $CD56$ e falta de marcadores de células T, tais como $CD3$ ou receptor de célula T (TCR). Subconjuntos de NK podem ser adicionalmente descritos em populações $CD56^{bright}$ e $CD56^{dim}$ com base na intensidade relativa dos dados obtidos para $CD56$ em análise por citometria de fluxo (Ames e Murphy, 2014).

Como já ressaltado, as células $CD56^{dim}$ compreendem a maioria das células NK circulantes no sangue. Estas células são altamente citotóxicas, mas produzem menor quantidade de citocinas quando comparadas com células $CD56^{bright}$. Além disso, quase todas as células NK $CD56^{dim}$ expressam moléculas KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptor*), bem como o receptor $Fc\gamma$ (*Fc-gamma receptor*) $CD16$. Estes receptores contribuem para a alta citotoxicidade das células NK $CD56^{dim}$, tornando-as sensíveis a

alvos com baixa expressão de MHC e células ligadas com anticorpos, respectivamente (Leung, 2014).

Por outro lado, as células NK CD56^{bright} compõem uma pequena proporção de células NK circulantes no sangue, mas são encontradas em maior abundância nos gânglios linfáticos. Quando estimuladas, as células CD56^{bright} são pouco citotóxicas mas produzem grandes quantidades de citocinas, principalmente, interferon-gama (IFN- γ). Estas células também possuem carência na expressão de CD16 e KIR, o que pode contribuir para o seu menor potencial citotóxico. Devido à sua presença nos linfonodos e à alta produção de citocinas, acredita-se que as células CD56^{bright} desempenham um papel importante na formulação de respostas imunes, regulando células dendríticas e células T do tipo 1 (Th1) (Magri *et al.*, 2011; Freud *et al.*, 2014).

2.3.4 Receptores

As células NK não realizam rearranjo gênico e criação de receptores de reconhecimento antígeno-específico, mas elas têm a capacidade de reconhecer moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I sobre as células-alvo através de uma única classe de receptores, os receptores KIR, que podem inibir ou ativar a função da célula NK. Receptores KIR inibitórios, possuem uma cauda citoplasmática longa, por isso receberam em sua denominação a letra "L" (*Long*), por exemplo KIR2DL1, já receptores KIR de ativação possuem uma cauda citoplasmática curta, e recebem em sua denominação a letra "S" (*Short*), como por exemplo KIR2DS1. (Malhotra e Shanker, 2011; Mentlik James *et al.*, 2013).

Os receptores KIR para moléculas de auto MHC classe I são cruciais para distinguir células normais de células autólogas transformadas ou infectadas. Neste contexto, investigadores diferentes demonstraram que as células NK podem matar seletivamente as células autólogas que perderam ou apresentam baixa expressão de moléculas de auto MHC classe I próprio (Malhotra e Shanker, 2011; Mentlik James *et al.*, 2013). No entanto, a expressão de MHC classe I não é sempre necessária para evitar a lise por células NK e a inibição por MHC de classe I nem sempre é suficiente para impedir a citotoxicidade NK, pois aspectos relacionados à atividade efetora das células NK são profundamente influenciados pela atuação concomitante dos demais receptores funcionais presentes na membrana celular (Davies *et al.*, 2014; Bodduluru *et al.*, 2015).

Sabe-se que cada célula NK expressa um repertório de receptores ativadores e inibidores. Sua citotoxicidade é regulada pela combinação de receptores de ativação (em particular, de receptores de citotoxicidade naturais NKp46, Nkp30 e NKp44 e a proteína de membrana NKG2D), receptores de superfície celular inibitórios KIR e, principalmente, o receptor heterodimérico tipo lectina C (NKG2A). Estes receptores determinam a atividade das células NK frente às células-alvo e também regulam a produção de citocinas durante a sua fase efetora de ativação (Figura 2.4) (Davies *et al.*, 2014).

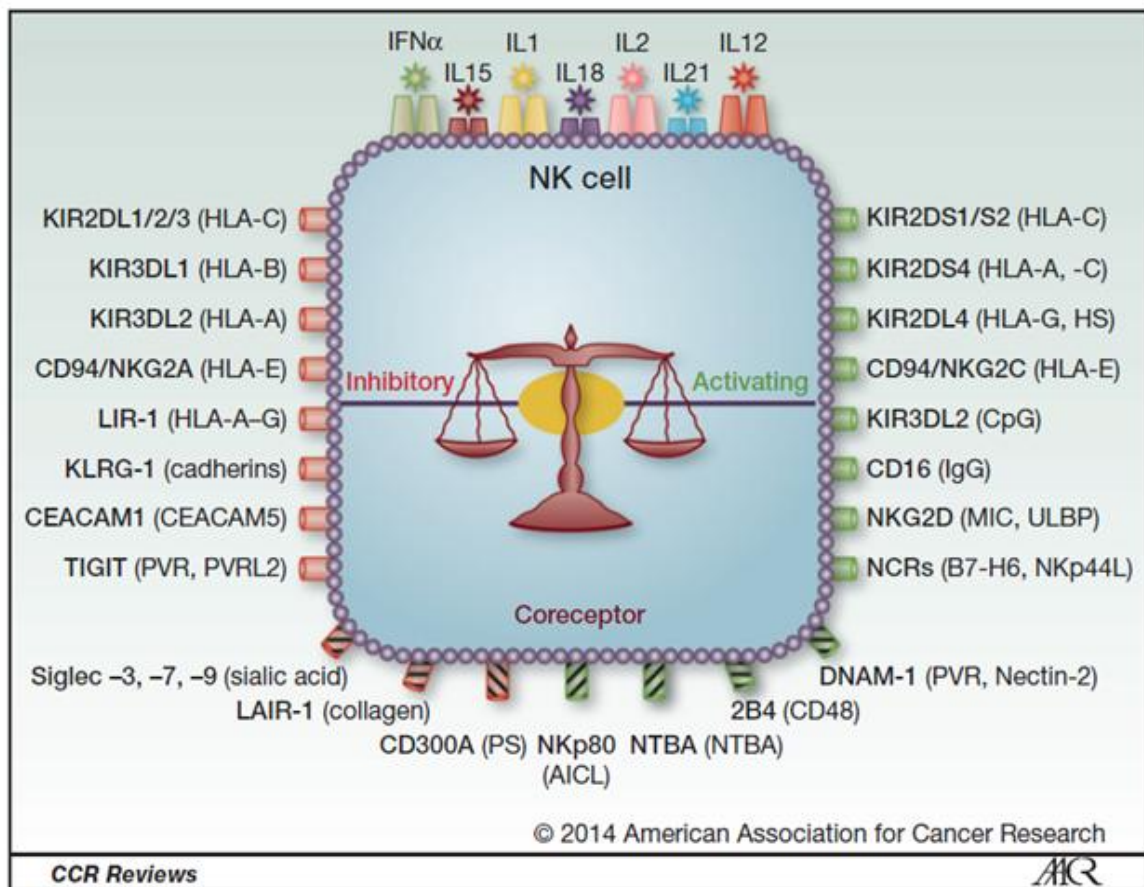


Figura 2.4. Receptores de superfície e os seus ligantes.

Receptores de citocina estão apresentados no topo da ilustração de célula NK humana. Demais receptores são classificados e codificados por cores com base na sua principal função (receptores inibitórios em vermelho, receptores ativadores em verde, co-receptores inibitórios em listras vermelhas e pretas, e co-receptores ativadores em listras verdes e pretas). Os ligantes são mostrados entre parênteses. Muitos outros receptores conhecidos não são mostrados, incluindo receptores quimiotáticos (CCR-2, -5, -7: CXCR-1, -3, -4, -6; CX3CR1; e Chem23R), receptores de adesão (CD2 e integras $\beta 1$ e $\beta 2$), e co-receptores de ativação (CD96, CS1 e TLR) (Leung, 2014).

2.3.5 Receptores de Ativação

Os padrões de expressão de receptores de ativação possuem maior ubiquidade, especialmente em células NK CD56^{dim}. O NKG2D e os receptores de citotoxicidade

naturais (*Natural Cytotoxicity Receptors* - NCRs: NKp30, NKp44, NKp46) são considerados como os principais receptores envolvidos no envio de um sinal de ativação quando as células NK encontram uma célula-alvo em uma sinapse imunológica. No entanto, outros receptores de ativação, tais como DNAM-1, o NKG2C/CD94, 2B4 e uma classe de receptores KIR ativadores também desempenham um papel na ativação de células NK (Ames e Murphy, 2014).

Em contraste com os receptores inibitórios, co-receptores associados com as proteínas acima citadas expressam Imunorreceptores Ativadores Baseados em Tirosina (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs* - ITAMs) para transmitir um sinal de ativação. Os ligantes para muitos receptores de ativação NK são moléculas MHC-Ib que se apresentam aumentados durante períodos de estresse celular. Por exemplo, os ligantes para NKG2D do tipo MIC-A/B, bem como a família de proteínas de ligação UL16 (*UL16-binding protein* – *ULBP16*) podem estar aumentados durante períodos de rápida proliferação (Jung *et al.*, 2012; Aggarwal *et al.*, 2016).

Os ligantes para o NKp30 são expressos em células sob estresse e os ligantes para o BAT-3 e o B7-H6 são expressos em células transformadas. O receptor NKp30 também reconhece o antígeno de citomegalovírus pp65. Entretanto, para o NKp44 foi demonstrada afinidade de ligação para glicoproteínas de envelope do vírus do Oeste do Nilo (WNV, do inglês *West Nile Virus*) e vírus da Dengue, enquanto que para o receptor NKp46 foi encontrada afinidade de ligação para vimentina (proteína do citoesqueleto) na superfície de células infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*. Contudo, para ambos, NKp44 e NKp46, há registros de afinidade de ligação para hemaglutinina (glicoproteína situada no envelope viral) de vírus *influenza*. Os receptores NKp46 e NKp30 demonstraram afinidade de ligação por proteoglicanos de heparan sulfato (*Heparan Sulfate Proteoglycan* - *HSPG*), proteínas presentes na superfície celular e na matriz extracelular, que modulam a atividade de um grande número de ligantes extracelulares. No entanto, outros ligantes continuam não identificados (Garg *et al.*, 2006; Hershkovitz *et al.*, 2009; Pegram *et al.*, 2011; Mayes *et al.*, 2017).

Experimentos em que estes receptores de citotoxicidade naturais são bloqueados resultam em uma diminuição da citotoxicidade contra células tumorais que não expressam hemaglutinina de *influenza*, sugerindo que tumores expressam ligantes para receptores de citotoxicidade naturais ainda não identificados, uma vez que a

citotoxicidade continua presente mesmo na ausência de ligantes conhecidos e no bloqueio de receptores NKps (Lakshmikanth *et al.*, 2009; Bar-On *et al.*, 2017).

O estimulador mais potente das células NK pode ser considerado o CD16 FcγRIIIA. Sinais de CD16 através de ITAMs presentes no domínio CD3ζ (CD3 cadeia zeta), as quais são proteínas citoplasmáticas acessórias, transmitem um sinal de ativação potente. Outro aspecto relevante é o reconhecimento de anticorpos IgG ligados às células-alvo que permite às células NK lisar as células revestidas com anticorpo através do processo de Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo (CCDA). Assim, células NK juntamente com o sistema complemento, atuam como mediadores finais para eliminar células patogênicas reconhecidas pela resposta imunológica humoral mediada por anticorpos (Venton *et al.*, 2016).

2.3.6 Receptores de Inibição

As células NK humanas reconhecem moléculas MHC classe I (HLA-A, B ou C) através de receptores KIR (do inglês *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor*). Receptores nesta família de moléculas são expressos em células NK maduras e se ligam ao HLA de modo independente do antígeno apresentado. Vírus ou tumores podem diminuir a expressão HLA, a fim de evitar a detecção por linfócito T citotóxico. No entanto, as células NK são mais sensíveis às células nestes estados. Interações KIR-HLA primeiramente atuam no envio de um sinal inibitório para a célula NK através do motivo de inibição à base de tirosina do imunorreceptor (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif – ITIM*), localizado no domínio citoplasmático de receptores inibitórios ou co-receptores. Deste modo, as células que exibem níveis mais baixos de HLA serão mais susceptíveis à lise pela célula NK. Estruturalmente distintos dos receptores KIR, os receptores CD94/NKG2A, quando ligados a moléculas de MHC-Ib (HLA-E), enviam um sinal inibitório semelhante através da via do ITIM (Ames e Murphy, 2014).

A capacidade de resposta a sinais de ativação está relacionada ao padrão de receptores inibitórios expressos em cada célula NK. As células detentoras de receptores NK inibitórios capazes de se ligarem ao MHC próprio tornam-se responsivas, enquanto que aquelas que não expressam estes marcadores permanecem hiporresponsivas. No entanto, este estado hiporreativo pode ser substituído através de ativação e, por

consequente, as células NK “não licenciadas” podem contribuir para respostas antitumorais ou antivirais sob condições apropriadas (Jewett *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012)

Como exemplo tem-se o KIR3DL1, que liga-se às moléculas de HLA-A ou B independentemente da presença do epítipo Bw4, ocorrendo a ligação mesmo na ausência do epítipo nas células do indivíduo. Deste modo, as células NK que expressam KIR3DL1 em um indivíduo com ausência do epítipo Bw4, serão propensas à autorreatividade, reconhecendo células próprias saudáveis como alvos, uma vez que estas células não apresentam um sinal inibitório eficaz. No entanto, por não encontrarem antígeno próprio correspondente durante o desenvolvimento, estas células permanecem hiporresponsivas e, assim, evitam autorreatividade. Este processo, agora denominado “licenciamento” (*Licensing*) ou “Educação de Célula NK” (*Natural Killer Cell Education*), é reconhecido como o mecanismo pelo qual as células NK alcançam a autotolerância, muito parecido como o desenvolvimento de células T no timo ou de células B na medula óssea e está mais extensivamente caracterizado em modelos animais (Orr e Lanier, 2010; Tarek *et al.*, 2012).

2.3.7 “Licenciamento” (*Licensing*)

O “licenciamento” é um importante conceito de ativação de células NK no qual admite-se que as células necessitem de “autorização ou licença” pelo MHC de classe I do ligante antes de se tornarem capazes de serem ativadas pela ausência deste ligante em outras células. Vários experimentos em modelo animal (murino) estabeleceram o papel do MHC de classe I na prestação de células NK funcionais (“licenciadas”). Por outro lado, a falha em envolver receptores inibitórios durante o desenvolvimento é causada por falta de interação com MHC de classe I, resultando na geração de um subconjunto de células anérgicas ou hiporresponsivas (KIRs “não licenciados”). Embora os mecanismos moleculares subjacentes às interações entre a MHC de classe I e receptores inibitórios de NK, que conferem capacidade de resposta das células, permaneçam apenas parcialmente definidos, sabe-se que ITIM no repertório de receptores inibitórios é essencial. Do mesmo modo, os estudos em seres humanos parecem confirmar os resultados obtidos em modelos murinos e o reconhecimento do complexo HLA de classe I por receptores KIR também está envolvido no licenciamento de células NK, conferindo às células capacidade efetora durante seu desenvolvimento (Jewett *et al.*, 2012; Malmberg *et al.*, 2017).

Os receptores KIR realizam o reconhecimento de diferentes moléculas junto ao MHC de classe I. O KIR2DL2 e o KIR2DL3 reconhecem alótipos de HLA-C caracterizados por Asn80 (oriundo da combinação com HLA-C1); o KIR2DL1 e, de forma mais fraca, o KIR2DL2 e o 3, reconhecem alótipos de HLA-C caracterizado por Lys80 (quando agrupados com HLA-C2); e o receptor KIR3DL1 reconhece alótipos de HLA-A e HLA-B com o epítipo Bw4 (Parham e Moffett, 2013).

Assim, o licenciamento de células NK é fator essencial para a aquisição de funcionalidade efetora, uma vez que, ao encontrarem células com a expressão diminuída ou alterada de moléculas de MHC classe I, as células NK “licenciadas” não estão mais sujeitas a sinais inibidores, exceto aqueles iniciados pelo engajamento com receptores MHC de classe I específicos, promovendo a citotoxicidade celular e a produção de citocina (Davies *et al.*, 2014).

Estes resultados conduziram a estudos clínicos que investigam o impacto da seleção de doadores de transplante de células tronco hematopoiéticas para transplante com tipos de HLA e KIR que favoreçam a ativação das células NK e, assim, promovam um efeito antileucêmico maior (Choi *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016; Dolstra *et al.*, 2017).

2.3.8 Genotipagem KIR

Maligndades hematológicas e respostas a terapias têm sido associadas ao genótipo KIR por meio de um número de mecanismos diferentes. A tipagem de receptores KIR não é apenas útil para a seleção de doadores alogênicos, mas também para prognósticos em terapia NK autóloga e caracterização de expressão gênica. Entre os receptores de NK conhecidos, a família de receptores KIR é altamente polimórfica e principal determinante da resposta NK. A tipagem clínica de receptores KIR inclui a genotipagem e a categorização de haplótipos A/B, a fenotipagem para a expressão do gene e o número de células KIR⁺ e a alelotipagem. (Chan *et al.*, 2013; Leung, 2014)

A diversidade de receptores KIR é dependente do conteúdo genético e apenas cerca de 5% das pessoas possuem todos os 15 membros da família de genes, os demais possuem carência de um ou mais genes. A diversidade de conteúdo genético é baseada

principalmente na diversidade de haplótipos B, que normalmente contêm mais receptores KIR de ativação (Figura 2.5) (Pyo et al., 2010; Parham e Moffett, 2013).

Os dois genes de indicação para haplótipos A são: KIR2DL3 e KIR3DL1. Eles são segregados com KIR2DL2 e KIR3DS1 como alelos centroméricos (Cen) e teloméricos (Tel), respectivamente. Com base neste padrão, a caracterização de haplótipo B pode ser obtida, a saber: KIR2DL3+/KIR2DL2-, Cen-A/A.; KIR2DL3+/KIR2DL2+, Cen-A/B; KIR2DL3-/KIR2DL2+, Cen-B/B; KIR3DL1+/KIR3DS1-, Tel-A/A; KIR3DL1+/KIR3DS1+, Tel-A/B; e KIR3DL1-/KIR3DS1+, Tel-B/B (Dorak, 2007; Pende et al., 2009).

Devido ao fato de receptores KIR serem codificados no cromossomo 19 e ligantes HLA no cromossomo 6, estas famílias de genes são segregadas de forma independente. Deste modo, os genótipos HLA não podem ser utilizados para prever o conteúdo KIR e a incompatibilidade autóloga KIR-HLA é possível (Dorak, 2007; Pende et al., 2009).

A diversidade de expressão do gene é outro aspecto importante na tipagem de receptores KIR. Por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real e citometria de fluxo, uma variabilidade maior que 10 vezes foi observada na expressão entre doadores. Atualmente, o método mais fácil de quantificar as células NK que expressam apenas um gene KIR inibitório (ou seja, negativo para todos os outros receptores inibitórios de MHC) é a citometria de fluxo multicolor. Embora o número de células que expressem apenas um gene KIR correlacione-se com a presença de ligantes próprios, a variabilidade entre doadores torna estas células inaceitáveis para uso clínico (Dorak, 2007; Pende et al., 2009).

O polimorfismo de alelos, que tem sido observado em todos os genes KIR inibitórios, também é fator importante na tipagem de receptores KIR. Por exemplo, na família KIR2DL1, foram observados 25 alelos e cada um exerce diferente influência nos mecanismos de inibição das células NK e durabilidade de expressão de superfície após interação com o ligante. Estas diferenças correlacionam-se com a intensidade da sinalização de inibição através da tirosina fosfatase SHP2 e β -arrestina-2, resultando em diferenças na formação de sinapses imunes (Bari et al., 2013; Parham e Moffett, 2013).

Com base nestas informações, investigações mostraram que os pacientes que receberam um enxerto de doador contendo o alelo KIR2DL1, funcionalmente mais forte devido à presença de arginina na posição 245 do aminoácido (KIR2DL1-R245),

apresentaram maior sobrevida e menor taxa de recaída do que os pacientes que receberam um enxerto de doador contendo apenas o alelo KIR2DL1, funcionalmente mais fraco com cisteína na mesma posição (KIR2DL1-C245) (Bari et al., 2013).

O efeito do polimorfismo alélico do KIR2DL1 foi semelhante em pacientes com leucemia mieloide aguda ou leucemia linfoblástica aguda entre todos os grupos de alelos. Os pacientes que receberam um enxerto KIR2DL1-R245-positivo com incompatibilidade HLA-C receptor-ligante apresentaram a melhor sobrevida e o menor risco de progressão da leucemia em comparação com aqueles que receberam enxerto do KIR2DL1-C245 (Bari et al., 2013).

Em outro estudo, analisando a pega do enxerto em Transplante Alogênico de Células-tronco Hematopoiéticas (alo-TCTH), é mostrado que doadores com o genótipo KIR2DS1 possuem associação com a redução do risco de recaída de LMA após ambos os transplantes: não aparentado e aparentado (Stringaris et al., 2010; Venstrom et al., 2012).

Além disso, o genótipo KIR pode prever a resposta ao tratamento para malignidades hematológicas; por exemplo, o genótipo KIR3DS1 prevê o aumento da taxa de recaída após transplante de células-tronco autólogas no mieloma, enquanto que os pacientes que não possuem o receptor de ativação KIR3DS1 possuem melhores resultados (Davies et al., 2014).

O genótipo KIR dos pacientes parece também determinar a resposta à terapia com inibidores de tirosina-quinase em indivíduos recentemente diagnosticados com LMC tratados com imatinib, onde o genótipo KIR2DS2 conferiu menor probabilidade de remissão citogenética completa e redução da sobrevida global, que poderiam ser superados com a utilização de dasatinib (Ali et al., 2012; Marin et al., 2012).

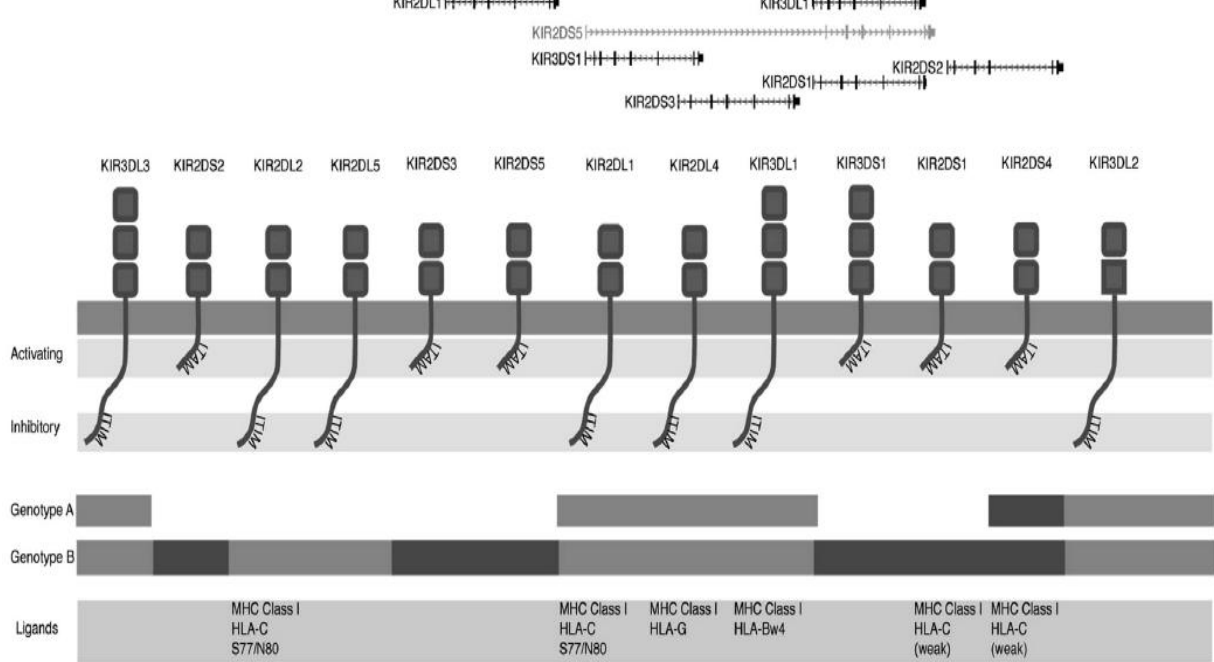


Figura 2.5. Genótipo KIR e a função do receptor

Esquema simplificado do locus do gene KIR (modificado a partir do <http://genome.ucsc.edu/> - UCSC genome browser, hg19, 2009). Pelo menos 37 haplótipos foram identificados até agora. No entanto, o genótipo KIR pode ser dividido em dois grupos, dependendo se o indivíduo é homocigoto para o genótipo A (AA), caso em que eles só expressam um receptor KIR de ativação (KIR2DS4), ou se eles têm pelo menos um haplótipo B (Bx). O haplótipo B é definido pela presença de um número variável de ativadores e inibidores KIR adicionais (KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5 e KIR3DS1) (Davies *et al.*, 2014)

2.4 Antígeno Leucocitário Humano G solúvel (sHLA-G)

2.4.1 Caracterização

O Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G) pertence às moléculas de MHC de Classe I não clássicas (HLA-I). O papel do HLA-G foi descrito pela primeira vez no âmbito da tolerância materno-fetal e, atualmente, sabe-se que o HLA-G possui um papel significativo no desenvolvimento de tolerância na sequência de transplantes de órgãos e de transplantes de medula óssea. Além disso, o HLA-G pode também contribuir para a propagação de infecções virais e para a proliferação de células cancerosas, atuando como inibidor da resposta imune (Hunt *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2012).

O HLA-G possui sete diferentes isoformas descritas: HLA-G1 a HLA-G4 ligados a membrana celular e HLA-G5 a HLA-G7 dissolvidos no plasma sanguíneo (Carosella *et al.*, 2015).

A modulação da resposta imunológica promovida por moléculas de HLA-G ocorre através de diferentes mecanismos, envolvendo tanto a supressão da atividade citotóxica das células NK e linfócitos T CD8+, assim como via inibição da proliferação de células T

(Figura 2.6) (Rouas-Freiss *et al.*, 2003; Le Rond *et al.*, 2004; Rouas-Freiss *et al.*, 2007; Amiot *et al.*, 2011; Locafaro *et al.*, 2014).

O HLA-G desempenha a sua ação inibidora através da interação com receptores ILT2 (CD85j/LILRB1), ILT4 (CD85d/LILRB2), expressos por células NK, linfócitos T e células apresentadoras de antígeno e KIR2DL4 (CD158d), expresso por células NK. Receptores ILT2 também são observados em monócitos, linfócitos B e T, células dendríticas e células NK, enquanto o ILT4 está presente principalmente em células da linha mielomonocítica. A expressão do receptor KIR2DL4, que desenvolve tanto atividade inibitória quanto estimulatória, é limitada às células NK (Carosella *et al.*, 2003; Biedron *et al.*, 2015).

A expressão de HLA-G é restrita principalmente à interface materno-fetal no citotrofoblasto, na placenta, âmnio, mas estando também presente em alguns tecidos adultos saudáveis como timo, córnea, células epiteliais brônquicas e pâncreas (Goldman-Wohl *et al.*, 2000; Lefebvre *et al.*, 2000; Hviid *et al.*, 2004; Brugière *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2015).

Dentre os diferentes tipos de células que expressam HLA-G, encontram-se as células-tronco mesenquimais, alguns monócitos ativados, precursores eritróides e células endoteliais. O HLA-G solúvel também é encontrado nos fluidos corporais, tais como plasma, fluido cerebrospinal, ascites malignas, derrame pleural e esperma (Hunt e Geraghty, 2005; Ivanova-Todorova *et al.*, 2009; Zilberman *et al.*, 2012; Morandi *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2014).

Ao longo da última década, tem sido avaliada a expressão de HLA-G em diferentes estados patológicos, tais como neoplasias, infecções virais, complicações gestacionais, doenças autoimunes e doenças inflamatórias (Cordero *et al.*, 2009; Brenol *et al.*, 2012; Da Silva *et al.*, 2014).

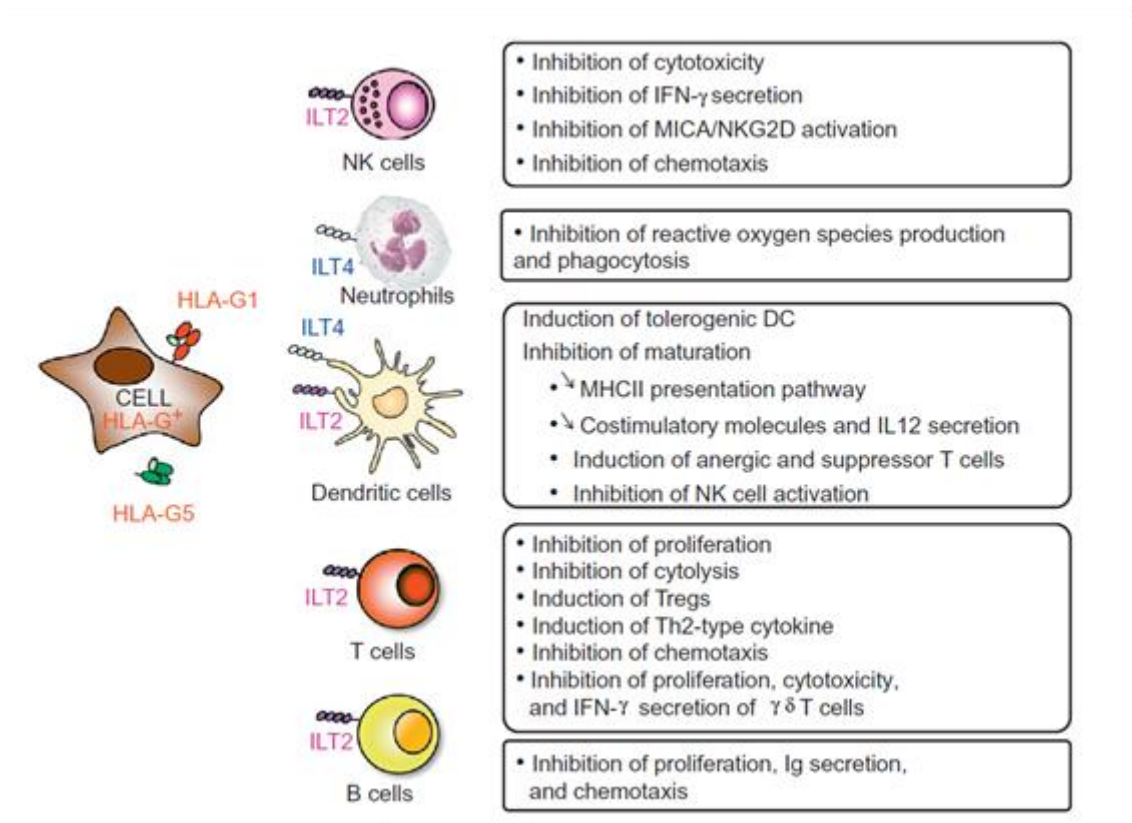


Figura 2.6. Funções imunes inibitórias do HLA-G.

Células efectoras do sistema imunológico humano são apresentadas, juntamente com os respectivos efeitos inibitórios envolvidos quando em interação com células expressando moléculas de HLA-G ou em interação com HLA-G solúvel (Carosella *et al.*, 2015).

2.4.2 Receptores de sHLA-G

Os receptores conhecidos para o HLA-G incluem receptores inibitórios (ILT4 e ILT2), receptores não inibitórios (CD8 e CD160) e o receptor KIR2DL4 com atividade que permanece ambígua em relação ao HLA-G (Tabela 2.2) (Carosella *et al.*, 2015).

Tabela 2.2: Receptores de HLA-G e Funções Associadas. ¹

Receptores de HLA-G	Domínios de Ligação HLA-G	Estrutura HLA-G Preferida	Expressão	Função
ILT2 (LILRB1, CD85j)	Alpha3 / B2M	Dímeros / multímeros	Células T, Células NK, B, Monócitos, Células Dendríticas	Inibitória
ILT4 (LILRB2, CD85d)	Alpha3	Dímeros / multímeros	Monócitos, Células Dendríticas Neutrófilos ativados Algumas Células tumorais	Inibitória ?
KIR2DL4 (CD158d)	Alpha1	?	Células NK Deciduais	Produção de Citocinas e Fatores de Crescimento
CD8	Alpha3	?	CD8+T CD8+NK	Apoptose
CD160 (BY55)	?	?	Células do Endotélio Vascular	Apoptose
Desconhecido	?	?	Células Eritróides	Inibição EPO-R
	?	?	Linhas Celulares	Regulação Positiva de Receptores Inibitórios

¹ Adaptado de Carosella et al. (2015).

2.4.2.1 LILRB1/ILT2 e LILRB2/ILT4

Os receptores ILT2 (também conhecido como CD85j e LILRB1) e ILT4 (também conhecido como CD85d e LILRB2) são os principais receptores de HLA-G em células imunitárias periféricas (Carosella et al., 2015).

O receptor ILT2 é expresso em monócitos, células dendríticas, células B e subconjuntos de células *Natural Killer* e células T, ao passo que o ILT4 é quase exclusivamente expresso por células da linhagem mielomonocítica (Carosella et al., 2015).

Ambos, o ILT2 e o ILT4, contêm imunorreceptores intracelular inibitórios baseados em tirosina (ITIMs) ligados às suas caudas citoplasmáticas inibindo respostas celulares através de fosfatases, tal como o recrutamento de SHP-1 (contendo o domínio de tirosinafosfatase 1). Os receptores ILT2 e ILT4 não apenas se ligam ao HLA-G, podendo ligar-se também a uma ampla gama de moléculas de MHC classe I por reconhecer o domínio $\alpha 3$ e $\beta 2m$ destas estruturas. No entanto, ambos ligam-se preferencialmente ao HLA-G em comparação com outras moléculas de MHC de classe I devido a uma sequência hidrófoba

única, presente em moléculas de HLA-G no domínio $\alpha 3$ (Shiroishi et al., 2003; Shiroishi et al., 2006).

2.4.2.2 *KIR2DL4*

O receptor KIR2DL4 foi primeiramente descrito tendo o HLA-G como único ligante e alguns autores relataram a sua função inibitória utilizando linhagens celulares, enquanto outros relataram seu potencial como receptor de ativação (Rajagopalan et al., 2001; Faure e Long, 2002; Carosella et al., 2015).

Esta divergência de informações pode ser proveniente do fato de que os receptores KIR2DL4 são expressos por células NK decíduais, mas não detectáveis na superfície celular de células NK a partir de sangue periférico. Portanto, os dados relativos à interação KIR2DL4/HLA-G pode ser relevante para as células NK decíduais no contexto da gravidez e não por células NK periféricas em qualquer outro contexto (Koopman et al., 2003; Carosella et al., 2015)

Assim, diante apenas de alguns estudos publicados no contexto da gravidez, o receptor KIR2DL4 continua a ser um receptor, cuja interação com o HLA-G e as suas consequências são, infelizmente, facilmente contestados por falta de expressivas informações para confirmação (Carosella et al., 2015).

2.4.2.3 *CD8*

O CD8 é conhecido por ser um co-receptor para as moléculas de MHC classe I. Em particular, a ligação de CD8 ao MHC de classe I é importante para a ativação adequada de células T CD8+. No entanto, a ligação de receptores CD8 a moléculas de HLA-G solúveis, que aumentam significativamente em uma variedade de condições fisiológicas e patológicas, está envolvida numa via de transdução de sinal que conduz a uma apoptose mediada pelo sistema Fas/FasL em células CD8+. A ligação de CD8 a moléculas HLA-G acontece principalmente através de seu domínio HLA $\alpha 3$, como ocorre em receptores ILT2 e ILT4 (Puppo et al., 2002; Contini et al., 2003; Holler e Kranz, 2003).

Em células NK também ocorre a expressão de receptores CD8, sendo que para o subconjunto de células NK CD56+/CD8+ é demonstrado um aumento da citotoxicidade em comparação com o seu homólogo CD8-. As células NK CD56+/CD8+ representam cerca de 3% e as células NK CD56+/CD8-, cerca de 4% de todas as células mononucleares

(*Peripheral Blood Mononuclear Cell – PBMC*) em doadores saudáveis (Addison et al., 2005).

2.4.2.4 CD160/BY55

O receptor CD160 foi primeiramente descrito como BY55, um glicosilfosfatidilinositol (GPI), receptor do tipo imunoglobulina, MHC de classe I dependente, expresso pelo grande subconjunto de células NK CD56^{dim} em sangue periférico, bem como por células T γ / δ , células intestinais intraepiteliais e algumas células T CD8+ (Le Bouteiller *et al.*, 2003; Barakonyi *et al.*, 2004).

Este receptor também é expresso por células endoteliais podendo ligar-se ao HLA-G solúvel e, curiosamente através deste receptor em estudo sobre apoptose de células endoteliais, o HLA-G exerceu efeitos anti-angiogênicos *in vivo* em coelhos. Porém, estas experiências ainda necessitam ser confirmadas em seres humanos, bem como em ratos, onde também identificou-se a presença de receptores CD160 (Maeda *et al.*, 2005; Fons *et al.*, 2006; Tsujimura *et al.*, 2006).

2.4.3 Ação do HLA-G em células NK

A função inibitória direta do HLA-G sobre células NK da decídua foi a primeira função do HLA-G descrita e, posteriormente, também confirmada em células NK periféricas (Rouas-Freiss, Goncalves, *et al.*, 1997; Rouas-Freiss, Marchal, *et al.*, 1997).

Estes primeiros estudos e todos aqueles que se seguiram demonstraram que, através da interação com receptores ILT2 em células NK, o HLA-G apresentado por uma célula-alvo (por exemplo, células do citotrofoblasto, células tumorais e linhagens transfectadas) ou presente no microambiente na forma solúvel, inibiu a citotoxicidade NK, protegendo assim a célula que expressa HLA-G (Goldman-Wohl *et al.*, 2000).

A interação de HLA-G-ILT2 também foi demonstrada como responsável por alterar a secreção de IFN γ por células NK, por causar a inibição da mobilização de cálcio intracelular e por promover regulação negativa em receptores de quimiocina, além de modular a quimiotaxia de células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} de sangue periférico e de amígdalas (Morandi *et al.*, 2011). Dados obtidos em relação a sinapses imunológicas entre

células NK e células tumorais, que expressam a isoforma de membrana HLA-G1 ou a isoforma solúvel sHLA-G5, mostraram que a interação HLAG-ILT2 inibe os estágios tardios e não iniciais de sinapses ativadoras em células NK (Favier *et al.*, 2010).

As células NK também expressam KIR2DL4, outro receptor para HLA-G, relacionado à regulação negativa da atividade citotóxica de células NK. Porém, as funções do HLA-G sobre este receptor não se encontram esclarecidas fora do contexto gestacional (Favier *et al.*, 2010; Morandi *et al.*, 2011; Carosella *et al.*, 2015).

2.5 Microambiente Medular

2.5.1 Medula Óssea e Hematopoese

A hematopoese ocorre em mamíferos através de um processo gradual que se inicia no saco vitelino entre a terceira e a quarta semana da gestação. Nesse momento, muito antes da geração de CTHs definitivas, os progenitores mieloides desenvolvem-se a partir do ectoderma primitivo do saco vitelino e dão origem a macrófagos embrionários. Em torno da quinta semana de gestação, o fígado é o principal sítio hematopoiético fetal. No fígado fetal, as CTHs se expandem, amadurecem e, pela primeira vez, dão origem a células eritroides, linfoides e mieloides maduras. O fígado permanece o sítio hematopoiético predominante durante as semanas 20 a 24 de gestação. A partir do fígado, as CTHs começam a colonizar também o timo e o baço fetal. Finalmente, durante o segundo trimestre, a MO passa a ser a responsável pela hematopoese mediada por auto-renovação das CTHs como o precursor final da hierarquia hematopoiética do adulto. (De Kleer *et al.*, 2014)

Na medula óssea encontra-se o nicho das CTHs. O termo "nicho da célula-tronco" foi introduzido em 1980 e definido como uma estrutura que abriga essas células (Heissig *et al.*, 2005; Le Blanc e Mougiakakos, 2012). A medula óssea é dividida em pelo menos quatro diferentes nichos que compõem o seu microambiente: endosteal, subendosteal, central e perissinusoidal. Os ensaios histológicos e funcionais indicam que as CTHs e os progenitores multipotentes preferencialmente colonizam as regiões endosteal e subendosteal, em estreita associação com a superfície óssea, onde estão quiescentes. Inversamente, progenitores comprometidos e células diferenciadas são distribuídos nas regiões central e perissinusoidal, onde deixam de estar quiescentes, regenerando de

forma contínua a hematopoese (Gong, 1978; Wilson e Trumpp, 2006; Matsumoto e Nakayama, 2013; Cordeiro-Spinetti *et al.*, 2015).

Além de CTHs e sua progênie, a MO é composta de uma matriz diversificada de células com funções especializadas que estão implicadas como contribuintes funcionais durante a homeostase. Estes incluem células endoteliais vasculares, células perivasculares, osteoblastos, nervos simpáticos, adipócitos, macrófagos e muitos subconjuntos de células estromais (Sasine *et al.*, 2017).

2.5.2 *Microambiente em Neoplasias Hematológicas*

Atualmente, diversas pesquisas concentram-se no estudo do microambiente medular e seu papel em relação ao desenvolvimento de neoplasias hematológicas. Diferentes estudos demonstraram que a interação de subconjuntos de células estromais da medula óssea contribui para a sobrevivência de células leucêmicas tanto *in vitro* como *in vivo*. Estudos adicionais sugerem que o estado leucêmico induz mudanças no microambiente medular, que afetam tanto a hematopoese quanto a arquitetura da medula óssea (Brower, 2016; Shahrabi *et al.*, 2016)

Recentes trabalhos mostram que pacientes com leucemia aguda e doenças pré-leucêmicas, como síndrome mielodisplásica e neoplasias mieloproliferativas, apresentam maiores níveis de angiogênese e vascularização na medula óssea. Um estudo onde foram comparadas biópsias de medula óssea de crianças com LLA com as de controles saudáveis revelou que a medula óssea dos pacientes apresentou padrões microvasculares distintos, incluindo aumento da densidade de microvasos (Ayala *et al.*, 2009; Mizia-Malarz e Sobol-Milejska, 2017)

Há evidências que os fatores de crescimento também podem ajudar a modular a sobrevivência de blastos leucêmicos no microambiente da medula óssea. O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (*Vascular endothelial growth factor* - VEGF) é expresso tanto por linhagens celulares de LMA como por blastos. Estudos sugerem que os níveis de VEGF são um indicador prognóstico em pacientes com LMA e a avaliação de um painel de fatores de crescimento angiogênicos em adultos com LMA, recentemente diagnosticados, sugeriu que níveis elevados de angiopoietina-2 correlacionam-se com a baixa resposta inicial à terapia (Loges *et al.*, 2005; Sison e Brown, 2011; Rashidi e Uy, 2015)

Esses estudos sugerem que o microambiente estromal da medula óssea desempenha um papel significativo no desenvolvimento de malignidades hematológicas e a capacidade de imunomodulação e indução da angiogênese, exercida por células leucêmicas, podem, portanto, ser o principal mecanismo envolvido na expansão e evasão imune exercida por estas células (Sison e Brown, 2011; Alcasid *et al.*, 2017)

2.5.3 *Microambiente e Células NK*

Há evidências de que tanto o sistema imune inato como o sistema adaptativo podem reconhecer células leucêmicas, permitindo sua eliminação ou manutenção de um equilíbrio que previna o crescimento tumoral, conforme descrito na hipótese de imunomodulação do câncer (Schreiber *et al.*, 2011). As células leucêmicas são suscetíveis ao reconhecimento por células T e células NK devido à expressão de antígenos associados à leucemia, moléculas de MHC e ligantes coestimuladores para receptores ativadores em células NK (El-Shami e Smith, 2008; Barrett e Le Blanc, 2010).

No entanto, as células leucêmicas podem escapar da vigilância imune de células NK através de uma série de mecanismos que contribuem para uma resposta imune anti-leucêmica disfuncional, incluindo células NK não competentes, propriedades evasivas de células-alvo, interações com células imunossupressoras e imunomodulação por agentes integrantes do microambiente tumoral (Lowdell *et al.*, 2002; Lion *et al.*, 2012; Alcasid *et al.*, 2017).

Além disso, algumas características das células NK mostraram-se associadas ao desfecho de paciente com LMA, principalmente prevendo a recaída após a terapia padrão e/ou após o Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH). Neste contexto, demonstrou-se que a atividade citotóxica das células NK contra células leucêmicas está inversamente correlacionada com a progressão da doença e a taxa de recaída, fornecendo um parâmetro prognóstico útil para a LMA (Tabela 2.3) (Lowdell *et al.*, 2002)

Na LMA são comumente encontradas alterações na expressão de receptores e ligantes que prejudicam substancialmente a atividade citotóxica mediada por células NK. A maioria dos pacientes com LMA tem uma expressão diminuída de Receptores de Citotoxicidade Natural ativadores de células NK (NCRs - *Natural Cytotoxicity Receptors*,

isto é, NKp30, NKp44 e NKp46) (Costello *et al.*, 2002; Fauriat *et al.*, 2007; Szczepanski *et al.*, 2009).

As próprias células leucêmicas na LMA também contribuem para a diminuição da lise celular mediada por células NK, por expressão diminuída ou ausente de ligantes de superfície para vários receptores ativadores de células NK, incluindo os NCRs e o NKG2D (Salih *et al.*, 2003; Nowbakht *et al.*, 2005; Sanchez-Correa *et al.*, 2011). Além disso, as células leucêmicas na LMA podem liberar ligantes para o NKG2D, como demonstrado pelo aumento dos níveis séricos de genes A e B (MIC A/B) relacionados à cadeia I do MHC de classe I em pacientes com LMA em comparação com controles saudáveis. Esses ligantes solúveis podem fornecer um estímulo sistêmico crônico para células NK resultando em redução da expressão do receptor e deterioração da citotoxicidade mediada por células NK (Salih *et al.*, 2003; Lion *et al.*, 2012).

Além das anormalidades das células NK e dos mecanismos de escape das células leucêmicas na LMA, a interação de ambos os tipos celulares com outras células do sistema imune presentes no microambiente medular fornecem um terceiro fator que contribui para o escape imune, como ocorre, por exemplo, na atividade supressora exercida por células dendríticas imaturas e linfócitos T regulatórios (Treg) sobre células NK (Lion *et al.*, 2012).

Tabela 2.3 Parâmetros prognósticos de células NK para LMA.

Parâmetro da célula NK	Associação	Referência
Alta frequência de células NK circulantes	Prognóstico favorável	(Savani <i>et al.</i> , 2007)
Atividade citotóxica de células NK	Inversamente correlacionado com a progressão da doença e a taxa de recaída	(Lowdell <i>et al.</i> , 2002)
Potência de secreção de IFN- γ de células NK	Prognóstico favorável	(Martner <i>et al.</i> , 2016)
Diminuição da expressão de NCRs em células NK	Doença ativa e baixa sobrevida	(Fauriat <i>et al.</i> , 2007)
Dificuldade na lise de células dendríticas imaturas por células NK	Progressão da doença	(Fauriat <i>et al.</i> , 2005)
Supressão por células T regulatórias (Treg)	Progressão da doença	(Szczepanski <i>et al.</i> , 2009)

Capítulo 3 – **Justificativa**

Considerando a importância da célula NK em seu papel efetor na imunidade inata frente a células neoplásicas e o potencial imunorregulatório do HLA-G na modulação de diferentes condições e patologias, este estudo visa contribuir com a elucidação da influência deste potencial regulador nos mecanismos fisiopatológicos da Leucemia Mieloide Aguda e na citotoxicidade de células NK.

Neste contexto, o estudo da expressão de HLA-G solúvel em neoplasias hematológicas oferece oportunidades para esclarecimento quanto à regulação de seus alvos e à compreensão de seus mecanismos nos processos celulares, além da avaliação de seu impacto e significado na fisiopatologia da LMA, possibilitando a descoberta de terapias contra alvos específicos e uma maior elucidação dos aspectos imunológicos envolvidos na doença.

Capítulo 4 – **Objetivos**

4.1 Objetivo Primário

Contribuir para o conhecimento do microambiente que protege células neoplásicas no contexto da LMA com vistas ao desenvolvimento de moléculas que possam romper a “harmonia” deste ambiente e se tornar adverso ao desenvolvimento da malignidade.

4.2 Objetivos Secundários

1. Comparar o perfil fenotípico presente em células NK integrantes do microambiente tumoral da LMA com o de indivíduos saudáveis;
2. Comparar a expressão de receptores para o HLA-G solúvel em células NK de indivíduos saudáveis doadores de medula óssea e indivíduos diagnosticados com LMA;
3. Avaliar o fenótipo das células NK nos indivíduos participantes do estudo;
4. Comparar os níveis de expressão de HLA-G solúvel dos indivíduos diagnosticados com LMA com o grupo controle;
5. Identificar processos biológicos relevantes para a patogênese da LMA;
6. Identificar a influência do HLA-G solúvel como potencial regulador de mecanismos de citotoxicidade das células NK;

7. Analisar o perfil de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias dosadas nos indivíduos participantes do estudo;
8. Medir os níveis de TNF- α em pacientes e controles;
9. Medir os níveis de IL-6 e IL-10 em pacientes e controles;
10. Medir a expressão dos receptores de citotoxicidade naturais (Natural Cytotoxicity Receptors - NCRs: NKp30, NKp44, NKp46) em pacientes e controles;
11. Medir a expressão dos receptores para HLA-G (ILT-2, KIR2DL4, CD8 e CD160) em pacientes e controles;
12. Medir a expressão de receptores KIR inibitórios em pacientes e controles;
13. Medir a frequência dos subtipos de células NK em pacientes e controles.

Referências

- ADDISON, E. G. et al. Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. **Immunology**, v. 116, n. 3, p. 354-61, Nov 2005.
- AGGARWAL, N. et al. Natural killer cell (NK) subsets and NK-like T-cell populations in acute myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 90, n. 4, p. 349-57, Jul 2016.
- ALCASID, M. et al. The clinicopathologic significance of lymphocyte subsets in acute myeloid leukemia. **Int J Lab Hematol**, v. 39, n. 2, p. 129-136, Apr 2017.
- ALI, S. et al. Dasatinib may overcome the negative prognostic impact of KIR2DS1 in newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia. In: (Ed.). **Blood**. United States, v.120, 2012. p.697-8.
- AMES, E.; MURPHY, W. J. Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 63, n. 1, p. 21-28, 2014/01/01 2014.
- AMIOT, L. et al. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 3, p. 417-31, Feb 2011.
- ANSELL, S. M.; VONDERHEIDE, R. H. Cellular composition of the tumor microenvironment. **Am Soc Clin Oncol Educ Book**, 2013.
- ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-405, May 19 2016.
- AYALA, F. et al. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. **Leukemia**, v. 23, n. 12, p. 2233-41, Dec 2009.

BACHER, U.; SCHNITTGER, S.; HAFERLACH, T. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. **Curr Opin Oncol**, v. 22, n. 6, p. 646-55, Nov 2010.

BAR-ON, Y. et al. Nkp46 recognizes the sigma1 protein of reovirus: Implications for reovirus-based cancer therapy. **J Virol**, Jul 19 2017.

BARAKONYI, A. et al. Cutting edge: engagement of CD160 by its HLA-C physiological ligand triggers a unique cytokine profile secretion in the cytotoxic peripheral blood NK cell subset. **J Immunol**, v. 173, n. 9, p. 5349-54, Nov 1 2004.

BARI, R. et al. Effect of donor KIR2DL1 allelic polymorphism on the outcome of pediatric allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 30, p. 3782-90, Oct 20 2013.

BARRETT, A. J.; LE BLANC, K. Immunotherapy prospects for acute myeloid leukaemia. **Clin Exp Immunol**, v. 161, n. 2, p. 223-32, Aug 2010.

BIEDRON, M. et al. The role of soluble HLA-G and HLA-G receptors in patients with hematological malignancies after allogeneic stem cell transplantation. **Med Oncol**, v. 32, n. 8, p. 219, Aug 2015.

BODDULURU, L. N. et al. Natural killer cells: the journey from puzzles in biology to treatment of cancer. **Cancer Lett**, v. 357, n. 2, p. 454-67, Feb 28 2015.

BRENOL, C. V. et al. O papel do gene e da molécula HLA-G na expressão clínica das doenças reumatológicas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, p. 82-91, 2012.

BROWER, V. Adhesion Molecules, Stem Cells, and the Microenvironment in Acute Myeloid Leukemia. **J Natl Cancer Inst**, v. 108, n. 4, Apr 2016.

BRUGIÈRE, O. et al. Immunohistochemical Study of HLA-G Expression in Lung Transplant Recipients. **American Journal of Transplantation**, v. 9, n. 6, p. 1427-1438, 2009.

BUDAGIAN, V. et al. Reverse signaling through membrane-bound interleukin-15. **J Biol Chem**, v. 279, n. 40, p. 42192-201, Oct 1 2004.

BURNET, M. Cancer—A Biological Approach: III. Viruses Associated with Neoplastic Conditions. IV. Practical Applications. **Br Med J**, v. 1, n. 5023, p. 841-7, Apr 13 1957.

CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. **Adv Immunol**, v. 81, p. 199-252, 2003.

_____. HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. **Adv Immunol**, v. 127, p. 33-144, 2015.

CARRERAS, J. et al. High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 9, p. 1470-6, Mar 20 2009.

CHAN, W. K. et al. Multiplex and genome-wide analyses reveal distinctive properties of KIR+ and CD56+ T cells in human blood. **J Immunol**, v. 191, n. 4, p. 1625-36, Aug 15 2013.

CHEN, R. et al. Inflammation, Cancer and Chemoresistance: Taking Advantage of the Toll-Like Receptor Signaling Pathway. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, n. 2, p. 93-107, 2007. ISSN 1600-0897.

CHOI, I. et al. Donor-derived natural killer cells infused after human leukocyte antigen-haploidentical hematopoietic cell transplantation: a dose-escalation study. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 20, n. 5, p. 696-704, May 2014.

CONTINI, P. et al. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 1, p. 125-34, Jan 2003.

COOPER, M. A. et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. **Blood**, v. 97, n. 10, p. 3146-51, May 15 2001.

CORDEIRO-SPINETTI, E.; TAICHMAN, R. S.; BALDUINO, A. The bone marrow endosteal niche: how far from the surface? **J Cell Biochem**, v. 116, n. 1, p. 6-11, Jan 2015.

CORDERO, E. A. et al. HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. **Tissue Antigens**, v. 74, n. 4, p. 308-13, Oct 2009.

COSTELLO, R. T. et al. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3661-7, May 15 2002.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-7, Dec 19-26 2002.

CRUSZ, S. M.; BALKWILL, F. R. Inflammation and cancer: advances and new agents. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 12, n. 10, p. 584-96, Oct 2015.

DA SILVA, G. K. et al. Influence of HLA-G polymorphisms in human immunodeficiency virus infection and hepatitis C virus co-infection in Brazilian and Italian individuals. **Infect Genet Evol**, v. 21, p. 418-23, Jan 2014.

DANIELOU-LAZARETH, A. et al. At diagnosis, diffuse large B-cell lymphoma patients show impaired rituximab-mediated NK-cell cytotoxicity. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 5, p. 1383-8, May 2013.

DAVIES, J. O. J. et al. Opportunities and limitations of natural killer cells as adoptive therapy for malignant disease. **Cytotherapy**, v. 16, n. 11, p. 1453-1466, Nov 2014.

DE KLEER, I. et al. Ontogeny of Myeloid Cells. **Front Immunol**, v. 5, 2014.

DOLSTRA, H. et al. Successful Transfer of Umbilical Cord Blood CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor-derived NK Cells in Older Acute Myeloid Leukemia Patients. **Clinical Cancer Research**, 2017.

DORAK, M. T. Role of natural killer cells and killer immunoglobulin-like receptor polymorphisms: association of HLA and KIRs. **Methods Mol Med**, v. 134, p. 123-44, 2007.

DOVEY, O. M. et al. Molecular synergy underlies the co-occurrence patterns and phenotype of NPM1-mutant acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 130, n. 17, p. 1911-1922, Oct 26 2017.

DREXLER, H. G.; QUENTMEIER, H. FLT3: receptor and ligand. **Growth Factors**, v. 22, n. 2, p. 71-3, Jun 2004.

DUBOIS, S. et al. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. **Immunity**, v. 17, n. 5, p. 537-47, Nov 2002.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. **Immunity**, v. 21, n. 2, p. 137-48, Aug 2004.

EL-SHAMI, K.; SMITH, B. D. Immunotherapy for myeloid leukemias: current status and future directions. **Leukemia**, v. 22, n. 9, p. 1658-64, Sep 2008.

ERVIK, M. et al. Cancer Today. Lyon, France, 2017.

FALINI, B. et al. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. **Leukemia**, v. 23, n. 10, p. 1731-43, Oct 2009.

FARAG, S. S.; CALIGIURI, M. A. Human natural killer cell development and biology. **Blood Rev**, v. 20, n. 3, p. 123-37, May 2006.

FAURE, M.; LONG, E. O. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. **J Immunol**, v. 168, n. 12, p. 6208-14, Jun 15 2002.

FAURIAT, C. et al. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. **Blood**, v. 109, n. 1, p. 323-30, Jan 01 2007.

_____. Defective killing of dendritic cells by autologous natural killer cells from acute myeloid leukemia patients. **Blood**, v. 106, n. 6, p. 2186, 2005.

FAVIER, B. et al. ILT2/HLA-G interaction impairs NK-cell functions through the inhibition of the late but not the early events of the NK-cell activating synapse. **Faseb j**, v. 24, n. 3, p. 689-99, Mar 2010.

FONS, P. et al. Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. **Blood**, v. 108, n. 8, p. 2608-15, Oct 15 2006.

FRASER, S. T.; BARON, M. H. Embryonic fates for extraembryonic lineages: New perspectives. **J Cell Biochem**, v. 107, n. 4, p. 586-91, Jul 1 2009.

FREUD, A. G.; CALIGIURI, M. A. Human natural killer cell development. **Immunol Rev**, v. 214, p. 56-72, Dec 2006.

FREUD, A. G.; YU, J.; CALIGIURI, M. A. Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. **Semin Immunol**, v. 26, n. 2, p. 132-7, Apr 2014.

GAJEWSKI, T. F.; SCHREIBER, H.; FU, Y. X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. **Nat Immunol**, v. 14, n. 10, p. 1014-22, Oct 2013.

GARG, A. et al. Vimentin expressed on Mycobacterium tuberculosis-infected human monocytes is involved in binding to the NKp46 receptor. **J Immunol**, v. 177, n. 9, p. 6192-8, Nov 1 2006.

GOLDMAN-WOHL, D. S. et al. HLA-G expression in extravillous trophoblasts is an intrinsic property of cell differentiation: a lesson learned from ectopic pregnancies. **Mol Hum Reprod**, v. 6, n. 6, p. 535-40, Jun 2000.

GONG, J. K. Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells. **Science**, v. 199, n. 4336, p. 1443-5, Mar 31 1978.

GONZALEZ, A. et al. The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 49, n. 3, p. 63-84, May-Jun 2012.

GREEN, H. N.; ANTHONY, H. M. The immunological theory of cancer. **Practitioner**, v. 190, p. 705-14, Jun 1963.

GROS, F. et al. Soluble HLA-G molecules increase during acute leukemia, especially in subtypes affecting monocytic and lymphoid lineages. **Neoplasia**, v. 8, n. 3, p. 223-30, Mar 2006.

HEISSIG, B. et al. A role for niches in hematopoietic cell development. **Hematology**, v. 10, n. 3, p. 247-53, Jun 2005.

HERSHKOVITZ, O. et al. NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells. **J Immunol**, v. 183, n. 4, p. 2610-21, Aug 15 2009.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. Essential Haematology. Oxford, UK, 2016.

HOLLER, P. D.; KRANZ, D. M. Quantitative analysis of the contribution of TCR/pepMHC affinity and CD8 to T cell activation. **Immunity**, v. 18, n. 2, p. 255-64, Feb 2003.

HUNT, J. S.; GERAGHTY, D. E. Soluble HLA-G isoforms: technical deficiencies lead to misinterpretations. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 11, n. 10, p. 715-717, 2005.

HUNT, J. S. et al. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. **Faseb j**, v. 19, n. 7, p. 681-93, May 2005.

HVIID, T. V. et al. HLA-G expression in placenta in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. **Am J Reprod Immunol**, v. 52, n. 3, p. 212-7, Sep 2004.

IBRAHIM, E. C. et al. Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. **Cancer Res**, v. 61, n. 18, p. 6838-45, Sep 15 2001.

INCA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. SILVA, I. N. D. C. J. A. G. D. Rio de Janeiro: Coordenação de Prevenção e Vigilância - Ministério da Saúde: 122 p. 2015.

IVANOVA-TODOROVA, E. et al. HLA-G expression is up-regulated by progesterone in mesenchymal stem cells. **Am J Reprod Immunol**, v. 62, n. 1, p. 25-33, Jul 2009.

JAEGER, B. N. et al. Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. **J Exp Med**, v. 209, n. 3, p. 565-80, Mar 12 2012.

JEWETT, A. et al. Natural killer cells preferentially target cancer stem cells; role of monocytes in protection against NK cell mediated lysis of cancer stem cells. **Curr Drug Deliv**, v. 9, n. 1, p. 5-16, Jan 2012.

JUNG, H. et al. RAE-1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by E2F transcription factors, which control cell cycle entry. **J Exp Med**, v. 209, n. 13, p. 2409-22, Dec 17 2012.

KHAZNADAR, Z. et al. Acute myeloid leukemia impairs natural killer cells through the formation of a deficient cytotoxic immunological synapse. **Eur J Immunol**, v. 44, n. 10, p. 3068-80, Oct 2014.

KOOPMAN, L. A. et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. **J Exp Med**, v. 198, n. 8, p. 1201-12, Oct 20 2003.

LAKSHMIKANTH, T. et al. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. **J Clin Invest**, v. 119, n. 5, p. 1251-63, May 2009.

LE BLANC, K.; MOUGIAKAKOS, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 5, p. 383-96, Apr 25 2012.

LE BOUTEILLER, P. et al. **Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity.** 2003.

LE FRIEC, G. et al. Soluble HLA-G inhibits human dendritic cell-triggered allogeneic T-cell proliferation without altering dendritic differentiation and maturation processes. **Hum Immunol**, v. 64, n. 8, p. 752-61, Aug 2003.

LE ROND, S. et al. Alloreactive CD4+ and CD8+ T cells express the immunotolerant HLA-G molecule in mixed lymphocyte reactions: in vivo implications in transplanted patients. **Eur J Immunol**, v. 34, n. 3, p. 649-660, Mar 2004.

LEE, D. A. et al. Haploidentical Natural Killer Cells Infused before Allogeneic Stem Cell Transplantation for Myeloid Malignancies: A Phase I Trial. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 22, n. 7, p. 1290-8, Jul 2016.

LEFEBVRE, S. et al. Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells. **Hum Immunol**, v. 61, n. 11, p. 1095-101, Nov 2000.

_____. Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. **J Pathol**, v. 196, n. 3, p. 266-74, Mar 2002.

LEUNG, W. Infusions of allogeneic natural killer cells as cancer therapy. **Clin Cancer Res**, v. 20, n. 13, p. 3390-400, Jul 01 2014.

LEVIS, M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2013, p. 220-6, 2013.

LI, J. et al. Human Amnion-Derived Stem Cells Have Immunosuppressive Properties on NK Cells and Monocytes. **Cell Transplant**, v. 24, n. 10, p. 2065-76, 2015.

LINK, A. et al. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. **Nat Immunol**, v. 8, n. 11, p. 1255-65, Nov 2007. 1529-2908.

LION, E. et al. Natural killer cell immune escape in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 2019-26, Sep 2012.

LOCAFARO, G. et al. HLA-G expression on blasts and tolerogenic cells in patients affected by acute myeloid leukemia. **J Immunol Res**, v. 2014, p. 636292, 2014.

LOGES, S. et al. Analysis of concerted expression of angiogenic growth factors in acute myeloid leukemia: expression of angiopoietin-2 represents an independent prognostic factor for overall survival. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 6, p. 1109-17, Feb 20 2005.

LOWDELL, M. W. et al. Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells. **Br J Haematol**, v. 117, n. 4, p. 821-7, Jun 2002.

MAEDA, M. et al. Murine CD160, Ig-like receptor on NK cells and NKT cells, recognizes classical and nonclassical MHC class I and regulates NK cell activation. **J Immunol**, v. 175, n. 7, p. 4426-32, Oct 1 2005.

MAGRI, G. et al. NKp46 and DNAM-1 NK-cell receptors drive the response to human cytomegalovirus-infected myeloid dendritic cells overcoming viral immune evasion strategies. **Blood**, v. 117, n. 3, p. 848-56, Jan 20 2011.

MALHOTRA, A.; SHANKER, A. NK cells: immune cross-talk and therapeutic implications. **Immunotherapy**, v. 3, n. 10, p. 1143-66, Oct 2011.

MALMBERG, K.-J. et al. Immune selection during tumor checkpoint inhibition therapy paves way for NK-cell "missing self" recognition. **Immunogenetics**, v. 69, n. 8, p. 547-556, 2017/08/01 2017.

MARIN, D. et al. KIR2DS1 genotype predicts for complete cytogenetic response and survival in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. **Leukemia**, v. 26, n. 2, p. 296-302, Feb 2012.

MARTNER, A. et al. Role of natural killer cell subsets and natural cytotoxicity receptors for the outcome of immunotherapy in acute myeloid leukemia. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 1, p. e1041701, 2016.

MATSUMOTO, A.; NAKAYAMA, K. I. Role of key regulators of the cell cycle in maintenance of hematopoietic stem cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 2, p. 2335-44, Feb 2013.

MAYES, K. et al. BPTF inhibits NK cell activity and the abundance of natural cytotoxicity receptor co-ligands. **Oncotarget**, v. 8, n. 38, p. 64344-64357, Sep 8 2017.

MENTLIK JAMES, A.; COHEN, A. D.; CAMPBELL, K. S. Combination Immune Therapies to Enhance Anti-Tumor Responses by NK Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 481, 2013.

MIN-OO, G. et al. Natural killer cells: walking three paths down memory lane. **Trends Immunol**, v. 34, n. 6, p. 251-8, Jun 2013.

MIRANDA-CARUS, M. E. et al. Human T cells constitutively express IL-15 that promotes ex vivo T cell homeostatic proliferation through autocrine/juxtacrine loops. **J Immunol**, v. 175, n. 6, p. 3656-62, Sep 15 2005.

MIZIA-MALARZ, A.; SOBOL-MILEJSKA, G. Assessment of Angiogenesis in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia Based on Serum Vascular Endothelial Growth Factor Assay. **Indian J Med Paediatr Oncol**, v. 38, n. 3, p. 321-325, Jul-Sep 2017.

MORANDI, F. et al. Soluble HLA-G dampens CD94/NKG2A expression and function and differentially modulates chemotaxis and cytokine and chemokine secretion in CD56bright and CD56dim NK cells. **Blood**, v. 118, n. 22, p. 5840-50, Nov 24 2011.

_____. Intrathecal soluble HLA-E correlates with disease activity in patients with multiple sclerosis and may cooperate with soluble HLA-G in the resolution of neuroinflammation. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 8, n. 4, p. 944-55, Sep 2013.

MUENST, S. et al. Increased programmed death-1+ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. **Hum Pathol**, v. 40, n. 12, p. 1715-22, Dec 2009.

NOWBAKHT, P. et al. Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. **Blood**, v. 105, n. 9, p. 3615-22, May 1 2005.

NUCKEL, H. et al. HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1694-8, Feb 15 2005.

ORR, M. T.; LANIER, L. L. Natural killer cell education and tolerance. **Cell**, v. 142, n. 6, p. 847-56, Sep 17 2010.

PARHAM, P.; MOFFETT, A. Variable NK cell receptors and their MHC class I ligands in immunity, reproduction and human evolution. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 2, p. 133-44, Feb 2013.

PEGRAM, H. J. et al. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. **Immunol Cell Biol**, v. 89, n. 2, p. 216-24, Feb 2011.

PENDE, D. et al. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. **Blood**, v. 113, n. 13, p. 3119-29, Mar 26 2009.

POLAKOVA, K.; ZELEZNIKOVA, T.; RUSS, G. HLA-G5 in the blood of leukemia patients and healthy individuals. **Leuk Res**, v. 37, n. 2, p. 139-45, Feb 2013.

PRATZ, K. W.; LEVIS, M. How I treat FLT3-mutated AML. In: (Ed.). **Blood**. Washington, DC, v.129, 2017. p.565-71.

PUPPO, F. et al. Soluble HLA class I molecules/CD8 ligation trigger apoptosis of CD8+ cells by Fas/Fas-ligand interaction. **ScientificWorldJournal**, v. 2, p. 421-3, Feb 12 2002.

PYO, C. W. et al. Different patterns of evolution in the centromeric and telomeric regions of group A and B haplotypes of the human killer cell Ig-like receptor locus. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15115, Dec 29 2010.

RAJAGOPALAN, S.; FU, J.; LONG, E. O. Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. **J Immunol**, v. 167, n. 4, p. 1877-81, Aug 15 2001.

RAMOS, C. S. et al. Analysis of HLA-G gene polymorphism and protein expression in invasive breast ductal carcinoma. **Hum Immunol**, v. 75, n. 7, p. 667-72, Jul 2014.

RASHIDI, A.; UY, G. L. Targeting the microenvironment in acute myeloid leukemia. **Curr Hematol Malig Rep**, v. 10, n. 2, p. 126-31, Jun 2015.

REBMANN, V. et al. HLA-G in B-chronic lymphocytic leukaemia: clinical relevance and functional implications. **Semin Cancer Biol**, v. 17, n. 6, p. 430-5, Dec 2007.

REILLY, J. T. Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? **Br J Haematol**, v. 128, n. 1, p. 18-34, Jan 2005.

RENNEVILLE, A. et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. **Leukemia**, v. 22, n. 5, p. 915-31, May 2008.

ROUAS-FREISS, N. et al. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 21, p. 11520-5, Oct 14 1997.

_____. The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 10, p. 5249-54, May 13 1997.

_____. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? **Cancer Res**, v. 65, n. 22, p. 10139-44, Nov 15 2005.

_____. HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. **Semin Cancer Biol**, v. 13, n. 5, p. 325-36, Oct 2003.

_____. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. **Semin Cancer Biol**, v. 17, n. 6, p. 413-21, Dec 2007.

SALIH, H. R. et al. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. **Blood**, v. 102, n. 4, p. 1389-96, Aug 15 2003.

SANCHEZ-CORREA, B. et al. Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: analysis of NK cell-activating receptors and their ligands. **Cancer Immunol Immunother**, v. 60, n. 8, p. 1195-205, Aug 2011.

SASINE, J. P.; YEO, K. T.; CHUTE, J. P. Concise Review: Paracrine Functions of Vascular Niche Cells in Regulating Hematopoietic Stem Cell Fate. **Stem Cells Transl Med**, v. 6, n. 2, p. 482-489, Feb 2017.

SAVANI, B. N. et al. Rapid natural killer cell recovery determines outcome after T-cell-depleted HLA-identical stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias but not with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 21, n. 10, p. 2145-52, Oct 2007.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565-70, Mar 25 2011.

SEBTI, Y. et al. Soluble HLA-G molecules are increased in lymphoproliferative disorders. **Hum Immunol**, v. 64, n. 11, p. 1093-101, Nov 2003.

SHAFER, D. et al. Low NK cell counts in peripheral blood are associated with inferior overall survival in patients with follicular lymphoma. **Leuk Res**, v. 37, n. 10, p. 1213-5, Oct 2013.

SHAHRABI, S. et al. Bone Marrow Blood Vessels: Normal and Neoplastic Niche. **Oncol Rev**, v. 10, n. 2, p. 306, Oct 10 2016.

SHIROISHI, M. et al. Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 44, p. 16412-7, Oct 31 2006.

_____. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 15, p. 8856-61, Jul 22 2003.

SISON, E. A.; BROWN, P. The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting. **Expert Rev Hematol**, v. 4, n. 3, p. 271-83, Jun 2011.

STRINGARIS, K. et al. Donor KIR Genes 2DL5A, 2DS1 and 3DS1 are associated with a reduced rate of leukemia relapse after HLA-identical sibling stem cell transplantation for acute myeloid leukemia but not other hematologic malignancies. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 16, n. 9, p. 1257-64, Sep 2010.

SULLIVAN, E. M. et al. NK cell genotype and phenotype at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia correlate with postinduction residual disease. **Clin Cancer Res**, v. 20, n. 23, p. 5986-94, Dec 01 2014.

SUN, K. et al. Mouse NK cell-mediated rejection of bone marrow allografts exhibits patterns consistent with Ly49 subset licensing. **Blood**, v. 119, n. 6, p. 1590-8, Feb 09 2012.

SWANN, J. B.; SMYTH, M. J. Immune surveillance of tumors. In: (Ed.). **J Clin Invest**, v.117, 2007. p.1137-46.

SZCZEPANSKI, M. J. et al. Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 10, p. 3325-32, May 15 2009.

TAREK, N. et al. Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. **J Clin Invest**, v. 122, n. 9, p. 3260-70, Sep 2012.

TSUJIMURA, K. et al. Characterization of murine CD160+ CD8+ T lymphocytes. **Immunol Lett**, v. 106, n. 1, p. 48-56, Jul 15 2006.

UROSEVIC, M. et al. Human Leukocyte Antigen G Up-Regulation in Lung Cancer Associates with High-Grade Histology, Human Leukocyte Antigen Class I Loss and Interleukin-10 Production. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 3, p. 817-824, 05/25/accepted 2001.

_____. HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. **Blood**, v. 99, n. 2, p. 609-17, Jan 15 2002.

VELLOSO, E. D. et al. Molecular and cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia: review and case studies. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 9, n. 2, p. 184-9, Jun 2011.

VENSTROM, J. M. et al. HLA-C dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. **N. Engl. J. Med.**, v. 367, p. 11, 2012.

VENTON, G. et al. Natural killer cells in acute myeloid leukemia patients: from phenotype to transcriptomic analysis. **Immunol Res**, v. 64, n. 5-6, p. 1225-1236, Dec 2016.

WADA, N. et al. Tumour-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. **Histopathology**, v. 60, n. 2, p. 313-9, Jan 2012.

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5904-12, Oct 6 2008.

WIENDL, H. et al. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. **J Immunol**, v. 168, n. 9, p. 4772-80, May 1 2002.

WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 2, p. 93-106, Feb 2006.

WU, D. Innate and Adaptive Immune Cell Metabolism in Tumor Microenvironment. **Adv Exp Med Biol**, v. 1011, p. 211-223, 2017.

YAN, W. H. et al. Unfavourable clinical implications for HLA-G expression in acute myeloid ukaemia. **J Cell Mol Med**, v. 12, n. 3, p. 889-98, Jun 2008.

YAO, G. D. et al. Expression and potential roles of HLA-G in human spermatogenesis and early embryonic development. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92889, 2014.

YU, J.; FREUD, A. G.; CALIGIURI, M. A. Location and cellular stages of natural killer cell development. **Trends Immunol**, v. 34, n. 12, p. 573-82, Dec 2013.

ZILBERMAN, S. et al. HLA-G1 and HLA-G5 active dimers are present in malignant cells and effusions: the influence of the tumor microenvironment. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 6, p. 1599-608, Jun 2012.

ZITVOGEL, L. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? In: (Ed.), v.118, 2008. p.1991-2001.

Capítulo 5 – Artículo Científico

Evaluation of Natural Killer Cell Phenotype and Soluble HLA-G Expression in the Bone Marrow of Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) at Diagnosis

Abstract

As central players of the innate immune system, natural killer (NK) cells can exert direct and indirect antitumoral effects via their cytotoxic and immune regulatory capacities, essential in the induction of an effective adaptive antitumoral immune response. NK cells are considered to be relevant in the immune surveillance of cancer. In acute myeloid leukemia (AML) patients, however, significantly impaired NK cell functions can facilitate escape from immune surveillance and affect patient outcome. The results showed a significantly lower frequency of NK cells in the bone marrow (BM) of AML patients when compared to the healthy bone marrow donors (4.25% vs. 7.18%, $p < 0.001$). When comparing the normal BM with AML BM, in the latter there was a higher frequency of CD56^{dim} CD16⁺ NK cells (90.47% vs. 78.71%, $p = 0.007$); lower frequency of CD56^{dim} CD16⁻ NK cells (7.51% vs. 17.24%, $p < 0.010$) and CD56^{Bright} NK cells subsets (2.00% vs. 4.93%, $n = 10$, $p < 0.014$). As for IL-6, IL10 and TNF- α levels, in AML BM, they increased significantly compared with healthy donors. Although there was not significant statistical difference, soluble HLA-G molecules presented higher levels in AML BM. New insights into AML microenvironment might unravel new targets for therapy.

1. Introduction

The immune system has been studied intensively for many years in different neoplasms, since it plays a fundamental role in the elimination of malignant cells, according to the immunovigilance hypothesis of the tumor microenvironment.¹⁻³

Observational studies have demonstrated specific infiltrative patterns of lymphocytes, macrophages, and granulocytes in carcinomas of the breast, lung, gastrointestinal tract,

and ovary, along with sarcomas, and skin cancers. In many instances, these infiltrates have been associated with specific prognostic outcomes in patients.^{4,5}

These findings, correlated with other studies, support a close interrelationship between cellular subsets of the immune system and cancer development and progression. Functional studies in murine models, as well as immunomodulatory therapies in humans, also support these observations.⁶⁻⁸

In hematological malignancies, the understanding of the immune system role is an area of continuous research. Recent studies on lymphomas show that T cells, macrophages and natural killer (NK) cells may play an important functional role in follicular lymphoma, classical Hodgkin's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma.⁹⁻¹³

In acute leukemia, specifically in the case of acute myeloid leukemia (AML), a particular attention has been given to NK cells in several studies, in which it was identified functional links between NK cell activities and AML progression.¹⁴⁻¹⁷

NK cells, as central agents of the innate immune system, may exert direct antitumoral effects on the tumor microenvironment through its cytotoxic capacity or also through the secretion of cytokines, which contributes indirectly to tumor control, supporting the development of an efficient adaptive antitumor system.^{16, 18}

Nevertheless, leukemic cells can escape NK cells immune surveillance through a succession of mechanisms, which contributes to a dysfunctional anti-leukemic immune response, namely: (1) NK cell abnormalities; (2) immunosuppressive and evasive properties of target cells; (3) interactions with other immunosuppressive cells, and (4) immunomodulation by tumor microenvironment soluble components.^{8, 16, 19}

However, the interactions between the different components of the tumor microenvironment represent the most important of the elements involved in the growth and maintenance of leukemic cells, along with the interference of the immunovigilance mechanisms, where immune cells that integrate the microenvironment experience an immunomodulation process favorable to the tumor progression.¹⁶

Three stages of immunomodulation by the tumor microenvironment were described: (1) recruitment of immune cells through the production of cytokines (monocyte

chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8)); (2) immunomodulation via secretion of cytokines regulating immune cells differentiation to promote the tumor development (proinflammatory mediators such as IL-1, IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), macrophage migration inhibitory factor (MIF), and soluble suppressor proteins acting as anti-inflammatory mediators such as soluble human leukocyte antigen G (sHLA-G), IL-10 and prostaglandin E2 (PGE2), and (3) immune response, in which the differentiated immune cells generate cytokines, hormones, growth factors, tumor proliferation promoting agents and tumor immune tolerance.²⁰⁻²³

Among the different elements present in the tumor microenvironment, the HLA-G has been widely evaluated in the context of tumor immunomodulation, for it acts as a negative regulator of the immune response through different mechanisms, including inhibition of angiogenesis, restriction of antigen recognition and T cell migration, and suppression of T and NK cells cytotoxicity.²⁴⁻²⁷

Human leukocyte antigen G (HLA-G) molecules corresponding to nonclassic class I genes of the major histocompatibility complex, showing restrictive distribution and lower polymorphism. Through the alternative splicing mechanism, the HLA-G gene generates seven transcriptional isoforms, encoding four membrane-bound protein isoforms (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, and HLA-G4) and three soluble isoforms (sHLA-G5, sHLA-G6, and sHLA-G7)^{28, 29}. Soluble HLA-G isoforms are found in body fluids such as plasma, cerebrospinal fluid, malignant ascites, pleural effusion and sperm³⁰⁻³⁴. Both soluble and membrane bound isoforms can be detected in tumor pathologies such as melanomas, breast cancer, lung carcinomas, renal, gliomas, lymphomas, and leukemias.^{26, 35-39}

It has also been shown that a shedding form of HLA-G1 protein (sHLA-G1), which is cleaved by metalloproteinases, coexists with HLA-G5 soluble isoforms generated by the translation of spliced mRNA.^{40, 41} The HLA-G5 is composed of α 1, α 2, and α 3 domains, whereas the HLA-G6 is composed of α 1 and α 3 domains, allowing an association with light-chain b2-microglobulin and CD8 molecules. A new variant, the HLA-G7, has been recently described and it is composed of only α 1 domains, but there is a lack of knowledge in its functions²⁸. The HLA-G5 is the full-length soluble isoform, in the same way that HLA-G1 is for membrane-bound isoforms, and it has the same properties as

those of other soluble isoforms. The interest in sHLA-G molecules is increasing steadily. In fact, these molecules are expressed during pregnancy by cytotrophoblastic cells that invade the maternal decidua and are secreted by trophoblasts. Basal plasma levels were detected in healthy subjects with no difference between the sexes.^{42, 43} Secretion of sHLA-G isoforms can be detected in the serum of transplanted patients during solid tumor pathologies and hematological malignancies.^{27, 28, 44}

The immunomodulatory role of HLA-G is well known in the context of pregnancy, as well as during immune reactions through interactions with inhibitory receptors. The HLA-G1 has been demonstrated to inhibit cytotoxic lysis by NK cells, as well as by lymphocyte T CD8+ cells through direct interactions with ILT-2 and KIR2DL4 receptors or through indirect interactions with CD94/NKG2A after induction of HLA-E expression.^{27, 42, 45, 46} Moreover, sHLA-G isoforms appear to be able to induce the apoptosis of CD8+ T cells through ligation with CD8, a characteristic shared with classic soluble HLA class I molecules, according to some authors.^{24, 47-49} The HLA-G1 and the HLA-G5 are also able to inhibit allogeneic T-cell proliferation and to interfere with the activation of immature CD8 + T cells. Soluble proteins appear to be more frequently expressed than membrane-bound isoforms in hematological malignancies, as demonstrated for lymphoproliferative disorders.^{28, 44, 48, 50, 51}

More recently, it has been shown that the expression of HLA-G by circulating blasts from AML and chronic myeloid leukemia (CML) cells was strongly associated with an unfavorable outcome of the disease.⁵²⁻⁵⁴ Additionally, a correlation between soluble HLA-G plasma levels and AML, acute lymphoblastic leukemia (ALL), and B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) was proposed.^{27, 44, 55}

However, an extensive understanding of immune system cellular subsets at diagnosis in AML is lacking. In this paper, using multiparameter flow cytometry, it is reported an analysis of NK cells subsets in AML and identified the levels of some important cytokines in the microenvironment, including IL-6, IL-10, and TNF- α . It was also evaluated the expression of sHLA-G molecules and relationships between relative proportions of NK cells subsets and subcategories of AML at initial diagnosis.

2. Materials and Methods

2.1 Patients

All protocols were approved by the institutional ethics committee and samples were collected under written informed consent according to the Declaration of Helsinki. Bone marrow samples from nineteen patients submitted to bone marrow aspiration and biopsy due to suspected leukemia diagnosis were analyzed. Ten patients affected by AML were included in this prospective and comparative study and analyzed for biological and clinical characteristics. Samples from healthy individuals (n = 10) were obtained from bone marrow donors at the beginning of the collection procedure to donation and were used as controls. AML diagnosis was based on the standard cytological criteria according to the French-American-British (FAB) classification. None of the patients received medical interventions before the study.

2.2 Cells Isolation and Plasma Collection

Bone marrow mononuclear cells (BMMCs) from AML patients and controls were isolated by the EuroFlow standard operating protocol for Bulk Lysis that is used for minimal residual disease (MRD) panels and indicated to detect bearer cells of specific surface antigens. The plasma was obtained from the EDTA-anticoagulated bone marrow samples of both, AML patients and controls, by centrifugation (1000 g) at 4°C and cryopreserved at -80°C for ELISA test and MILLIPLEX assay.

2.3 Cytogenetic Analysis

Cytological analysis was performed using standard G-band karyotyping technique. Results were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature⁵⁶ at the Genetic Unit of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2.4 Flow Cytometry Analysis

The BMMCs cells obtained with Bulk Lysis protocol were stained for 20 min at room temperature in the dark with commercially available monoclonal antibodies (mAbs), which is specific for the human antigens described in Table S. 1. Samples were acquired using a FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, CA, USA) and data were analyzed with Infinicyt software v 1.8 (Cytognos S.L , Salamanca, Spain). The cells were identified using a multiparametric approach based on the combination of mAbs.

2.5 Detection of Soluble HLA-G

Levels of shed HLA-G1 and soluble HLA-G5 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with a commercially available assay, the sHLA-G BioAssay™ kit (US Biological, Massachusetts, USA).

2.6 Determination of Cytokine Profile in Bone Marrow Plasma Samples

Levels of IL-10, IL-6, and TNF- α in the bone marrow plasma samples of patients suffering from AML and healthy individuals were determined using a multiplex assay with a customized MILLIPLEX MAP kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) on the Luminex® 200™ System (Luminex Corporation).

2.7 Statistical Analysis

All results are presented as mean values \pm standard deviation (SD). The comparison of parameters between AML patients and controls was performed using the nonparametric Mann-Whitney U test for continuous variable and Fisher's exact test for categorical data. The Spearman's rank correlation coefficient was utilized to determine the statistical dependence between two variables. Differences were regarded as significant at $p < 0.05$. The results were analyzed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 18.0 (SPSS Inc. Chicago, USA).

3. Results and Discussion

It was studied NK cells characteristics in the BM of AML at diagnosis of 10 patients referred to the Department of Hematology and Bone Marrow Transplantation of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The median age was approximately 46 years, 60% were male and the AML subtypes are described Table 1. The mean percentage of blasts in the peripheral blood of patients was $42.0\% \pm 36.94\%$ (mean \pm SD, $n = 10$, range 4.0–97.0%). Patients' BMMCs were analyzed by flow cytometry and the NK cells were defined as CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻, and CD56⁺ expression on CD45^{bright} cells.

Table 1. Clinical patients' characteristics and cytogenetic analysis.

Patient number	FAB Classification	Sex	Age	Blasts in BM (%)	Blasts in PB (%)	Karyotype	FLT3-ITD Mutation
1	AML	M	70	38	4	46XY	Negative
2	AML - M3	F	37	84	4	/	/
3	AML - M3	M	58	88	74	46XY	/
4	AML	F	17	82	78	46XX	Negative
5	AML - M2	M	49	92	10	/	/

6	AML- M4	M	46	10	23	/	/
7	AML - M3	F	25	95	71	/	/
8	AML - M4	M	59	80	2	46XY	Negative
9	AML - M4	M	46	57	57	46XY	Negative
10	AML - M2	F	26	90	97	46XX	Negative

Abbreviations: FAB, French-American-British classification; BM, bone marrow; PB, peripheral blood; AML, acute myeloid leukemia.

NK cells are generally divided into 2 subsets, CD56^{bright} and CD56^{dim} populations, based on the relative intensity of the CD56 stain when analyzed by flow cytometry. CD56^{dim} cells comprise the majority of circulating NK cells in the blood. These cells are highly cytotoxic but produce less cytokines when compared with the CD56^{bright} cells. Furthermore, nearly all CD56^{dim} NK cells express the killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) as well as the Fcγ-receptor CD16. These receptors contribute to the high cytotoxicity of CD56^{dim} NK cells by making them sensitive to targets with low-MHC expression and cells bound with antibody, respectively.⁵⁷⁻⁵⁹

The results showed a significantly lower frequency of NK cells in the bone marrow of AML patients compared to that observed in healthy donors ($4.25\% \pm 0.86\%$, $n = 10$, versus $7.18\% \pm 0.84\%$, $n = 10$; $p < 0.001$) (Figure 1). Additionally, the percentages of NK cells subsets were significantly different. The NK cells from the AML patients had higher frequency of CD56^{dim} CD16⁺ NK cells ($90.47\% \pm 7.62\%$, $n = 10$, versus $78.71\% \pm 10.13\%$, $n = 10$; $p = 0.007$) but lower frequency of CD56^{dim} CD16⁻ NK cells ($7.51\% \pm 7.25\%$, $n = 10$, versus $17.24\% \pm 9.21\%$, $n = 10$; $p < 0.010$) and CD56^{bright} NK cells subsets ($2.00\% \pm 1.07\%$, $n = 10$, versus $4.93\% \pm 2.40\%$, $n = 10$; $p < 0.014$). These findings suggest the presence of a NK cell subtype with a higher cytotoxic capacity in the microenvironment of the AML disease, despite the lower concentration of NK cells in the patient bone marrow blood samples.

Although the CD56^{bright} NK cells are strong cytokine-secreting cells and vital for the initiation of adaptive immunity and cell proliferation, they are not attractive for the generation of sustained anti-leukemic immunity.⁶⁰

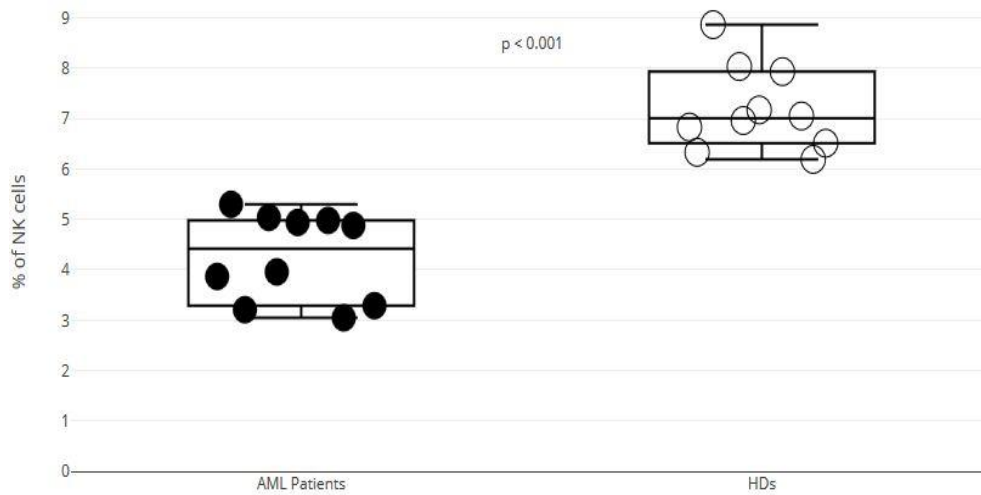


Figure 7. Percentages of CD56⁺ NK cells among the CD45^{bright} cells in the bone marrow of AML patients and healthy donors (HDs) are shown. Each dot represents a single AML patient or HD. Lines indicate the median and interquartile range of positive cells detected in all patients and donors analyzed ($p < 0.001$).

The proportion of NK cells expressing NKG2D, CD160, and KIR2DL1 receptors were significantly different between the groups. In terms of surface density, the median fluorescence intensity (MFI) on NK cells from the AML patients had higher expression of KIR2DL1 receptor (1044.60 ± 881.30 vs. 249.34 ± 150.07) but lower expression of NKG2D (1989.32 ± 538.54 vs. 2616.05 ± 578.65) and CD160 (839.62 ± 222.85 vs. 1287.22 ± 445.02) than NK cells from healthy donors as shown in Figure 2.

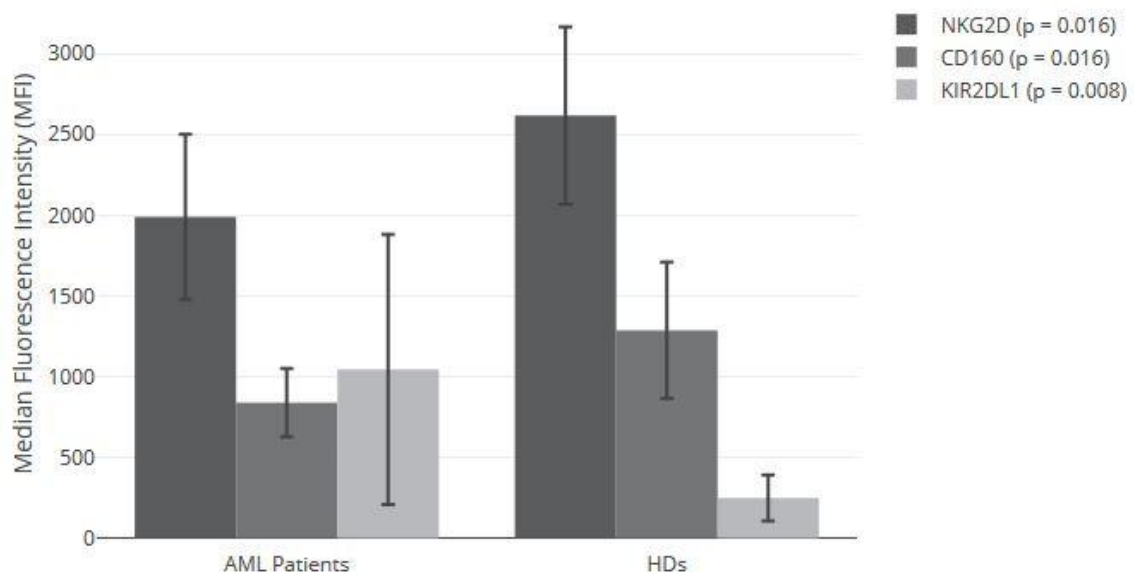


Figure 8. Expression of NKG2D, CD160 and KR2DL1 receptors in terms of surface density by median fluorescence intensity (MFI) on NK cells from bone marrow blood samples of AML patients and HDs ($p < 0.05$).

The majority of AML patients has a downregulated NK cell surface expression of the activating natural cytotoxicity receptors (NCRs; that is, NKp30, NKp44 and NKp46).^{8, 16, 61} However, the expression of NCRs on the NK cells obtained was similar between the AML

patients and healthy donors (data not shown). Together with the activating NK cell receptor NKG2D, the NCRs are the main receptors involved in NK cell-mediated recognition and killing of leukemic target cells^{16, 62}.

The AML cells themselves contribute to impaired NK cell-mediated killing by the decrease or the absence of surface ligands expression for various NK cell activating receptors, including NCRs and NKG2D.⁶³⁻⁶⁵ Furthermore, AML cells can shed ligands for NKG2D, as demonstrated by the increased serum levels of MHC class I chain-related genes A and B (MICA/B) in AML patients compared with healthy controls.^{66, 67} These soluble ligands may provide a chronic systemic stimulus to NK cells, resulting in reduced receptor expression and impaired NK cell-mediated cytotoxicity.⁶⁶

Additionally, the expression of the CD8 receptor has been associated with a more functional profile of NK cells, as detected by the cytokine production and degranulation.⁶⁸⁻⁷⁰ Moreover, sHLA-G isoforms appear to be able to induce the apoptosis of CD8⁺ T cells and NK cells through the ligation with CD8^{70, 71}, a characteristic shared with classic soluble HLA class I molecules, according to some authors.^{47, 72} In the results presented in this paper, the percentage of CD8⁺ NK cells was significantly different (11.40% ± 5.84% for AML patients vs. 4.43% ± 2.29% for HDs) (Figure 3).

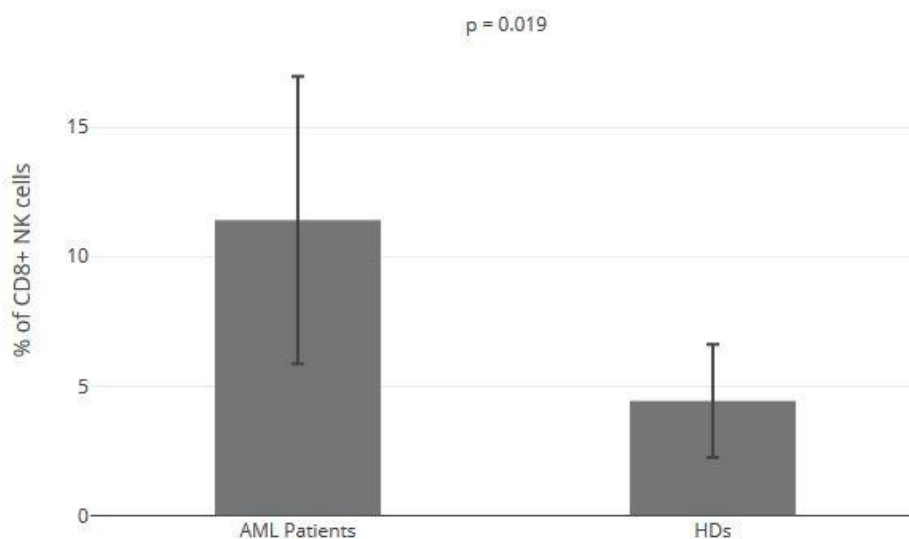


Figure 9. CD8⁺ NK cells frequency detected by flow cytometry. Significant difference in CD8⁺ expression on NK cells between AML patients and HDs ($p = 0,019$).

Another activating receptor in NK cells, the CD160, that binds preferentially to HLA-C and soluble HLA-G molecules have been studied because of its stimulatory effect of cytokine secretion on NK cells.⁷³⁻⁷⁵ The CD160 is expressed on the cell surface of the CD56^{dim} NK cell in the peripheral blood where it constitutes the major NK cell subpopulation.⁷⁶ This receptor seems to trigger the NK cell activation in a similar manner to CD16 receptor. Upon specific engagement of CD160 by its physiological ligand, the NK cells produce significant levels of IFN- γ , TNF- α , IL-6, as well as IL-8 and MIP-1 β , but marginal amounts of IL-4 or IL-10.⁷³

Besides the activating receptor status, the inhibitory receptor phenotype also has a role in the escape of AML leukemic cells from NK cells. KIRs are a major NK cell receptor family with important inhibitory potential. Through extensive genotyping of NK cell inhibitory receptors, Verheyden et al.⁶⁵ showed that a noticeable proportion of leukemic patients expresses a KIR phenotype in favor of NK cell immune escape, resulting from the heterozygous combination of defined A and B haplotypes and characterized by a higher number of different KIRs with major inhibitory capacity, in particular those with long cytoplasmic domain (KIRDLs).

However, considering the inhibitory receptors for sHLA-G, KIR2DL4 and ILT2, eventually expressed in NK cells, there was no significant difference in the percentage of ILT2⁺ NK cells between AML patients and controls, and there was no expression of KIR2DL4 in both groups (data not shown).

The concentration of Soluble HLA-G (sHLA-G1 and sHLA-G5) molecules in BM plasma samples from AML patients were higher ($386,49 \pm 343,13$ U/mL, $n = 10$) than in controls ($185,96 \pm 222,11$ U/mL, $n = 8$) as shown in Figure 4. However, such difference was not statistically significant with this sample size.

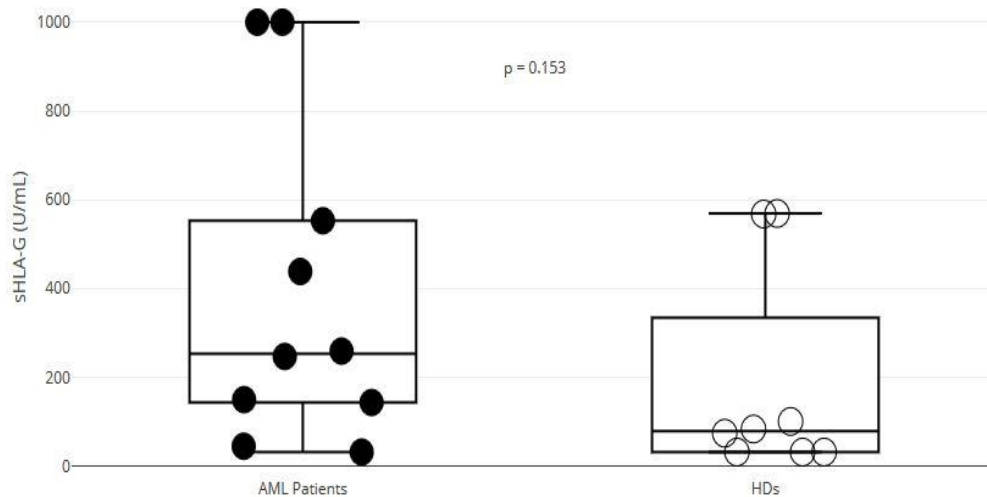


Figure 10. Soluble sHLA-G levels in the BM plasma samples of AML patients (closed circles) and HDs (open circles). The concentration of sHLA-G (shed HLA-G1 and HLA-G5) was evaluated using specific sandwich ELISA. Results are expressed as arbitrary units (U)/mL of sHLA-G. Mann-Whitney U test reveals no significant difference in sHLA-G levels between patients and controls ($p = 0.153$).

The analysis of the association between the expression of sHLA-G and clinical parameters, including patient age, gender, subtype of AML, and percentage of blasts at diagnosis, revealed that sHLA-G expression is independent of all the abovementioned variables. Notably, no correlation was found between age and sHLA-G levels in BM plasma samples in healthy donors.

Although this study has been performed in a small cohort of patients, as far as it is known, this is the first demonstration of sHLA-G levels in BM samples of AML patients at diagnosis.

The aberrant sHLA-G expression as a clinical biomarker for diagnosis or prognosis has been intensively investigated in tumors and it is known that the sHLA-G isoforms seem to be more frequent than membrane-bound isoforms in solid tumors (ovarian and breast cancer ascites), as well as in hematopoietic malignancies such as AML.^{50, 54, 77}

Because membrane-bound and sHLA-G molecules are well-known for their immunoregulatory actions, their expression could favor tumor escape, as has been shown in melanomas⁷⁸ and gliomas.^{28, 38, 79}

After, it was investigated whether the IL-6, IL10 and TNF- α levels in the bone marrow plasma of AML patients and healthy donors were different. The results are shown in the

Figures 5, 6 and 7, respectively. As can be seen, it is indeed demonstrated that a higher concentration of the dosed cytokines, IL6 (85.37 ± 124.14 pg/mL vs. 3.2 ± 0.0 pg/mL), IL10 (46.62 ± 51.37 pg/mL vs. 5.08 ± 1.49 pg/mL) and TNF- α (30.08 ± 8.34 pg/mL vs. 3.25 ± 0.10 pg/mL) is found in the BM plasma from the AML patients than from healthy donors.

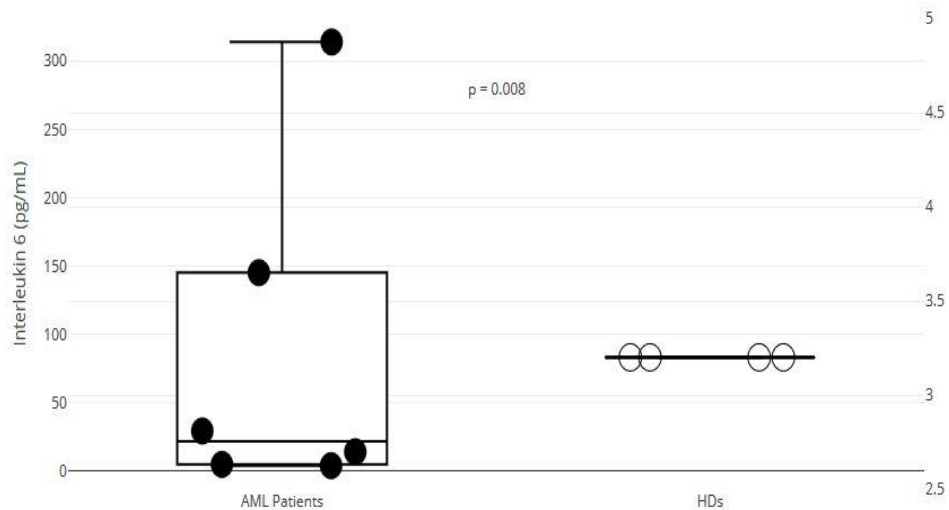


Figure 11. Plasma levels of IL-6 in the bone marrow of AML patients compared with those of HDs. The concentration was expressed in pg/mL and for healthy donors the values are related to the secondary axis. A significant increase of IL-6 level on AML patients was established ($n = 6$) compared to that in controls ($n = 4$), according to Mann-Whitney U test ($p = 0.008$).

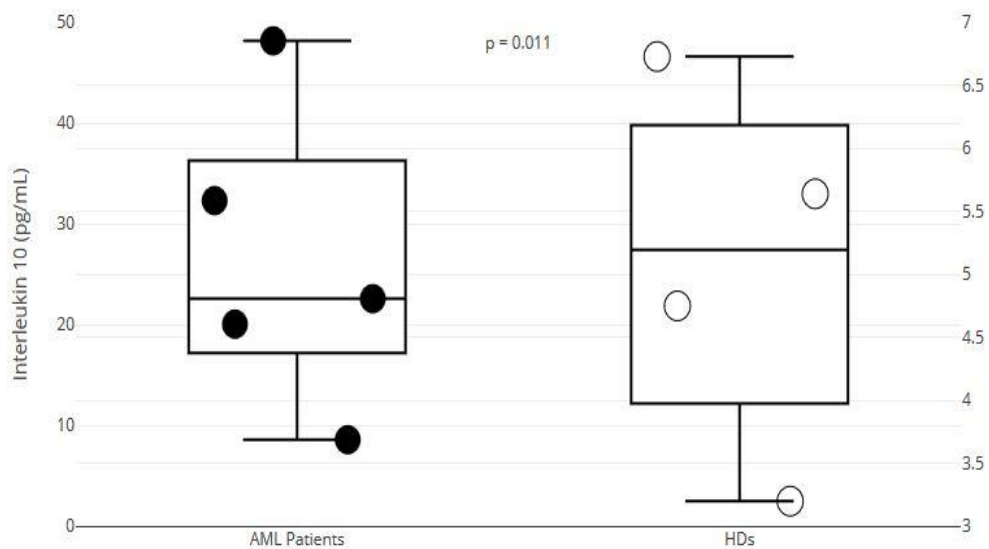


Figure 12. Plasma levels of IL-10 in the bone marrow of AML patients compared with those of HDs. The concentration was expressed in pg/mL and for healthy donors the values are related to the secondary axis. A significant increase of IL-10 level on AML patients was established ($n = 5$) compared to that in controls ($n = 4$), according to Mann-Whitney U test ($p = 0.011$).

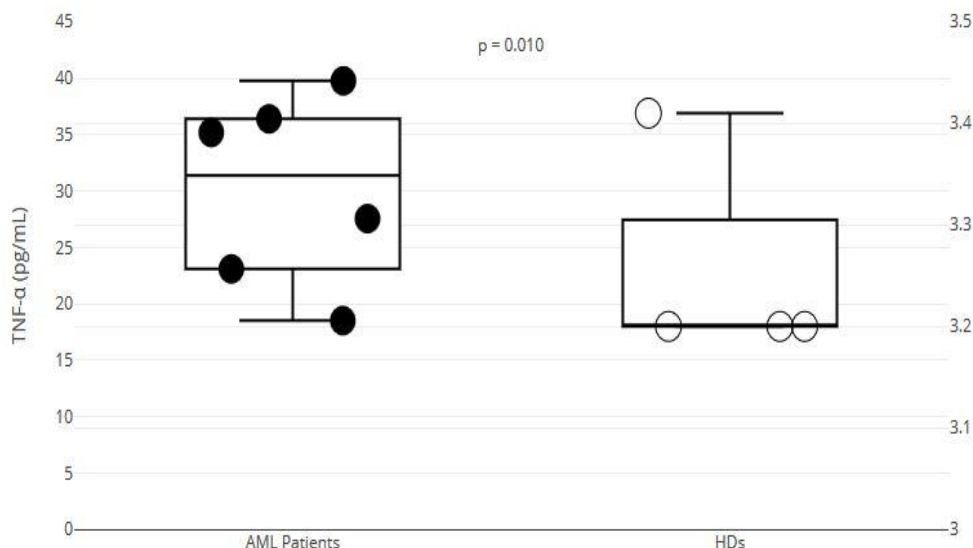


Figure 13. Plasma levels of TNF- α in the bone marrow of AML patients compared with those of HDs. The concentration was expressed in pg/mL and for healthy donors the values are related to the secondary axis. A significant increase of TNF- α level on AML patients was established ($n = 6$) compared to that in controls ($n = 4$), according to Mann-Whitney U test ($p = 0.010$).

Cytokines and chemokines play a role in the pathogenesis of AML and can affect the disease and host alike. The bone marrow microenvironment is a dynamic network of growth factors, cytokines, chemokines, and stromal cells that can promote leukemogenesis and progression of AML⁸⁰. Dysregulation of many cytokines including IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α , IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18, IL-11, IL-22, IL-23, TGF- β , and IFN- γ has been implicated in all stages of tumor and leukemia development from initiation and promotion to invasion and metastasis.^{17, 80-83}

Moreover, a large number of molecules that are part of the leukemic microenvironment can be related directly to the modulation of NK cytotoxic activity and the expression of NK cell activating receptors.^{4, 5, 65, 80}

4. Conclusions

Results from this study further improve the knowledge on the characterization of the bone marrow microenvironment and NK cells immunophenotype at diagnosis of AML.

Additionally, it was demonstrated for the first time that soluble HLA-G molecules are present in BM plasma samples at the diagnosis of AML. The prognostic value of sHLA-G

concentration in BM plasma samples from AML patients at diagnosis has to be established in future studies.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Supplementary material

Table S. 1. **Antibodies used for flow cytometry analysis.**

Antigen	Supplier	Fluorochromes	Comment
CD3	Becton Dickinson	FITC	dump channel
CD8	Becton Dickinson	APC	phenotype
CD14	Becton Dickinson	FITC	dump channel
CD19	Becton Dickinson	FITC	dump channel
CD16	Becton Dickinson	APC-H7	phenotype
CD45	Becton Dickinson	PE-Cy5	phenotype
CD56	Becton Dickinson	PE-Cy7	phenotype
CD85j (ILT2)	Becton Dickinson	PE	phenotype
CD158a (KIR2DL1)	Becton Dickinson	APC	phenotype
CD158b (KIR2DL2/3)	Becton Dickinson	PE	phenotype
CD158d (KIR2DL4)	Biologend	APC	phenotype
CD158e1/k (KIR3DL1/2)	Miltenyi Biotec	PE	phenotype
CD314 (NKG2D)	Becton Dickinson	PE	phenotype
CD335 (NKp46)	Becton Dickinson	PE	phenotype
CD336 (NKp44)	Biologend	APC	phenotype
CD337 (NKp30)	Biologend	APC	phenotype
CD160	Becton Dickinson	PE	phenotype
Ms IgG1, k	Becton Dickinson	APC	Isotype

References

1. Burnet, M., Cancer—A Biological Approach: III. Viruses Associated with Neoplastic Conditions. IV. Practical Applications. *Br Med J* **1957**, *1* (5023), 841-7.
2. Green, H. N.; Anthony, H. M., The immunological theory of cancer. *Practitioner* **1963**, *190*, 705-14.
3. Dunn, G. P.; Old, L. J.; Schreiber, R. D., The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **2004**, *21* (2), 137-48.
4. Wu, D., Innate and Adaptive Immune Cell Metabolism in Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* **2017**, *1011*, 211-223.
5. Gajewski, T. F.; Schreiber, H.; Fu, Y. X., Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* **2013**, *14* (10), 1014-22.
6. Zitvogel, L., The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? 2008; Vol. 118, pp 1991-2001.
7. Swann, J. B.; Smyth, M. J., Immune surveillance of tumors. In *J Clin Invest*, 2007; Vol. 117, pp 1137-46.

8. Alcasid, M.; Ma, L.; Gotlib, J. R.; Arber, D. A.; Ohgami, R. S., The clinicopathologic significance of lymphocyte subsets in acute myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol* **2017**, *39* (2), 129-136.
9. Carreras, J.; Lopez-Guillermo, A.; Roncador, G.; Villamor, N.; Colomo, L.; Martinez, A.; Hamoudi, R.; Howat, W. J.; Montserrat, E.; Campo, E., High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* **2009**, *27* (9), 1470-6.
10. Muenst, S.; Hoeller, S.; Dirnhofer, S.; Tzankov, A., Increased programmed death-1+ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. *Hum Pathol* **2009**, *40* (12), 1715-22.
11. Wada, N.; Zaki, M. A.; Hori, Y.; Hashimoto, K.; Tsukaguchi, M.; Tatsumi, Y.; Ishikawa, J.; Tominaga, N.; Sakoda, H.; Take, H.; Tsudo, M.; Kuwayama, M.; Morii, E.; Aozasa, K., Tumour-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. *Histopathology* **2012**, *60* (2), 313-9.
12. Danielou-Lazareth, A.; Henry, G.; Geromin, D.; Khaznadar, Z.; Briere, J.; Tamouza, R.; Cayuela, J. M.; Thieblemont, C.; Toubert, A.; Dulphy, N., At diagnosis, diffuse large B-cell lymphoma patients show impaired rituximab-mediated NK-cell cytotoxicity. *Eur J Immunol* **2013**, *43* (5), 1383-8.
13. Shafer, D.; Smith, M. R.; Borghaei, H.; Millenson, M. M.; Li, T.; Litwin, S.; Anad, R.; Al-Saleem, T., Low NK cell counts in peripheral blood are associated with inferior overall survival in patients with follicular lymphoma. *Leuk Res* **2013**, *37* (10), 1213-5.
14. Sullivan, E. M.; Jeha, S.; Kang, G.; Cheng, C.; Rooney, B.; Holladay, M.; Bari, R.; Schell, S.; Tuggle, M.; Pui, C. H.; Leung, W., NK cell genotype and phenotype at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia correlate with postinduction residual disease. *Clin Cancer Res* **2014**, *20* (23), 5986-94.
15. Fauriat, C.; Just-Landi, S.; Mallet, F.; Arnoulet, C.; Sainty, D.; Olive, D.; Costello, R. T., Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood* **2007**, *109* (1), 323-30.
16. Lion, E.; Willemsen, Y.; Berneman, Z. N.; Van Tendeloo, V. F.; Smits, E. L., Natural killer cell immune escape in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **2012**, *26* (9), 2019-26.
17. Khaznadar, Z.; Henry, G.; Setterblad, N.; Agaoglu, S.; Raffoux, E.; Boissel, N.; Dombret, H.; Toubert, A.; Dulphy, N., Acute myeloid leukemia impairs natural killer cells through the formation of a deficient cytotoxic immunological synapse. *Eur J Immunol* **2014**, *44* (10), 3068-80.
18. Ansell, S. M.; Vonderheide, R. H., Cellular composition of the tumor microenvironment. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* **2013**.
19. Lowdell, M. W.; Craston, R.; Samuel, D.; Wood, M. E.; O'Neill, E.; Saha, V.; Prentice, H. G., Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells. *Br J Haematol* **2002**, *117* (4), 821-7.
20. Chen, R.; Alvero, A. B.; Silasi, D.-A.; Mor, G., Inflammation, Cancer and Chemoresistance: Taking Advantage of the Toll-Like Receptor Signaling Pathway. *American Journal of Reproductive Immunology* **2007**, *57* (2), 93-107.
21. Coussens, L. M.; Werb, Z., Inflammation and cancer. *Nature* **2002**, *420* (6917), 860-7.
22. Whiteside, T. L., The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* **2008**, *27* (45), 5904-12.

23. Crusz, S. M.; Balkwill, F. R., Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nat Rev Clin Oncol* **2015**, *12* (10), 584-96.
24. Amiot, L.; Ferrone, S.; Grosse-Wilde, H.; Seliger, B., Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? *Cell Mol Life Sci* **2011**, *68* (3), 417-31.
25. Rouas-Freiss, N.; Moreau, P.; Menier, C.; Carosella, E. D., HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. *Semin Cancer Biol* **2003**, *13* (5), 325-36.
26. Rouas-Freiss, N.; Moreau, P.; Menier, C.; LeMaout, J.; Carosella, E. D., Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. *Semin Cancer Biol* **2007**, *17* (6), 413-21.
27. Locafaro, G.; Amodio, G.; Tomasoni, D.; Tresoldi, C.; Ciceri, F.; Gregori, S., HLA-G expression on blasts and tolerogenic cells in patients affected by acute myeloid leukemia. *J Immunol Res* **2014**, *2014*, 636292.
28. Carosella, E. D.; Rouas-Freiss, N.; Tronik-Le Roux, D.; Moreau, P.; LeMaout, J., HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. *Adv Immunol* **2015**, *127*, 33-144.
29. Ramos, C. S.; Goncalves, A. S.; Marinho, L. C.; Gomes Avelino, M. A.; Saddi, V. A.; Lopes, A. C.; Simoes, R. T.; Wastowski, I. J., Analysis of HLA-G gene polymorphism and protein expression in invasive breast ductal carcinoma. *Hum Immunol* **2014**, *75* (7), 667-72.
30. Hunt, J. S.; Geraghty, D. E., Soluble HLA-G isoforms: technical deficiencies lead to misinterpretations. *MHR: Basic science of reproductive medicine* **2005**, *11* (10), 715-717.
31. Ivanova-Todorova, E.; Mourdjeva, M.; Kyurkchiev, D.; Bochev, I.; Stoyanova, E.; Dimitrov, R.; Timeva, T.; Yunakova, M.; Bukarev, D.; Shterev, A.; Tivchev, P.; Kyurkchiev, S., HLA-G expression is up-regulated by progesterone in mesenchymal stem cells. *Am J Reprod Immunol* **2009**, *62* (1), 25-33.
32. Zilberman, S.; Schenowitz, C.; Agaoglu, S.; Benoit, F.; Riteau, B.; Rouzier, R.; Carosella, E. D.; Rouas-Freiss, N.; Menier, C., HLA-G1 and HLA-G5 active dimers are present in malignant cells and effusions: the influence of the tumor microenvironment. *Eur J Immunol* **2012**, *42* (6), 1599-608.
33. Morandi, F.; Venturi, C.; Rizzo, R.; Castellazzi, M.; Baldi, E.; Caniatti, M. L.; Tola, M. R.; Granieri, E.; Fainardi, E.; Uccelli, A.; Pistoia, V., Intrathecal soluble HLA-E correlates with disease activity in patients with multiple sclerosis and may cooperate with soluble HLA-G in the resolution of neuroinflammation. *J Neuroimmune Pharmacol* **2013**, *8* (4), 944-55.
34. Yao, G. D.; Shu, Y. M.; Shi, S. L.; Peng, Z. F.; Song, W. Y.; Jin, H. X.; Sun, Y. P., Expression and potential roles of HLA-G in human spermatogenesis and early embryonic development. *PLoS One* **2014**, *9* (3), e92889.
35. Lefebvre, S.; Antoine, M.; Uzan, S.; McMaster, M.; Dausset, J.; Carosella, E. D.; Paul, P., Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. *J Pathol* **2002**, *196* (3), 266-74.
36. Ibrahim, E. C.; Guerra, N.; Lacombe, M. J.; Angevin, E.; Chouaib, S.; Carosella, E. D.; Caignard, A.; Paul, P., Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res* **2001**, *61* (18), 6838-45.
37. Urosevic, M.; Kurrer, M. O.; Kamarashev, J.; Mueller, B.; Weder, W.; Burg, G.; Stahel, R. A.; Dummer, R.; Trojan, A., Human Leukocyte Antigen G Up-Regulation in Lung Cancer Associates with High-Grade Histology, Human Leukocyte Antigen Class I Loss and Interleukin-10 Production. *The American Journal of Pathology* **2001**, *159* (3), 817-824.
38. Wiendl, H.; Mitsdoerffer, M.; Hofmeister, V.; Wischhusen, J.; Bornemann, A.; Meyermann, R.; Weiss, E. H.; Melms, A.; Weller, M., A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol* **2002**, *168* (9), 4772-80.

39. Urosevic, M.; Willers, J.; Mueller, B.; Kempf, W.; Burg, G.; Dummer, R., HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood* **2002**, *99* (2), 609-17.
40. Park, G. M.; Lee, S.; Park, B.; Kim, E.; Shin, J.; Cho, K.; Ahn, K., Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, *313* (3), 606-11.
41. Dong, Y.; Lieskovska, J.; Kedrin, D.; Porcelli, S.; Mandelboim, O.; Bushkin, Y., Soluble nonclassical HLA generated by the metalloproteinase pathway. *Hum Immunol* **2003**, *64* (8), 802-10.
42. Rouas-Freiss, N.; Moreau, P.; Ferrone, S.; Carosella, E. D., HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res* **2005**, *65* (22), 10139-44.
43. Solier, C.; Aguerre-Girr, M.; Lenfant, F.; Campan, A.; Berrebi, A.; Rebmann, V.; Grosse-Wilde, H.; Le Bouteiller, P., Secretion of pro-apoptotic intron 4-retaining soluble HLA-G1 by human villous trophoblast. *Eur J Immunol* **2002**, *32* (12), 3576-86.
44. Gros, F.; Sebti, Y.; de Guibert, S.; Branger, B.; Bernard, M.; Fauchet, R.; Amiot, L., Soluble HLA-G molecules increase during acute leukemia, especially in subtypes affecting monocytic and lymphoid lineages. *Neoplasia* **2006**, *8* (3), 223-30.
45. Rouas-Freiss, N.; Goncalves, R. M.; Menier, C.; Dausset, J.; Carosella, E. D., Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94* (21), 11520-5.
46. Rouas-Freiss, N.; Marchal, R. E.; Kirszenbaum, M.; Dausset, J.; Carosella, E. D., The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94* (10), 5249-54.
47. Contini, P.; Ghio, M.; Poggi, A.; Filaci, G.; Indiveri, F.; Ferrone, S.; Puppo, F., Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol* **2003**, *33* (1), 125-34.
48. Le Rond, S.; Le Maoult, J.; Creput, C.; Menier, C.; Deschamps, M.; Le Friec, G.; Amiot, L.; Durrbach, A.; Dausset, J.; Carosella, E. D.; Rouas-Freiss, N., Alloreactive CD4+ and CD8+ T cells express the immunotolerant HLA-G molecule in mixed lymphocyte reactions: in vivo implications in transplanted patients. *Eur J Immunol* **2004**, *34* (3), 649-660.
49. Biedron, M.; Rybka, J.; Wrobel, T.; Prajs, I.; Poreba, R.; Kuliczowski, K., The role of soluble HLA-G and HLA-G receptors in patients with hematological malignancies after allogeneic stem cell transplantation. *Med Oncol* **2015**, *32* (8), 219.
50. Sebti, Y.; Le Friec, G.; Pangault, C.; Gros, F.; Drenou, B.; Guilloux, V.; Bernard, M.; Lamy, T.; Fauchet, R.; Amiot, L., Soluble HLA-G molecules are increased in lymphoproliferative disorders. *Hum Immunol* **2003**, *64* (11), 1093-101.
51. Le Friec, G.; Laupeze, B.; Fardel, O.; Sebti, Y.; Pangault, C.; Guilloux, V.; Beauplet, A.; Fauchet, R.; Amiot, L., Soluble HLA-G inhibits human dendritic cell-triggered allogeneic T-cell proliferation without altering dendritic differentiation and maturation processes. *Hum Immunol* **2003**, *64* (8), 752-61.
52. Nuckel, H.; Rebmann, V.; Durig, J.; Duhrsen, U.; Grosse-Wilde, H., HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2005**, *105* (4), 1694-8.

53. Rebmann, V.; Nuckel, H.; Duhrsen, U.; Grosse-Wilde, H., HLA-G in B-chronic lymphocytic leukaemia: clinical relevance and functional implications. *Semin Cancer Biol* **2007**, *17* (6), 430-5.
54. Yan, W. H.; Lin, A.; Chen, B. G.; Luo, W. D.; Dai, M. Z.; Chen, X. J.; Xu, H. H.; Li, B. L., Unfavourable clinical implications for HLA-G expression in acute myeloid leukaemia. *J Cell Mol Med* **2008**, *12* (3), 889-98.
55. Polakova, K.; Zeleznikova, T.; Russ, G., HLA-G5 in the blood of leukemia patients and healthy individuals. *Leuk Res* **2013**, *37* (2), 139-45.
56. Opitz, J. M., Book review ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M, editors. Published in collaboration with Cytogenetic and Genome Research by PB - Karger , Basel. VI and 140 pp. plus fold-out, 11 Fig. 4 tables. *American Journal of Medical Genetics Part A* **2013**, *161* (8), 2108-2109.
57. Freud, A. G.; Yu, J.; Caligiuri, M. A., Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Semin Immunol* **2014**, *26* (2), 132-7.
58. Leung, W., Infusions of allogeneic natural killer cells as cancer therapy. *Clin Cancer Res* **2014**, *20* (13), 3390-400.
59. Martner, A.; Rydstrom, A.; Riise, R. E.; Aurelius, J.; Anderson, H.; Brune, M.; Foa, R.; Hellstrand, K.; Thoren, F. B., Role of natural killer cell subsets and natural cytotoxicity receptors for the outcome of immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Oncoimmunology* **2016**, *5* (1), e1041701.
60. Poli, A.; Michel, T.; Theresine, M.; Andres, E.; Hentges, F.; Zimmer, J., CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* **2009**, *126* (4), 458-65.
61. Szczepanski, M. J.; Szajnik, M.; Welsh, A.; Foon, K. A.; Whiteside, T. L.; Boyiadzis, M., Interleukin-15 enhances natural killer cell cytotoxicity in patients with acute myeloid leukemia by upregulating the activating NK cell receptors. *Cancer Immunol Immunother* **2010**, *59* (1), 73-9.
62. Pegram, H. J.; Andrews, D. M.; Smyth, M. J.; Darcy, P. K.; Kershaw, M. H., Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol* **2011**, *89* (2), 216-24.
63. Sanchez-Correa, B.; Morgado, S.; Gayoso, I.; Bergua, J. M.; Casado, J. G.; Arcos, M. J.; Bengochea, M. L.; Duran, E.; Solana, R.; Tarazona, R., Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: analysis of NK cell-activating receptors and their ligands. *Cancer Immunol Immunother* **2011**, *60* (8), 1195-205.
64. Pende, D.; Marcenaro, S.; Falco, M.; Martini, S.; Bernardo, M. E.; Montagna, D.; Romeo, E.; Cognet, C.; Martinetti, M.; Maccario, R.; Mingari, M. C.; Vivier, E.; Moretta, L.; Locatelli, F.; Moretta, A., Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* **2009**, *113* (13), 3119-29.
65. Verheyden, S.; Bernier, M.; Demanet, C., Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia* **2004**, *18* (12), 2002-7.
66. Salih, H. R.; Antropius, H.; Gieseke, F.; Lutz, S. Z.; Kanz, L.; Rammensee, H. G.; Steinle, A., Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* **2003**, *102* (4), 1389-96.
67. Diermayr, S.; Himmelreich, H.; Durovic, B.; Mathys-Schneeberger, A.; Siegler, U.; Langenkamp, U.; Hofsteenge, J.; Gratwohl, A.; Tichelli, A.; Paluszewska, M.; Wiktor-Jedrzejczak, W.; Kalberer, C. P.; Wodnar-Filipowicz, A., NKG2D ligand expression in AML increases in response to HDAC inhibitor valproic acid and contributes to allorecognition by NK-cell lines with single KIR-HLA class I specificities. *Blood* **2008**, *111* (3), 1428-36.

68. Addison, E. G.; North, J.; Bakhsh, I.; Marden, C.; Haq, S.; Al-Sarraj, S.; Malayeri, R.; Wickremasinghe, R. G.; Davies, J. K.; Lowdell, M. W., Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology* **2005**, *116* (3), 354-61.
69. Jonges, L. E.; Albertsson, P.; van Vlierberghe, R. L.; Ensink, N. G.; Johansson, B. R.; van de Velde, C. J.; Fleuren, G. J.; Nannmark, U.; Kuppen, P. J., The phenotypic heterogeneity of human natural killer cells: presence of at least 48 different subsets in the peripheral blood. *Scand J Immunol* **2001**, *53* (2), 103-10.
70. Ahmad, F.; Hong, H. S.; Jackel, M.; Jablonka, A.; Lu, I. N.; Bhatnagar, N.; Eberhard, J. M.; Bollmann, B. A.; Ballmaier, M.; Zielinska-Skowronek, M.; Schmidt, R. E.; Meyer-Olson, D., High frequencies of polyfunctional CD8+ NK cells in chronic HIV-1 infection are associated with slower disease progression. *J Virol* **2014**, *88* (21), 12397-408.
71. Fournel, S.; Aguerre-Girr, M.; Huc, X.; Lenfant, F.; Alam, A.; Toubert, A.; Bensussan, A.; Le Bouteiller, P., Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol* **2000**, *164* (12), 6100-4.
72. Puppo, F.; Contini, P.; Ghio, M.; Indiveri, F., Soluble HLA class I molecules/CD8 ligation trigger apoptosis of CD8+ cells by Fas/Fas-ligand interaction. *ScientificWorldJournal* **2002**, *2*, 421-3.
73. Barakonyi, A.; Rabot, M.; Marie-Cardine, A.; Aguerre-Girr, M.; Polgar, B.; Schiavon, V.; Bensussan, A.; Le Bouteiller, P., Cutting edge: engagement of CD160 by its HLA-C physiological ligand triggers a unique cytokine profile secretion in the cytotoxic peripheral blood NK cell subset. *J Immunol* **2004**, *173* (9), 5349-54.
74. Le Bouteiller, P.; Barakonyi, A.; Giustiniani, J.; Lenfant, F.; Marie-Cardine, A.; Aguerre-Girr, M.; Rabot, M.; Hilgert, I.; Mami-Chouaib, F.; Tabiasco, J.; Boumsell, L.; Bensussan, A., *Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity*. 2003; Vol. 99, p 16963-8.
75. Fons, P.; Chabot, S.; Cartwright, J. E.; Lenfant, F.; L'Faqihi, F.; Giustiniani, J.; Herault, J. P.; Gueguen, G.; Bono, F.; Savi, P.; Aguerre-Girr, M.; Fournel, S.; Malecaze, F.; Bensussan, A.; Plouet, J.; Le Bouteiller, P., Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood* **2006**, *108* (8), 2608-15.
76. Le Bouteiller, P.; Tabiasco, J., Killers become builders during pregnancy. In *Nat Med*, United States, 2006; Vol. 12, pp 991-2.
77. Lin, A.; Yan, W. H., HLA-G expression in cancers: roles in immune evasion, metastasis and target for therapy. *Mol Med* **2015**.
78. Lesport, E.; Baudhuin, J.; LeMaoult, J.; Sousa, S.; Doliger, C.; Carosella, E. D.; Favier, B., Human melanoma cell secreting human leukocyte antigen-G5 inhibit natural killer cell cytotoxicity by impairing lytic granules polarization toward target cell. *Hum Immunol* **2009**, *70* (12), 1000-5.
79. Gonzalez, A.; Rebmann, V.; LeMaoult, J.; Horn, P. A.; Carosella, E. D.; Alegre, E., The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. *Crit Rev Clin Lab Sci* **2012**, *49* (3), 63-84.
80. Ayala, F.; Dewar, R.; Kieran, M.; Kalluri, R., Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia* **2009**, *23* (12), 2233-41.
81. Kornblau, S. M.; McCue, D.; Singh, N.; Chen, W.; Estrov, Z.; Coombes, K. R., Recurrent expression signatures of cytokines and chemokines are present and are independently

prognostic in acute myelogenous leukemia and myelodysplasia. *Blood* **2010**, *116* (20), 4251-61.

82. Loges, S.; Heil, G.; Bruweleit, M.; Schoder, V.; Butzal, M.; Fischer, U.; Gehling, U. M.; Schuch, G.; Hossfeld, D. K.; Fiedler, W., Analysis of concerted expression of angiogenic growth factors in acute myeloid leukemia: expression of angiopoietin-2 represents an independent prognostic factor for overall survival. *J Clin Oncol* **2005**, *23* (6), 1109-17.

83. Szczepanski, M. J.; Szajnik, M.; Czystowska, M.; Mandapathil, M.; Strauss, L.; Welsh, A.; Foon, K. A.; Whiteside, T. L.; Boyiadzis, M., Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* **2009**, *15* (10), 3325-32.

Capítulo 6 – Considerações Finais

Os resultados deste estudo contribuem para o aprimoramento do conhecimento referente à caracterização do microambiente da medula óssea e do imunofenotipo das células NK ao diagnóstico da Leucemia Mielóide Aguda.

Além disso, demonstramos pela primeira vez que as moléculas de HLA-G solúveis (sHLA-G) estão presentes no microambiente da medula óssea no diagnóstico de LMA. Contudo, o valor prognóstico da concentração de sHLA-G em amostras de plasma de medula óssea ao diagnóstico de LMA precisa ser investigado em estudos futuros.

Capítulo 7 – **Perspectivas Futuras**

O papel que o microambiente tumoral desempenha na imunomodulação das células integrantes do sistema imune tornou-se uma área de intensa pesquisa e emergente análise para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas.

Novas iniciativas no tratamento de neoplasias, também objetivam a modulação do sistema imune dos pacientes, no entanto, células NK também estão envolvidas na mediação dos efeitos de diversas terapias usadas para tratar doenças neoplásicas hematológicas, através de uma grande variedade de mecanismos.

Portanto, uma melhor compreensão da biologia subjacente da atividade exercida por proteínas solúveis, citocinas e quimiocinas em relação às células atuantes no microambiente tumoral pode nos fornecer uma ferramenta para tratamento dos pacientes de forma mais eficaz e evitando a vulnerabilidade, declínio funcional e morbidade da terapêutica atualmente disponível.

Anexos

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para doadores saudáveis adultos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do projeto GPPG: 15-0633

Título do Projeto: Avaliação do Perfil Fenotípico de Células Natural Killer (NK) e da Expressão de Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G) em Paciente com Leucemia Mielóide Aguda em Início de Diagnóstico

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é estudar os mecanismos que influenciam no desenvolvimento da Leucemia Mielóide Aguda, investigando características das células Natural Killer, umas das células que compõem o sistema imunológico humano, como também da molécula de HLA-G, uma molécula responsável por diferentes efeitos sobre as células do sistema imune. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Para realização deste estudo é necessário comparar um grupo de pacientes que apresentam a característica estudada com um grupo de pessoas que não apresenta esta característica. Você está sendo convidado, a participar do grupo controle, ou seja, que não possui a doença em questão.

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: Será realizada uma coleta de cerca de 5,0 ml (volume equivalente a uma colher de chá) de sangue da medula. Esta amostra será obtida juntamente com a coleta de medula que será realizada para a doação. Alguns dados necessários para realização do projeto serão obtidos através de análise de prontuários, por isso solicitamos sua autorização para este acesso.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são decorrentes do procedimento de coleta, que pode provocar um desconforto no local onde a agulha for introduzida, tanto no momento da coleta, quanto posteriormente a ela. Poderá surgir neste local uma área vermelha ou até mesmo roxa (hematoma) na pele, mas que também desaparecerá com o decorrer do tempo. É importante você saber que a participação na pesquisa não agrega riscos a este procedimento que já é realizado para a doação de medula óssea.

Você não terá benefícios diretos ao participar da pesquisa. Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são de contribuição para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado e os resultados poderão auxiliar a realização de estudos futuros, podendo viabilizar o desenvolvimento de possíveis abordagens terapêuticas que possam contribuir para um melhor prognóstico da doença.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, cujos custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 1 de 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Ressaltando também que a amostra (o sangue doado) será descartado ao final dos testes realizados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dra. Lucia Silla, pelo telefone (51) 33598850, com o pesquisador Filipe Sehn pelo telefone (51) 33598850 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 2 de 2

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes adultos.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nº do projeto GPPG: 15-0633

Título do Projeto: Avaliação do Perfil Fenotípico de Células Natural Killer (NK) e da Expressão de Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G) em Paciente com Leucemia Mielóide Aguda em Início de Diagnóstico

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é estudar os mecanismos que influenciam no desenvolvimento da Leucemia Mielóide Aguda, investigando características das células Natural Killer, umas das células que compõem o sistema imunológico humano, como também da molécula de HLA-G, uma molécula responsável por diferentes efeitos sobre as células do sistema imune. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Estamos realizando este convite, porque você possui suspeita de diagnóstico para leucemia e realiza acompanhamento médico regular junto ao Serviço de Hematologia Clínica do HCPA.

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: Será realizada uma coleta de dados necessários para realização do projeto que serão obtidos através de análise de prontuários e uma coleta de cerca de 5,0 ml (volume equivalente a uma colher de chá) de sangue da medula. Esta amostra será obtida de uma parte do volume de medula que já será coletada para o exame de diagnóstico. Alguns dados necessários para realização do projeto serão obtidos através de análise de prontuários, por isso solicitamos sua autorização para este acesso.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são decorrentes do procedimento de coleta, que pode provocar um desconforto no local onde a agulha for introduzida, tanto no momento da coleta, quanto posteriormente a ela. Poderá surgir neste local uma área vermelha ou até mesmo roxa (hematoma) na pele, mas que também desaparecerá com o decorrer do tempo. É importante você saber que a participação na pesquisa não agrega riscos a este procedimento que já é realizado na rotina assistencial e fazem parte do tratamento.

Você não terá benefícios diretos ao participar da pesquisa. Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são de contribuição para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado e os resultados poderão auxiliar a realização de estudos futuros, podendo viabilizar o desenvolvimento de possíveis abordagens terapêuticas que possam contribuir para um melhor prognóstico da doença.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, cujos custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 1 de 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Ressaltando também que a amostra (o sangue doado) será descartada ao final dos testes realizados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dra. Lucia Silla, pelo telefone (51) 33598850, com o pesquisador Filipe Sehn pelo telefone (51) 33598850 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 2 de 2

Anexo 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para responsáveis por pacientes menores de idade.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - responsáveis

Nº do projeto GPPG: 15-0633

Título do Projeto: Avaliação do Perfil Fenotípico de Células Natural Killer (NK) e da Expressão de Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G) em Paciente com Leucemia Mielóide Aguda em Início de Diagnóstico.

O paciente pelo qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é estudar os mecanismos que influenciam no desenvolvimento da Leucemia Mielóide Aguda, investigando características das células Natural Killer, umas das células que compõem o sistema imunológico humano, como também da molécula de HLA-G, uma molécula responsável por diferentes efeitos sobre as células do sistema imune. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Estamos realizando este convite, porque paciente pelo qual você é responsável possui suspeita de diagnóstico para leucemia e realiza acompanhamento médico regular junto ao Serviço de Hematologia Clínica do HCPA.

Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes: Será realizada uma coleta de cerca de 5,0 ml (volume equivalente a uma colher de chá) de sangue da medula. Esta amostra será obtida de uma parte do volume de medula que já será coletado para o exame de diagnóstico. Alguns dados necessários para realização do projeto serão obtidos através de análise de prontuários, por isso solicitamos sua autorização para este acesso.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são decorrentes do procedimento de coleta, que pode provocar um desconforto no local onde a agulha for introduzida, tanto no momento da coleta, quanto posteriormente a ela. Poderá surgir neste local uma área vermelha ou até mesmo roxa (hematoma) na pele, mas que também desaparecerá com o decorrer do tempo. É importante você saber que a participação na pesquisa não agrega riscos a este procedimento que já é realizado na rotina assistencial e fazem parte do tratamento.

Você não terá benefícios diretos ao participar da pesquisa. Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são de contribuição para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado e os resultados poderão auxiliar a realização de estudos futuros, podendo viabilizar o desenvolvimento de possíveis abordagens terapêuticas que possam contribuir para um melhor prognóstico da doença.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, cujos custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Rubrica do responsável _____ Rubrica do pesquisador _____ Página 1 de 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - responsáveis

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Ressaltando também que a amostra (o sangue doado) será descartada ao final dos testes realizados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dra. Lucia Silla, pelo telefone (51) 33598850, com o pesquisador Filipe Sehn pelo telefone (51) 33598850 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa:

Assinatura (se aplicável)

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 2 de 2

Anexo 4: The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: Checklist of items that should be included in reports of observational studies.

	Item No	Page	Recommendation
Title and abstract	1	49	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract
			(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found
Introduction		49	
Background/rationale	2	49 - 52	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported
Objectives	3	52	State specific objectives, including any prespecified hypotheses
Methods		53	
Study design	4	53	Present key elements of study design early in the paper
Setting	5	53	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection
Participants	6	53	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants
		/	(b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case
Variables	7	53	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable
Data sources/ measurement	8*	54	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group
Bias	9	/	Describe any efforts to address potential sources of bias
Study size	10	53	Explain how the study size was arrived at

Quantitative variables	11	54	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why
Statistical methods	12	54	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding
		/	(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions
		/	(c) Explain how missing data were addressed
		/	(d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed <i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy
		/	(e) Describe any sensitivity analyses
Results		54	
Participants	13*	54	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed
		/	(b) Give reasons for non-participation at each stage
		/	(c) Consider use of a flow diagram
Descriptive data	14*	55	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders
		/	(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest
		/	(c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)
Outcome data	15*	/	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time
		/	<i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure
		54-61	<i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures
Main results	16	54-61	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included
		/	(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized
		/	(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period
Other analyses	17	/	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses

Discussion		54	
Key results	18	54-61	Summarise key results with reference to study objectives
Limitations	19	55	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias
Interpretation	20	54-61	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence
Generalisability	21	61	Discuss the generalisability (external validity) of the study results
Other information		/	
Funding	22	/	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.