UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

IZABELA APARECIDA LOPES

**Identificação dos mecanismos de regulação das células
Natural Killer pelo fator de transcrição C/EBPG
(CCAAT/enhancer binding protein gamma)**

RIBEIRÃO PRETO

2018

IZABELA APARECIDA LOPES

**Identificação dos mecanismos de regulação das células
Natural Killer pelo fator de transcrição C/EBPG
(CCAAT/enhancer binding protein gamma)**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular.

Área de concentração: Diferenciação celular normal e neoplásica.

Orientadora: Dra. Lorena Lobo de Figueiredo Pontes

RIBEIRÃO PRETO

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação

Serviço de Biblioteca e Documentação Médica

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Lopes, Izabela Aparecida

Identificação dos mecanismos de regulação das células *Natural Killer* pelo fator de transcrição C/EBPG (*CCAAT/enhancer binding protein gamma*) – Ribeirão Preto, 2018.

90f

Dissertação (mestrado), apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Programa de Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular.

Orientador: Figueiredo-Pontes, Lorena Lobo de

1. Fator de transcrição C/EBPG. 2. Células *Natural Killer*
3. Expressão gênica 4. Deficiência funcional

FOLHA DE APROVAÇÃO

Izabela Aparecida Lopes

Identificação dos mecanismos de regulação das células *Natural Killer* pelo fator de transcrição C/EBPG (CCAAT/enhancer binding protein gamma)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular.

Área de concentração: Diferenciação celular normal e neoplásica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, meu sustento e proteção. Aos meus pais João Batista Lopes e Maria Isabel Lopes por todo amor e doação a mim dedicado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à minha orientadora pela confiança, por me dar a oportunidade de recomeçar; pela paciência e tolerância; por sempre me apoiar e incentivar a ser melhor; e por ser um exemplo de pesquisadora por sua ética e senso de responsabilidade.

À minha família, em especial aos meus pais. À minha mãe Isabel, meu grande exemplo de resiliência, meu colo nos momentos difíceis, sempre tão compreensiva e amorosa. Ao meu pai, por todo seu esforço, por todos os conselhos, por ser meu porto-seguro. À minha irmã Lindamara, por me incentivar, compreender e ser minha grande amiga e companheira de vida. Agradeço todas as orações e ações de vocês sem as quais este trabalho não seria concretizado. Vocês são o projeto de Deus para minha vida.

À querida Adriana, que foi não só minhas mãos e cérebro por inúmeras vezes, foi uma amiga no melhor sentido desta palavra. Agradeço por todo o apoio e incentivo nos momentos que mais precisei e por ter confiado em mim.

Às queridas Ana Sílvia e Adriana, por terem me acolhido tão bem desde os tempos do estágio. Ana, agradeço todos os conselhos, sua disposição em ajudar e contribuir e o carinho com que sempre me tratou. Adriana, sou muito grata por nossa convivência sempre tão leve e harmoniosa.

Ao professor Rego, por ter me recebido em seu laboratório. Agradeço por ter ido muito além de suas atribuições profissionais, sendo conselheiro e compreensivo, quando mais precisei.

À querida Cleide, que me acolheu desde os tempos do estágio com muita paciência, compreensão e disposição.

À querida Priscila, por seus ensinamentos e grande colaboração para a execução deste trabalho.

Às queridas Amélia e Josiane, por seus ensinamentos e sua disponibilidade em contribuir com este trabalho.

Aos colegas pós-graduandos, em especial ao Thiago que, por diversas vezes, contribuiu e colaborou com este trabalho. Agradeço aos demais alunos da minha orientadora, Cristina e Talita por compartilharem suas experiências.

Aos funcionários e aos demais alunos, pela disposição em ajudar e por suas contribuições para a resolução dos nossos problemas.

Por fim, e, acima de tudo, a Deus.

RESUMO

Lopes, I A. Identificação dos mecanismos de regulação das células *Natural Killer* pelo fator de transcrição C/EBPG (CCAAT/enhancer binding protein gamma) 2018. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Os C/EBP (CCAAT/enhancer-binding proteins) são uma família de fatores de transcrição implicados numa variedade de processos da hematopoese, regulando tanto a diferenciação terminal como a proliferação celular. Dentre estes, sabe-se que o C/EBP gamma (C/EBPG) está envolvido na maturação funcional de células *Natural Killer* (NK). Entretanto, os mediadores dessa regulação não são conhecidos. As células NK são linfócitos com funções efetoras de citotoxicidade e de produção de citocinas, dependentes de um equilíbrio dinâmico entre a expressão de receptores ativatórios e inibitórios bem como de receptores de citocinas. As duas funções (citotóxica e secretora), fazem das células NK importantes componentes da hematopoese, capazes de eliminar alvos susceptíveis bem como de recrutar outras células e amplificar a resposta inflamatória. Diante de incompatibilidade entre as células-alvo e células NK efetoras, os efeitos citotóxicos preponderam; enquanto na ausência de incompatibilidade, os efeitos mediados por citocinas sobre as demais células hematopoéticas se sobressaem. Por exemplo, citocinas como IFN γ , TNF α , TGF β , GM-CSF e IL-10, produzidas por células NK, são potenciais reguladoras da função das células-tronco hematopoéticas (CTH). Com o objetivo de estudar a regulação das células NK pelo C/EBPG, utilizamos células NK isoladas de animais transgênicos *knockout* (KO) para o C/ebpg e seus controles para analisar sua expressão gênica e função diferencial, com especial foco nos genes-alvo com potencial para regulação da hematopoese. Visando identificar potenciais genes-alvo do C/EBPG, isolamos células NK deficientes para o C/ebpg e controles, por meio de *sorting*, e realizamos posterior isolamento do RNA seguido de análise de expressão gênica em larga escala. A validação da expressão diferencial dos genes-alvo do C/ebpg, de interesse para a função secretória das células NK, foi realizada por PCR em Tempo Real para oito genes diferencialmente expressos na análise de expressão gênica em larga escala, a saber: *Il-10*, *Gmcsf*, *Ifng*, *Tnfa*, *Tgfb*, *Tlr4*, *Myd88* e *Irak4*. Os dados referentes à expressão basal e estimulada com IL-2, destes genes em células NK de animais KO para o C/ebpg e seus controles, revelaram uma tendência ao aumento da expressão de *Myd88* nos animais KO quando comparados aos controles. Foram verificados os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF α and IFN γ por meio de citometria de fluxo, utilizando o sobrenadante da cultura de NK de ambos os animais, observando-se que, após a ativação com IL-2, a produção de IFN γ mostrou-se diminuída em células NK

deficientes para o C/ebpg em comparação aos controles. Para caracterizar as células NK Cebpg-deficientes, analisamos a sua frequência (células linhagem⁻/CD3⁻/NK1.1⁺) e expressão dos receptores NKG2D, Ly49D e NKG2A, não sendo observadas diferenças numéricas ou de expressão de receptores entre células NK deficientes ou não para o C/ebpg. Os subtipos funcionais destas células foram caracterizados de acordo com a expressão de CD27 e CD11b, que permitem identificar as subpopulações de células NK imaturas secretórias, secretórias, citotóxicas e tolerantes. Os animais KO mostraram maior percentagem de células secretórias e redução percentual e numérica de células citotóxicas quando comparadas às células NK dos controles. Para demonstrar a deficiência funcional realizamos um ensaio de ativação de células. Em concordância, após a co-incubação de esplenócitos totais com células YAC-1, o ensaio de detecção do CD107 revelou que as células dos animais KO para o C/ebpg são cinco vezes menos ativadas do que células NK controles. Ademais, foi realizado um ensaio de citotoxicidade por citometria de fluxo utilizando o CTO (*Cell Tracker Orange*) como sonda fluorescente, o qual se incorpora às células-alvo da linhagem YAC-1. Como resultado, para a razão 10:1 NK: células-alvo, as células NK C/ebpg KO foram menos citotóxicas do que as células NK dos controles. Concluímos que as células NK de animais transgênicos KO para o C/ebpg têm função deficiente, menor potencial citotóxico e expressão de genes e citocinas alteradas em relação aos seus controles. Os mediadores apontados, em especial, o IFN γ , são alvos importantes para a regulação da função secretória das células NK.

Palavras-chave: 1. Fator de transcrição C/EBPG; 2. Células *Natural Killer*; 3. IFN γ .

ABSTRACT

Lopes, IA. Identification of Natural Killer cells regulation mechanisms by the transcription factor C/EBPG (CCAAT/enhancer binding protein gamma) 2018. 90f. Dissertation (Master's degree in Science). Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

C/EBP (CCAAT/enhance-binding proteins) are a family of transcription factors involved in a variety of hematopoietic processes, regulating both terminal differentiation and cellular proliferation. Among these, it is known that C/EBP gamma (C/EBPG) is involved in the functional maturation of Natural Killer (NK) cells. However, the mediators of this regulation are unknown. NK cells are lymphocytes with effector functions of cytotoxicity and production of cytokines, both dependent on a dynamic equilibrium between the expression of activating and inhibitory receptors as well as cytokine receptors. The two functions (cytotoxic and secretory) make NK cells important components of hematopoiesis, able to eliminate susceptible targets as well as recruit other cells to amplify inflammatory responses. In face of incompatibility between target cells and NK effector cells, cytotoxic effects predominate; while in the absence of incompatibility, cytokine-mediated effects that influence other hematopoietic cells prevail. For example, cytokines such as IFN γ , TNF α , TGF β , GM-CSF and IL-10, produced by NK cells, are potential regulators of hematopoietic stem cells (HSC). With the aim of studying the regulation of NK cells by C/EBPG, we isolated NK cells from transgenic C/ebpg knockout (KO) animals and controls to analyze their differential gene expression and function, with a special focus on hematopoiesis regulation. In order to identify potential C/EBPG target genes, we isolated C/ebpg-deficient and control NK cells by the use of sorting by flow cytometry and isolated RNA for gene expression analysis. Differential expression of C/ebpg target genes was performed by Real-time PCR for eight genes differentially expressed in the microarray analysis: *Il-10*, *Gmcsf*, *Ifng*, *Tnfa*, *Tgfb*, *Tlr4*, *Myd88* e *Irak4*. When compared to controls, non-activated and IL-2-stimulated C/ebpg KO NK cells presented a tendency to have higher expression of *Myd88*. Cytokine levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 α , TNF α and IFN γ , obtained from NK culture supernatants, were verified by flow cytometry, after IL-2 activation. Among these cytokines, the production of IFN γ by C/ebpg-deficient NK cells was found to be reduced. To further characterize NK cells, we analyzed their frequency (Lineage⁻/CD3⁻/NK1.1⁺ cells) and the expression of the receptors NKG2D, Ly49D and NKG2A, and both analyses presented similar expression between control or C/ebpg KO NK cells. The functional subtypes of these cells were characterized according to the expression of CD27 and CD11b, which allow the identification of NK subpopulations

as immature secretory, mature secretory, cytotoxic or tolerant. The KO animals showed higher percentage of secretory cells and percentual and numerical reduction of cytotoxic cells when compared to the NK control cells. In agreement, CD107a expression was 5-times lower in C/ebpg KO splenocytes than in control splenocytes after co-incubation with YAC-1 cells. In addition, a cytotoxicity assay by flow cytometry was performed. The fluorescent probe CTO (Cell Tracker Orange) was incorporated to YAC-1 cells, used as target cells. As a result, in the 10:1 NK:target cells ratio, C/ebp KO cells were less cytotoxic than NK control cells. We concluded that C/ebpg-deficient cells are dysfunctional, have a greater secretory potential and an altered expression of genes and cytokines as compared to their controls. The potential mediators revealed by our study, in particular, IFN γ , may be important targets for the regulation of NK secretory function.

Key words: 1. C/EBPG transcription factor; 2. Natural Killer cells; 3. IFN γ .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diagrama esquemático de estruturas CEBP e locais de mutação.....	15
Figura 2. Gráfico ilustrativo da porcentagem de células Natural Killer apoptóticas após serem co-cultivadas com células da linhagem leucêmica K562, estimuladas com IL-2	31
Figura 3. Delineamento experimental das etapas do estudo de caracterização de células Natural Killer normais (C/ebpg CT) ou deficientes (C/ebpg KO) para o fator de transcrição C/EBPG	33
Figura 4. Esquema representativo do modelo murino knockin knockout do C/ebpg	35
Figura 5. Gel de agarose mostrando a genotipagem	37
Figura 6 Gráficos ilustrativos da estratégia de gating por citometria de fluxo demonstrando a seleção da população de células NK.....	39
Figura 7. Normalização das amostras biológicas de cada fenótipo (C/ebpg CT e KO)	42
Figura 8. Hierarquização das amostras biológicas de cada fenótipo (C/ebpg CT e KO)	42
Figura 9. Gráficos ilustrativos da estratégia de gating por citometria de fluxo para subtipos funcionais de células NK, de acordo com a expressão de CD27 e CD11b.	46
Figura 10. Gráficos ilustrativos da estratégia de gating por citometria de fluxo, de acordo com a expressão de CD107a	47
Figura 11. Citospin das células YAC-1 (células-alvo, CA)	49
Figura 12. Gráficos ilustrativos da estratégia de gating por citometria de fluxo demonstrando a seleção da população de células NK Gráficos ilustrativos da estratégia de gating por citometria de fluxo demonstrando as populações de células NK (células efetoras, CEF) e YAC-1 (células-alvo, CA) marcadas com o fluoróforo CTO (<i>Cell Tracker Orange</i>) após co-cultura por 3 horas, e a viabilidade das mesmas por marcação com 7-AAD	49
Figura 13. Imagem do gel de agarose resultante da genotipagem para confirmação do genótipo C/ebpg f/f e detecção da vavCRE recombinase no modelo murino transgênico C/ebpg Knockout.....	51

Figura 14. Representação da análise de expressão gênica diferencial entre células Natural killer (NK) normais e deficientes para o C/ebpg.....	53
Figura 15. Gráficos ilustrativos da expressão gênica diferencial entre células NK de animais controles (CT) e knockouts (KO) para o C/ebpg	58
Figura 16. Gráfico ilustrativo da quantificação de IFN γ em animais Knockout (KO) para o C/ebpg e controles	60
Figura 17. Gráficos ilustrativos da análise de citometria de fluxo para quantificação de células NK de animais controles (CT) e knockouts (KO) para o C/ebpg, de acordo com a expressão de NK1.1 e CD3e.....	61
Figura 18. Gráficos ilustrativos da análise de citometria de fluxo para quantificação dos receptores NKG2A, NKG2D e Ly49D de animais controles (CT) e knockouts (KO) para o C/ebpg	62
Figura 19. Distribuição de subtipos de células NK em baço de animais C57BL6(wt)	64
Figura 20. Análise estatística percentual (A) e absoluta (B) de subtipos funcionais de células NK em animais C/ebpg Knockout (KO) e controles (CT)	65
Figura 21. Gráficos ilustrativos da análise de citometria de fluxo demonstrando as populações de células NK (células efectoras, CEF) e YAC-1 (células-alvo, CA) marcadas com o fluoróforo CTO (<i>Cell Tracker Orange</i>) após co-cultura por 3 horas, e determinação da viabilidade das mesmas por marcação com 7-AAD	66
Figura 22. Análise estatística da citotoxicidade por citometria de fluxo demonstrando a morte celular de células-alvo YAC-1 (incorporação de 7-AAD) quando co-cultivadas com células NK de animais knockout (KO) para o C/ebpg e controles (CT), n=3 por grupo	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos primers utilizados para a identificação genotípica dos animais	36
Tabela 2 - Protocolo de ciclagem no termociclador para amplificação das bandas.....	36
Tabela 3 - Sequências dos oligonucleotídeos que foram utilizados para análise da expressão gênica animais KO para o C/ebpg e seus controles	44
Tabela 4 - Vias de sinalização murinas que apresentaram expressão diferencial do RNAm relevante entre células NK normais e deficientes para o C/ebpg	52
Tabela 5 - Informações sobre os oligonucleotídeos desenhados para investigação dos genes-alvo do estudo por PCR em Tempo Real	55
Tabela 6 - Reação mix para realização do RT-PCR	56
Tabela 7 - Parâmetros de ciclagem do RT-PCR	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Família de fatores de transcrição C/EBPs e hematopoese	15
1.2 C/EBPG e hematopoese	17
1.3 As células <i>Natural Killer</i>	19
1.3.1 Função citotóxica	21
1.3.2 Função anti-tumoral	25
1.3.3 Função secretora	28
1.4 C/EBPG e células NK.....	29
 2 HIPÓTESE / OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
 3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Delineamento experimental.....	33
3.2 Aspectos éticos da pesquisa	33
3.3 Obtenção do modelo murino transgênico C/ebpg knockout e expansão das colônias	34
3.4 Genotipagem do modelo murino transgênico C/ebpg KO	35
3.5 Obtenção de amostras murinas	37
3.6 Isolamento e cultura de células NK	38
3.7 Extração do RNA total	40
3.8 Transcrição em cDNA	41
3.9 <i>Microarray</i>	41
3.10 PCR em tempo real.....	43
3.11 Estudo do perfil de citocinas secretadas pelas células NK.....	44
3.12 Caracterização de células NK por imunofenotipagem.....	45
3.13 Ensaio de ativação de células NK	46
3.14 Determinação da citotoxicidade das células NK.....	48
3.15 Análise estatística	49
 4 RESULTADOS.....	50
4.1 Expansão das colônias de animais C/ebpg flox/flox (f/f) e vavCre para gerar animais C/ebpg KO e controles para experimentação	50

4.2 Análise da expressão gênica em larga escala de células NK normais e deficientes para o C/ebpg	51
4.3 Padronização do PCR em Tempo Real de genes-alvo do C/ebpg.....	54
4.4 PCR em Tempo Real de genes-alvo da regulação de células NK pelo C/ebpg ..	57
4.5 Análise da produção de citocinas de células NK C/ebpg-deficientes	59
4.6 Quantificação do número de células NK C/ebpg-deficientes.....	61
4.7 Quantificação de receptores de células NK normais ou deficientes para C/ebpg.....	62
4.8 Quantificação de subtipos funcionais de células NK C/ebpg-deficientes	63
4.9 Ensaio de ativação de células NK C/ebpg-deficientes	65
4.10 Análise da citotoxicidade de células NK normais e deficientes para o C/ebpg por Citometria de Fluxo	66
 5 DISCUSSÃO	 68
 6 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS.....	 73
 7 CONCLUSÕES	 74
 REFERÊNCIAS.....	 75
 ANEXOS	 86
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Animais	86
ANEXO B - Artigo submetido à Science Translational Medicine, em análise:.....	87
 APÊNDICE.....	 88
APÊNDICE A - Curvas de eficiência de oito genes diferencialmente expressos:	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Família de fatores de transcrição C/EBPs e hematopoese

Os C/EBP (CCAAT/enhancer-binding proteins) são uma família de fatores de transcrição que compartilham uma região de ligação de DNA e uma leucina de dimerização em zíper que pode homodimerizar e heterodimerizar com outros membros da família e fatores de transcrição independentes (YAMANAKA R, et al, 1998), conforme se detalha na Figura 1. Esta família de fatores de transcrição tem sido implicada numa variedade de processos incluindo a função dos hepatócitos, diferenciação de adipócitos e crescimento de vários tecidos. Em especial na hematopoese, os C/EBPs tem um papel tanto na diferenciação terminal de células como no controle da proliferação celular (YAMANAKA R. et al, 1998; KAISHO T. et al, 1999).

Figura 1. Diagrama esquemático de estruturas CEBP e locais de mutação. O domínio da ligação de DNA, o zipper de leucina e o domínio de transativação potencial são mostrados em azul, em vermelho e em verde, respectivamente. Os códons de início ATG, incluindo os códons de iniciação potenciais, são indicados pelas setas com a numeração de aminoácidos. Os tamanhos da proteína são mostrados no lado direito. As setas indicam as posições das mutações já detectadas em cada uma das isoformas (Adaptado de: AKASAKA T. et al, 2007).

Seis membros da família C/EBP foram identificados: C/EBP α (C/EBPA), C/EBP β (C/EBPB), C/EBP γ (C/EBPG), C/EBP δ (C/EBPD), C/EBP ϵ (C/EBPE) e C/EBP ζ (C/EBPZ) (TENEN D.G., 2003, LEKSTROM-HIMES, J.; XANTHOPOULOS, K. G., 1998, NERLOV C., 2007, POLI, V., 1998). No sistema hematopoético, o C/EBPA desempenha um papel crucial na função dos progenitores multipotentes de

células da linhagem mieloide. Camundongos deficientes em C/ebpa são caracterizados por um bloqueio específico na transição dos progenitores mieloides comuns (CMP) para progenitores de granulócitos-macrófagos (GMP), resultando na ausência de granulócitos maduros e funcionais (ZHANG, D. E. et al, 1997, ZHANG, P. et al, 2004). Tais efeitos estão associados à regulação pelo C/ebpa da expressão de genes associados à maturação mieloide tais como G-CSF, M-CSF, GM-CSF, lactoferrina e repressão da transcrição de genes relacionados à diferenciação de outras linhagens (CHIM, C. S.; WONG, A. S.; KWONG, Y. L, 2002; CILLONI, D. et al, 2003; LEROY, H. et al, 2005; PABST, T. et al, 2001; PERROTTI, D. et al, 2002; PREUDHOMME, C. et al, 2002; WOUTERS, B. J. et al, 2007).

O C/EBPA também controla as propriedades de auto-renovação das células-tronco hematopoéticas (CTH). As CTH deficientes em C/ebpa apresentam aumento da sua capacidade competitiva de repopulação e diminuição de sua quiescência em estudos de transplante de células hematopoéticas murinas (ZHANG P. et al, 2004; KOSMICHMIELER S. et al, 2009). A indução de mutações, modificações pós-transcricionais e pós-translacionais, inibição da transcrição e regulação epigenética do C/EBPA mostraram que defeitos neste fator de transcrição estão associados com a fisiopatologia da leucemia mieloide aguda (LMA), situação na qual há um bloqueio da maturação mieloide e aumento da capacidade de auto-renovação da célula-tronco neoplásica (ROSEN E. D. et al, 2002). De fato, mutações no C/EBPA podem ser identificadas em 7-10% de todos os pacientes com LMA e em cerca de 15% dos pacientes com LMA e cariótipo normal (ROSEN E. D. et al, 2002; NERLOV C., 2007; YE ME M. et al, 2013).

O C/EBPB desempenha um papel na ativação de macrófagos e é necessário durante a granulopoese de emergência após a administração de citocinas, um processo que envolve a produção rápida de granulócitos (PABST T. et al, 2001; VALK P. J. et al, 2004; DOHNER K. et al, 2005). Embora C/EBPA e C/EBPB sejam os membros mais bem estudados da família de fatores de transcrição C/EBP, C/EBPE, C/EBPD e C/EBPZ também têm sido implicados em diferentes estágios do desenvolvimento de granulócitos e a expressão aberrante destes membros C/EBP tem sido observada em LMA e síndromes de deficiência de grânulos secundários (AGRAWAL, S. et al, 2007, GOMBART, A. F, KOEFFLER, H. P, 2002; HUANG, A. M. et al, 2004; LEKSTROM-HIMES, J. A. et al, 1999; QIAN, J. et al, 2005; YAMANAKA, R. et al, 1997). A maioria dos estudos sobre o C/EBPG descreve o seu

papel tanto na inibição como ativação da função dos demais C/EBPs. Ao contrário das outras isoformas, o papel do C/EBPG na regulação da hematopoese foi menos estudado até o momento.

1.2 C/EBPG e hematopoese

Diferentemente dos outros C/EBPs, os quais são expressos em tipos celulares específicos, o C/EBPG é ubiquitosamente e constitutivamente expresso e foi identificado pela primeira vez pela sua afinidade pelos locais de regulação-cis da cadeia pesada de imunoglobulina (COOPER C. et al, 1995). Estruturalmente, o C/EBPG é caracterizado pela ausência de domínios de transativação, embora conserve a região de base e os domínios de zíper de leucina, necessários para o DNA se homo/heterodimerizar (THOMASSIN H. et al, 1992; PARKINS. E. et al, 2002). Sozinho, o C/EBPG não ativa e também não reprime a transativação; no entanto, pode inibir a ativação transcripcional por outros membros C/EBPs em tipos celulares específicos (THOMASSIN, 1992; ROMAN C. et al, 1990).

O C/EBPG pode ligar-se tanto à região intensificadora IgH como à região promotora Vh1 da cadeia pesada da imunoglobulina (Ig), tendo sido originalmente identificado como uma proteína de ligação de Ig (Ig/EBP-1, do inglês *immunoglobulin enhancer binding protein-1*) (YAMANAKA R. et al, 1998; KAISHO T. et al, 1999; NISHIZAWA, M.; WAKABAYASHI-ITO, N.; NAGATA, S., 1998). O C/EBPG também pode se ligar aos elementos reguladores de outros genes tais como G-CSF, IL-4, IL-6 e IL-8 (DAVYDOV I. V. et al, 1995, ZAFARANA G. et al, 2000). Apesar de não possuir os domínios de transativação, o C/EBPG pode interagir com outros fatores de transcrição por meio do domínio zíper de leucina e funcionar como regulador negativo (DI SANTO J. P., 2006). Alternativamente, pode aumentar a capacidade de ligação ao DNA de outros fatores de transcrição (ZAFARANA G. et al, 2000). Assim, o C/EBPG é considerado um regulador dos demais fatores de transcrição C/EBPs.

Embora classicamente descrito como regulador indireto das funções das outras isoformas C/EBPs, alguns estudos tentaram elucidar o papel do C/EBPG na hematopoese normal. A superexpressão do *C/ebpg* em camundongos transgênicos causou aumento de gamaglobulina e bloqueio definitivo na eritropoese levando à anemia grave e mortalidade fetal (TRINCHIERI G., 1989).

Mais recentemente, descreveu-se um papel importante para o C/EBPG na hematopoese maligna. Segundo Alberich-Jorda e colaboradores, no subtipo de LMA com hipermetilação do C/EBPA, níveis de expressão aumentada do C/EBPG foram encontrados. De forma semelhante aos casos de LMA em humanos, em camundongos knockout (KO) para o C/ebpa, a ablação deste gene levou ao aumento da expressão do *C/ebpg*, demonstrando uma relação direta entre a expressão dos dois genes. Mostrou-se que a superexpressão do *C/EBPG* (ou *C/ebpg*) em células mieloides humanas e murinas foi capaz de bloquear a diferenciação neutrofílica. De forma concordante, a repressão do *C/EBPG* (ou *C/ebpg*) em células da medula óssea de pacientes com C/EBPA silenciado ou de animais C/ebpa KO reestabeleceu completamente a diferenciação granulocítica. Estes dados apontam para um papel do C/EBPG na maturação granulocítica da LMA com anormalidades do C/EBPA sugerindo que pacientes com esta doença possam beneficiar-se de abordagens terapêuticas que incluam a redução dos níveis de C/EBPG (ALBERICH-JORDA M. et al, 2012).

Diante dos achados acima citados, Alberich-Jorda e seu grupo de pesquisa (Professor Daniel G. Tenen, Harvard Medical School, Boston, MA, EUA), objetivando esclarecer o papel do C/EBPG na hematopoese normal, gerou um modelo murino *C/ebpg* knockout (KO) condicional. Um modelo murino não condicional KO para este gene já havia sido gerado previamente (KAISHO T. et al, 1999), porém, como os animais deste modelo apresentavam elevada mortalidade neonatal de causa não esclarecida, o mesmo impossibilitava o estudo da hematopoese adulta. No modelo do professor Tenen, o *C/ebpg* foi clonado entre sítios da enzima cre-recombinase e, apenas após o cruzamento com animais que expressam a enzima cre-recombinase, ocorre a exclusão do *C/ebpg*.

Neste modelo, a hematopoese foi caracterizada do ponto de vista imunofenotípico (por meio de caracterização das populações de células-tronco, progenitores multipotentes, células mieloides e linfoides de acordo com a expressão de seus antígenos de superfície) e funcional (por meio de experimentos de transplante de células progenitoras hematopoéticas normais e deficientes para o *C/ebpg*). Os resultados mostraram não haver redução no número de células hematopoéticas progenitoras ou maduras nem tampouco na sua caracterização imunofenotípica. Também não foi observada deficiência da CTH em sua capacidade de repopulação em animais letalmente ou subletalmente irradiados. Adicionalmente,

apesar do potencial papel na leucemogênese humana e da alta expressão do *C/ebpg* nas várias subpopulações de células hematopoéticas murinas, a sua deleção condicional no modelo murino transgênico mostrou que este fator de transcrição é dispensável tanto para a granulopoese em estado basal como para a granulopoese de emergência (KARDOSOVA, M. et al, 2018).

1.3 As células *Natural Killer*

As células *Natural Killer* (NK) são um dos subtipos de linfócitos originados de células progenitoras hematopoéticas da medula óssea, os quais que se diferenciam em progenitores multilinfoides e, posteriormente, em um progenitor comum com os linfócitos B. Além da origem na medula óssea, o timo fetal e o fígado também contêm progenitores celulares bipotentes T/NK que tem o potencial de se diferenciar em células NK maduras (KONDO; WEISSMAN; AKASHI, 1997). Entretanto, estudos sugerem que a medula óssea seja o principal órgão de desenvolvimento destas células, visto que procedimentos de ablação da medula óssea levam à disfunção das células NK, enquanto que a ausência do fígado ou do timo por doença ou remoção cirúrgica não resulta em prejuízos quantitativos ou funcionais das células NK (HERBERMAN et al., 1975; KIESSLING; KLEIN; WIGZELL, 1975; KUMAR et al., 1979; RAMOS et al., 1996; SCHWARZ; HISERODT, 1990; SEAMAN et al., 1978).

As células NK foram descritas inicialmente em meados de 1970 como possuidoras da capacidade de destruir células tumorais *in vitro*. Desde então, muitos conhecimentos foram evidenciados sobre sua origem, diferenciação, repertório de receptores e funções efetoras, bem como sua habilidade em modular respostas imunes adaptativas (KIESSLING et al., 1975; KIESSLING; KLEIN; WIGZELL, 1975).

Dispensando mecanismos de imunização ou pré-ativação, as células NK podem reconhecer e eliminar células alteradas e produzir rapidamente fatores solúveis (quimiocinas e citocinas), que possuem ações antimicrobianas ou sobre outras células do sistema imune (KIESSLING; KLEIN; WIGZELL, 1975; COLUCCI et al., 2003). De forma sintética, estas funções efetoras são dependentes de um equilíbrio dinâmico entre a expressão de receptores de ativação e de inibição, bem como de receptores de citocinas (TRINCHIERI, 1989).

Por ser um agente indispensável para o sistema de vigilância imune do organismo, as células NK são amplamente distribuídas em todos os tecidos do

corpo. Entretanto, ainda não foi completamente elucidado se sua extensa distribuição ocorre devido a sua recirculação, existência de subtipos de células NK com diferentes capacidades de *homing* ou do seu desenvolvimento em diversos locais. Na maior parte dos tecidos, as células NK representam uma minoria da fração de linfócitos totais (variando, em tecidos murinos, de 2% no baço a 10% nos pulmões, e de 2 a 18% no sangue periférico humano) (GREGOIRE et al, 2007).

Estudos recentes mostraram que o receptor CD27 da família do TNF é um marcador importante para distinguir os subtipos de célula NK. A densidade de expressão de superfície do CD27 e CD11b subdivide as células NK murinas em quatro subconjuntos e representa seu nível de maturação. Segundo Fu e colaboradores, há evidências de que a expressão de CD11b e CD27 pode refletir as distintas populações de células NK humanas. Neste estudo, as células NK do sangue periférico eram CD11b⁺CD27⁻, enquanto as células NK de cordão umbilical tem CD11b⁺CD27⁻ e populações CD11b⁺CD27⁺ (duplo positivo - DP). Em contrapartida, de acordo com os seus estágios de desenvolvimento imaturo, células NK da decidua têm grandes populações CD11b⁻CD27⁻ (duplo negativo - DN). Eles ainda demonstraram que esses estágios também podem estar associados a funções efetoras de células NK. As células DN NK exibiram um fenótipo imaturo e potencial de diferenciação. As células CD11b⁻CD27⁺ e as células DP NK tiveram melhor capacidade de secretar citocinas. Além disso, células NK CD11b⁺CD27⁻ apresentaram alta função citolítica. Tal variedade de características demonstram que as células NK humanas em diferentes estágios de desenvolvimento têm funções especiais (FU B, et al; 2011).

À medida que progridem em seus estágios de maturação, as células NK adquirem uma coleção de receptores que permite reagir frente aos mais variados estímulos. Os receptores ativatórios NK identificam a presença de ligantes codificados por patógenos microbianos e de ligantes celulares expressos constitutivamente ou induzidos por *stress* celular. Entretanto, as células NK não exercem citotoxicidade contra as células normais devido à expressão de receptores inibitórios, muitos dos quais se ligam aos antígenos classe I do complexo maior de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) bem como a outras glicoproteínas e proteínas da matriz extracelular (KUMAR; MCNERNEY, 2005). Por conseguinte, se os antígenos MHC classe I estiverem ausentes nas células do hospedeiro, em consequência de infecção ou transformação, as células NK podem responder devido às interações entre os receptores de ativação, agora

não mais bloqueados, e os ligantes próprios nas células MHC classe I deficientes, um fenômeno conhecido como perda do autorreconhecimento (KARRE et al., 1986). Os receptores de inibição MHC classe I - específicos incluem os receptores KIR (do inglês *killer cell immunoglobulin-like receptor*, KIR) em humanos, os dímeros lecitina-*like* Ly49 em camundongos e os heterodímeros lecitina-*like* CD94-NKG2A em ambas as espécies (PARHAM, 2005; YOKOYAMA; PLOUGASTEL, 2003).

Diversas estratégias de reconhecimento de antígenos somadas à ativação de vias de sinalização permitem que as células NK respondam a uma ampla variedade de estímulos (COLUCCI et al., 2002). Esta concepção é uma extensão lógica do modelo de “múltipla escolha” das células NK (HERCEND; SCHMIDT, 1988; KARRE, 1991). Assim, as células NK podem não depender de uma única estratégia de reconhecimento para lidar com modificações na expressão do MHC próprio e podem ser ativadas por vias de sinalização próprias e distintas, inclusive potencialmente redundantes. A distinção entre estimulação e coestimulação das células NK parece ser menos clara do que, por exemplo, ocorre nas células T. Diferentes receptores geram sinais favoráveis, o que é contrabalanceado pela ação dos receptores de inibição. Uma vez que a soma total dos estímulos de ativação atinge um limiar, a ativação da célula NK é desencadeada (COLUCCI et al., 2002).

1.3.1 Função citotóxica

As células NK possuem uma grande variedade de receptores ativadores e inibidores, que estimulam ou reduzem a atividade de células NK, respectivamente (MORETTA A. et al, 1993). As funções efectoras de células NK são reguladas de forma dinâmica e dependente da integração de sinais distintos que emanam de receptores das células NK após a sua interação com ligantes expressos nas células-alvo. As células NK poupam as células normais que expressam moléculas de classe I do MHC e baixas quantidades de moléculas auto-induzidas pelo estresse, e são capazes de eliminar células-alvo que apresentam expressão aberrante de moléculas MHC classe I. Estas últimas são características comuns às células tumorais e células infectadas por vírus (MORETTA A. et al, 1999, 1993; LIEBERMAN J., 2010; MISAWA E. et al, 2003).

Receptores inibitórios incluem os ligantes do MHC de classe I do tipo KIR (*killer-cell immunoglobulin-like receptor*) com dois ou três domínios extracelulares de

imunoglobulina e uma porção citoplasmática longa (KIR2DL e KIR3DL); leucócitos do tipo imunoglobulina membro da subfamília de receptores 1 (LILRB1); e CD94 / NKG2 (MORETTA A. et al, 1999, 1993; LIEBERMAN J., 2010; MISAWA E. et al, 2003).

Os receptores inibitórios KIR reconhecem os grupos alélicos HLA-A, HLA-B e HLA-C, enquanto que o complexo CD94-NKG2 (NKG2A, NKG2C, NKG2E) reconhece o antígeno HLA-E do complexo MHC classe I. O complexo padrão de expressão dos receptores KIR permite que as células NK identifiquem células que não expressem uma ou várias moléculas MHC classe I. Quando uma célula NK que expressa um receptor KIR específico para um alelo particular MHC classe I interage com uma célula-alvo que não o expressa, a célula NK não será inibida e destruirá a célula-alvo (MORETTA A. et al, 1999, 1993; LIEBERMAN J., 2010; MISAWA E. et al, 2003).

Os receptores ativatórios NK identificam a presença de ligantes codificados por patógenos microbianos e de ligantes celulares expressos constitutivamente ou induzidos por *stress* celular. Entretanto, as células NK não exercem citotoxicidade contra as células normais devido à expressão de receptores inibitórios, muitos dos quais se ligam aos antígenos classe I do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) bem como a outras glicoproteínas e proteínas da matriz extracelular. Portanto, se os antígenos MHC classe I estiverem ausentes nas células do hospedeiro, em consequência de infecção ou transformação, a ação dos receptores ativatórios é liberada e produz sinalização capaz de levar à citotoxicidade (MORETTA A. et al, 1999, 1993; LIEBERMAN J., 2010; MISAWA E. et al, 2003).

As células NK reconhecem as células infectadas, transformadas ou transplantadas por meio das moléculas HLA em sua superfície. É necessário que ocorra diminuição da expressão ou mesmo ausência de moléculas HLA em células infectadas, em células tumorais ou mesmo em células transplantadas com HLA estranho ou diferente, para que as células NK se tornem ativadas (MORETTA A. et al, 1999, 1993; LIEBERMAN J., 2010; MISAWA E. et al, 2003).

A atividade lítica das células NK se realiza por meio da liberação de grânulos citotóxicos contendo perforina e granzima ou, alternativamente, por mecanismos de apoptose dependentes de TNF, Fas ligante e Trail (DUNN G. P. et al, 2002). As células NK possuem altas concentrações de grânulos líticos em seu citoplasma assim como na circulação periférica (COOPER et al, 2001). Estas vesículas líticas

contêm um número de proteínas, assim como, perforina e granzima unicamente designadas a induzir a morte celular de suas células alvo após a liberação (COOPER et al, 2001; Burkhardt ET AL, 1989; TSCHOPP and NABHOLZ, 1990). Subsequentemente à ativação, seguida pela integração de sinais complexos de ambos receptores, ativatórios e inibitórios na superfície destas células, as células NK rapidamente liberam estes grânulos na sinapse imunológica induzindo a morte das células alvo (COOPER et al, 2001; MORRETA et al, 2002; CERWENKA and LANIER, 2001).

Ligada à membrana dos grânulos citolíticos está a molécula LAMP-1 (membrana lipossomal associada proteína-1) ou CD107a (WINCHESTER, 2001; PETERS et al, 1991). Esta e outros membros da família de proteínas LAMP são proteínas de membrana altamente glicosiladas que representam aproximadamente 50% das proteínas na membrana lipossomal (FUKUDA, 1991; KANAAN, et al, 1996). Os membros da família LAMP possuem caudas curtas citosólicas que são usadas para interagir com mediadores *trans* Golgi que estão envolvidos na triagem e segmentação de proteínas por via lipossomal (WINCHESTER, 2001).

Recentemente, a expressão de CD107a na superfície celular foi descrita como um marcador da citotoxicidade de linfócitos T CD8+ em seu processo de degranulação e mostrou ser fortemente superexpressa na superfície celular após estimulação em concomitância com a perda de perforina (BETTS, et al, 2003).

Dada a forte capacidade citotóxica das células NK, Alter e seus colaboradores investigaram o potencial papel do CD107a como marcador da ativação e função das células NK. Eles demonstraram que o CD107a é significativamente superexpresso na superfície de células NK após estimulação com células alvo de MHC e após estimulação com acetato-13-misterato-12-phorbol (PMA) e ionomicina. Este marcador foi expresso após duas horas de estimulação e correlacionou-se fortemente com a secreção de citocinas e a lise mediada por células NK das células-alvo (ALTER, et al, 2004).

O ensaio de liberação do cromo radioativo (^{51}Cr) ou CRA (do inglês, *chromium release assay*) no qual os alvos marcados com ^{51}Cr são co-cultivados com células efetoras durante quatro a dezesseis horas e o sobrenadante da cultura é quantificado para a liberação de ^{51}Cr por meio de análise em contador gamma tem sido usado desde 1968 para determinar a atividade citolítica de células efetoras (ODER et al, 1980; MORALES and OTTENHOF, 1983). Apesar de o ensaio ser

confiável e ter se tornado um "padrão de ouro" para medir a citotoxicidade, apresenta uma série de desvantagens e limitações funcionais como o uso de radioatividade. Além dos riscos para a saúde, o isótopo radioativo tem alto custo devido à meia-vida curta do ^{51}Cr e requer treinamento e licenciamento em segurança radioativa. O uso do CRA é limitado a alvos que espontaneamente se marcam com quantidades suficientes de ^{51}Cr para uma confiável detecção de lise. Além disso, a sensibilidade do CRA depende do "background", ou seja, da quantidade de ^{51}Cr liberado a partir de células-alvo viáveis durante o período do ensaio, e o ensaio não é passível de interpretação se a liberação espontânea de ^{51}Cr for muito elevada. Por isso, a variabilidade entre ensaios é considerável, com coeficientes de variação (CV) acima de 20% comumente presentes. Outra limitação decorre do fato de o ensaio não permitir análise concomitante da morte celular (apoptose). Por estas razões, a busca de métodos que possam substituir o CRA tem sido contínua e alguns ensaios alternativos foram introduzidos (VON ZONS et al, 1997; JEDEMA et al, 2004; RODEN et al, 1999; CHOHRUDI et al, 2003).

Recentemente, métodos baseados em citometria de fluxo têm sido desenvolvidos para superar algumas das desvantagens e limitações do CRA. Por exemplo, o monitoramento de morte celular por meio de medições altamente sensíveis da liberação de fluorocromos por alvos marcados ou colorações com marcadores ou corantes específicos para indicação de morte de células-alvo representam novas iniciativas (GOLDEBERG et al, 1999; OZDEMIR et al, 2003; LIU et al, 2002).

Kim GG e seus colaboradores desenvolveram um ensaio multicolorimétrico com citometria de fluxo para medir simultaneamente a citotoxicidade mediada por células NK, visualizar conjugados de células tumorais e efetoras, obter contagens de células absolutas, medir a função citolítica de células efetoras e determinar o seu imunofenótipo. Esta abordagem proporcionou uma avaliação mais precisa dos mecanismos envolvidos na morte das células-alvo pelas células efetoras obtidas a partir de doadores normais ou indivíduos doentes. Ao mesmo tempo, buscaram por resultados dos ensaios que se correlacionassem com o CRA tradicional. Utilizando células efetoras isoladas a partir do sangue periférico de pacientes com câncer, os autores demonstraram que o novo ensaio baseado em citometria de fluxo é capaz de identificar e caracterizar subtipos de células efetoras responsáveis pela morte de células-alvo tumorais (KIM GG et al, 2007).

1.3.2 Função anti-tumoral

Sabe-se que o sistema imune é capaz de detectar e rejeitar neoplasias incipientes (BURNET, 1957; DUNN et al., 2002) e que o escape à destruição imune é um mecanismo de proteção tumoral adquirido durante os múltiplos passos da tumorigênese (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; HANAHAN; WEINBERG, 2011). A teoria da imunovigilância propõe que as células e os tecidos são permanentemente monitorados pelo sistema imune, que reconhece e elimina a maioria das células tumorais (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Embora a imunidade tumoral tenha sido tradicionalmente atribuída ao reconhecimento de antígenos tumorais pelos linfócitos T, as células NK, ainda que não reconheçam diretamente antígenos tumorais específicos, também são capazes de detectar e eliminar células neoplásicas, sendo que esta função depende de uma fina regulação entre a secreção de mediadores pelo microambiente no qual o tumor se desenvolve e a ligação destes aos receptores de ativação e de inibição destas células.

A caracterização dos receptores de ativação e de inibição das células NK surgiu das primeiras observações de que a citotoxicidade das células NK era desencadeada pelas células tumorais que apresentavam perda de expressão ou expressão insuficiente das moléculas MHC classe I (LANIER, 2005; MORETTA, L.; MORETTA, 2004), um fenômeno conhecido como perda de autorreconhecimento (LJUNGGREN; KARRE, 1990). Essas observações levaram à identificação dos receptores inibitórios KIR e do complexo CD94-NKG2A, que são expressos pelas células NK. Os receptores inibitórios KIR reconhecem os grupos alélicos HLA-A, HLA-B e HLA-C, enquanto que o complexo inibitório CD94-NKG2A reconhece o antígeno HLA-E do complexo MHC classe I (BRAUD et al., 1998; LANIER, 1998; LONG, 1999; MORETTA, et al., 1996). Os indivíduos diferem no número e tipo de genes KIR herdados e seu produto genético é distribuído clonalmente no repertório das células NK. A maioria destas células expressa pelo menos um receptor KIR específico para um alelo MHC classe I próprio. O complexo padrão de expressão dos receptores KIR permite que as células NK detectem células que não expressem uma ou várias moléculas MHC classe I (GARRIDO et al., 1997; LANIER, 2005). Quando uma célula NK que expressa um receptor KIR específico para um alelo particular MHC classe I interage com uma célula-alvo que não o expressa (isto é, perda de autorreconhecimento), a célula NK não será inibida e destruirá a célula-alvo (LJUNGGREN; MALMBERG, 2007).

Além de detectar a ausência de moléculas próprias MHC classe I, as células NK também necessitam do estímulo de ligantes das células-alvo que se conectam a receptores ativatórios específicos. A atividade das células NK mediada pelo receptor NKG2D é um exemplo deste tipo de regulação. Enquanto os outros receptores do complexo CD94-NKG2 (NKG2A, NKG2C, NKG2E) formam heterodímeros com o CD94 e se ligam ao HLA-E, o NKG2D forma homodímeros e se conecta a ligantes induzidos por estresse estruturalmente relacionados ao MHC classe I. Essa ligação é capaz de levar a uma potente resposta citotóxica mesmo na presença de níveis normais de moléculas MHC classe I inibitórias.

Portanto, o reconhecimento das células-alvo tumorais pelas células NK é finamente regulado por processos que envolvem a integração de sinais derivados dos múltiplos receptores inibitórios e ativatórios. Adicionalmente, evidências recentes sugerem que as células NK, além do seu efeito citolítico direto contra células tumorais, podem também gerar uma resposta imune adaptativa do tipo *T helper 1* (Th1), favorecendo as respostas antitumorais (MARTIN-FONTECHA et al., 2004). Não apenas o papel dos receptores de superfície das células NK na proteção antitumoral tem sido estudado, mas também de proteínas componentes dos grânulos citoplasmáticos, como por exemplo a proteína NKLAM (do inglês, *NK-Lytic Associated Molecule*). Classicamente conhecida por seu papel na citólise mediada por perforina/granzima, observou-se mais recentemente, por meio de modelo transgênico de camundongos deficientes para NKLAM, que a ausência desta molécula resulta em maior número e tamanho de tumores, bem como de nódulos pulmonares metastáticos de melanoma do tipo B16 (HOOVER; GULLICKSON; KORNBLUTH, 2009).

A despeito dos vários mecanismos descritos de proteção antitumoral mediada por células NK, sabe-se que a eficácia destas células em controlar as neoplasias é limitada devido ao fato de as células tumorais serem capazes de escapar ao reconhecimento pelas células NK (LOPEZ-SOTO et al., 2015). Os mecanismos que levam a este escape imunológico não são mutuamente exclusivos e, ao contrário, colaboram entre si. Em primeiro lugar, as células NK de uma determinada neoplasia podem ter função deficiente ou apresentar expressão alterada de receptores, ou seja, diminuição dos receptores de ativação e/ou aumento dos receptores inibitórios KIR. Além disso, as células tumorais e o estroma do tumor podem secretar ligantes que modulam a ação dos receptores, tais como moléculas imunossupressoras como

TGF β 1 (do inglês, *Transforming Growth Factor β 1*), interleucinas e polipeptídeos solúveis do complexo MHC classe I.

Vale ressaltar ainda que o microambiente inflamatório do tumor favorece a evasão do controle mediado por células NK. Este fenômeno pode ocorrer por meio de dois mecanismos principais: supressão da função efetora NK e seleção de células tumorais com baixa imunogenicidade (VITALE et al., 2014).

Várias células do sistema imune podem interagir com células NK para potencializar seus efeitos. Células dendríticas e macrófagos, por exemplo, promovem ativação NK enquanto neutrófilos podem favorecer a diferenciação terminal de células NK funcionais. Entretanto, no sítio do tumor, a maioria das células do sistema imune pode estar alterada ou direcionada a produzir uma resposta do tipo Th2, resultando em perda da interação ou mesmo supressão das células NK. A expressão e função dos receptores de superfície das células NK responsáveis pelo reconhecimento NK-mediado e por suas funções citotóxicas são também reguladas por várias citocinas. O TGF β (do inglês, *Transforming Growth Factor β*), por exemplo, produzido por linfócitos T regulatórios, células dendríticas, macrófagos e células mieloides associados ao tumor, inibe a expressão de NKp30 e NKG2D, os dois receptores cruciais para o reconhecimento e morte celular mediada por células NK. Interleucina-4 (IL-4), por sua vez, reduz a capacidade de produção de citocinas pelas células NK, bem como sua interação com as células dendríticas. Como estes, vários outros elementos supressores da função efetora de células NK podem ser citados, incluindo a hipóxia associada ao microambiente tumoral, que pode levar à diminuição da expressão ou função dos receptores NK (CASTRICONI et al., 2003; MARCENARO et al., 2005; MORETTA, A. et al., 2005).

Ademais, a exposição crônica dos tumores às células NK pode favorecer a seleção de células neoplásicas com expressão alterada dos ligantes para os seus receptores inibitórios ou de ativação. Por exemplo, células de melanoma quando co-cultivadas com células NK foram resistentes à lise NK mediada, devido ao aumento de expressão de moléculas MHC classe I. Em contraposição, tumores podem também evadir o reconhecimento mediado por NKp44-NKG2D por meio de diminuição da expressão de ligantes de superfície (BALSAMO et al., 2012).

Em resumo, as interações tumor-células NK são complexas e envolvem mecanismos aditivos de supressão/evasão. O papel desempenhado pelas células NK em eliminar determinadas linhagens de células tumorais é evidente e o seu uso

terapêutico em certos cenários antineoplásicos tem se mostrado vantajoso e eficaz no controle da doença.

1.3.3 Função secretora

A função secretora inclui a produção de citocinas como IFN γ , TNF α , TGF β , GM-CSF (do inglês, *Granulocyte colony-stimulating factor*), MIP1 α , MIP1 β , IL-10 e outras, as quais podem afetar a função de outras células hematopoéticas incluindo linfócitos T maduros e células dendríticas (LÓPES-SOTO A. et al, 2015; VUKICEVIC M. et al, 2010).

A diferenciação *in vitro* de células NK a partir de progenitores da medula óssea requer citocinas e fatores de crescimento como SCF (do inglês *stem cell factor*), FLT3 (do inglês *fms lyke tyrosine kinase 3*) e as interleucinas (ILs) IL-7 e IL-15, esta última essencial para o desenvolvimento NK (MROZEK; ANDERSON; CALIGIURI, 1996; WILLIAMS et al., 1997). A ausência de IL-15 ou ainda quaisquer alterações em seu receptor levam a reduções importantes na quantidade de células NK e a um bloqueio de sua diferenciação na medula óssea (DISANTO et al., 1995; GILMOUR et al., 2001).

As células NK maduras expressam constitutivamente receptores para os interferons tipo I (IFN α e IFN β) e interleucinas como IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18, responsáveis não apenas por induzir a sua proliferação, mas também estimular sua atividade. A IL-2, em particular, é uma citocina pluripotente capaz de expandir e ativar as células NK assim como promover a sua migração nos tecidos-alvo e aumentar a secreção de citocinas e quimiocinas (LÓPES-SOTO A. et al, 2015).

Além das citocinas e dos fatores de crescimento, o estroma da medula óssea é fundamental para a formação do repertório de receptores de reconhecimento e para a completa diferenciação das células NK *in vitro* (ROTH et al., 2000; WILLIAMS et al., 2000). Assim, as interações moleculares que existem entre as células NK e as células estromais da medula óssea são essenciais para o desenvolvimento e funções normais das células NK (HESSLEIN; LANIER, 2011). Diante de incompatibilidade entre as células-alvo e células NK efectoras, os efeitos citotóxicos das células NK preponderam; enquanto na ausência de incompatibilidade os efeitos mediados por citocinas sobre as demais células hematopoéticas se sobressaem. Dentre estes últimos, os efeitos de ativação de macrófagos, células dendríticas e

linfócitos T mediados por citocinas NK são bem conhecidos (BRAUD V. M. et al, 1998). Entretanto, a capacidade das células NK em regular as funções das células progenitoras hematopoéticas ainda não foi explorada.

1.4 C/EBPG e células NK

Dentre os fatores de transcrição envolvidos na regulação do desenvolvimento, proliferação e função das células NK, o C/EBPG pode ser citado. Kaisho e colaboradores (1999) descreveram a geração de um modelo murino de deleção germinativa do gene *C/ebpg* nos quais os animais apresentavam letalidade elevada em até 48 horas de nascimento. Por meio do estudo de quimeras deste modelo, demonstrou-se que os esplenócitos (mas não células NK purificadas) derivados de camundongos deficientes para o *C/ebpg* tinham citotoxicidade contras as células-alvo YAC-1 bem como sua capacidade de produzir IFN γ após estímulo com IL-12 e/ou IL-18 reduzidas, apesar de apresentarem números normais de linfócitos B, T e NK (KAISHO T. et al, 1999).

No modelo condicional mediado pela Cre-recombinase gerado no laboratório do Professor Tenen, a análise funcional de células NK foi estudada em relação ao seu papel na granulopoese de emergência (KARDOSOVA, M. et al, 2018), que se mostrou pouco relevante. Também não se demonstrou efeito direto da importância do C/EBPG sobre o número, fenótipo e capacidade de repopulação das células-tronco hematopoéticas (CTH).

Entretanto, este grupo de pesquisa demonstrou que efeitos indiretos mediados por citocinas dependentes de células NK podem afetar a função de autorenovação da CTH. Sabe-se que as CTH residem em nichos na medula óssea, onde recebem sinais de citocinas produzidas por outras células hematopoéticas e células estromais. Estudos baseados em cultura de células progenitoras *in vitro* e alguns estudos em animais geneticamente modificados identificaram várias citocinas capazes de interferir com as propriedades de auto-renovação, apoptose, mobilização e formação de colônias da CTH, tais como Interferons (IFN α , IFN β , IFN γ), TNF α , G-CSF, SCF (do inglês, *Stem Cell Factor*), Trombopoetina, FGFs (do inglês, *Fibroblastic Growth Factors*), Angiopoetina-1, IGFs (do inglês, *Insulin-like Growth Factors*), além de ligantes dos receptores Toll (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*) e diversas interleucinas (ZHANG C. C., 2008; YANG L. et al, 2005).

Os efeitos destas citocinas sobre a hematopoese são dependentes do microambiente. O IFN γ , reconhecido mais comumente como inibidor da hematopoese, pode estimular a proliferação de CTH, sendo que após a exposição à citocina endógena, as células LSK (células negativas para marcadores de linhagem, positivas para Sca-1 e cKit) expandem e têm maior potencial para formação de colônias e diferenciação mieloide (BALDRIDGE, M. T., 2011). De forma semelhante, o TNF α , apesar de conhecido por inibir o crescimento e induzir apoptose das CTH, foi recentemente associado ao aumento da clonogenicidade da CTH, aumento da proporção de progenitores multipotentes e prevenção de apoptose (FRAZÃO, J. B.; ERRANTE, P. R.; CONDINO-NETO, A., 2013). Consequentemente, a estimulação crônica ou sinalização excessiva de IFN γ bem como de TNF α pode levar a exaustão da CTH, resultando em síndromes de falência medular como anemia aplástica e síndromes mielodisplásicas (LIANG P. H. et al, 2011).

Em suma, fatores extrínsecos produzidos por células hematopoéticas ou estromais da medula óssea (MO) determinam diferentes desfechos para a CTH. Os efeitos até agora relatados são redundantes e frequentemente atribuídos globalmente às células estromais que compõem o nicho. Pouco se sabe sobre como as demais células hematopoéticas da medula óssea, em especial células T e NK, conhecidas por sua capacidade de desencadear respostas inflamatórias, podem afetar direta e indiretamente a função da CTH.

Figueiredo-Pontes e colaboradores, utilizando o modelo condicional *knockout* do C/ebpg gerado no Laboratório do Prof. Tenen, estudaram o potencial efeito das células NK sobre CTH normais. Utilizando um modelo de co-cultura de células NK e células progenitoras hematopoéticas murinas, isoladas por meio de *sorting*, e transplantadas em animais letalmente irradiados, demonstraram que células NK normais prejudicaram a frequência e enxertia da CTH; efeito este não observado quando a excisão do C/ebpg era realizada (Figura 2). Os resultados sugeriram que o C/ebpg está envolvido na potencial regulação das CTH por citocinas produzidas por células NK, e foram recentemente submetidos à publicação em conjunto com achados complementares produzidos ao longo dessa dissertação (Figueiredo-Pontes e colaboradores, dados não publicados, em fase de submissão).

Figura 2. Análise gráfica do quimerismo após 8 e 16 semanas de transplante de células progenitoras hematopoéticas murinas após exposição em cultura às células Natural Killer (NK) de animais deficientes para o CCAAT/enhancer-binding protein gamma (C/ebpg) ou células NK controle. Células-tronco hematopoéticas CD45.1/2 (definidas como linhagem negativas, Sca1⁺, ckit^{hi}, CD48⁻, CD150⁺) após exposição in vitro à co-cultura com células NK de animais singeneicos. Nas condições de cultura com células NK normais estimuladas (CT S NK) ou não estimuladas (CT NS NK) com a citocina IL-2, há diminuição do quimerismo em relação ao transplante de células-tronco isoladas. Os efeitos se revertem ou não são observados quando células NK KO para o C/ebpg, estimuladas ou não (KO S NK e KO NS NK) são usadas para a co-cultura. (Figueiredo-Pontes et al, em fase de submissão). HSC: *hematopoietic stem cells*; CT: *control*; KO: *knockout*; NS: *non-stimulated*; S: *stimulated*.

Portanto, além da regulação do desenvolvimento e maturação das células NK sugerido pelo modelo de excisão germinativa do C/ebpg, podemos aventar a hipótese de que este fator de transcrição apresente um papel distinto dos demais membros de sua família sobre a regulação da função da CTH. Enquanto o C/EBPA, por exemplo, regula diretamente a proliferação e capacidade de auto-renovação dos progenitores hematopoéticos, é possível que o C/EBPG atue como um regulador indireto, seja por meio do controle transcripcional das outras isoformas, seja por meio da regulação da produção de citocinas NK.

Apesar das evidências de que o C/EBPG controle a função citotóxica de células NK (KAISHO T. et al, 1999) bem como a função regulatória destas células sobre propriedades da CTH (FIGUEIREDO-PONTES et al, em submissão), ambos os estudos carecem de detalhamento sobre os mecanismos que determinam estas disfunções. Assim, o estudo mais aprofundado da função de células NK adultas, dependente do C/EBPG, em relação à citotoxicidade e produção de citocinas, não havia sido explorado até o presente momento, sendo este o alvo principal deste projeto de pesquisa.

2 HIPÓTESE / OBJETIVOS

Sabe-se que o C/EBP gamma (C/EBPG) está envolvido na maturação funcional de células *natural killer* (NK). Entretanto, os mediadores dessa regulação não são conhecidos. Tanto a função citotóxica como a secretora fazem das células NK importantes componentes da hematopoese, capazes de eliminar alvos susceptíveis, recrutar outras células para amplificar a resposta inflamatória e produzir citocinas com capacidade para regular as funções da célula-tronco hematopoética (CTH). Assim, pretendemos com esse projeto de pesquisa:

2.1 Objetivo geral

Investigar os mecanismos de regulação da função de células NK pelo fator de transcrição C/EBPG.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar potenciais genes-alvo do C/ebpg e validar a expressão de oito genes-alvo do C/ebpg, diferencialmente expressos em animais C/ebpg deficientes e seus controles;
2. Identificar citocinas diferencialmente secretadas por células NK normais e provenientes de animais Knockout para C/ebpg;
3. Caracterizar as células NK quanto à frequência, expressão dos receptores NKG2D, Ly49D e NKG2A, e distribuição dos subtipos funcionais de acordo com a expressão de CD27 e CD11b em animais C/ebpg deficientes e seus controles;
4. Estudar a função citotóxica das células NK por citometria de fluxo em animais C/ebpg deficientes e seus controles
5. Estudar a expressão de CD107a em animais C/ebpg deficientes e seus controles.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

O estudo consistiu de análise observacional transversal analítica e comparativa entre células *Natural Killer* de camundongos transgênicos deficientes ou não para o fator de transcrição C/EBPG. O planejamento experimental está ilustrado sumariamente na Figura 3.

Figura 3. Delineamento experimental das etapas do estudo de caracterização de células *Natural Killer* normais (C/ebpg CT) ou deficientes (C/ebpg KO) para o fator de transcrição C/EBPG.

3.2 Aspectos éticos da pesquisa

O projeto foi submetido ao CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biosegurança) em 03 de novembro de 2015 e teve aprovação em 17 de novembro de 2015 (nº127/2015, parecer em anexo).

3.3 Obtenção do modelo murino transgênico *C/ebpg* knockout e expansão das colônias

Os camundongos transgênicos *C/ebpg* *Flox/Flox* e *vavCre* foram cedidos como doação pelo colaborador internacional Dr. Daniel Tenen da *Harvard Medical School*. As duas linhagens transgênicas (ambas de *background* C57BL/6) foram acasaladas para obter animais duplo transgênicos (*C/ebpg* *Flox/Flox* *vavCre*^{+/-}). As colônias foram expandidas no biotério da Instituição para a realização do estudo. Os animais foram mantidos no biotério do Centro de Terapia Celular da FMRP-USP, sob condições livres de patógenos (*SPF*, do inglês *Specified Pathogen Free*) e de acordo com as políticas do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais.

A geração do modelo transgênico *C/ebpg* *knockout* foi recentemente descrita (KARDOSOVA, M. et al, 2018). Brevemente, pode-se descrever que um vetor (pL253) contendo uma região 5' homóloga de 5.4 Kb, uma região codificadora do *C/ebpg* flaqueada por sítios loxP, uma sequência IRES-TOMATO ligada ao cassete de resistência à neomicina flaqueada por sítios FRT, e uma região homóloga 3' de 3.3 Kb foi usado para substituir os éxons 1 e 2 do gene *C/ebpg* alvo, conforme ilustra a figura 4. Após o sequenciamento, a construção foi eletroporada em células-tronco embrionárias e estas, após correta seleção, foram injetadas em blastocistos de camundongos da linhagem C57BL/6. Após o nascimento das quimeras, os animais com genótipos desejados foram acasalados para garantir a transmissão germinativa nos animais C57BL/6. O cruzamento dos animais *C/ebpg* *Flox/Flox* (F/F) com os camundongos *vavCre* positivos (Cre⁺, que expressam a cre-recombinase) resulta em animais KO para o *C/ebpg*. Os animais *C/ebpg* F/F negativos para a *vavCre-recombinase* (Cre⁻) são considerados controles experimentais. Por meio de genotipagem, os animais controles (F/F Cre⁻) e KO (F/F Cre⁺) são identificados e, após a idade adulta (8 semanas), podem ser levados à experimentação (KARDOSOVA, M. et al, 2018).

Figura 4. Esquema representativo do modelo murino transgênico *knockin knockout* do CCAAT/enhancer-binding protein gamma (C/ebpg). O éxon 2 do *C/ebpg* é flanqueado por sítios loxP, alvos da enzima cre-recombinase, identificados como triângulos. Os círculos pretos identificam os sítios FRT para remoção do cassete de resistência à neomicina. O cruzamento dos animais *C/ebpg* Flox/Flox (F/F) com os camundongos *vavCre* positivos (CRE+, que expressam a cre-recombinase especificamente em células hematopoéticas) resulta em animais *knockout* para o *C/ebpg* (KO: F/F CRE+). Os animais controles apresentam a mesma construção, porém são negativos para a *vavCre* (CT: F/F CRE-). As letras a, b, c, d, e identificam a localização dos oligonucleotídeos desenhados para a genotipagem.

Fonte: Adaptado de KARDOSOVA, M. et al, 2018

3.4 Genotipagem do modelo murino transgênico C/ebpg KO

Para cada experimentação, os animais da colônia *C/ebpg* KO foram genotipados. Após a coleta de pequenos fragmentos da orelha dos camundongos transgênicos, realizava-se a digestão enzimática das amostras adicionando-se 200μL de NaOH 1M a cada tubo de 1,5mL contendo a amostra, levando-a à digestão por 1 hora a 95-100°C. Após a digestão, adicionava-se 50μL de Tris HCl 1M pH 6,8 a cada amostra e, então o sobrenadante era transferido para um novo tubo de 1,5mL, podendo ser armazenado a 4°C por até 180 dias ou prosseguir com a reação de amplificação por reação em cadeia de polimerase PCR (do inglês, *polymerase chain reaction*).

Para a PCR de genotipagem, a reação foi preparada adicionando-se DNTPs, tampão enzimático 5X, Taq polimerase, oligonucleotídeos (Tabela 1), DNA e água livre de nuclease. O protocolo de ciclagem no termociclador para amplificação das

bandas era de: 94°C por cinco minutos; 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 60°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos; finalizando com extensão a 72°C por 7 minutos. A banda de 629 pares de bases (pb) identifica a presença do alelo selvagem para o *C/ebpg* e a presença de uma banda de 324 pb identifica a excisão do gene. Para a realização da PCR para a *vavCRE*, que possui peso molecular de 236 pb, o programa de termociclagem era o seguinte: 95°C por três minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 64°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos; 72°C por 2 minutos. A tabela 2 ilustra as condições utilizadas para estas reações.

Após a amplificação, as amostras eram submetidas à eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo utilizando 15µL de cada amostra. A figura 5 ilustra a detecção em gel de agarose do resultado da genotipagem, permitindo identificar animais wt/wt (do inglês, *wild-type/wild-type*, ou selvagens), wt/f (do inglês, *wild-type/flox*, ou heterozigotos) e f/f (do inglês, *flox-flox*, que tem o *C/ebpg* flaqueado por sítios da cre-recombinase em dois alelos).

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a identificação genotípica dos animais transgênicos *C/ebpg* selvagens ou *knockouts* de acordo com o tamanho dos fragmentos correspondentes aos alelos selvagem ou mutado bem como expressão da *vav-Cre* recombinase.

Tabela 1 – Primers e sequências iniciadoras	
Primers	Sequências 5'-3'
<i>Cebpg</i> A1	CTCCAGACTGCCTTGGGAAA
<i>Cebpg</i> B1	AAAGAGCCATTTCTGGGGAAGT
<i>Cebpg</i> C1	AGTGTCATTCACTCAGGCACA
<i>Vav-Cre</i> F	AGATGCCAGGACATCAGGAACCTG
<i>Vav-Cre</i> R	ATCAGCCACACCAGACACAGAGATC

Tabela 2. Protocolo de ciclagem no termociclador para amplificação dos fragmentos correspondentes aos alelos selvagem ou mutado bem como expressão da *vav-Cre* recombinase de animais transgênicos *C/ebpg* selvagens ou *knockouts*.

Tabela 2 – Programas utilizados para as reações de PCR						
35 ciclos						
Gene	Desnaturação	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Resfriamento
<i>Cebpg</i>	94° 5'	94° 40"	60° 40"	72° 40"	72° 7'	4-10° ∞
<i>Vav-Cre</i>	95° 3'	95° 30"	60° 60"	72° 60"	72° 2'	4-10° ∞

Figura 5. Gel de agarose mostrando a genotipagem de animais do modelo transgênico *knockout* para o *C/ebpg*. A genotipagem é realizada por meio de extração do DNA genômico de pequenos fragmentos da orelha dos camundongos e do sangue seguida por reação de PCR. Os oligonucleotídeos *a*, *b* e *c* são utilizados para a detecção da construção de excisão condicional do *C/ebpg* na cauda e no sangue permitindo a identificação dos genótipos wt/wt, wt/f e f/f. A presença ou não da cre-recombinase é determinada por meio de detecção da *vavCre*. A presença ou ausência da excisão no sangue é representada por *d-e* e *c-e*.

Fonte: próprio autor

3.5 Obtenção de amostras murinas

A população de células NK murinas foi isolada do baço dos camundongos nos seguintes passos aqui descritos de forma resumida: 1) obtenção de suspensão de células esplênicas submetidas à lise de glóbulos vermelhos; 2) depleção imunomagnética de células eritroides, B e T, usando anticorpos biotinilados Ter119, CD19, CD4 e CD8, seguido de ligação da biotina a *microbeads* estreptavidina e seleção negativa por meio do uso do equipamento auto-MACS; 3) marcação da suspensão de células negativas para as linhagens eritróide, B e T com anticorpos anti-estreptavidina, CD3 e NK1.1 e separação da população de células linhagem negativas, CD3 negativas e NK1.1 positivas por meio de *sorting* por citometria de fluxo utilizando o equipamento FACS Aria cell sorter (BD Biosciences).

Pares de animais com sexo e idade semelhantes (entre 8 e 16 semanas de vida), KO para o *C/ebpg* e seus controles, foram eutanasiados para coleta de células esplênicas. Para a realização destes procedimentos, os animais receberam anestesia inalatória com isoflurano (Abbott Laboratories, Argentina). Para indução anestésica, utilizamos isoflurano 4% e, para a manutenção, isoflurano 2% em máscara. Assim que verificamos a ausência de reflexos de resposta à dor, como

pinçamento das falanges distais e da cauda, procedemos ao deslocamento cervical. Os animais eutanasiados tiveram o baço extraído e macerado para a obtenção de suspensão de células em PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*) enriquecida de 2% de soro bovino fetal (SBF). Essa suspensão celular foi filtrada para remoção de grumos em filtros apropriados de 70 μm , submetida à lise de glóbulos vermelhos com tampão contendo 0.15 M de cloreto de amônio, 1 mM de bicarbonato de potássio e 0.1 mM de EDTA, lavada com PBS e ressuspensa para contagem no contador automático Coulter T890. Obtivemos aproximadamente 100×10^6 de células esplênicas por animal com uso desta técnica.

3.6 Isolamento e cultura de células NK

Após a obtenção da suspensão de células do baço dos animais controle (CT: F/F Cre-) e *knockout* (KO: F/F Cre+) para o C/ebpg, realizamos uma seleção imunomagnética negativa para as outras linhagens celulares utilizando o equipamento AutoMACS (Miltenyi Biotec). Para tanto, adicionamos anticorpos biotinizados anti-TER119 (clone TER-119, Biolegend), anti-CD19 (clone MB19-1, Biolegend), anti-CD4 (clone GK1.5, Biolegend) e anti-CD8a (clone 53-6.7, Biolegend), e após 30 minutos de marcação e lavagem com tampão específico, procedemos à incubação com microesferas magnéticas de estreptavidina por 20 minutos. Por fim, a suspensão de células foi filtrada para eliminação de grumos e levada ao equipamento AutoMacs onde a seleção negativa foi realizada.

Ao final da separação, utilizamos a fração negativa para obtenção das células NK. Esta fração foi levada à nova marcação com anticorpos anti-estreptavidina, para selecionar as células negativas para linhagem eritroide e linfóide B e T que ainda contaminassem a amostra (clone 4B4-1, anti-streptavidin-PerCP, Biolegend) e com anti-CD3 (clone 145-2C11, Biolegend) e anti-NK1.1 (clone PK136, Biolegend) por 30 minutos. Em seguida, realizamos o *sorting* no citômetro de fluxo FACS Aria (BD Biosystems). Após a depleção de linhagem por meio de separação imunomagnética, obtivemos cerca de 50×10^6 células de cada animal, ou seja, metade do número de esplênócitos inicial e, ao final, após o *sorting* por citometria de fluxo, em média $1-4 \times 10^5$ por animal. A estratégia de identificação das células NK pode ser vista na figura 6.

Após isolamento, as células NK foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços em 200 μL de meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SBF/poço a 37°C e 5%

de CO₂ durante 24 horas na presença de IL-2 (concentração de 1.000 U/mL), para estímulo das células NK. Após esta curta cultura, procedeu-se à coleta do sobrenadante da cultura para análise do perfil de citocinas, e o *pellet* de células restante na placa de cultura foi lavado com 250 µL de PBS estéril para obtenção de uma suspensão de células NK, submetida à rápida lise com 750 µL do reagente Trizol (Invitrogen) para isolamento do RNA. O mesmo procedimento de isolamento de células NK foi usado para realização do ensaio de citotoxicidade.

Figura 6. Gráficos ilustrativos da estratégia de seleção por citometria de fluxo da população de células NK de camundongos transgênicos *knockout* para o *C/ebpg*. A população de células NK murinas foi isolada do baço dos camundongos após obtenção de suspensão de células esplênicas submetidas à lise de glóbulos vermelhos. Executamos a depleção imunomagnética de células eritroides, B e T, usando anticorpos biotinilados Ter119, CD19, CD4 e CD8, seguido de ligação da biotina às microesferas de estreptavidina e seleção imunomagnética negativa por meio do uso do equipamento auto-MACS. Posteriormente, a suspensão de células linhagem foi marcada com anticorpos anti-estreptavidina (PerCP), CD3 (FITC) e NK1.1 (APC). Após a seleção dos esplenócitos por tamanho (FSC) e complexidade (SSC), exclusão de debris e definição de eventos únicos, as células NK foram definidas como Linhagem negativas, CD3 negativas e NK1.1 positivas para o *sorting* por citometria de fluxo utilizando o equipamento FACS Aria cell sorter BD Biosciences).

3.7 Extração do RNA total

Após a coleta do sobrenadante das células NK murinas, o *pellet* de células restante na placa de cultura foi lavado com 250 µL de PBS 1X estéril com DEPC (Dietilpirocarbonato) para obtenção de uma suspensão de células NK, que foram submetidas à lise com 750µL do reagente Trizol (Invitrogen). A extração do RNA total foi realizada seguindo os seguintes passos:

A. Fase de separação: cada amostra recebeu a adição de 200 µL de clorofórmio e foi homogeneizada em vortex por 15 segundos; após incubação em temperatura ambiente por 15 minutos, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C;

B. Precipitação do RNA: após a centrifugação, a fase aquosa (superior) de cada amostra foi cuidadosamente transferida para um novo tubo, aos quais foram adicionados 500 µL de isopropanol gelado; as amostras foram incubadas por 1h à temperatura de -80°C; em seguida, após incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C;

C. Lavagem do RNA: após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o *pellet* de RNA foi lavado com etanol 70% em vortex; em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C;

D. Solubilização do RNA: após a centrifugação, o etanol foi removido e os tubos abertos foram expostos em ar ambiente por 5 minutos para a secagem do *pellet*; em seguida, o *pellet* de RNA foi ressuspenso em 15 µL de água livre de RNase.

A quantificação do RNA total foi realizada por leitura de densidade óptica (DO) no equipamento *Nanovue* (GE Healthcare Life Sciences) no comprimento de onda de 260 nm, considerando que 1 DO a 260 nm equivale a 40 µg/mL de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas, sendo esperados para uma boa extração valores entre 1,8 a 2,0.

3.8 Transcrição em cDNA

A transcrição reversa do cDNA foi realizada a partir de uma fração do RNA obtido de cada amostra utilizando a enzima *Superscript II* (Invitrogen) segundo as instruções do fabricante. Foi usado 1.000 ng de RNA para a transcrição.

3.9 Microarray

Após isolamento de células NK murinas conforme descrito acima, o RNA total foi isolado por meio de lise com o reagente TRIZOL e extração com o kit RNAeasy (QUIAGEN), conforme instruções do fabricante. As amostras de RNA foram enviadas para o Instituto de Genética Molecular em Praga, onde teve sua qualidade e quantificação realizada. A integridade do RNA foi analisada no equipamento Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent), e apenas as amostras com perfil de RNA intacto foram usadas para experimentação (RIN > 7). Quatro amostras biológicas para cada fenótipo (C/ebpg CT e KO) foram analisadas. Seiscentos picogramas de RNA foram amplificados com o kit *PicoSL WTASystem V2* (NuGEN), marcadas com o reagente *Biotin Encore IL Module* (NuGEN), e 750 ng de RNA amplificado e marcado de cada amostra foram hibridizados ao Chip *MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip* (Illumina Microarray, plataforma utilizada), de acordo com as instruções do fabricante. Os dados brutos foram processados usando o pacote *Beadarray* (Bioconductor) e a análise GSEA (*Gene set enrichment analysis*) foi realizada.

Os dados de *microarray* foram depositados no banco de dados online *ArrayExpress* (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) sob o número de acesso E-MTAB-5604.

A plataforma utilizada, Illumina microarray, possui tecnologia de BeadArray que faz seu próprio pré-processamento e controle de qualidade diferente de outras tecnologias de microarray e possui Lumi, um pacote do biocondutor projetado especialmente para processar os dados do microarray de Illumina, que inclui entrada de dados, controle de qualidade, estabilização de variância, normalização e anotações de genes (Figuras 7 e 8).

Figura 7. Normalização das amostras biológicas de cada fenótipo (C/ebpg CT e KO). A normalização foi feita por meio do software Lumi que uniu as amostras mais semelhantes e separou as mais discrepantes entre ambos fenótipos.

Figura 8. Hierarquização das amostras biológicas de cada fenótipo (C/ebpg CT e KO). A hierarquização foi feita por meio do software Lumi que uniu as amostras mais semelhantes e separou as mais discrepantes entre ambos fenótipos.

3.10 PCR em tempo real

A amplificação em tempo real das amostras de mRNA foi realizada utilizando o reagente *Power Sybr Green Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA), oligonucleotídeos e 25 ng de cada amostra de cDNA transcrito. O aparelho utilizado foi o *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Foi avaliada a expressão gênica diferencial das células NK dos animais KO para o *C/ebpg* e seus controles dos seguintes genes: *Tgfb*, *Tnfa*, *Tlr4*, *Irak4*, *Gmcsf*, *Myd88* e *Ifng* (Tabela 3). Os oligonucleotídeos utilizados nas reações foram desenhados utilizando a ferramenta *online* IDT (do inglês, *Integrated DNA Technologies*). As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos (para ativação da DNA polimerase), seguidos por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 62°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultâneo). As reações de PCR foram realizadas em duplicatas. A expressão gênica da β -actina e do *Gapdh*, genes constitutivos, foi utilizada como controle endógeno da reação. Os resultados foram avaliados por meio do *software Sequence Detection System V1.3* para a aquisição dos valores de *Threshold Cycle* (Ct) e os dados exportados para planilhas do *software* Excel. O resultado quantitativo (Ct) para cada transcrito foi normalizado para cada amostra subtraindo o valor do Ct obtido para a média de expressão dos controles endógenos β -actina e *Gapdh*, obtendo o valor de Δ Ct. Como referência para o cálculo de valores de expressão relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizamos as amostras controle.

Utilizamos diluição seriada 10:1 para cinco pontos, iniciando com 100ng de células esplênicas totais. A eficiência da amplificação de cada um dos genes com suas respectivas curvas de *melting* e padrão estão ilustradas no apêndice A.

Tabela 3. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a análise da expressão gênica por PCR em tempo Real de RNA obtido de células NK isoladas de animais knockout (KO) para o C/ebpg e seus controles. A tabela contém a identificação de cada gene testado, a descrição detalhada da sequência 5'-3', tamanho de cada fragmento, temperatura de anelamento, número da sequência do gene no banco de dados do NCBI e tamanho do produto amplificado para análise da expressão gênica diferencial entre animais KO para o C/ebpg e seus controles.

Primers	Sequência 5'-3'	Tamanho/ Tm	Número no NCBI	Tamanho do produto
IFNG. F	5'actggcaaaaggatggtgac3'	20bp/60.0 °C	NM_010511.2	237 bp
IFNG. R	3'tgagctcattgaatgcttg 5'	20bp/59.9 °C		
TGFB. F	5'tgtctcagctccacagaga3'	20bp/59.9 °C	NM_009367.3	183bp
TGFB. R	3'tggtgtgagggcaaggac5'	20bp/60.1 °C		
GM-SCF.F	5'ggccttgaagcatgtagag3'	20 bp/59.8 °C	NM_009969.4	161 bp
GM-SCF.R	3'ccgtagaccctgctcgaata5'	20 bp/60.2 °C		
IL-10.F	5'ccaagccttatcggaatga3'	20bp/60.0°C	NM_010548.2	162 bp
IL-10.R	Tt3'ttcacagggagaaatcg5'	20bp/60.0°C		
TNFA.F	5'agccccagctctgtatcctt3'	20bp/60.0°C	NM_001278601.1	212 bp
TNFA.R	3'ctcccttgcagaactcagg5'	20bp/60.0°C		
TLR4.F	5'ggcagcaggtggaattgtat3'	20bp/60.0°C	NM_021297.3	198 bp
TLR4.R	3'aggccccagagtttgttct5'	20bp/60.1°C		
MYD88.F	5'actggcctgagcaactagga3'	20bp/60.0 °C	NM_010851.2	219 bp
MYD88.R	3'cgtgccactacctgtagcaa5'	20bp/59.9 °C		
IRAK4.F	5'agctgcgtcacctacctgtt3'	20 bp/59.9 °C	NM_029926.5	208bp
IRAK4.R	3'gtttggtgatgtgctgtgg5'	20 bp/60.0 °C		

3.11 Estudo do perfil de citocinas secretadas pelas células NK

Um total de 250.000 células NK de animais KO para o C/ebpg e seus controles foram purificadas por meio de *sorting* e cultivadas com RPMI1640 suplementado com soro bovino fetal 10% e 1000 U/mL de IL-2 por 24 horas. Por citometria de fluxo foram determinados os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF α and IFN γ a partir de 200 μ L do sobrenadante da cultura. Foi utilizado o Kit Cytometric Bead Array technology (BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante.

3.12 Caracterização de células NK por imunofenotipagem

Conforme já descrito, após a obtenção de células esplênicas de camundongos CT e KO para o C/ebpg, e a lise de glóbulos vermelhos, um número máximo de 1×10^6 células por tubo foi submetido à marcação com anticorpos destinados à seleção de células NK.

Para o experimento de quantificação de células NK, primeiramente excluíram-se as células das linhagens eritroide, B e T marcadas com anticorpos dirigidos aos antígenos Ter-119, CD19, CD4, CD8 ligados à biotina e revelados com estreptavidina PerCP (clone 4B4-1, anti-streptavidin-PerCP, Biolegend) e, em seguida, as células NK foram definidas como CD3 negativas e NK1.1 positivas de acordo com a marcação com os anticorpos CD3 APCCy7 (clone 17A-2, Biolegend) e NK1.1 APC (clone PK136, Biolegend). Ao final das incubações com os anticorpos monoclonais, adicionou-se a cada amostra o reagente DAPI (diamidino-2-fenilindole, Roche) para exclusão de células mortas e análise dos dados apenas em células viáveis.

Para a caracterização dos subtipos funcionais, além da marcação com o painel de anticorpos definidores de células NK, estas foram marcadas com os anticorpos anti-CD27 FITC (clone LG.3A10, Biolegend) e anti-CD11b PE (clone MI/10, Biolegend), e, por fim, também foi adicionado o DAPI (diamidino-2-fenilindole, Roche).

Para a quantificação da expressão dos receptores NK, a mesma técnica de definição imunofenotípica das células NK foi realizada, adicionando-se ao painel de anticorpos previamente descrito aqueles dirigidos aos receptores NKG2D (clone 1D11, Biolegend) e Ly49D (clone 4E5, Biolegend) (receptores de ativação) e ao receptor NKG2A (clone 16A11, Biolegend) (receptor de inibição).

Para todos os experimentos de imunofenotipagem, em média 100.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences). Realizamos quantificação relativa e absoluta para um $n=4$ de cada grupo (CT e KO). As análises foram realizadas utilizando o programa FlowJo versão X com a estratégia de *gating* demonstrada na figura 9.

Figura 9. Gráficos ilustrativos da estratégia de *gating* por citometria de fluxo para identificar subtipos funcionais de células NK, de acordo com a expressão de CD27 e CD11b. Para a análise, após a exclusão de células não viáveis por marcação com DAPI (diamidino-2-fenilindole), a estratégia de *gating* consistiu em excluir células linhagem positivas (marcadas com anticorpos dirigidos aos antígenos Ter-119, CD19, CD4, CD8 ligados à biotina e revelados com estreptavidina) e analisar as células NK como CD3 negativas e NK1.1 positivas. Dentre as células NK, a expressão diferencial de CD27 e CD11b permitiu identificar as subpopulações NK tolerante (IMATURA), secretória imatura (IM SECRETÓRIA), secretória madura (SECRETÓRIA), e citotóxica (CITOTÓXICA).

3.13 Ensaio de ativação de células NK

Para este ensaio, foi feito o co-cultivo de células NK (esplenócitos) de camundongos controle (F/F Cre-) e KO (F/F Cre+) para o C/ebpg juntamente com células tumorais murinas YAC-1 numa razão de 10:1 (NK: YAC-1).

Como controle da atividade basal das células NK, um tubo contendo células NK não estimuladas com YAC-1 foi incluído no experimento. Para mostrar a capacidade de ativação das células NK (controle positivo), as células foram estimuladas com (PMA) (2.5 µg/mL) e ionomicina (0.5 µg/mL) (Sigma).

As células foram incubadas por 5 horas a 37 °C com 5% de CO₂ e foi adicionada brefeldina A (Sigma) a uma concentração final de 10 µg/mL assim como 6 µL of monensina (Golgi-Stop, BD Biosciences) numa concentração final de 6 µg/mL. Enquanto a brefeldina previne a exocitose de citocinas contendo vesículas

que permitem a visualização da produção de citocinas após a estimulação, a monensina previne a acidificação das vesículas endocíticas, evitando a degradação das proteínas CD107a que são reinternalizadas, o que permite a visualização deste marcador após a estimulação.

Para incubação com anticorpos e aquisição dos dados no citômetro de fluxo, um máximo de 2×10^6 células foram adicionadas a cada tubo. A estratégia de marcação com anticorpos para identificação de células NK já foi previamente descrita. Brevemente, para exclusão de células eritroides, B e T, foi realizada a marcação com anticorpos biotinilados anti-Ter119, anti-CD19, anti-CD4 e anti-CD8a seguida de marcação com anti-estreptavidina (para selecionar as células linhagem negativas). Em seguida, foram adicionados os anticorpos anti-CD3, anti-NK1.1 e CD107a-PE (clone ID4B, Biolegend). Foram adquiridos 1×10^6 eventos totais por citometria de fluxo usando o citômetro FACScanto II (BD Biosciences), e os resultados foram analisados utilizando o software Flowjo versão X, conforme ilustra a figura 10.

Figura 10. Gráficos ilustrativos da estratégia de *gating* por citometria de fluxo para identificar células NK ativadas, de acordo com a expressão de CD107a. Para a análise, após a exclusão de células não viáveis, a estratégia consistiu em excluir células linhagem positivas (marcadas com anticorpos dirigidos aos antígenos Ter-119, CD19, CD4, CD8 ligados à biotina e revelados com estreptavidina) e analisar as células NK como CD3 negativas e NK1.1 positivas. Dentre as células NK, a expressão diferencial de CD107a permitiu identificar o percentual de células NK ativadas após coincubação com células YAC-1 por 5 horas, em condições ideais.

3.14 Determinação da citotoxicidade das células NK

Para verificar a existência ou não de deficiência citotóxica de células NK em animais C/ebpg KO, optamos por usar o método de citometria de fluxo. Para nossa padronização deste método, utilizamos como células efetoras (CEF) células NK sorteadas de camundongos KO para o C/ebpg e seus controles. Como células-alvo (CA), utilizamos células tumorais murinas YAC-1, tradicionalmente usadas para os ensaios de citotoxicidade com células NK murinas por apresentarem baixa expressão do Complexo de Histocompatibilidade Maior de classe I, sendo sensíveis à citotoxicidade NK (Figura 10). A linhagem de células YAC-1 foi obtida como doação do Laboratório da Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Campinas (Hemocentro de Campinas), por meio de colaboração com a pesquisadora Cristiane Okuda Torello.

Tanto as CEF como as CA foram cultivadas individualmente ou co-cultivadas em meio RPMI 1640 com soro bovino fetal a 10%, a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. O número de células necessário para experimentação foi definido por meio de contagem em câmara de Neubauer.

A sonda fluorescente utilizada para visualização no citômetro de fluxo da viabilidade das CA após a exposição às células NK foi o CTO (*Cell Tracker Orange*). O reagente CTO atravessa livremente as membranas celulares; uma vez dentro da célula, é transformado em produtos intracelulares impermeáveis. Após a conversão para a versão impermeável, o CTO é muito bem retido nas células vivas por várias gerações e exibe fluorescência por pelo menos 72 horas. Ademais, apresenta propriedades ideais para o ensaio: é estável, bem retido pelas células, brilhantemente fluorescente em pH fisiológico e não contribui para citotoxicidade.

As CA marcadas com CTO foram co-incubadas com as CEF (células NK) nas razões de CEF:CA de 1:1, 5:1 e 10:1 por 3 horas a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. Posteriormente, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS 1X e marcadas com 7-AAD (marcador de viabilidade celular 7-amino-actinomycin D, Sigma). Tubos controle de células YAC-1 e de células NK foram preparados nas mesmas condições. Para análise, foram adquiridos 20.000 eventos CTO positivos utilizando o citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences). A análise dos dados foi realizada utilizando o software Flowjo versão X e está ilustrada na figura 12.

Figura 11. Análise morfológica das células da linhagem YAC-1, derivada de linfoma murino, usadas como células-alvo para os ensaios de citotoxicidade de células NK. As imagens correspondem a lâminas de citocentrífuga das células YAC-1 após cultivo em meio RPMI 1640 com soro bovino fetal 10% a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. Aumento de 100 X.

Figura 12. Gráficos ilustrativos da estratégia de *gating* por citometria de fluxo para definição das populações de células NK (células efectoras, CEF) e YAC-1 (células-alvo, CA) marcadas com o fluoróforo CTO (*Cell Tracker Orange*) após co-cultura por 3 horas, e a viabilidade das mesmas por marcação com 7-AAD. As células YAC-1 foram selecionadas com base na incorporação do CTO e parâmetros SSC/FSC e depois analisadas quanto à incorporação de 7-AAD.

3.15 Análise estatística

O programa GraphPad InStat 5 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA) foi utilizado para as análises.

Ao menos quatro experimentos independentes foram realizados para cada ensaio.

Foi feito teste de normalidade para todos os ensaios.

O teste *T de Student* foi utilizado para a análise da expressão genica, análise da frequência de células NK e da produção de citocinas.

Para analisar os ensaios de subtipos funcionais, ativação e citotoxicidade por citometria de fluxo de células NK foi utilizado o teste ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Expansão das colônias de animais C/ebpg flox/flox (f/f) e vavCre para gerar animais C/ebpg KO e controles para experimentação

Conforme já se detalhou previamente, a deleção do C/ebpg é obtida mediante recombinação Cre, de forma que os animais f/f Cre-recombinase negativos são controles com expressão normal do C/ebpg e os animais f/f Cre-recombinase positivos são C/ebpg deficientes.

Inicialmente, realizamos cruzamentos entre animais wt/f para o flaqueamento do C/ebpg e, após obtenção dos animais homozigotos f/f, passamos a realizar os acasalamentos com animais transgênicos que expressam ou não a vavCre-recombinase.

Neste último modelo, a Cre-recombinase é expressa sob controle regulatório do promotor murino vav, que garante a deleção do C/ebpg apenas em células hematopoéticas e endoteliais. Desde o início do projeto, 10 acasalamentos entre animais f/f vav-Cre negativos e f/f vav-Cre positivos foram gerados para experimentação, resultando em 426 animais que foram genotipados e utilizados para experimentação ou eutanasiados quando o pareamento e idade não eram adequados no tempo de experimentação. Apesar dos acasalamentos gerados para experimentação incluírem apenas casais conhecidamente C/ebpg f/f, optamos por realizar genotipagem completa em todos os animais destinados aos experimentos, incluindo o PCR para detecção da sequência de C/ebpg flanqueada por sítios da cre-recombinase (flox) bem como o PCR para detectar a presença da vav-Cre, como ilustrado na Figura 13.

Figura 13. Ilustração do resultado da genotipagem para confirmação do genótipo *C/ebpg* f/f e detecção da *vavCre*-recombinase no modelo murino transgênico *C/ebpg* *knockout*. O gel de agarose à esquerda da figura mostra a genotipagem para a presença da sequência do *C/ebpg* que permite identificar animais wt/wt, wt/f e f/f. BR: branco. O gel de agarose à direita da figura corresponde ao resultado do PCR para *vavCre*, mostrando a presença da recombinase na mesma sequência de animais testados para a sequência do *C/ebpg*.

Fonte: próprio autor

4.2 Análise da expressão gênica em larga escala de células NK normais e deficientes para o *C/ebpg*

As amostras de RNA de células NK utilizadas para o *microarray* foram obtidas previamente ao início deste projeto pela atual orientadora e enviadas para o Laboratório da Dra. Merixtell Alberich-Jordà no Instituto de Genética Molecular em Praga, República Checa para realização desta análise. Recebemos a análise do *microarray* incluindo os dados brutos, *heatmaps* e análise GSEA (do inglês, *gene set enrichment analysis*). Para escolha dos genes por nós considerados candidatos ao mecanismo de regulação das células NK pelo C/EBPG, consideramos tanto a análise das principais vias de sinalização com expressão gênica diferencial entre células NK normais e deficientes para o *C/ebpg* como a análise de genes individuais que apresentaram diferença de expressão (fold change) significativa ($p < 0,05$), com foco nas vias ou genes com potencial para interferir sobre a hematopoese.

A tabela 4 (abaixo) exemplifica as principais vias de sinalização com expressão diferencial dependente do C/EBPG. Chamaram a nossa atenção, especialmente, as vias de sinalização dos receptores Toll-like, apoptose, VEGF, interleucinas e interferons. Todas essas vias podem estar implicadas na regulação da hematopoese, em particular na função das células-tronco. Após a análise das vias de sinalização, observamos os *heatmaps* construídos (Figura 14) que

mostraram os genes diferencialmente expressos quando se compara a expressão gênica entre células NK CT e KO após cultura e estímulo com IL-2 (Figura 13).

Por fim, reunindo os conhecimentos já existentes quanto às citocinas produzidas por células NK com capacidade potencial de regular as células-tronco com os dados oriundos do *microarray* de células NK normais ou deficientes, concluímos nossa análise com decisão para estudar de forma mais aprofundada os seguintes genes-alvos: *Ifng*, *Tgfb*, *Gmcsf*, *Il-10*, *Tnfa*, *Vegfa*, *Tlr4*, *Myd88* e *Irak4*. Dentre os genes escolhidos todos apresentaram diferença de expressão significativa ($p < 0,05$) exceto *Tnfa*, *Tlr4* e *Myd88* inseridos na análise devido aos seus papéis em relação aos genes que apresentaram diferença e seus potenciais para interferir sobre a hematopoese.

Tabela 4: Vias de sinalização murinas que apresentaram expressão diferencial do RNAm relevante entre células NK normais e deficientes para o C/ebpg. Estão representadas três diferentes formas de análise de vias de sinalização (KEGG, Panther e WikiPathways).

KEGG				
Index	Name	P-value	Z-score	Combined Score
1	toll like receptor signaling pathway	0.002136	-1.90	3.08
2	Apoptosis	0.003123	-1.85	3.00
3	b cell receptor signaling pathway	0.003992	-1.75	2.84
4	vegf signaling pathway	0.01860	-1.82	1.05
5	aminoacyl trna biosynthesis	0.02612	-1.55	0.89
6	pancreatic câncer	0.02696	-1.69	0.97
7	ubiquitin mediated proteolysis	0.02886	-1.28	0.73
8	chronic myeloid leucemia	0.03096	-1.61	0.93
9	c21 steroid hormone metabolism	0.03397	0.75	-0.43
10	cytokine cytokine receptor interaction	0.04043	-1.53	0.87
Panther				
Index	Name	P-value	Z-score	Combined Score
1	PDGF signaling pathway	0.008832	-1.83	1.58
2	Ras Pathway	0.009693	-1.63	1.41
3	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	0.02198	-1.70	0.78
4	FAS signaling pathway	0.04208	-1.04	0.47
5	Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin	0.06194	-1.16	0.53
6	Apoptosis signaling pathway	0.07748	-1.07	0.49
7	5HT4 type receptor mediated signaling pathway	0.07987	-0.20	0.09
8	Interleukin signaling pathway	0.08382	-0.83	0.38
9	Interferon-gamma signaling pathway	0.09151	0.02	-0.01
10	B cell activation	0.09658	-0.56	0.26
WikiPathways 2015				
Index	Name	P-value	Z-score	Combined Score
1	IL-1 Signaling Pathway	0.0002496	-1.97	7.02
2	Alzheimers Disease	0.0002259	-1.90	6.77
3	Chemokine signaling pathway	0.001401	-1.88	5.65
4	Apoptosis	0.001372	-1.77	5.31
5	Insulin Signaling	0.003465	-1.73	4.52
6	MAPK signaling pathway	0.008518	-1.69	3.28
7	IL-3 Signaling Pathway	0.03410	-1.12	1.30

Figura 14. Representação da análise de expressão gênica diferencial entre células Natural killer (NK) normais e deficientes para o *C/ebpg*. O *heatmap* construído mostra os genes diferencialmente expressos quando se comparam células NK controle (CT) e KO após cultura e estímulo com IL-2. A intensidade das cores vermelhas significa aumento da expressão enquanto que a intensidade das cores azuis significa a diminuição da expressão dos genes listados na lateral da figura.

4.3 Padronização do PCR em Tempo Real de genes-alvo do C/ebpg

Desenhamos oligonucleotídeos para o PCR em Tempo Real usando ferramenta *online* IDT (do inglês, *Integrated DNA Technologies*). Para cada par de oligonucleotídeos, foi realizada uma curva de padronização da amplificação com diferentes concentrações de cDNA utilizando amostras de células esplênicas de camundongos selvagens para determinar as condições de amplificação dos genes pela metodologia de SYBR Green.

Na primeira tentativa de realizar estes ensaios, tivemos problemas com a qualidade das amostras sorteadas devido ao pequeno número de células NK viáveis. Mesmo os genes constitutivos *Gapdh* e *Hprt* apresentavam amplificação tardia, por volta do 25^o ciclo. Além de otimizar as condições do *sorting* utilizando pool de 2 a 3 animais para cada isolamento de células NK, optamos por desenhar novos oligonucleotídeos para o PCR em Tempo Real evitando qualquer possibilidade de amplificação de DNA e garantindo amplificação apenas das sequências de éxons. O gene VEGFA foi excluído da pesquisa pois não obtivemos sucesso com o desenho dos oligonucleotídeos nas condições desejadas. As informações sobre estes oligonucleotídeos estão descritas na tabela 6.

Tabela 5. Informações sobre os oligonucleotídeos desenhados para investigação dos genes-alvo do C/ebpg por PCR em Tempo Real. As sequências e posições das combinações de oligonucleotídeos iniciadores utilizadas para a transcrição e amplificação dos genes constitutivos (*Gapdh*, *Bactina* e *Hprt*) e genes alvo (*Ifng*, *Tgfb*, *Gmcsf*, *Il10*, *Tnfa*, *Vegfa*, *Tlr4*, *Myd88* e *Irak4*) foram determinadas com base na base de dados do *NCBI*. Os oligonucleotídeos iniciadores estão representados da região 5' para a 3'; a denominação "F" (de *forward*) é usada para o oligonucleotídeo iniciador direto enquanto a denominação "R" (de *reverse*) representa o oligonucleotídeo iniciador reverso.

Primers	Sequência 5'-3'	Tamanho/ <i>T_m</i>	Número no NCBI	Tamanho do produto
IFNG. F	5'actggcaaaaggatggtgac3'	20bp/60.0 °C	NM_010511.2	237 bp
IFNG. R	3'tgagctcattgaatgcttgg 5'	20bp/59.9 °C		
TGFB. F	5'ttgcttcagctccacagaga3'	20bp/59.9 °C	NM_009367.3	183bp
TGFB. R	3'tggtgtagagggaaggac5'	20bp/60.1 °C		
GM-SCF.F	5'ggccttggaagcatgtagag3'	20 bp/59.8 °C	NM_009969.4	161 bp
GM-SCF.F	3'ccgtagaccctgctcgaata5'	20 bp/60.2 °C		
IL-10.F	5'ccaagccttatcggaatga3'	20bp/60.0°C	NM_010548.2	162 bp
IL-10.R	Tt3'ttcacagggagaaatcg5'	20bp/60.0°C		
TNFA.F	5'agccccagctctgtatcct3'	20bp/60.0°C	NM_001278601.1	212 bp
TNFA.R	3'ctcccttgcagaactcagg5'	20bp/60.0°C		
TLR4.F	5'ggcagcaggtggaattgtat3'	20bp/60.0°C	NM_021297.3	198 bp
TLR4.R	3'aggcccagagttttgttct5'	20bp/60.1°C		
MYD88.F	5'actggcctgagcaactagga3'	20bp/60.0 °C	NM_010851.2	219 bp
MYD88.R	3'cgtgccactacctgtagcaa5'	20bp/59.9 °C		
IRAK4.F	5'agctgcgtcacctacctgtt3'	20 bp/59.9 °C	NM_029926.5	208bp
IRAK4.R	3'gtttgtgatgttgctgtgg5'	20 bp/60.0 °C		

As reações de RT-PCR foram padronizadas nas condições descritas nas tabelas 7 e 8, as quais permitiram uma boa amplificação das sequências gênicas selecionadas por volta do 20º ciclo, bem como uma boa curva de *melting* para os genes *Gapdh*, *Hprt*, *Il-10*, *Gmcsf*, *Tgfb*, *Tlr4*, *Myd88* e *Irak4*. A temperatura de anelamento adequada para os vários oligonucleotídeos testados variou de 60°C a 62°C.

Tabela 6. Reação para realização da RT-PCR:

Parâmetros	Padronizado
Reagente SYBR Green	7,5 µL
Primer F	0,2 µL
Primer R	0,2 µL
Água nuclease free	4,6µL
cDNA	2,5 µL (25ng)
Parâmetros	Padronizado
Reagente SYBR Green	7,5 µL
Primer F	0,2 µL
Primer R	0,2 µL
Água nuclease free	4,6µL
Cdna	2,5 µL (25ng)

Tabela 7. Parâmetros de ciclagem da RT-PCR:

Parâmetros	Teste	Padronizado
Denaturação inicial	95°C/10 minutos	95°C/10 minutos
Ciclagem(45x):	denaturação: 95°C/15 segundos anelamento: 60°C/30 segundos extensão: 60°C/61°C/1 minuto	denaturação: 95°C/15 segundos Anelamento + extensão: 62°C/2 minutos para GAPDH, HPRT, IL-10, GM-CSF, IFNG, TGFβ, TLR4, MY88 e IRAK4 60°C//2 minutos para βactina

Realizamos a padronização das curvas de eficiência dos oligonucleotídeos para a realização do PCR em Tempo Real utilizando amostras de baço total de animais C/ebpg f/f Cre negativos (controles com expressão normal do C/ebpg). Utilizamos diluição seriada 10:1 para cinco pontos, iniciando com 100ng de células esplênicas totais. A eficiência da amplificação de cada um dos genes com suas respectivas curvas de *melting* e padrão estão ilustradas no apêndice A.

4.4 PCR em Tempo Real de genes-alvo da regulação de células NK pelo C/ebpg

Após a padronização das curvas de eficiência dos oligonucleotídeos, os ensaios de PCR em Tempo Real para os genes *Tnfa*, *Il-10*, *Ifng*, *Gmcsf*, *Myd88*, *Tlr4*, *Irak4* e *Tgfb* foram realizados, utilizando como molde RNA de células NK obtidas de animais C/ebpg f/f Cre negativos (controles com expressão normal do C/ebpg) e C/ebpg f/f Cre positivos (animais com C/ebpg deficiente) por meio de *sorting* (n= 4 por grupo). A primeira análise incluiu amostras de células NK logo após o *sorting* e não ativadas em cultura com a interleucina IL-2. A segunda análise incluiu células NK isoladas e estimuladas com IL-2 por 48 horas. A análise dos resultados pode ser vista na Figura 15. Não foi possível analisar a expressão de *Il-10* devido a não amplificação de algumas amostras.

A expressão gênica dos genes estudados foi determinada em relação ao gene constitutivo *Gapdh*. Foram comparados os grupos controle sem IL-2 e knockout sem IL-2 e controle com IL-2 e knockout com IL-2. Não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para nenhum dos genes analisados, em nenhuma das comparações.

Apesar da falta de significância estatística, a análise gráfica da expressão gênica por PCR em Tempo Real sugeriu uma tendência ao aumento da expressão do gene *Tgfb*, *Gmcsf* e *Myd88* e discreta redução da expressão dos genes *Ifng* e *Tlr4* em células NK de animais C/ebpg-KO em relação aos animais controle apenas após o estímulo com IL-2.

Figura 15. Gráficos ilustrativos da expressão gênica diferencial entre células NK de animais controles (CT) e *knockouts* (KO) para o *Clebpγ*. A expressão gênica dos genes estudados foi determinada por RT-PCR em Tempo Real em relação ao gene constitutivo *Gapdh*. Não houve diferença significativa para nenhum dos genes nas quatro comparações feitas. Análise estatística foi realizada utilizando medianas +/- erro padrão por teste de Mann Whitney. Comparamos animais controles (CT) e knockouts (KO) para o *Clebpγ* sem estímulo com IL-2 (IL-2 -) e animais controles (CT) e knockouts (KO) após estímulo com IL-2 (IL-2 +).

4.5 Análise da produção de citocinas de células NK C/ebpg-deficientes

Um total de 250.000 células NK de animais KO para o C/ebpg e seus controles foram purificadas por meio de *sorting* e cultivadas com RPMI1640 suplementado com soro bovino fetal 10% e 1000 U/mL de IL-2 por 24 horas. Então, o sobrenadante foi coletado e os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF α and IFN γ foram quantificados usando o Kit *Cytometric Bead Array technology* (BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante e analisado por citometria de fluxo. Dentre as citocinas analisadas, observamos que as células NK de animais KO, após ativação com a interleucina IL-2, tiveram produção diminuída de IFN γ em comparação aos controles (Figura 16).

Figura 16. Resultado da quantificação de citocinas em animais Knockout (KO) para o C/ebpg e controles (CT). As células NK Cebpg-deficientes, após ativação com a interleucina IL-2, mostraram uma produção diminuída de IFN γ quando comparadas aos controles.

4.6 Quantificação do número de células NK C/ebpg-deficientes

Para quantificar as células NK de animais C/ebpg-deficientes e seus controles, a estratégia de análise consistiu em excluir as células não viáveis por marcação com DAPI (diamidino-2-fenilindole), seguida da exclusão de células linhagem positivas (marcadas com anticorpos dirigidos aos antígenos Ter-119, CD19, CD4, CD8 ligados à biotina e revelados com estreptavidina) e selecionar as células NK identificadas como CD3 negativas e NK1.1 positivas ($\text{Lin}^- \text{CD3}^- \text{NK1.1}^+$).

Em média, 100.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences). Realizamos quantificação relativa (percentagem de células $\text{Lin}^- \text{CD3}^- \text{NK1.1}^+$ dentre as células esplênicas viáveis) e absoluta (número de células $\text{Lin}^- \text{CD3}^- \text{NK1.1}^+$ corrigido para o número de células do baço de cada animal estudado, quantificado em câmara de Neubauer) para um $n=4$ de cada grupo (CT e KO). A análise estatística foi feita utilizando o teste T pareado tanto para a análise relativa (% de células NK) quanto para a análise absoluta (número de células NK).

A porcentagem e o número absoluto de células NK não foi diferente nos grupos CT e KO, conforme ilustrado na figura 17.

Figura 17. Gráficos ilustrativos da análise de citometria de fluxo para quantificação de células NK de animais controles (CT) e knockout (KO) para o C/ebpg, de acordo com a expressão de NK1.1 e CD3. Para a análise, após a exclusão de células não viáveis, a estratégia de *gating* consistiu em excluir células linhagem positivas (marcadas com anticorpos dirigidos aos antígenos Ter-119, CD19, CD4, CD8 ligados à biotina e revelados com estreptavidina) e analisar as células NK como CD3 negativas e NK1.1 positivas. Não houve diferença significativa entre animais CT e KO tanto na análise percentual (A) quanto na análise de números absolutos (B) de células NK. Foi utilizado o teste T pareado para ambas análises, relativa e absoluta, $n=4$ por grupo.

4.7 Quantificação de receptores de células NK normais ou deficientes para C/ebpg

Usando a mesma estratégia de análise por imunofenotipagem já descrita para quantificar o número de células NK, quantificamos os receptores NKG2D, Ly49D e NKG2A nas células Lin⁻CD3⁻NK1.1⁺ de animais C/ebpg CT e KO adicionando anticorpos dirigidos a estes antígenos ao coquetel definidor de células NK

Da mesma forma, em média 100.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences). A percentagem de células positivas para cada receptor foi analisada. Realizamos quantificação relativa para um n=4 de cada grupo (CT e KO) que mostrou expressão semelhante entre células NK de animais C/ebpg-deficientes e seus controles (Figura 18).

Figura 18. Gráficos ilustrativos da análise de citometria de fluxo para quantificação de receptores de células NK de animais controles (CT) e knockout (KO). Para a análise, após a exclusão de células não viáveis, a estratégia de *gating* consistiu em excluir células linhagem positivas (marcadas com anticorpos dirigidos aos antígenos Ter-119, CD19, CD4, CD8 ligados à biotina e revelados com estreptavidina) e analisar as células NK como CD3 negativas e NK1.1 positivas. Foram analisadas as células positivas para cada receptor (NKG2A, NKG2D e Ly49D) dentre as células NK1.1⁺. A expressão de todos os receptores foi semelhante entre os animais CT e KO. Foi utilizado teste T pareado para análise, n=4 por grupo (CT e KO, ns: valor de *p* não significativo).

4.8 Quantificação de subtipos funcionais de células NK C/ebpg-deficientes

Segundo a literatura, células NK CD11b⁻CD27⁻ caracterizam-se por um fenótipo imaturo e ausência de potencial para diferenciação (NK tolerante); células NK CD11b⁻CD27⁺ são secretórias imaturas; células NK CD11b⁺CD27⁺ são secretórias maduras com maior habilidade para secretar citocinas; e células NK CD11b⁺CD27⁻ são citotóxicas e exibem forte função citolítica.

A caracterização das células NK murinas de animais CT e KO para o C/ebpg por meio de citometria de fluxo foi descrita anteriormente. Resumidamente, um máximo de 1×10^6 células foram submetidas à marcação com anticorpos anti-linhagem (anti-TER119 anti-CD19, anti-CD4 e anti-CD8a), anti-CD3, anti-NK1.1, CD27 e CD11b.

Nos animais C/ebpg CT, a subpopulação de células NK citotóxicas foi predominante. Em contrapartida, nos animais C/ebpg KO, observamos maiores proporções de células secretórias maduras (CD27⁺CD11b⁺) ($p < 0,001$) e menores proporções ($p < 0,01$) e números absolutos ($p < 0,05$) de células citotóxicas (CD27⁻CD11b⁺) em relação aos animais CT. Os resultados estão ilustrados na figura 19.

Figura 19. Análise gráfica da percentagem e números absolutos de subtipos funcionais de células NK em animais C/ebpg controles (CT) e *knockout* (KO), n = 4 por grupo. Estão representados os quatro subtipos de células NK: NK imatura (imatura), NK secretória imatura (im secret), NK secretória madura (secretória) e NK citotóxica (citotóxica). A análise relativa do ensaio (percentagem de células) (A) mostrou significância estatística para os subtipos de células NK secretórias e NK citotóxicas e a análise dos números absolutos (B) mostrou significância estatística somente para o subtipo de células NK citotóxicas, comparando animais KO para o C/ebpg e controles. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, ns=não significativo). Valor de p geral do teste ANOVA no canto superior esquerdo dos gráficos.

A Subtipos NK (análise relativa)

B Subtipos NK (análise absoluta)

4.9 Ensaio de ativação de células NK C/ebpg-deficientes

O CD107a foi descrito como um marcador da atividade funcional das células NK pois torna-se significativamente aumentado na superfície das células NK após a estimulação com alvos desprovidos de MHC, e pode ser detectado por citometria de fluxo. Além disso, a expressão de CD107a correlaciona-se tanto com a produção de citocinas quanto com a lise de células-alvo mediada por células NK. No entanto, além de ser expresso de forma coordenada em quase todas as células secretoras de citocinas, o CD107a também foi expresso em um grande subconjunto de células NK que não secretam citocinas após a estimulação.

Segundo Alter e colaboradores (ALTER, et al, 2004), considera-se resposta positiva de ativação se a frequência de CD107a após estimulação com alvos desprovidos de MHC for pelo menos três vezes maior do que aquela de controles não estimulados.

Como pode ser visto no gráfico abaixo (figura 20), a percentagem de ativação de células NK de acordo com a expressão de CD107a, após ativação com células-alvo da linhagem YAC-1, mostrou-se significativamente reduzida em animais deficientes para o C/ebpg em relação aos controles. Essa diferença favoreceu os animais controles (CT) em mais de 5 vezes a ativação detectada nos animais KO ($p < 0,01$).

Figura 20. Análise estatística da expressão de CD107a por citometria de fluxo demonstrando células NK ativadas de animais knockout (KO) para o C/ebpg e controles (CT) (n = 4 por grupo). A análise percentual da expressão do CD107 mostrou ativação cinco vezes maior para animais CT em relação aos animais KO para o C/ebpg. A análise foi feita usando teste t não pareado, $p = 0,007$. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro-padrão (CT = 12.44 ± 2.509 ; KO = 2.255 ± 0.6762).

4.10 Análise da citotoxicidade de células NK normais e deficientes para o C/ebpg por Citometria de Fluxo

Realizamos análise por citometria de fluxo do efeito de citotoxicidade de células NK efetoras sobre células-alvo da linhagem YAC-1 marcadas com o fluoróforo CTO (*Cell Tracker Orange*) após co-cultura por 3 horas, e marcação com 7-AAD. Um experimento representativo da análise está ilustrado na Figura 21. Após a análise de imunofenotipagem, o cálculo da morte celular específica foi obtido por meio de uso da seguinte fórmula:

Cálculo % morte celular específica

$$\frac{\text{Eventos CTO+7AAD+ menos Morte celular espontânea\%}}{100 \text{ menos Morte celular espontânea\%}} \times 100$$

Figura 21. Gráficos ilustrativos da análise de citometria de fluxo demonstrando as populações de células NK (células efetoras, CEF) e YAC-1 (células-alvo, CA) marcadas com o fluoróforo CTO (*Cell Tracker Orange*) após co-cultura por 3 horas, e determinação da viabilidade das mesmas por marcação com 7-AAD. As células YAC-1 foram selecionadas com base na incorporação do CTO e parâmetros SSC/FSC e depois analisadas quanto à incorporação de 7-AAD para todas as razões CEF:CA de 10:1, 5:1 e 1:1.

Como se pode observar na figura 22, a comparação entre as percentagens de morte celular específica entre animais CT e KO para o C/ebpg mostrou que as células NK de animais KO para o C/ebpg são menos citotóxicas do que seus controles, na razão 10:1 (NK: YAC-1) ($p < 0,05$). Nas demais razões, os animais KO para o C/ebpg mostraram tendência à redução da citotoxicidade, contudo, não houve

significância estatística. Os resultados demonstram deficiência funcional das células NK de animais C/ebpg-deficientes em relação aos seus controles.

Figura 22. Análise estatística da citotoxicidade por citometria de fluxo demonstrando a morte celular de células-alvo YAC-1 (incorporação de 7-AAD) quando co-cultivadas com células NK de animais *knockout* (KO) para o C/ebpg e controles (CT), n=5 por grupo. Para cada um dos cinco experimentos resumidos no gráfico, a obtenção de número suficiente de células NK purificadas por sorting para as co-culturas necessitou de um pool de esplenócitos de 2 animais. A comparação entre animais CT e KO para o C/ebpg mostrou que há menor citotoxicidade das células NK nos animais KO para o C/ebpg em comparação com seus controles, na razão 10:1 (NK: YAC-1) (* $p < 0,05$). As demais razões mostraram tendência à redução da citotoxicidade nos animais KO para o C/ebpg em comparação aos controles, contudo, não houve significância estatística (ns=não significante).

5 DISCUSSÃO

O papel das interleucinas na regulação das CTH tem sido elucidado mais recentemente na literatura. A maioria das citocinas que afetam a CTH exibem pleiotropia e redundância. Ações pleiotrópicas parecem ser o resultado da sua diferente atividade em conjunto com outras citocinas. Sua redundância pode ser explicada pela convergência de diferentes vias de sinalização para regulação dos diferentes destinos das CTH. Podemos citar, por exemplo, a IL10, que, ao ser estimulada de três a quatro vezes, leva a um aumento na frequência e capacidade de repopulação das CTH em cultura. Além disso, receptores de superfície para IL-10 foram detectados em células progenitoras murinas (ZHANG, C. C.; LODISH, H. F, 2008; BALDRIDGE, M. T.; KING, K. Y.; GOODELL, M. A, 2011).

O presente estudo se destinou a desvendar o papel do C/EBPG, um dos membros da família de fatores de transcrição C/EBPs, importantes reguladores da hematopoese. Apesar dos achados de que o C/EBPG tem expressão gênica inversamente proporcional à expressão do C/EBPA em amostras humanas de leucemia mieloide aguda (ALBERICH-JORDA M. et al, 2012), o papel do C/EBPG em regular a hematopoese normal ao nível da CTH nunca foi demonstrado.

O modelo murino condicional *C/ebpg knockout* (KO) usado nesse trabalho foi gerado inicialmente para caracterizar a hematopoese. Entretanto, não foram observadas anormalidades numéricas ou funcionais da CTH, nem tampouco na mielopoese normal ou estimulada por insulto bacteriano (KARDOSOVA, M. et al, 2018). Os achados de que o C/EBPG tem um papel sobre a maturação de células NK (DI SANTO J. P., 2006), bem como de que é essencial para a função destas células (KAISHO T. et al, 1999) motivaram a investigação dos mecanismos que envolvem a regulação da atividade de células NK. Além da regulação direta sobre as células NK, acreditamos que a participação do C/EBPG na hematopoese ocorra também de forma indireta por meio de regulação da atividade secretória das células NK, capazes de produzir citocinas que potencialmente regulam a função da CTH.

Estudos que ajudem a elucidar como fatores extrínsecos regulam os diferentes destinos das CTHs do ponto de vista molecular são importantes para esclarecer como estes fatores podem contribuir para a otimização da função das CTH normais bem como para a origem das neoplasias hematopoéticas originadas de transformação da CTH. De fato, nosso grupo evidenciou prejuízo na frequência e

capacidade de autorenovação da CTH após exposição em modelos de co-cultura com células NK normais, efeito este não observado quando células NK deficientes em C/ebpg foram utilizadas para experimentação (Figueiredo-Pontes et al, 2018, em submissão à revista Science Translational Medicine; ANEXO 2).

Diante desses dados, caracterizamos neste trabalho as células NK de animais do modelo transgênico KO para o C/ebpg. As células foram avaliadas tanto do ponto de vista funcional quanto de expressão gênica de mediadores com potencial influência sobre a função da CTH. Em relação ao modelo murino KO para o C/ebpg descrito previamente (KAISHO T. et al, 1999) o nosso modelo não apresenta a letalidade precoce em 48 horas após o nascimento, permitindo o estudo da função NK na hematopoese adulta. Não obstante, analisamos a função de células NK purificadas, de forma condicional e controlada, e não a função de esplenócitos totais como previamente descrito (Kim GG, et al, 2007). Assim, consideramos que o modelo usado é inédito em caracterizar especificamente a regulação direta das células NK pelo C/ebpg.

Com base nos resultados da análise de expressão gênica de larga escala e na hipótese de citocinas produzidas por células NK podem regular a hematopoese, selecionamos genes-alvo para estudo de expressão gênica por PCR em tempo real. Dentre os genes analisados (*Ifng*, *Tgfb*, *Gmcsf*, *Il-10*, *Tnfa*, *Tlr4*, *Myd88* e *Irak4*) observamos tendência a maior expressão para os genes *Myd88*, *Tgfb* e *Gmcsf* e tendência à redução da expressão dos genes *Tlr4* e *Ifng* em células NK deficientes em C/ebpg com o estímulo com IL-2, embora os resultados careçam de significância estatística. A comparação entre a análise da expressão gênica de larga escala e a análise por PCR em tempo real foi correspondente para dois genes, *Gmcsf* e *Irak4*. Houve aumento da expressão de *Gmcsf* enquanto *Irak4* teve redução da expressão quando as células NK foram estimuladas com IL-2 sendo esta diferença estatisticamente significativa apenas no *microarray*.

Dessa forma, consideramos o possível envolvimento da via de sinalização dos receptores do tipo Toll (*Toll like receptors* ou TLRs) na regulação de células NK dependente do C/EBPG devido aos achados de possível aumento de *Myd88* e redução de *Tlr4*. Os TLRs geralmente funcionam como homodímeros, embora a ligação heterodimérica tenha sido relatada, e utilizam em grande parte a proteína adaptadora de diferenciação mieloide e resposta primária 88 (MyD88) para ativar a produção de citocinas inflamatórias por meio da sinalização de NF-κB. (TAKEDA, K.;

AKIRA, S, 2004). Sabe-se que progenitores murinos expressam receptores de detecção de componentes bacterianos (TLR2 e TLR4), e a estimulação destes receptores provoca a entrada do ciclo celular e a diferenciação mieloide *in vitro*, dependente de MyD88. Assim, embora esta conclusão esteja além dos objetivos deste trabalho, podemos hipotetizar que citocinas dependentes da via dos TLRs possam regular a função de células NK.

Curiosamente, os ensaios de expressão gênica revelaram que a ativação das células NK com IL-2 alterou a expressão de alguns dos genes estudados. Após o estímulo, os genes *Tgfb* e *Gmcsf* mostraram tendência ao aumento da expressão, enquanto a expressão de *Tlr4* e *Irak4* se mostrou reduzida, tanto em animais controles como deficientes para o *C/ebpg*. De fato, a IL-2 é uma citocina pluripotente capaz de expandir e ativar as células NK assim como promover a sua migração nos tecidos-alvo e aumentar a secreção de citocinas e quimiocinas (BIRON et al., 1999; MISAWA et al., 2003; ORR; LANIER, 2010; RAULET, 2004). Assim, estas modificações funcionais podem resultar em alterações da expressão gênica como as que observamos em nosso estudo.

Independentemente dos achados de expressão gênica, ressaltamos o achado de que células NK *Cebpg*-deficientes, ativadas com IL-2, apresentaram produção diminuída de IFN γ quando comparadas aos controles. As demais citocinas estudadas não se mostraram diferentes. Os interferons tem um papel crítico e complexo sobre a hematopoese. Classicamente, especialmente os interferons do tipo I (α e β), exercem um efeito proliferativo mas transitório sobre as CTH, fazendo com que as células quiescentes ciclem e se tornem mais susceptíveis à morte celular espontânea ou induzida (KILADJIAN, et al, 2011). Também existem evidências de morte celular da CTH em síndromes de falência medular como anemia de Fanconi nas quais se encontram elevados níveis de IFN tipo I (de BRUIN, et al, 2013). Da mesma forma, o interferon tipo II (IFN γ) pode estimular a proliferação da CTH, sendo que após a exposição à citocina endógena, as células LSK (células negativas para marcadores de linhagem, positivas para Sca-1 e cKit) expandem e tem maior potencial para formação de colônias e diferenciação mieloide (BALDRIDGE, M. T., 2011). Evidências recentes sugerem que a exposição ao IFN γ impede a auto-renovação da CTH por induzir diferenciação mieloide preferencial (MATATTAL, et al, 2014). Considerando a hipótese de que células NK podem regular a função da CTH e, sabendo que células NK disfuncionais (*C/ebpg*-

deficientes) são deficientes em produzir IFN γ , é plausível que esta citocina esteja envolvida no prejuízo à função da CTH.

É possível que o IFN γ seja um mediador importante da função NK. Estudos para comprovação desse mecanismo de forma mais direta, seja por bloqueio dos receptores de IFN γ em animais selvagens, seja por adição de IFN γ às culturas de células NK poderão futuramente melhor elucidar a regulação C/ebpg- IFN γ . Além deste mediador, pretendemos ampliar a busca por citocinas diferencialmente produzidas em nosso modelo de animais transgênicos com excisão condicional do C/ebpg. Para tanto, amostras de sobrenadantes de cultura de células NK isoladas em nosso trabalho foram enviadas ao colaborador internacional Robert S. Welner, da Universidade do Alabama, para realização de uma pesquisa ampliada de citocinas potencialmente envolvidas.

Com objetivo de caracterização das células NK Cebpg-deficientes, analisamos a frequência, os receptores e os subtipos funcionais destas células, caracterizadas como linhagem negativas/CD3⁻/NK1.1⁺ e, de acordo com a expressão de NKG2D, Ly49D e NKG2A, assim como de CD27 e CD11b. A quantificação das células NK e dos receptores de citotoxicidade aqui testados mostrou expressão semelhante entre células NK de animais C/ebpg-deficientes e seus controles. Apesar de não termos encontrado defeitos numéricos nas células NK deficientes em C/ebpg, observamos relevantes alterações funcionais.

Primeiramente, animais KO para o C/ebpg apresentaram maior percentagem de células secretórias e diminuição percentual e absoluta da subpopulação de células NK citotóxicas quando comparadas às células NK dos controles. Os estágios de maturação definidos pela expressão de CD27 e CD11b estão associados às funções efectoras das células NK. As células duplo negativas para estes marcadores exibem um fenótipo imaturo e potencial de diferenciação. As células CD27⁺CD11b^{+/-} apresentam grande capacidade de secretar citocinas. As células NK CD11b⁺CD27⁻ são aquelas que apresentam atividade citolítica.

Estudos recentes mostraram que a expressão de CD107a na superfície celular foi associada à degranulação de linfócitos T CD8⁺, e que este marcador teve sua expressão aumentada na superfície da célula após a estimulação (BETTS et al., 2003). Esses dados sugerem que empregar CD107a como marcador da atividade funcional das células NK pode permitir a identificação de uma grande fração de células NK ativadas que podem degranular na ausência de secreção de citocinas.

Assim, o CD107a é reconhecidamente um marcador sensível da atividade das células NK (Alter, et al, 2004) .

Sabendo que as células NK citotóxicas e/ou secretoras também expressam esse marcador, investigamos a função potencial de CD107a como um marcador de ativação. Para tanto, co-cultivamos esplenócitos totais de camundongos transgênicos CT e KO para o C/ebpg com células YAC-1, na razão 10:1, e observamos que as células dos animais KO foram cinco vezes menos ativadas do que células NK dos animais controle após o contato com as células-alvo.

Por fim, para caracterizar a função mais direta de citotoxicidade dependente de células NK em nosso modelo, optamos por usar o método de citometria de fluxo e não o método clássico de liberação do cromo radioativo. Apesar de o ensaio do cromo ser usado de longa data, ser confiável e reconhecido como "padrão-ouro" para medir a citotoxicidade NK, apresenta a grande desvantagem de uso de radioatividade. Assim, optamos por usar um método alternativo, baseado em citometria de fluxo e previamente validado em relação ao método do cromo radioativo (Kim GG , et al, 2007). Trata-se de um ensaio multicorimétrico com citometria de fluxo para medir simultaneamente a citotoxicidade mediada por células NK, visualizar conjugados de células tumorais e efetoras, obter contagens de células absolutas, medir a função citolítica de células efetoras e determinar o seu imunofenótipo. Conseguimos reproduzir o método descrito por Kim e colaboradores em células humanas, nas células murinas NK do nosso modelo KO para o C/ebpg pela primeira vez no Laboratório de Hematologia Experimental da FMRP-USP. Comparando animais CT e KO para o C/ebpg, observamos que houve menor citotoxicidade das células NK nos animais KO na razão 10:1 entre células efetoras e células-alvo em comparação aos controles. As razões menores (5:1 e 1:1) também mostraram a mesma tendência sem significância estatística. Não foi possível realizar experimentos com maiores razões do que 10:1 no tempo de desenvolvimento deste projeto devido ao número de células NK que precisariam ser isoladas para o experimento. Por exemplo, podemos citar aqui que a coleta de esplenócitos de dois animais gerava a obtenção de aproximadamente 8×10^5 células. Esta é uma dificuldade técnica do ensaio de imunofenotipagem em relação ao método radioativo, mas que pode ser ultrapassada com otimização das condições de *sorting* e cultura de células NK. Acreditamos que o aumento da proporção células NK:células-alvo iria demonstrar ainda melhor a deficiência funcional.

6 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

6.1. Utilizamos pela primeira vez na Instituição um modelo murino transgênico C/ebpg KO que permitiu avaliação funcional das células NK.

6.2. Identificamos potenciais genes-alvo do C/ebpg por meio de análise da expressão gênica em larga escala de células NK deficientes ou não para o C/ebpg e, por meio de PCR em Tempo Real foram avaliados possíveis mediadores da regulação das células NK pelo C/ebpg.

6.3. As células NK Cebpg-deficientes, após ativação com a interleucina IL-2 mostraram uma produção diminuída de IFN γ quando comparadas aos controles.

6.4. A frequência de células NK e a expressão dos receptores NKG2D, Ly49D e NKG2A apresentou expressão semelhante entre células NK deficientes ou não para o C/ebpg.

6.5. A deficiência do C/ebpg foi associada à menor frequência de células NK citotóxicas e maior frequência de células secretórias em relação aos animais controle para o C/ebpg;

6.6. Animais KO para o C/ebpg apresentaram menor ativação após exposição a células-alvo quando a expressão do CD107a foi avaliada, em comparação aos controles.

6.7. Animais KO para o C/ebpg exibiram menor citotoxicidade das células NK em comparação aos controles.

7 CONCLUSÕES

Em resumo, conseguimos com este trabalho caracterizar pela primeira vez o fenótipo de deficiência funcional de células NK ligadas ao C/ebpg em um modelo murino que permite deletar este fator de transcrição especificamente no tecido hematopoético adulto. Concluimos que o C/ebpg é de fato relevante para a ativação e citotoxicidade das células NK e não apenas para seu desenvolvimento do ponto de vista ontogenético. Ademais, nosso estudo apontou mediadores alvo para esta regulação, dentre os quais se destaca a citocina IFN γ . Não apenas o C/ebpg mas também seus mediadores podem ser alvos terapêuticos em situações nas quais se pretenda otimizar a função de células NK. Por exemplo, em neoplasias nas quais se demonstre deficiência de células NK, a ativação de células NK pode ser uma estratégia de imunoterapia.

REFERÊNCIAS

AKASAKA, T. et al. Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). **Blood**, v. 109, n. 8, p. 3451-61, Apr 2007.

ALBERICH-JORDÀ, M. et al. C/EBP γ deregulation results in differentiation arrest in acute myeloid leukemia. **J Clin Invest**, v. 122, n. 12, p. 4490-504, Dec 2012.

ALTER, G.; MALENFANT, J. M.; ALTFELD, M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. **J Immunol Methods**, v. 294, n. 1-2, p. 15-22, Nov 2004.

BALDRIDGE, M. T.; KING, K. Y.; GOODELL, M. A. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. **Trends Immunol**, v. 32, n. 2, p. 57-65, Feb 2011.

BALSAMO, M. et al. Melanoma cells become resistant to NK-cell-mediated killing when exposed to NK-cell numbers compatible with NK-cell infiltration in the tumor. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 7, p. 1833-42, Jul 2012.

BRAUD, V. M. et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 795-9, Feb 1998.

BETTS, M. R. et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. **J Immunol Methods**, v. 281, n. 1-2, p. 65-78, Oct 2003.

BIRON, C. A. et al. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 189-220, 1999.

BLOMBERG, K. et al. Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity. I. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence. **J Immunol Methods**, v. 86, n. 2, p. 225-9, Feb 1986.

BURKHARDT, J. K.; HESTER, S.; ARGON, Y. Two proteins targeted to the same lytic granule compartment undergo very different posttranslational processing. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 18, p. 7128-32, Sep 1989.

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.

BUZA-VIDAS, N. et al. Cytokines regulate postnatal hematopoietic stem cell expansion: opposing roles of thrombopoietin and LNK. **Genes Dev**, v. 20, n. 15, p. 2018-23, Aug 2006.

CASTRICONI, R. et al. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 7, p. 4120-5, Apr 01 2003.

CHAHROUDI, A.; SILVESTRI, G.; FEINBERG, M. B. Measuring T cell-mediated cytotoxicity using fluorogenic caspase substrates. **Methods**, v. 31, n. 2, p. 120-6, Oct 2003.

CERWENKA, A.; LANIER, L. L. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. **Immunol Rev**, v. 181, p. 158-69, Jun 2001.

CHEN, E. Y. et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **BMC Bioinformatics**, v. 14, p. 128, Apr 2013. ISSN 1471-2105.

CHIOSSONE, L. et al. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. **Blood**, v. 113, n. 22, p. 5488-96, May 2009.

COLUCCI, F.; CALIGIURI, M. A.; DI SANTO, J. P. What does it take to make a natural killer? **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 5, p. 413-25, May 2003.

COLUCCI, F.; DI SANTO, J. P.; LEIBSON, P. J. Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? **Nat Immunol**, v. 3, n. 9, p. 807-13, Sep 2002.

COOPER, M. A.; FEHNIGER, T. A.; CALIGIURI, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. **Trends Immunol**, v. 22, n. 11, p. 633-40, Nov 2001.

COOPER, C. et al. Ig/EBP (C/EBP gamma) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family transcriptional activators. **Nucleic Acids Res**, v. 23, n. 21, p. 4371-7, Nov 1995.

DAVYDOV, I. V. et al. Cloning of the cDNA encoding human C/EBP gamma, a protein binding to the PRE-I enhancer element of the human interleukin-4 promoter. **Gene**, v. 161, n. 2, p. 271-5, Aug 1995.

De BRUIN AMAM, DEMIREL O, HOOIBRINK B, BRANDTSrandts CH, NOLTE MA. Interferon-gamma impairs proliferation of hematopoietic stem cells in mice. **Blood**. v. 92, n. 2, p. 377-81, Mar 2013.

DI SANTO, J. P. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 257-86, 2006.

DISANTO, J. P. et al. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 2, p. 377-81, Jan 17 1995.

DUNN, G. P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol**, v. 3, n. 11, p. 991-8, 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.

DYBKAER, K. et al. Genome wide transcriptional analysis of resting and IL2 activated human natural killer cells: gene expression signatures indicative of novel molecular signaling pathways. **BMC Genomics**, v. 8, p. 230, 2007.

DÖHNER, K. et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3740-6, Dec 2005.

EGUIZABAL, C. et al. Natural killer cells for cancer immunotherapy: pluripotent stem cells-derived NK cells as an immunotherapeutic perspective. **Front Immunol**, v. 5, p. 439, 2014.

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

FARAG, S. S. et al. Biology and clinical impact of human natural killer cells. **Int J Hematol**, v. 78, n. 1, p. 7-17, Jul 2003.

FRAZÃO, J. B.; ERRANTE, P. R.; CONDINO-NETO, A. Toll-like receptors' pathway disturbances are associated with increased susceptibility to infections in humans. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 61, n. 6, p. 427-43, Dec 2013.

FRENCH, A. R.; YOKOYAMA, W. M. Natural killer cells and viral infections. **Curr Opin Immunol**, v. 15, n. 1, p. 45-51, Feb 2003.

FU, B. et al. CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells. **Immunology**, v. 133, n. 3, p. 350-9, Jul 2011.

FUKUDA, M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. **J Biol Chem**, v. 266, n. 32, p. 21327-30, Nov 1991.

GAO, H. et al. C/EBP gamma has a stimulatory role on the IL-6 and IL-8 promoters. **J Biol Chem**, v. 277, n. 41, p. 38827-37, Oct 2002.

GRÉGOIRE, C. et al. The trafficking of natural killer cells. **Immunol Rev**, v. 220, p. 169-82, Dec 2007.

GILMOUR, K. C. et al. Defective expression of the interleukin-2/interleukin-15 receptor beta subunit leads to a natural killer cell-deficient form of severe combined immunodeficiency. **Blood**, v. 98, n. 3, p. 877-9, Aug 01 2001.

GOLDBERG, J. E.; SHERWOOD, S. W.; CLAYBERGER, C. A novel method for measuring CTL and NK cell-mediated cytotoxicity using annexin V and two-color flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 224, n. 1-2, p. 1-9, Apr 1999.

HAYAKAWA, Y.; SMYTH, M. J. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. **J Immunol**, v. 176, n. 3, p. 1517-24, Feb 2006.

HAYAKAWA, Y. et al. Functional subsets of mouse natural killer cells. **Immunol Rev**, v. 214, p. 47-55, Dec 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 04 2011.

HERBERMAN, R. B. et al. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. **Int J Cancer**, v. 16, n. 2, p. 230-9, Aug 15 1975.

HERCEND, T.; SCHMIDT, R. E. Characteristics and uses of natural killer cells. **Immunol Today**, v. 9, n. 10, p. 291-3, Oct 1988.

HESSLEIN, D. G.; LANIER, L. L. Transcriptional control of natural killer cell development and function. **Adv Immunol**, v. 109, p. 45-85, 2011.

HIRAI, H. et al. C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. **Nat Immunol**, v. 7, n. 7, p. 732-9, Jul 2006.

HOOVER, R. G.; GULLICKSON, G.; KORNBLUTH, J. Impaired NK cytolytic activity and enhanced tumor growth in NK lytic-associated molecule-deficient mice. **J Immunol**, v. 183, n. 11, p. 6913-21, Dec 01 2009.

IKAWA, T. et al. Commitment of common T/Natural killer (NK) progenitors to unipotent T and NK progenitors in the murine fetal thymus revealed by a single progenitor assay. **J Exp Med**, v. 190, n. 11, p. 1617-26, Dec 06 1999.

KAISHO, T. et al. Impairment of natural killer cytotoxic activity and interferon gamma production in CCAAT/enhancer binding protein gamma-deficient mice. **J Exp Med**, v. 190, n. 11, p. 1573-82, Dec 1999.

KANNAN, K. et al. Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium. **Cell Immunol**, v. 171, n. 1, p. 10-9, Jul 1996.

KARDOSOVA, M. et al. C/EBP γ is dispensable for steady-state and emergency granulopoiesis. **Haematologica**, Mar 2018.

KARRE, K. MHC gene control of the natural killer system at the level of the target and the host. **Semin Cancer Biol**, v. 2, n. 5, p. 295-309, Oct 1991.

KARRE, K. et al. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. **Nature**, v. 319, n. 6055, p. 675- 8, Feb 20-26, 1986.

KIESSLING, R. et al. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. **Eur J Immunol**, v. 5, n. 2, p. 117-21, Feb 1975.

KIESSLING, R.; KLEIN, E.; WIGZELL, H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. **Eur J Immunol**, v. 5, n. 2, p. 112-7, Feb 1975.

KILADJIAN JJ, MESA RA, HOFFMAN R. The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies. **Blood**, v. 5, n. 2, p. 117-21, Feb 2011.

KIM, G. G. et al. A novel multiparametric flow cytometry-based cytotoxicity assay simultaneously immunophenotypes effector cells: comparisons to a 4 h ⁵¹Cr-release assay. **J Immunol Methods**, v. 325, n. 1-2, p. 51-66, Aug 2007.

KOO, K. C. et al. Reduction of the CD16 (-) CD56bright NK cell subset precedes NK cell dysfunction in prostate cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e78049, 2013.

KONDO, M.; WEISSMAN, I. L.; AKASHI, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. **Cell**, v. 91, n. 5, p. 661- 72, Nov 28 1997.

KOSCHMIEDER, S. et al. Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 4, p. 619-28, Feb 2009.

KUMAR, V. et al. Natural killer cells in mice treated with 89strontium: normal target-binding cell numbers but inability to kill even after interferon administration. **J Immunol**, v. 123, n. 4, p. 1832-8, Oct 1979.

KUMAR, V.; MCNERNEY, M. E. A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 5, p. 363-74, May 2005.

LANE, S. W.; SCADDEN, D. T.; GILLILAND, D. G. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. **Blood**, v. 114, n. 6, p. 1150-7, Aug 2009.

LANIER, L. L. NK cell receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 16, p. 359-93, 1998.

LANIER, L. L. NK cell recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 225-74, 2005.

LIANG, P. H. et al. Vascular endothelial growth inhibitor (VEGI; TNFSF15) inhibits bone marrow-derived endothelial progenitor cell incorporation into Lewis lung carcinoma tumors. **Angiogenesis**, v. 14, n. 1, p. 61-8, Mar 2011.

LIEBERMAN, J. Anatomy of a murder: how cytotoxic T cells and NK cells are activated, develop, and eliminate their targets. **Immunol Rev**, v. 235, n. 1, p. 5-9, May 2010.

LIU, L. et al. Visualization and quantification of T cell-mediated cytotoxicity using cell-permeable fluorogenic caspase substrates. **Nat Med**, v. 8, n. 2, p. 185-9, Feb 2002.

LJUNGGREN, H. G.; KARRE, K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. **Immunol Today**, v. 11, n. 7, p. 237-44, Jul 1990.

LJUNGGREN, H. G.; MALMBERG, K. J. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 5, p. 329-39, May 2007.

LONG, E. O. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 875-904, 1999.

LÓPEZ-SOTO, A. et al. NKG2D signaling in cancer immunosurveillance. **Int J Cancer**, v. 136, n. 8, p. 1741-50, Apr 2015.

MALE, V.; BRADY, H. J. Transcriptional control of NK cell differentiation and function. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 381, p. 173-87, 2014.

MARCENARO, E. et al. IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. **J Immunol**, v. 174, n. 7, p. 3992-8, Apr 01 2005.

MARTÍN-FONTECHA, A. et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T (H) 1 priming. **Nat Immunol**, v. 5, n. 12, p. 1260-5, Dec 2004.

MELENOVSKY, V. et al. Metabolic characterization of volume overload heart failure due to aorto-caval fistula in rats. **Mol Cell Biochem**, v. 354, n. 1-2, p. 83-96, Aug 2011.

MISAWA, E. et al. Booster effect of interleukin-2 on natural killer 1.1+ cells stimulated by administration of macrophage colony-stimulating factor in mice. **J Immunother**, v. 26, n. 1, p. 21-30, 2003 Jan-Feb 2003.

MORETTA, A. et al. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. **J Exp Med**, v. 171, n. 3, p. 695-714, Mar 1990.

MORETTA, A. et al. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. **J Exp Med**, v. 178, n. 2, p. 597-604, Aug 1993.

MORETTA, A. et al. What is a natural killer cell? **Nat Immunol**, v. 3, n. 1, p. 6-8, Jan 2002.

MORETTA, L.; MORETTA, A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. **EMBO J**, v. 23, n. 2, p. 255-9, Jan 2004.

MORETTA, A. et al. Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. **Trends Immunol**, v. 26, n. 12, p. 668-75, Dec 2005.

MROZEK, E.; ANDERSON, P.; CALIGIURI, M. A. Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. **Blood**, v. 87, n. 7, p. 2632-40, Apr 01 1996.

NERLOV, C. The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. **Trends Cell Biol**, v. 17, n. 7, p. 318-24, Jul 2007.

NISHIZAWA, M.; WAKABAYASHI-ITO, N.; NAGATA, S. Molecular cloning of cDNA and a chromosomal gene encoding GPE1-BP, a nuclear protein which binds to granulocyte colony-stimulating factor promoter element 1. **FEBS Lett**, v. 282, n. 1, p. 95-7, Apr 1991.

OPPENHEIM, D. E. et al. Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. **Nat Immunol**, v. 6, n. 9, p. 928-37, Sep 2005.

PABST, T. et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. **Nat Genet**, v. 27, n. 3, p. 263-70, Mar 2001.

PARHAM, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 3, p. 201-14, Mar 2005.

PARK, D.; SYKES, D. B.; SCADDEN, D. T. The hematopoietic stem cell niche. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 17, p. 30-9, 2012.

PARKIN, S. E. et al. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) activator proteins by heterodimerization with C/EBPgamma (Ig/EBP). **J Biol Chem**, v. 277, n. 26, p. 23563-72, Jun 2002.

PETERS, P. J. et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. **J Exp Med**, v. 173, n. 5, p. 1099-109, May 1991.

POLI, A. et al. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. **Immunology**, v. 126, n. 4, p. 458-65, Apr 2009.

RAMOS, S. B. et al. Phenotypic and functional evaluation of natural killer cells in thymectomized children. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 81, n. 3, p. 277- 81, Dec 1996.

RAULET, D. H. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. **Nat Immunol**, v. 5, n. 10, p. 996-1002, Oct 2004.

ROMAN, C. et al. Ig/EBP-1: a ubiquitously expressed immunoglobulin enhancer binding protein that is similar to C/EBP and heterodimerizes with C/EBP. **Genes Dev**, v. 4, n. 8, p. 1404-15, Aug 1990.

ROSEN, E. D. et al. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. **Genes Dev**, v. 16, n. 1, p. 22-6, Jan 2002.

ROSS J, LI L. Recent advances I understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate. **Curr Opin Hematol**, v. 4, n. 8, p. 1404-15, Aug 2006.

ROTH, C. et al. Clonal acquisition of inhibitory Ly49 receptors on developing NK cells is successively restricted and regulated by stromal class I MHC. **Immunity**, v. 13, n. 1, p. 143-53, Jul 2000.

RUBIO, V. et al. Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. **Nat Med**, v. 9, n. 11, p. 1377-82, Nov 2003.

SANCHEZ, M. J. et al. Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. **J Exp Med**, v. 180, n. 2, p. 569-76, Aug 01 1994.

SCHWARZ, R. E.; HISERODT, J. C. Effects of splenectomy on the development of tumor-specific immunity. **J Surg Res**, v. 48, n. 5, p. 448-53, May 1990.

SEAMAN, W. E. et al. Beta-Estradiol reduces natural killer cells in mice. **J Immunol**, v. 121, n. 6, p. 2193-8, Dec 1978.

SPITS, H. et al. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. **Immunol Rev**, v. 165, p. 75-86, Oct 1998.

SONG, G. et al. Regulation of the C/EBP α signaling pathway in acute myeloid leukemia (Review). **Oncol Rep**, v. 33, n. 5, p. 2099-106, May 2015.

SOUZA-FONSECA-GUIMARAES, F. et al. Toll-like receptors expression and interferon- γ production by NK cells in human sepsis. **Crit Care**, v. 16, n. 5, p. R206, 2012.

TANAKA, T. et al. Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 353-61, Jan 1995.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin Immunol**, v. 16, n. 1, p. 3-9, Feb 2004.

THOMASSIN, H. et al. Molecular cloning of two C/EBP-related proteins that bind to the promoter and the enhancer of the alpha 1-fetoprotein gene. Further analysis of C/EBP beta and C/EBP gamma. **Nucleic Acids Res**, v. 20, n. 12, p. 3091-8, Jun 1992.

TRINCHIERI, G. Biology of natural killer cells. **Adv Immunol**, v. 47, p. 187-376, 1989.

TSCHOPP, J.; NABHOLZ, M. Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T lymphocytes. **Annu Rev Immunol**, v. 8, p. 279-302, 1990.

VALK, P. J. et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 350, n. 16, p. 1617-28, Apr 2004.

VITALE, M. et al. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. **Eur J Immunol**, v. 44, n. 6, p. 1582-92, Jun 2014.

VIVIER, E. et al. Functions of natural killer cells. **Nat Immunol**, v. 9, n. 5, p. 503-10, May 2008.

VOSSEN, M. T. et al. CD27 defines phenotypically and functionally different human NK cell subsets. **J Immunol**, v. 180, n. 6, p. 3739-45, Mar 2008.

VUKICEVIC, M. et al. CD56bright NK cells after hematopoietic stem cell transplantation are activated mature NK cells that expand in patients with low numbers of T cells. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 11, p. 3246-54, Nov 2010.

WANG, Q. F.; FRIEDMAN, A. D. CCAAT/enhancer-binding proteins are required for granulopoiesis independent of their induction of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. **Blood**, v. 99, n. 8, p. 2776-85, Apr 2002.

WILLIAMS, N. S. et al. Clonal analysis of NK cell development from bone marrow progenitors in vitro: orderly acquisition of receptor gene expression. **Eur J Immunol**, v. 30, n. 7, p. 2074-82, Jul 2000.

WILLIAMS, N. S. et al. Generation of lytic natural killer 1.1+, Ly-49- cells from multipotential murine bone marrow progenitors in a stroma-free culture: definition of cytokine requirements and developmental intermediates. **J Exp Med**, v. 186, n. 9, p. 1609-14, Nov 03 1997.

WINCHESTER, B. G. Lysosomal membrane proteins. **Eur J Paediatr Neurol**, v. 5 Suppl A, p. 11-9, 2001.

YAMANAKA, R. et al. CCAAT/enhancer binding proteins are critical components of the transcriptional regulation of hematopoiesis (Review). **Int J Mol Med**, v. 1, n. 1, p. 213-21, Jan 1998.

YANG, L. et al. IFN-gamma negatively modulates self-renewal of repopulating human hemopoietic stem cells. **J Immunol**, v. 174, n. 2, p. 752-7, Jan 2005.

YOKOYAMA, W. M.; SCALZO, A. A. Natural killer cell activation receptors in innate immunity to infection. **Microbes Infect**, v. 4, n. 15, p. 1513-21, Dec 2002.

YOKOYAMA, W. M.; PLOUGASTEL, B. F. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 4, p. 304-16, Apr 2003.

YE, M. et al. C/EBP α controls acquisition and maintenance of adult haematopoietic stem cell quiescence. **Nat Cell Biol**, v. 15, n. 4, p. 385-94, Apr 2013.

ZAFARANA, G. et al. Erythroid overexpression of C/EBP γ in transgenic mice affects gamma-globin expression and fetal liver erythropoiesis. **EMBO J**, v. 19, n. 21, p. 5856-63, Nov 2000.

ZHANG, C. C.; LODISH, H. F. Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. **Curr Opin Hematol**, v. 15, n. 4, p. 307-11, Jul 2008.

ZHANG, P. et al. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP α . **Immunity**, v. 21, n. 6, p. 853-63, Dec 2004.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 127/2015, sobre o projeto intitulado “*Identificação Dos Mecanismos De Regulação Das Células Natural Killer Pelo Fator De Transcrição C/EBPG (CCAAT/enhancer binding protein gamma)*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Eduardo Magalhães Rego** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 29 de fevereiro de 2016.

We certify that the protocol nº 127/2015, entitled “*Dentification Of Adjustment Mechanisms Of Natural Killer Cells By Transcription Factor C/EBPG (CCAAT / enhancer binding protein gamma)*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 02/29/2016.

Ribeirão Preto, 29 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro
Vice-Presidente, em exercício, da
CEUA – FMRP – USP

Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – (16)3315-3301

ANEXO B – Artigo submetido à Science Translational Medicine, em análise:

FIGUEIREDO-PONTES et al

Inhibiting natural killer cell activity promotes hematopoietic stem cell function during transplantation

Lorena Lobo de Figueiredo-Pontes^{1,*}, Robert S. Welner^{2,3,*}, Miroslava Kardosova⁴, Izabela Aparecida Lopes¹, Hong Zhang³, Hynek Strnad⁴, Alena Moudra⁵, Anna T. Jonasova⁵, Sanghoon Lee⁶, Daniel G. Tenen^{3,7,**}, and Meritxell Alberich-Jorda^{4,**}

¹Hematology/Oncology Division, Department of Internal Medicine, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14048-900, Brazil

²Hematology/Oncology Department, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA

³Harvard Stem Cell Institute, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

⁴Department of Hemato-oncology, Institute of Molecular Genetics of the Academy of Science of Czech Republic, Prague 142 00, Czech Republic

⁵1st Department of Medicine - Department of Haematology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital, Prague 120 00, Czech Republic

⁶Department of Systems Biology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, USA

⁷Cancer Science Institute, National University of Singapore, Singapore 117599, Singapore

*L.L. Figueiredo-Pontes and R.S. Welner contributed equally to this paper.

**D.G. Tenen and M. Alberich-Jorda contributed equally to this paper.

Corresponding authors:

Daniel G. Tenen Cancer Science Institute (CSI)

National University of Singapore

Centre for Translational Medicine

14 Medical Drive, #12-01 Singapore

11759 Tel: +65-6516-8239

Email: daniel.tenen@nus.edu.sg

Meritxell Alberich-Jorda

Institute of Molecular Genetics of the AS CR

Department of Hemato-oncology

Videnska 1083

142 20 Prague 4

Czech Republic

Tel: +420 241 062 467

E-mail: alberich@img.cas.cz

Correspondence and requests for material should be addressed to M.A-J

APÊNDICE

APÊNDICE A - Curvas de eficiência de oito genes diferencialmente expressos:

Curvas de amplificação, de melting e padrão dos genes *Tnfa* (A), *Tlr4* (B), *Il-10* (C), *Tgfb* (D), *Irak4* (E), *Gmcsf* (F), *Myd88* (G), *Ifng* (H) e *Gapdh* (I).