**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

ADRIANA QUEIROZ ARANTES ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER* NAS
NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS**

RIBEIRÃO PRETO

2017

ADRIANA QUEIROZ ARANTES ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER* NAS
NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS**

Versão corrigida.

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

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

2017

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

Rocha, Adriana Queiroz Arantes

Caracterização do papel das células *Natural Killer* nas neoplasias mieloproliferativas – Ribeirão Preto, 2017.

110f

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. Neoplasias mieloproliferativas. 2. Mutação da JAK2.
3. Células *Natural Killer*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Adriana Queiroz Arantes Rocha

Caracterização do papel das células *Natural Killer* nas neoplasias mieloproliferativas

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: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, fonte de todo amor e criação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à minha orientadora pela oportunidade de trabalho e imenso aprendizado e pela confiança em mim depositada; agradeço a paciência infinita, a tolerância frente às minhas limitações e ao auxílio nos momentos necessários.

À minha família, especialmente à minha mãe Edite, ao meu marido Juliano, ao meu irmão Aurélio, à minha cunhada Lígia, por acreditarem em mim, pelo incentivo a sempre ser melhor, pela compreensão nos dias difíceis e pela colaboração na conclusão deste trabalho. Ele é também fruto de todo o esforço de vocês. Tenho muito a agradecer ao meu querido Juliano por ser sempre companheiro, paciente, educado, compreensivo, e por ter sido elemento ativo e fundamental para a concretização de mais esta etapa. Conseguimos! Ao nosso pequeno Antônio, por alegrar todos os meus dias e preenchê-los de amor e inocência.

Às queridas Cristina e Izabela, que foram minhas mãos e cérebro por inúmeras vezes e dividiram comigo as alegrias e incertezas deste caminho. Compartilho com vocês o resultado deste esforço. Não há como retribuir à altura que merecem!

A todos os meus amigos, por estarem sempre prontos a ouvir e aconselhar.

Aos companheiros e funcionários do laboratório, por toda a orientação e colaboração, pela disposição em ajudar e tentar contribuir na resolução dos nossos problemas.

Aos contratados e docentes, por dedicarem seu tempo ao trabalho e ensino visando o bem dos pacientes, pelas discussões e pelo exemplo.

Aos pacientes, que voluntariamente se dispuseram a colaborar, mesmo nos momentos de maior vulnerabilidade, e por confiarem no trabalho médico e em nossos estudos e pesquisas.

Por fim, e, acima de tudo, à Deus, que me presenteou com o milagre da vida, da saúde, e permitiu que eu chegasse até aqui, me amparando, guiando e fortalecendo em todos os momentos.

RESUMO

Rocha, AQA. Caracterização do papel das células *Natural Killer* nas neoplasias mieloproliferativas. 2017. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

As células Natural Killer (NK), quando estimuladas por meio de seus receptores, rapidamente produzem citocinas e quimiocinas, incluindo IFN γ , TNF α , TGF β , GM-CSF, MIP1 α , MIP1 β , IL-10 e outras, as quais podem afetar a função de outras células hematopoéticas. Considerando as evidências recentes de que as células-tronco hematopoéticas (CTH) respondem diretamente à sinalização de várias citocinas, acreditamos que a produção de citocinas mediada pelas células NK possa regular a função da CTH e que a sua desregulação possa favorecer a transformação maligna. As neoplasias mieloproliferativas (NMP) negativas para o rearranjo t(9;22)/*BCR-ABL1*, incluindo as entidades Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose Primária (MFP), são doenças hematopoéticas originadas de alteração clonal da CTH, e podem servir de modelo para o estudo dessa regulação NK-CTH. Além de mutações que ativam vias de proliferação e sobrevivência celular, como a mutação *JAK2*^{V617F}, presente em mais da metade das NMP, outros mecanismos contribuem para a patogênese e manutenção da doença, tais como mutações adicionais e regulação da hematopoese neoplásica pelo microambiente da medula óssea. Este último inclui não apenas células do estroma, mas também células do sistema imune. Dessa forma, com objetivo de investigar a potencial contribuição das células NK para a patogênese das NMP, caracterizamos células do sangue periférico de pacientes com NMP do Ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, bem como células esplênicas obtidas de animais de um modelo murino condicional *knockin* de expressão heterozigótica da *Jak2*^{V617F} (*Jak2*^{VF}) quanto à frequência, expressão de receptores e função das células NK. Observamos menor porcentagem de células NK e maior expressão do receptor inibitório NKG2A nos animais *Jak2* wt/VF. Pacientes portadores de NMP apresentaram número absoluto de células NK-CD16⁺ reduzido em relação aos controles saudáveis. O número de células NK-CD16⁺ foi menor na MFP em relação aos controles e à TE, particularmente naqueles portadores da mutação *JAK2*^{V617F}. Encontramos menor expressão do receptor de ativação NKG2D nos portadores de PV positivos para a mutação *JAK2*^{V617F}. Houve menor expressão do receptor de ativação NKp46 nos portadores de NMP, particularmente nos portadores da mutação *JAK2*^{V617F}, e nos pacientes com MFP. Observamos também menor expressão do receptor NKG2A nos portadores de TE negativos para a mutação *JAK2*^{V617F}. Em concordância com a redução de células NK, a porcentagem de linfócitos totais mostrou-se reduzida nos pacientes com NMP, particularmente nos portadores de MFP, independentemente da mutação *JAK2*^{V617F}. Encontramos redução percentual e absoluta do subtipo de células NK CD56^{bright}CD16⁻ (cuja

principal função é secretória) nos pacientes com NMP, especialmente na presença da mutação *JAK2*^{V617F}, nos pacientes com PV e MFP, e menor frequência absoluta do subtipo CD56-CD16^{bright} (com função primariamente citotóxica) nos portadores de MFP. Em contraste, não verificamos deficiência citotóxica das células NK dos animais Jak2 wt/VF em relação aos controles Jak2 wt/wt. Adicionalmente, as células NK dos animais Jak2-mutados demonstraram menor capacidade de secreção da citocina MIP-1 α , reconhecida por regular a função de CTH, em relação aos animais controle. Finalmente, houve expressão significativamente aumentada do gene *MyD88* nos animais mutados em relação aos controles, sugerindo que a via de sinalização dos receptores do tipo *Toll* (TLR) pode estar envolvida na regulação NK-CTH nas NMP. Em resumo, detectamos deficiência numérica e funcional de células NK em células primárias murinas e humanas de NMP. Nossos achados sugerem potencial regulação da hematopoese maligna pelas células NK nestas neoplasias e podem contribuir para a identificação de novas estratégias terapêuticas que possam interferir nesta complexa interação.

Palavras-chave: Neoplasias mieloproliferativas. Mutação da JAK2. Células *Natural Killer*.

ABSTRACT

Rocha, AQA. Characterization of the Natural Killer cells role in myeloproliferative neoplasms. 2017. 110f. Dissertação (Master degree in Science). Medical School of Ribeirao Preto, University of São Paulo, Ribeirao Preto, São Paulo, 2017.

Natural Killer (NK) cells, when stimulated by their receptors, rapidly produce cytokines and chemokines, including IFN γ , TNF α , TGF β , GM-CSF, MIP1 α , MIP1 β , IL-10 and others, which may affect the function of other hematopoietic cells. Considering the recent evidence that hematopoietic stem cells (HSC) directly respond to cytokine signaling, we hypothesized that NK cells mediated cytokine production can regulate HSC function and that their dysregulation may favor malignant transformation. BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms (MPN), including Polycythemia Vera (PV), Essential Thrombocythemia (ET) and Primary Myelofibrosis (PMF), are hematopoietic diseases originated from HSC clonal transformation, and thus can serve as a model for studying this NK-HSC regulation. In addition to mutations that activate cell proliferation and survival pathways, such as the *JAK2*^{V617F} mutation, present in more than half of MPN cases, other mechanisms contribute to the pathogenesis and maintenance of the disease, such as additional mutations and regulation of neoplastic hematopoiesis by the bone marrow microenvironment. This latter includes not only stromal cells but also cells of the immune system. Therefore, in order to investigate the potential contribution of NK cells to the pathogenesis of MPN, we characterized the frequency, receptor expression and function of NK cells from patients with MPN from the Clinical Hospital of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, as well as from splenic cells obtained from animals of a conditional knockin murine model of *Jak2*^{V617F} heterozygous expression. Lower percentage of NK cells and higher NKG2A inhibitory receptor expression was observed in *Jak2* wt/VF animals as compared to *Jak2* wt/wt controls. In agreement, patients with MPN presented reduced absolute numbers of NK-CD16⁺ cells when compared to healthy controls. The number of NK-CD16⁺ cells was lower in the PMF than in controls or ET patients, particularly in those bearing the *JAK2*^{V617F} mutation. We found lower expression of the NKG2D activatory receptor in PV patients with the *JAK2*^{V617F} mutation. There was lower expression of the Nkp46 activatory receptor in MPN patients, particularly in those with the *JAK2*^{V617F} mutation, and in PMF patients. We also observed reduced expression of the NKG2A receptor in non-JAK2 mutated ET patients. In agreement with the NK cell reduction, the percentage of total lymphocytes was reduced in patients with MPN, particularly in PMF, regardless of the *JAK2*^{V617F} mutation. We found an absolute decrease of the CD56^{bright}CD16⁻ NK subtype (whose main function is secretory) in patients with MPN, especially when the *JAK2*^{V617F} mutation was present, in patients with PV and PMF. Also, lower absolute frequency of CD56⁻CD16^{bright} NK subtype (primarily cytotoxic) was found in PMF patients. In contrast, we did not find cytotoxic

deficiency in the Jak2 wt/VF NK cells as compared to the Jak2 wt/wt controls. In addition, Jak2-mutated NK cells presented reduced ability of secreting the cytokine MIP-1 α , known to regulate HSC function. Finally, there was significantly increased expression of the *MyD88* gene in the Jak2-mutated animals as compared to controls, suggesting that the *Toll*-like receptors (TLR) signaling pathway may be involved in NK-HSC regulation in MPN. In summary, we detected numerical and functional deficiency of NK cells in murine and human primary cells of MPN. Our findings suggest a potential regulation of malignant hematopoiesis by NK cells in these neoplasms and may contribute to the identification of new therapeutic strategies that may target this complex interaction.

Key-words: Myeloproliferative Neoplasms. JAK2 mutation. Natural Killer cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Função das células NK	16
Figura 2. Subtipos de NK	19
Figura 3. Representação esquemática da geração do modelo transgênico <i>knockin</i> <i>Jak2^{V617F}</i>	40
Figura 4. Ilustração da genotipagem para a presença do alelo <i>Jak2</i> mutado no modelo murino <i>Jak2^{V617F}</i> por meio de PCR de DNA genômico obtido do fragmento da orelha (gel de agarose 2,5%)	42
Figura 5. Ilustração da genotipagem para a presença do alelo <i>vavCre</i> no modelo murino <i>Jak2^{V617F}</i> por meio de PCR de DNA genômico obtido do fragmento da orelha (gel de agarose 2,5%)	42
Figura 6. Comparação fenotípica entre os animais <i>Jak2</i> wt/VF e controle <i>Jak2</i> wt/wt	50
Figura 7. Comparação dos parâmetros hematimétricos dos animais <i>Jak2</i> wt/VF (fenótipo de PV) e animais <i>Jak2</i> wt/wt (controles).....	52
Figura 8. Comparação do peso do baço (g) entre os animais <i>Jak2</i> wt/VF (fenótipo de PV) e animais <i>Jak2</i> wt/wt (controles)	52
Figura 9. Estratégia de imunofenotipagem de células NK murinas	58
Figura 10. Análise da porcentagem e número de esplenócitos e células NK de animais portadores da mutação <i>Jak2^{V617F}</i> e controles	59
Figura 11. Análise da expressão dos receptores de células NK nos animais <i>Jak2</i> wt/wt e <i>Jak2</i> wt/VF	61
Figura 12. Estratégia de imunofenotipagem de células NK humanas.....	62
Figura 13. Análise da porcentagem de linfócitos totais nos pacientes com NMP e controles.....	64
Figura 14. Análise do número absoluto de linfócitos totais nos pacientes com NMP e controles.....	65
Figura 15. Análise do número absoluto de células NK-CD16 ⁺ nos pacientes com NMP e controles.....	67
Figura 16. Análise da porcentagem das células NK-CD16 ⁺ nos pacientes com NMP e controles.....	68
Figura 17. Estratégia de identificação dos subtipos de células NK humanas	69

Figura 18. Análise da porcentagem dos subtipos de células NK nos pacientes com NMP e controles	71
Figura 19. Análise dos valores absolutos dos subtipos de células NK nos pacientes com NMP e controles	72
Figura 20. Análise dos valores percentuais (linha superior) e absolutos (linha inferior) de linfócitos T/NK nos pacientes com NMP (PV, TE e MFP) e controles	73
Figura 21. Análise dos valores percentuais (linha superior) e absolutos (linha inferior) de linfócitos T nos pacientes com NMP (PV, TE e MFP) e controles	74
Figura 22. Análise dos valores percentuais (linha superior) e absolutos (linha inferior) de linfócitos B nos pacientes com NMP (PV, TE e MFP) e controles	75
Figura 23. Estratégia de análise da expressão dos receptores de células NK humanas	76
Figura 24. Análise de expressão do receptor NKG2D em pacientes com NMP e controles	77
Figura 25. Análise de expressão do receptor NKp46 em pacientes com NMP e controles	78
Figura 26. Análise de expressão do receptor NKG2A em pacientes com NMP e controles	79
Figura 27. Análise de expressão do receptor KIR2DL em pacientes com NMP e controles	80
Figura 28. Membranas de nitrocelulose do ensaio de citocinas murinas <i>Mouse Cytokine Array Panel A</i>	81
Figura 29. Média de intensidade relativa de MIP-1 α nas células NK dos animais Jak2 wt/VF e controles	81
Figura 30. Estratégia de <i>gating</i> para a análise funcional das células NK murinas	82
Figura 31. Média de expressão relativa dos genes <i>MyD88</i> , <i>IRAK4</i> , <i>TLR4</i> , <i>TNF-α</i> , <i>IFN-γ</i> e <i>TGF-β</i> em células NK de animais portadores da mutação (Jak2 wt/VF) e controles (Jak2 wt/wt)	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> e sequência dos iniciadores.....	42
Tabela 2 - Programas utilizados para as reações de PCR.....	42
Tabela 3 - Caracterização genotípica, laboratorial e fenotípica no modelo murino Jak2 ^{V617F} (Jak2 wt/VF) e controles (Jak2 wt/wt)	51
Tabela 4 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com NMP incluídos no estudo (2014-2017)	55
Tabela 5 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com NMP do HCFMRP (2014-2017)	56
Tabela 6 - Porcentagem de morte celular específica das células YAC-1 nos animais Jak2 wt/wt e Jak2 wt/VF.....	83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
As células <i>Natural Killer</i>	15
Células NK e imunidade tumoral	21
Células NK e neoplasias hematopoéticas	27
Neoplasias mieloproliferativas associadas à mutação da <i>JAK2^{V617F}</i>	30
NMP e o nicho hematopoético	35
 2 HIPÓTESE/OBJETIVOS.....	 37
 3 MATERIAL E MÉTODOS	 39
3.1 Aspectos éticos da pesquisa	399
3.2 Obtenção do modelo murino transgênico <i>knockin Jak2^{V617F}</i>	39
3.3 Expansão das colônias <i>Jak2^{V617F}</i> e <i>vavCre</i>	41
3.4 Genotipagem do modelo murino transgênico	41
3.5 Obtenção de amostras murinas	433
3.6 Obtenção de amostras humanas	43
3.7 Caracterização imunofenotípica das células NK dos animais <i>Jak2 wt/VF</i>	44
3.8 Caracterização das células NK de pacientes portadores de NMP	45
3.9 Isolamento e cultura de células NK dos animais <i>Jak2 wt/VF</i>	46
3.10 Estudo do perfil de citocinas secretadas pelas células NK murinas	46
3.11 Determinação funcional das células NK murinas	47
3.12 Extração do RNA total	47
3.13 Transcrição em cDNA	48
3.14 PCR em tempo real das células NK murinas	48
3.15 Análise estatística	49
 4 RESULTADOS.....	 50
4.1 Caracterização fenotípica dos animais <i>Jak2 wt/VF</i>	50
4.2 Caracterização clínica e laboratorial dos pacientes portadores de NMP	53
4.3 Caracterização imunofenotípica das células NK dos animais <i>Jak2^{V617F}</i>	57
4.3.1 Análise quantitativa das células NK	57
4.3.2 Análise de expressão de receptores	60

4.4 Caracterização imunofenotípica das células NK dos pacientes portadores de NMP	62
4.4.1 Análise quantitativa das células NK	62
4.4.2 Avaliação da expressão de receptores.....	76
4.5 Análise do perfil de citocinas secretadas por células NK murinas.....	80
4.6 Avaliação funcional das células NK murinas	82
4.7 Análise da expressão gênica das células NK murinas	83
5 DISCUSSÃO	84
6 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS.....	93
ANEXOS	105
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Humanos	105
ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Pacientes).....	106
ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Controles).....	108
ANEXO D - Parecer do Comitê de Ética em Animais.....	110

1 INTRODUÇÃO

As células *Natural Killer*

As células *Natural Killer* (NK) são um dos subtipos de linfócitos, grupo celular heterogêneo que também engloba os linfócitos B e T. As células NK foram originalmente caracterizadas em meados de 1970 quanto à sua capacidade de destruir células tumorais *in vitro* sem requerer uma sensibilização imune prévia do hospedeiro (KIESSLING; KLEIN; WIGZELL, 1975). Pela primeira vez, havia sido descrita a existência, em camundongos normais, de um novo tipo de célula, com características funcionais e de superfície únicas, que demonstravam atividade citolítica rápida e específica contra células murinas de leucemia induzida pelo vírus Moloney (do inglês Moloney Leukemia Virus, MLV) sem requerer a presença de anticorpos. Os pesquisadores utilizaram uma combinação de procedimentos para a remoção dos linfócitos B, T e monócitos da amostra de células esplênicas, de forma que aproximadamente 5% das células restantes do baço murino apresentavam a mesma atividade citolítica e antileucêmica presente na população celular inicial (KIESSLING et al., 1975; KIESSLING; KLEIN; WIGZELL, 1975).

Desde então, muito conhecimento tem sido adquirido sobre a sua origem, diferenciação, repertório de receptores e funções efetoras, bem como sua habilidade em modular respostas imunes adaptativas (COLUCCI; CALIGIURI; DI SANTO, 2003; FARAG; CALIGIURI, 2006; LANIER, 1998; RAULET, 2004). As células NK podem ser definidas como uma linhagem específica de linfócitos que, dispensando mecanismos de imunização ou pré-ativação, 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 (COLUCCI et al., 2003). As células NK em desenvolvimento adquirem um complexo arsenal de receptores de superfície que permite responder a estímulos microbianos, citocinas, sinais de estresse celular e moléculas expressas após a transformação de células-alvo, sendo assim essenciais na defesa do organismo contra doenças infecciosas e câncer (COLUCCI; DI SANTO; LEIBSON, 2002). De forma resumida, estas células apresentam funções efetoras de citotoxicidade e de produção de citocinas, dependentes de um equilíbrio dinâmico entre a expressão de receptores

de ativação e de inibição, bem como de receptores de citocinas (TRINCHIERI, 1989) (Figura 1).

Figura 1. Função das células NK. As células NK em desenvolvimento adquirem um complexo arsenal de receptores de superfície que permite responder a estímulos microbianos, citocinas, sinais de estresse celular e moléculas expressas após a transformação de células-alvo, sendo assim essenciais na defesa do organismo contra doenças infecciosas e câncer. Diferentes receptores de ativação geram sinais positivos, o que é contrabalanceado pela ação dos receptores de inibição, como ilustrado em vermelho pelo receptor para o Complexo de Histocompatibilidade Principal classe I (MHC-I), que exercem a inibição dominante de citotoxicidade e secreção. Uma vez que a soma total dos estímulos de ativação atinge um limiar, a ativação da célula NK pode ser desencadeada. Na ausência de inibição através do MHC-I, as células-alvo que expressam ligantes para receptores de ativação são mortas. Combinações de receptores de coativação sinergizam para induzir uma resposta citotóxica e secretora. A morte da célula-alvo requer sinais para a polarização e degranulação de grânulos líticos. As células NK respondem a vários ativadores solúveis como citocinas e quimiocinas que fornecem sinais para funções como migração e sobrevivência, como a IL-15. Em resposta a fatores solúveis, as células NK secretam IFN- γ , TNF- α , outras citocinas e quimiocinas e podem desenvolver uma resposta transcricional para moléculas pró-inflamatórias e pró-angiogênicas.

Fonte: Adaptado de Long E.O. et al., *Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition*. Annu Rev Immunol. 2013; 31:227-58.

As células NK são derivadas da medula óssea, originadas a partir de um progenitor comum com os linfócitos B e T (KONDO; WEISSMAN; AKASHI, 1997). O

timo fetal e o fígado também contêm progenitores celulares bipotentes T/NK que tem o potencial de se desenvolver em células NK maduras (IKAWA et al., 1999; SANCHEZ, M. J. et al., 1994; SPITS et al., 1998). 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 baço ou 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).

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).

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).

Como agentes primordiais para o sistema de vigilância imune do organismo, as células NK são amplamente distribuídas em todos os tecidos do corpo. Entretanto, ainda não está completamente esclarecido se esta extensa distribuição ocorre em virtude de sua recirculação, da existência de subtipos de células NK com diferentes capacidades de *homing* ou do seu desenvolvimento em múltiplos locais. Na maioria 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).

Do ponto de vista de diferenciação fenotípica, sabe-se que os precursores murinos de células NK (pNK) são caracterizados pela expressão de CD122 e NKG2D e ausência de outros marcadores de maturidade. As células NK imaturas

(iNK) adquirem o antígeno NK1.1 (apenas nas linhagens C57BL/6) e CD94, que permanecem até a maturidade. A expressão dos receptores Ly49 e CD49b (DX5) é tardia e ocorre nas células NK maduras (mNK). CD11b e CD43 também são expressos no decorrer do processo de maturação embora as funções efetoras não dependam diretamente da expressão destes marcadores (DI SANTO, 2006).

As células NK humanas constituem aproximadamente 10% dos linfócitos do sangue periférico e são caracterizadas pela ausência de expressão de CD3 e expressão de CD56 e/ou CD16, podendo ser categorizadas em cinco populações: (1) $CD56^{bright}CD16^{-}$: apresentam CD56 de alta expressão ($CD56^{bright}$) e ausência de expressão de CD16 ($CD16^{-}$), correspondem a 50 a 70% das células $CD56^{bright}$; (2) $CD56^{bright}CD16^{dim}$: apresentam CD56 de alta expressão ($CD56^{bright}$) e CD16 de baixa expressão de CD16 ($CD16^{dim}$), correspondem a 30 a 50% das células $CD56^{bright}$; (3) $CD56^{dim}CD16^{-}$: apresentam apenas CD56 de baixa expressão ($CD56^{dim}$); (4) $CD56^{dim}CD16^{bright}$: apresentam baixa expressão de CD56 ($CD56^{dim}$) e alta expressão de CD16 ($CD16^{bright}$) e (5) $CD56^{-}CD16^{bright}$: apresentam apenas CD16 de alta expressão ($CD16^{bright}$) (POLI et al., 2009). Cerca de 90% das células NK do sangue periférico e baço são $CD56^{dim}CD16^{bright}$, expressam perforina, granzima e grânulos citolíticos e apresentam marcante função citotóxica. A elevada expressão de receptores Fc de baixa afinidade para IgG (FcγRIII, também conhecido como CD16) permite a essas células reconhecer células-alvo recobertas por anticorpos para realizar citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Em contraste, as células NK de tecidos linfonodais e tonsilas são $CD56^{bright}CD16^{-}$, não expressam perforina e apresentam predominantemente propriedades imunorregulatórias mediadas por uma potente capacidade de produção de citocinas em resposta à estimulação por IL-12, IL-15 e IL-18. As principais citocinas produzidas são IFN γ , TNF α , GM-CSF, IL-10 e IL-13 (Figura 2). Em indivíduos saudáveis, as populações $CD56^{dim}CD16^{-}$ e $CD56^{-}CD16^{bright}$ são minoria (DI SANTO, 2006; POLI et al., 2009; VIVIER et al., 2008).

Figura 2. Subtipos de células NK. As células NK humanas constituem aproximadamente 10% dos linfócitos do sangue periférico e são caracterizadas pela ausência de expressão de CD3 e expressão de CD56 e/ou CD16, podendo ser categorizadas principalmente em duas populações funcionalmente distintas: CD56^{bright} (com alta expressão do CD56) e CD56^{dim} (com expressão reduzida do CD56). As células CD56^{dim} representam pelo menos 90% das células NK do sangue periférico, enquanto um máximo de 10% são células CD56^{bright}. As células CD56^{bright} apresentam expressão reduzida ou ausente de CD16, sendo dessa forma células CD16^{dim} ou negativo. Por outro lado, as células CD56^{dim} apresentam alta expressão de CD16 e são células CD16^{bright}. Os subtipos de células NK CD56^{bright} e CD56^{dim} exibem diferentes perfis de receptores e funções imunes inatas, muitos deles esquematizados nesta figura. As células NK CD56^{bright} produzem citocinas imunorreguladoras abundantes, tais como IFN- γ , IL-10, TNF- α , TNF- β e GM-CSF, mas são mediadores menos efetivos da citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) e citotoxicidade natural. Em contraste, as células NK CD56^{dim} produzem baixos níveis de citocinas derivadas de células NK e são mediadores potentes da citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) e citotoxicidade natural. As células NK CD56^{dim} apresentam níveis muito elevados de receptores inibitórios KIR (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor*), enquanto que as células NK CD56^{bright} quiescentes possuem alta expressão do receptor inibitório CD94/NKG2A. As duas funções (citotóxica e secretora), ambas mediadas pela ativação de receptores por seus ligantes, fazem das células NK importantes componentes da hematopoese, capazes de eliminar alvos susceptíveis por meio de múltiplos mecanismos bem como recrutar outras células e amplificar a resposta inflamatória. Diante da compatibilidade entre as células-alvo e células NK efectoras, os efeitos mediados por citocinas se sobressaem, enquanto que, na presença de incompatibilidade, os efeitos citotóxicos preponderam.

Fonte: Adaptado de Cooper M.A. et al., *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56^{bright} subset*. Blood 2001 May 15; 97(10):3146-51.

À medida que avançam na sua maturação, as células NK adquirem um repertório de receptores que permite reagir frente aos mais variados estímulos. Os receptores ativatórios NK detectam 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).

Portanto, 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 *self*-ligantes 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 ideia 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 positivos, 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).

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 (LIEBERMAN, 2010). Além dos receptores de autorreconhecimento celular, 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 IL18, 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.

Além da função citolítica, não menos importante é a função das células NK em produzir citocinas, incluindo IFN γ , TNF α , TGF β , GM-CSF, MIP1 α , MIP1 β , IL-10 e outras; a secreção de citocinas influencia as respostas imunes adaptativas através da modulação do crescimento e diferenciação de outras células hematopoéticas

incluindo linfócitos T maduros, monócitos, células dendríticas e granulócitos (BIRON et al., 1999; MISAWA et al., 2003; ORR; LANIER, 2010; RAULET, 2004). As duas funções (citotóxica e secretora), ambas mediadas pela ativação de receptores por seus ligantes, fazem das células NK importantes componentes da hematopoese, capazes de eliminar alvos susceptíveis por meio de múltiplos mecanismos bem como recrutar outras células e amplificar a resposta inflamatória. Diante de incompatibilidade entre as células-alvo e células NK efetoras, os efeitos citotóxicos preponderam; enquanto que, 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; entretanto, a capacidade das células NK em regular as funções das células progenitoras hematopoéticas ainda não foi explorada.

Células NK e imunidade tumoral

Sabe-se, de longa data, 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, A. 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. Entretanto, as células tumorais desenvolvem variadas estratégias na tentativa de superar a ação antitumoral do sistema imune (LOPEZ-SOTO et al., 2015). Um destes mecanismos de evasão das células tumorais à imunidade NKG2D-mediada é impedir a expressão dos ligantes deste receptor pelas células tumorais. Isso ocorre quando há uma exposição crônica do receptor NKG2D a membranas que expressam seus ligantes, como ocorre no câncer, levando a uma redução da atividade citotóxica NKG2D-mediada e, consequentemente, à susceptibilidade aumentada à tumorigênese (OPPENHEIM et al., 2005). Outros mecanismos seriam a atividade estimulatória dos ligantes NKG2D para o metabolismo oncogênico, proliferação e disseminação metastática (EL-GAZZAR et al., 2014) e, ainda, a secreção de formas-livres dos ligantes NKG2D

pelas células neoplásicas, levando à redução da expressão dos receptores NKG2D pelas células NK (LOPEZ-SOTO et al., 2015).

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).

Até o momento, a maioria dos estudos referentes aos mecanismos de imunovigilância do câncer mediados pelas células NK foi realizada em tumores sólidos, demonstrando a capacidade das células NK em eliminar diferentes linhagens de células tumorais humanas e murinas *in vitro*, bem como células tumorais humanas primárias. Vários estudos experimentais em modelos murinos demonstraram o papel das células NK em erradicar linhagens celulares tumorais enxertadas *in vivo*; elas têm sido envolvidas na erradicação de tumores desenvolvidos espontaneamente e ainda induzidos experimentalmente em camundongos (HAYAKAWA; SMYTH, 2006; WU; LANIER, 2003). É interessante notar que as células NK parecem ser particularmente eficientes em eliminar células metastáticas e pequenos enxertos tumorais, enquanto que grandes tumores sólidos geralmente não são erradicados facilmente (FEHNIGER; COOPER; CALIGIURI, 2002). Entretanto, quando as células NK são geneticamente modificadas com superexpressão de IL-15, tornam-se mais densamente granulares e secretoras de perforina, sendo capazes de eliminar tumores sólidos maiores que 1 cm em animais transgênicos deficientes de linfócitos B e T (LIU et al., 2012). Células NK humanas transferidas a modelos murinos também se mostraram envolvidas na rejeição de tumores humanos enxertados. Além disso, existe uma correlação entre o aumento da função das células NK e a resposta antitumoral em indivíduos tratados com interleucina-2, citocina que induz a proliferação e ativação destas células (FEHNIGER et al., 2002).

Dentre os principais mecanismos de ação antitumoral das células NK, podemos citar a regulação de citotoxicidade mediada pelo receptor NKG2D, expresso não apenas por células NK, mas também por células NKT, linfócitos T CD4 e CD8 ativados e $\gamma\delta$. Além do papel estabelecido de aumento da secreção de

ligantes do NKG2D por linhagens tumorais, este receptor foi mais recentemente implicado também no controle da indução de tumores espontâneos. Camundongos transgênicos deficientes para este receptor (*Klrk1*^{-/-}), embora tenham células NK, NKT e T em número normal, apresentam maior incidência de adenocarcinoma prostático quando esta linhagem foi cruzada com animais transgênicos TRAMP (do inglês, *Transgenic Model of Autochthonous Prostate Cancer*, modelo murino de câncer de próstata que mimetiza a doença humana descrito por Kaplan-Lefko e colaboradores em 2003). Não obstante, o cruzamento dos animais *Klrk1*^{-/-} com animais transgênicos Eμ-myc (modelo de Linfoma B, descrito por Adams e colaboradores em 1985), resultou em aceleração da progressão dos linfomas na progênie duplo transgênica em relação aos controles (GUERRA et al., 2008). Um outro exemplo desta regulação envolve os receptores da família Ly49, que reconhecem a perda do MHC classe I, e cuja expressão atenuada em animais geneticamente modificados leva a um acentuado crescimento tumoral e ao desenvolvimento de metástases de vários modelos de tumores sólidos (TU et al., 2014).

Não apenas o papel dos receptores de superfície das células NK 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. 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, moléculas imunossupressoras como TGFβ1, interleucinas e

polipeptídeos solúveis do complexo MHC classe I. Mais recentemente, descreveu-se em câncer de mama que as células neoplásicas podem influenciar a maturação terminal das células NK com maior número de células não citotóxicas, tanto no sangue periférico como na lesão neoplásica, de pacientes em relação aos controles. Estes são os mecanismos frequentemente observados em neoplasias sólidas, que parecem adquirir um estado de tolerância imunológica por meio de estratégias de produção de uma grande variedade de moléculas inibitórias ou se tornando “invisíveis” às células NK (FLAVELL et al., 2010; MAMESSIER; BOURGIN; OLIVE, 2013; MAMESSIER et al., 2011; PLATONOVA et al., 2011).

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 , 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).

Diante do fato de que células NK podem ter como alvo células tumorais humanas, várias estratégias para o seu uso terapêutico tem sido propostas e, mais recentemente, pesquisadas em estudos clínicos (LJUNGGREN; MALMBERG, 2007). Tais estratégias consistem em:

a) ativação de células NK endógenas – estudos avaliam os efeitos da administração de citocinas (como IL-2 e IL-21), fatores de crescimento e ainda ativadores do sistema imune utilizados no tratamento do câncer (como talidomida, lenalidomida, BCG e complexos imunoestimulatórios de DNA) na ativação e expansão das células NK (BRANDAU et al., 2001; COLOMBO; TRINCHIERI, 2002; FARAG; CALIGIURI, 2006; FUJII et al., 2007; HAYASHI et al., 2005; LINK et al., 2006; ROSENBERG, 2000);

b) atividade das células NK no TMO alogênico – estratégia de tratamento para várias malignidades hematológicas, o TMO alogênico pode ser visto como uma forma de imunoterapia, exercendo seu efeito não apenas pela intensa quimioterapia prévia ao transplante, mas ainda pela introdução de um sistema imune doador competente que é capaz de realizar um efeito enxerto *versus* tumor (LJUNGGREN; MALMBERG, 2007);

c) infusão de linfócitos do doador baseada em células NK – no caso de recaídas após o TMO alogênico, a infusão de linfócitos do doador pode ser capaz de induzir um potente efeito enxerto *versus* tumor (EVT) (LJUNGGREN; MALMBERG, 2007);

d) imunoterapia com células NK adotivas – estudos sugerem que células NK haploidênticas podem persistir e se expandir *in vivo*, tendo um papel importante no tratamento de certas malignidades, podendo ser utilizadas isoladamente ou em associação com TMO. Transferências de células NK adotivas (NKG2), que expressam vários receptores ativatórios e não expressam receptores KIR, tem mostrado citotoxicidade significativa contra várias linhagens de células tumorais (LJUNGGREN; MALMBERG, 2007; MILLER et al., 2005).

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.

Células NK e neoplasias hematopoéticas

Conforme descrito acima, a maioria dos estudos acerca da imunogenicidade antitumoral das células NK foi realizada em neoplasias sólidas. As primeiras evidências do papel das células NK no controle de neoplasias hematopoéticas se deram com os estudos de transplante de células tronco hematopoéticas (CTH), que se baseia na ablação de uma medula óssea neoplásica (como no caso das leucemias agudas e doenças mieloproliferativas) e substituição da hematopoese a partir de uma fonte alogênica de CTH normais. Tal procedimento tem o potencial de curar a leucemia, em parte pela presença de células imunes do enxerto (como linfócitos T e células NK) e/ou desenvolvidas a partir das células tronco enxertadas, mediando o chamado efeito enxerto *versus* leucemia ou *GvL* (do inglês, *graft versus leukemia*), que elimina as células residuais leucêmicas. O papel das células NK em proteger contra a leucemia tem sido inferido de análises retrospectivas de dados de pacientes que receberam transplantes de medula óssea, nos quais parece haver redução de recaída e maior sobrevida livre de doença naqueles que receberam transplante não relacionado ou HLA parcialmente incompatível quando se compara ao grupo de transplantados com medula óssea HLA compatível. Este efeito protetor tem sido atribuído à alorreatividade das células NK mediada pela ausência do KIR-ligante no receptor (incompatibilidade KIR-ligante ou perda de autorreconhecimento) (RUGGERI et al., 1999). Em contrapartida, outros estudos não apontam benefícios para a compatibilidade HLA-NK mediada pelo receptor KIR ou relatam pior evolução para os transplantes com HLA parcialmente incompatíveis (BRUNSTEIN et al., 2009; DAVIES et al., 2002). As razões que poderiam justificar essas diferenças incluem a metodologia utilizada para se determinar a incompatibilidade do ligante KIR, o tipo de doador e a grande heterogeneidade de regimes de condicionamento e malignidades hematológicas incluídas nas análises. É plausível que o papel das células NK seja distinto a depender da doença em questão e que, além da compatibilidade HLA, o microambiente alterado de cada neoplasia e a produção de

citocinas pelas células NK tenham influência sobre a efetividade antineoplásica destas células.

Apenas mais recentemente tem sido estudado o papel das células NK no controle direto de alguns tipos de neoplasias hematopoéticas como, por exemplo, as neoplasias mieloproliferativas, nas quais há uma expansão do componente mieloide da medula óssea e sangue periférico e aparente preservação do componente hematopoético linfóide. Nestas, a célula neoplásica iniciadora se trata da célula-tronco hematopoética, que adquire vantagem de sobrevivência e autorrenovação sobre as CTH normais.

Na Leucemia Mieloide Crônica (LMC), neoplasia mieloproliferativa portadora do rearranjo t(9;22)/BCR-ABL1, demonstrou-se que células NK alogênicas são capazes de lisar *in vitro*, pelo menos parcialmente, células progenitoras CD34 positivas de pacientes. Além disso, células autólogas NK são capazes de suprimir o crescimento de progenitores hematopoéticos *in vitro* de forma independente da incompatibilidade entre ligantes das células-alvo e receptores NK, sugerindo que mecanismos independentes da função de autorreconhecimento podem resultar em controle da CTH neoplásica (CERVANTES et al., 1996; YONG et al., 2009). Ainda, por meio de um modelo de transplante de precursores primários da medula óssea que expressam o oncogene *BCR-ABL1* em receptores murinos letalmente irradiados, simulando situações de identidade ou incompatibilidade pelo complexo MHC classe I, foi demonstrado que a perda de autorreconhecimento mediada por células NK pode eliminar as células iniciadoras da leucemia, apontando a efetividade anti-tumoral das células NK como potencial estratégia terapêutica para a cura da LMC (KIJIMA; GARDIOL; HELD, 2011). Chen *et al.* relataram ainda que o número e função das células NK de pacientes com LMC virgens de tratamento estão reduzidos, e que estas alterações persistem a despeito do tratamento com o inibidor de tirosina quinase (CHEN et al., 2012). Uma indicação adicional do papel protetor das células NK neste contexto consiste na observação de que a recuperação precoce das células NK foi capaz de prever resultados clínicos positivos em pacientes com LMC submetidos a transplante singênico de medula óssea com depleção de células T (SAVANI et al., 2006). Finalmente, as inter-relações entre as células NK e outras células do sistema imune, como as células dendríticas, podem potencializar as respostas imunes adaptativas contra a LMC (DEGLI-ESPOSTI; SMYTH, 2005; WALZER et al., 2005).

Mais recentemente, estudos foram desenvolvidos com pacientes portadores de LMC em remissão em que houve a proposta de suspensão do tratamento com inibidores de tirosino-quinase. Portadores de LMC com resposta molecular duradoura durante o tratamento com imatinibe e livres de recaída molecular, após a descontinuação deste tratamento, apresentaram número mais elevado de células NK circulantes do que aqueles com recaída e, ainda, maior quantidade de células NK CD56^{dim} (maior atividade citotóxica) no momento da descontinuação do imatinibe foi associada a maior sucesso na descontinuação do tratamento (REA et al., 2017). Nesta mesma linha de estudos, em pacientes com LMC que receberam dasatinibe como tratamento (excluindo-se os pacientes com resistência prévia ao imatinibe) e que apresentaram níveis aumentados de células NK, a interrupção do tratamento foi considerada uma opção segura em casos de resposta molecular maior por pelo menos 1 ano (IMAGAWA et al., 2015). Estes dados sugerem que as células NK sejam importantes na prevenção da recaída da LMC por exercer ação contra as células leucêmicas residuais após a descontinuação do tratamento.

Embora na LMC os estudos citados sugiram um papel relevante para a imunidade antileucêmica mediada pelas células NK, pouco se sabe a respeito da importância destas células na origem e progressão das neoplasias mieloproliferativas (NMP) negativas para o rearranjo t(9;22)/BCR-ABL1. Um estudo antigo sugeriu que pacientes com doenças mieloproliferativas negativas para o cromossomo Philadelphia (Ph-negativas) frequentemente tem menor atividade de células NK *in vitro*, não somente naqueles tratados com agentes citorreduzores, mas também nos pacientes não tratados ou que realizavam apenas flebotomia. O defeito da célula NK neste estudo parecia ser intrínseco, pois o número de células B mostrou-se similar ao dos controles e não houve aumento da atividade das células NK quando submetidas à ação de INF- α ou IL-2. Entretanto, não foi possível concluir se a disfunção NK era realmente inerente à doença ou se a terapia citorrredutora com hidroxiuréia ou ³²P tinha influência sobre os achados, nem tampouco investigou possíveis mecanismos envolvidos (FROOM et al., 1989).

Posteriormente, outras pesquisas se dedicaram a este assunto. Nas NMP BCR/ABL1 negativas foi observada menor porcentagem de células NK CD16⁺ em portadores de Mielofibrose Primária (MFP) e porcentagem aumentada na Policitemia Vera (PV) quando comparados a controles saudáveis; a atividade citotóxica das células NK encontrava-se reduzida nas NMP, mais acentuadamente na MFP, e o

tratamento das células NK de pacientes portadores de PV e Trombocitemia Essencial (TE) (mas não de MFP) com INF α e IL-2 aumentou a citotoxicidade das células NK contra células K562 (GERSUK et al., 1993).

Em estudo mais recente, em que foram incluídos apenas indivíduos portadores de PV, observou-se aumento nos valores percentuais de células NK, mas com valores absolutos semelhantes; não houve diferença de expressão dos receptores de ativação e de inibição das células NK nem tampouco de citotoxicidade; o número absoluto de linfócitos totais foi semelhante entre os dois grupos, mas houve redução dos valores percentuais e absolutos dos linfócitos B e T (SANCHEZ, C.; BAIER; et al., 2015; SANCHEZ, C.; LE TREUT; et al., 2015). Este estudo demonstrou ainda presença de mutação $JAK2^{V617F}$ em linfócitos em todos os portadores de PV, conforme observações prévias (DELHOMMEAU et al., 2007; LARSEN et al., 2007). De outra forma, resultados conflitantes evidenciaram níveis reduzidos de células NK em portadores de NMP virgens de tratamento (RILEY et al., 2015). Por fim, Schönberg e colaboradores (2015) demonstraram atividade citotóxica reduzida das células NK em pacientes com NMP se comparados a indivíduos saudáveis. O tratamento com ruxolitinibe levou a uma redução da expressão de receptores de ativação NKp46 e NKG2D se comparados aos controles pareados por idade (SCHONBERG et al., 2015).

Dessa forma, embora alguns estudos tenham analisado anormalidades de expressão fenotípica e capacidade funcional das células NK nas NMP, os dados ainda não são uniformes e carecem de melhor elucidação. A continuidade dos esforços nessa área de pesquisa permitirá que novos conhecimentos sejam alcançados.

Neoplasias mieloproliferativas associadas à mutação da $JAK2^{V617F}$

As NMP são doenças clonais derivadas das CTH e compreendem principalmente as seguintes entidades negativas para o rearranjo t(9;22)/BCR-ABL1: Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária. As NMP são caracterizadas pela proliferação dos precursores mieloides da medula óssea com consequente aumento na produção de pelo menos uma das linhagens celulares maduras no sangue periférico. A incidência das NMP não é bem estabelecida, mas estima-se que seja de aproximadamente 2,6 casos por 100.000 habitantes/ano.

Clinicamente, essas doenças apresentam mimetismo fenotípico expressando variados graus de eritrocitose, trombocitose, leucocitose, hematopoese extramedular, trombose e hemorragia. Embora apresentem uma história natural de doença estimada em anos, um cenário de mieloproliferação benigna pode mascarar clones de células-tronco neoplásicas capazes de expansão e transformação para formas mais agressivas de insuficiência de medula óssea ou leucemia aguda, ainda que em frequências variadas de acordo com cada um destes distúrbios (ROLLISON et al., 2008; SPIVAK, 2017; VARDIMAN et al., 2009; TITMARSH et al., 2014).

A Policitemia Vera é caracterizada pela eritrocitose absoluta patológica, ou seja, pelo aumento das células de origem eritroide no sangue periférico, de origem primária, independente dos mecanismos regulatórios normais da eritropoese. Os pacientes podem apresentar ainda neutrofilia e leucocitose. É fundamental para o diagnóstico a presença de hipercelularidade na medula óssea, representada pelo aumento das três séries hematopoéticas, fenômeno conhecido como panmielose. A fisiopatologia da doença envolve a ocorrência da mutação da tirosino-quinase Janus-Kinase 2 (mutação $JAK2^{V617F}$ no éxon 14 da JAK2) em cerca de 96% dos casos. Mutações no éxon 12 da JAK2 podem ocorrer em cerca de 3% dos casos de PV e, muito raramente, pode-se encontrar pacientes com PV sem nenhuma destas mutações. Apresenta incidência estimada em 0,8 casos/100.000 habitantes/ano e idade de acometimento entre 50 e 60 anos. A doença é de evolução caracteristicamente insidiosa e grande parte dos pacientes não apresenta sintomas; o diagnóstico pode ser suspeitado em exames (hemograma) ou consulta médica de rotina (se houver presença de pletora e/ou esplenomegalia); não raro, o diagnóstico é feito após a ocorrência de uma das principais complicações da doença, os eventos tromboembólicos arteriais ou venosos. Uma minoria dos pacientes pode apresentar evolução clonal, desenvolvendo complicações tardias mais graves como mielofibrose pós-policitêmica, síndrome mielodisplásica ou leucemia mieloide aguda (aproximadamente 3%) (VARDIMAN et al., 2009; TITMARSH et al., 2014).

A Trombocitemia Essencial é um subtipo de NMP que envolve primariamente os precursores megacariocíticos, que se apresentam morfológicamente maduros e grandes na medula óssea. Dessa forma, a alteração predominante e essencial no sangue periférico é a trombocitose sustentada acima de 450.000, descartadas as causas secundárias. Aproximadamente metade dos pacientes apresenta pesquisa da mutação $JAK2^{V617F}$ positiva. Os portadores de TE podem ser assintomáticos e a

principal complicação relacionada à doença é a ocorrência de eventos tromboembólicos arteriais ou venosos (VARDIMAN et al., 2009; TITMARSH et al., 2014).

A Mielofibrose Primária é caracterizada pela proliferação predominante de megacariócitos e granulócitos, podendo ou não estar associada à deposição reacional de tecido conjuntivo fibroso na medula óssea e hematopoese extramedular. A fase mais inicial, chamada de pré-fibrótica, apresenta medula óssea hipercelular e fibrose reticulínica mínima ou ausente; os megacariócitos são tipicamente anormais e sua histotopografia e morfologia são pontos fundamentais para o diagnóstico da MFP pré-fibrótica; gradualmente, ocorre evolução para a fase fibrótica com presença marcante de fibrose reticulínica medular e, frequentemente, osteoesclerose. A fase fibrótica é caracterizada por leucoeritroblastose e dacriócitos (hemácias em forma de gota) no sangue periférico, hepatomegalia e esplenomegalia. A MFP apresenta incidência estimada de 0,5 a 1,5 casos por 100.000 habitantes/ano e ocorre mais frequentemente entre a sexta e sétima décadas de vida, afetando igualmente ambos os sexos. Até 30% dos pacientes podem se apresentar assintomáticos ao diagnóstico. As manifestações clínicas mais frequentes incluem anemia, leucocitose e/ou trombocitose, fadiga, perda ponderal, sudorese noturna, dispnéia e febre baixa. Aproximadamente 50 a 60% dos pacientes apresentam a mutação *JAK2*^{V617F}. A sobrevida dos pacientes com MFP varia de meses a décadas; o prognóstico depende do estágio em que a doença é diagnosticada e da presença de determinados fatores, como por exemplo idade superior a 65 anos, níveis de hemoglobina inferiores a 10 g/dL, contagem de leucócitos acima de $25 \times 10^9/L$, contagem de plaquetas inferior a $100 \times 10^9/L$, presença de blastos no sangue periférico, necessidade transfusional e anormalidades cariotípicas. As principais causas de morbidade e mortalidade relacionadas à MFP são infecções e hemorragias secundárias à falência medular, eventos tromboembólicos, hipertensão portal, insuficiência cardíaca e leucemia aguda, esta última com incidência de até 30% (VARDIMAN et al., 2009; TITMARSH et al., 2014).

Mutações patogênicas foram identificadas em mais de 90% dos pacientes com NMP; 50 a 60% deles apresentam uma das principais mutações, conhecidas como “*driver mutations*”, as quais são determinadoras do fenótipo: *JAK2*^{V617F}, *CALR* (calreticulina) e *MPL* (receptor da trombopoetina) (VAKIL; TEFFERI, 2011). A

mutação $JAK2^{V617F}$ é a principal mutação caracterizada nas NMP negativas para o rearranjo t(9;22)/BCR-ABL1. Consiste em uma mutação de ponto no domínio regulatório da proteína Janus Kinase 2 (JAK2), com a substituição de uma guanina por uma timidina que resulta na substituição de uma valina por uma fenilalanina na posição 617. A prevalência estimada é maior que 96% na PV e 50% na TE e MFP e seu valor como um marcador diagnóstico é reforçado por sua baixa prevalência em outras patologias hematológicas (CAMPBELL et al., 2005; JAMES et al., 2006; TEFFERI et al., 2005; VAKIL; TEFFERI, 2011).

A JAK2 é uma tirosino-quinase citoplasmática amplamente expressa, que tem papel fundamental na transdução de sinais de múltiplos receptores para fatores de crescimento. A mutação $JAK2^{V617F}$, uma mutação ativadora, é plenamente consistente com a hipersensibilidade aos fatores de crescimento expressa pelos progenitores hematopoéticos dos pacientes com NMP (BAXTER et al., 2005). Durante a eritropoese, um dos principais alvos da JAK2 é STAT5, um transdutor de sinais e ativador da transcrição. Depois da fosforilação pela JAK2, STAT5 se dimeriza e se transloca para o núcleo, regulando a transcrição de genes-alvo implicados na proliferação e sobrevivência celular, dentre os quais encontra-se a proteína antiapoptótica Bcl-xL (GARCON et al., 2006; SOCOLOVSKY et al., 1999).

Estudos ofereceram evidências de que a mutação $JAK2^{V617F}$ na PV e MFP apresenta-se na célula tronco/progenitora linfomieloide e que o fenótipo da doença é relacionado provavelmente à vantagem proliferativa ofertada principalmente às células mieloides, levando então a uma desordem mieloproliferativa pura, e não linfoproliferativa (DELHOMMEAU et al., 2007; ZHAO et al., 2005). A mutação $JAK2^{V617F}$ foi ainda documentada em linfócitos B, T e células NK de pacientes com NMP (BOGANI et al., 2007; LARSEN et al., 2007).

O tratamento convencional das NMP (PV, TE e MFP) até o momento não é curativo nem é capaz de prolongar a sobrevida ou prevenir a progressão da doença (FRUCHTMAN et al., 1997; TEFFERI, 2016). Dessa forma, a descoberta da mutação $JAK2^{V617F}$ contribuiu para o desenvolvimento de drogas inibidoras da JAK2, vindo de encontro à necessidade de novas escolhas terapêuticas para as NMP, em especial para a MFP.

O inibidor de JAK 1/2 ruxolitinibe foi o primeiro a ser avaliado em estudos clínicos para NMP (estudo fase I em pacientes com MFP teve início em 2007) e, ainda, o primeiro a ser aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso

na MFP de risco alto e intermediário (2011) (TEFFERI, 2012). Esta droga foi aprovada recentemente para o uso em pacientes portadores de PV intolerantes ou resistentes à hidroxiuréia (VANNUCCHI et al., 2015). Nestes estudos foi demonstrada a superioridade do ruxolitinibe em relação à terapia padrão na redução do volume esplênico e na melhora dos sintomas constitucionais associados à PV e à MFP. Entretanto, a droga não demonstrou ser capaz de modificar a história natural da doença (como redução da fibrose medular ou indução de remissão parcial ou completa) e seus efeitos colaterais a curto e longo prazo (relacionados à mielossupressão) podem limitar o seu uso (HEINE; BROSSART; WOLF, 2013; TEFFERI, 2012; TEFFERI; BARBUI, 2015).

Os achados dos estudos clínicos são consistentes com dados obtidos em um modelo murino de mutação da JAK2, no qual a inibição da JAK2 falhou em eliminar a população de células-tronco iniciadoras das NMP. Nesse modelo, por meio de transplante seriado de CTH ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{ckit}^{\text{hi}}$, LSKs) proveniente de animais portadores da mutação *Jak2*^{V617F} e tratados por seis semanas com um inibidor seletivo da JAK2, em receptores secundários letalmente irradiados, observou-se reconstituição hematopoética completa com elevação do hematócrito três semanas após injeção das LSKs dos animais primários (JAMIESON et al., 2006; MULLALLY et al., 2010).

O achado de que a inibição da JAK2 não é suficiente para curar a doença, reforça que outros mecanismos estejam envolvidos na fisiopatologia das NMP. De fato, a mutação não está presente em todos os pacientes e outras mutações, concomitantes ou não à mutação *JAK2*^{V617F} já foram descritas em até 20% dos pacientes, tais como mutações do *MPL* (em 3% das TE e 10% das MFP), *LNK* (em menos de 1% das PV, TE ou MFP), *TET2* (em aproximadamente 5% das TE e 15-20% das PV ou MFP), *ASXL1* (em 5% das TE e 20% das MFP), *IDH1/IDH2* (em menos de 3% das PV ou TE), *EZH2* (em aproximadamente 7% das MFP e 3% das PV), *DNMT3A* (em 7% das PV ou MFP), *CBL* (em menos de 1% das PV, TE ou MFP), *TP53* (em menos de 5% das MFP), *SF3B1* (em cerca de 7% das MFP) (JAMIESON, et al., 2006). Adicionalmente, em dezembro de 2013, dois grupos descreveram uma mutação dos genes da calreticulina (*CALR*) em pacientes que não apresentavam as mutações *JAK2*^{V617F} ou *MPL*, numa frequência aproximada de 67% das TE e 88% das MFP negativas para as referidas mutações (KLAMPFL et al., 2013; NANGALIA et al., 2013; TEFFERI, 2012). Nenhuma dessas mutações

adicionais consiste em alvo terapêutico específico para este grupo de doenças e, assim, a busca por mais conhecimento sobre a fisiopatologia da doença deve ser incentivada.

NMP e o nicho hematopoético

As propriedades de quiescência, autorrenovação e determinação da diferenciação das CTH, células multipotentes primitivas, dependem da sua estreita relação com o microambiente da medula óssea, múltiplos componentes celulares e da matriz óssea, moléculas de adesão, quimiocinas e seus receptores, bem como fatores solúveis e ligados às membranas presentes no estroma medular (SEKE ET ET ET et al., 2013; SCHEPERS; CAMPBELL; PASSEGUÉ, 2015). Estes constituintes não estão distribuídos de forma homogênea no espaço medular, mas se encontram localizados preferencialmente em áreas de osso trabecular denominadas “nichos”.

O nicho medular é atualmente reconhecido como uma complexa estrutura composta por diferentes tipos celulares, tais como células estromais mesenquimais multipotentes, células endoteliais vasculares, megacariócitos, células da linhagem osteoblástica, neurônios simpáticos, células de Schwann, monócitos e macrófagos (SCHMITT-GRAEFF; NITSCHKE; ZEISER, 2015; MEDYOUF, 2017). Estas células se mostraram capazes de modular a função das CTH e há evidências de que suas funções podem ser afetadas no contexto das malignidades.

Estudos recentes demonstram que tanto as células normais quanto neoplásicas estabelecem uma inter-relação bidirecional de interdependência com as células do nicho circundante. Essas interações celulares possivelmente contribuem para o surgimento de malignidades hematológicas por meio da modulação de importantes mecanismos de segurança relacionados à autorrenovação, proliferação, sobrevivência e evasão imunológica. Os componentes celulares do nicho medular e os meios pelos quais modulam tanto a hematopoese normal quanto a neoplásica tem sido bastante estudados na última década (MEDYOUF, 2017).

Há evidências de que as células estromais da medula óssea de pacientes portadores de NMP não carregam a mutação *JAK2*^{V617F} (BACHER et al., 2010; MERCIER et al., 2009), porém citocinas produzidas por linhagens celulares estromais são capazes de proteger as células hematopoéticas *JAK2* positivas dos efeitos de inibição do crescimento induzidos pela inibição da *JAK2* (MANSHOURI et

al., 2011). Embora relevante, esse efeito do microambiente, sendo pleiotrópico e dependente de várias citocinas (tais como IL-6, FGF, IFN e fatores quimiotáticos), parece ser ainda de difícil manipulação do ponto de vista terapêutico.

Além da desregulação intrínseca das CTH das NMP, sinais externos produzidos por outras células da medula óssea, além das células do nicho, podem contribuir para a propagação das células neoplásicas inicializadoras e, conseqüentemente, para a expansão dos progenitores mieloides-eritroides, favorecendo as manifestações fenotípicas da doença. Conforme previamente mencionado, os efeitos citocina-mediados das células NK podem afetar as CTH normais e, potencialmente, as células neoplásicas inicializadoras das NMP.

2 HIPÓTESE/OBJETIVOS

Até o momento, não se sabe se as células NK das NMP, independente da presença da mutação *JAK2*^{V617F}, contribuem para o fenótipo da doença. É possível que as células NK sejam numérica ou funcionalmente deficientes nas NMP e/ou que as células neoplásicas inicializadoras e os progenitores mielo-eritroides que mantêm a doença sejam resistentes aos efeitos antineoplásicos das células NK. Nossa hipótese é a de que as células NK, por meio da produção de citocinas e quimiocinas, participem da regulação da função das CTH e que o desbalanço desse equilíbrio predisponha à iniciação e/ou manutenção da neoplasia. Como as NMP *JAK2*^{V617F} positivas resultam de alteração clonal da CTH, podem servir de modelo para o estudo dos mecanismos regulatórios entre células NK e CTH. Diante do exposto, objetivamos:

Objetivo geral:

Caracterizar fenotipicamente e funcionalmente as células NK de animais portadores da mutação *Jak2*^{V617F} bem como de pacientes portadores de NMP e seus respectivos controles.

Objetivos específicos:

a) avaliar quantitativamente as células NK dos animais portadores da mutação *Jak2*^{V617F} bem como dos pacientes com NMP, portadores ou não da mutação *JAK2*, em comparação aos controles, por meio da técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo;

b) avaliar a expressão de receptores de ativação e inibição nas células NK dos animais portadores da mutação *Jak2*^{V617F} bem como dos pacientes que apresentam NMP, com ou sem a presença da mutação *JAK2*^{V617F}, em comparação aos controles, por meio da técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo; os receptores murinos avaliados foram NKG2D, Ly49H, Ly49D e NKG2A; os receptores humanos avaliados foram NKG2D, NKp46, NKG2A e KIR2DL;

c) avaliar o perfil de citocinas secretadas pelas células NK do modelo murino Jak2^{V617F} e controles por meio de ensaio de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*);

d) verificar a função das células NK do modelo murino Jak2^{V617F} em relação aos controles através de seu perfil de citotoxicidade utilizando a técnica de citometria de fluxo;

e) analisar a expressão diferencial de genes alvo de interesse para a regulação da função das células NK nas células NK murinas Jak2^{V617F} em relação às células NK de controles por meio da técnica de PCR (do inglês *Protein Chain Reaction*) em tempo real; foi avaliada a expressão dos seguintes genes: *TGF-β*, *TNF-α*, *TLR4*, *IRAK4*, *GM-CSF*, *MyD88* e *IFN-γ*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos da pesquisa

O projeto de pesquisa foi submetido para apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) (Parecer CEP número 1.639.214, ANEXO A) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Parecer CEUA número 070/2015, ANEXO D) e recebeu os pareceres favoráveis.

3.2 Obtenção do modelo murino transgênico *knockin* $Jak2^{V617F}$

Os animais transgênicos para a mutação $Jak2^{V617F}$ foram originalmente descritos por Mullally et al. (*Cancer Cell*, 2010). Neste modelo murino *knockin* para a mutação $Jak2^{V617F}$, a expressão da mutação está sob o controle de um promotor murino endógeno da *Jak2*. Animais *knockin* $Jak2^{V617F}$ foram gerados por meio de procedimentos clássicos de construção gênica em células-tronco embrionárias murinas. Os animais quiméricos resultantes foram cruzados com animais selvagens (wt, do inglês *wild-type*) C57BL/6 para gerar animais heterozigotos *floxed* $Jak2^{V617F}$. Estes foram então cruzados com animais transgênicos E2ACre a fim de induzir a expressão $Jak2^{V617F}$ durante a embriogênese murina (LAKSO et al., 1996). A exposição à cre-recombinase resulta na inversão do éxon mutante seguido por uma reação de excisão que remove o éxon wt, por meio de dois sítios de clivagem da enzima (um sítio LoxP e um sítio LoxP511), fixando a inversão no lugar. Estes animais heterozigotos para a $Jak2^{V617F}$ ($Jak2^{+/VF}$) desenvolvem NMP letal com 100% de penetrância e sobrevida média de 146 dias. Os animais apresentam níveis elevados de hematócrito, esplenomegalia e eritropoese extramedular acentuada. Os pesquisadores não obtiveram nenhum animal $Jak2^{V617F}$ em homozigose; acredita-se que a homozigose para a $Jak2^{V617F}$ seja embrionicamente letal. Eles também não foram capazes de gerar animais homozigotos *floxed* ($Jak2^{F/FI}$), já que a construção gênica realizada parece interferir na expressão do gene *Jak2* normal, funcionando como *Jak2 null*, que é embrionicamente letal. Os animais heterozigotos $Jak2^{+/FI}$ não apresentam alterações fenotípicas (MULLALLY et al., 2010).

Os animais que iniciaram a formação da colônia utilizada nesta pesquisa foram gentilmente cedidos pela Dra. Ann Mullally, pesquisadora do *Dana Farber Cancer*

Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, EUA. Recebemos como doação os animais $Jak2^{wt/FI}$, que não tem fenótipo clínico. Diferentemente do modelo original, para gerar os animais portadores da mutação V617F, realizamos cruzamento dos animais $Jak2^{wt/FI}$ com animais transgênicos $vavCre$, nos quais a cre-recombinase é expressa sob o controle do gene regulatório murino vav , especificamente em células das linhagens hematopoética e endotelial, obtendo-se a expressão germinativa da $Jak2^{V617F}$ apenas nestes tipos celulares. A recombinação cre ocorre em duas etapas, uma que remove o éxon wt e outra que coloca a V617F em orientação normal para a transcrição (Figura 3). Os camundongos transgênicos $Jak2^{wt/FI}$ e $vavCre$, ambos de linhagem C57BL/6, foram importados para a FMRP-USP e a colônia foi expandida nesta Instituição para a realização do estudo. Os animais são mantidos no biotério do Centro de Terapia Celular da FMRP-USP, sob condições livre de patógenos (SPF, do inglês *specific pathogen free*) e de acordo com as políticas do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Figura 3. Representação esquemática da geração do modelo transgênico *knockin* $Jak2^{V617F}$. Inicialmente, um sítio LoxP foi introduzido anteriormente ao éxon 14 normal da $Jak2$ e, em seguida, um cassete de clonagem consistindo nas seguintes regiões: um sítio LoxP511, o fragmento de cDNA numa orientação invertida contendo a mutação G1849T (que resulta na troca de aminoácidos V617F), um sítio LoxP invertido, mais um sítio LoxP511 invertido e o gene de resistência à neomicina flanqueado por sítios FRT. Os animais quiméricos resultantes foram cruzados com animais *wild-type* (wt) C57BL/6 para gerar animais heterozigotos *floxed* $Jak2^{V617F}$. Após cruzamento com animais transgênicos $vavCre$, nos quais a cre-recombinase é expressa sob o controle do gene regulatório murino vav , a expressão germinativa da $Jak2^{V617F}$ é obtida. A recombinação cre ocorre em duas etapas, uma que remove o éxon wt e a outra que coloca a V617F em orientação normal para a transcrição.

Fonte: Adaptado de Mullally A. et al., *Physiological $Jak2^{V617F}$ expression causes a lethal myeloproliferative neoplasm with differential effects on hematopoietic stem and progenitor cells*. Cancer Cell. 2010 Jun 15;17(6):584-596.

3.3 Expansão das colônias $Jak2^{V617F}$ e $vavCre$

Os camundongos transgênicos $Jak2^{wt/FI}$ e $vavCre$ foram recebidos no biotério do Centro de Terapia Celular da FMRP-USP e a colônia foi iniciada pela primeira vez nesta Instituição. Os animais $Jak2^{wt/FI}$, que não tem fenótipo clínico, após cruzamento com animais transgênicos $vavCre$, apresentam a expressão germinativa da mutação $Jak2^{V617F}$. Os acasalamentos de animais $Jak2^{wt/FI}$ $vavCre$ negativos e animais $Jak2^{wt/wt}$ $vavCre$ positivos começaram a ser feitos e geraram os animais utilizados para experimentação. Dos cruzamentos realizados, foram obtidos animais com os seguintes genótipos: $Jak2^{wt/wt}$ $vavCre$ -, $Jak2^{wt/FI}$ $vavCre$ -, $Jak2^{wt/wt}$ $vavCre$ +, $Jak2^{wt/FI}$ $vavCre$ +, cada um com uma frequência de 25%. Os animais completamente selvagens ($Jak2^{wt/wt}$ $vavCre$ -) foram descartados da colônia por meio de eutanásia. Os animais $Jak2^{wt/FI}$ $vavCre$ - foram utilizados para acasalamento com os animais $Jak2^{wt/wt}$ $vavCre$ + para expansão da colônia. Os animais $Jak2^{wt/FI}$ $vavCre$ + desenvolvem uma NMP letal com 100% de penetrância a partir de quatro semanas de vida, com sobrevida média de 100-150 dias; estes animais foram utilizados para experimentação. Os animais $Jak2^{wt/wt}$ $vavCre$ + são considerados controles para os experimentos.

3.4 Genotipagem do modelo murino transgênico

Após o nascimento, o DNA genômico foi obtido a partir de pequenos fragmentos da orelha dos camundongos e foi realizada genotipagem por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) com oligonucleotídeos específicos para a amplificação da $Jak2$ wt e mutada, bem como para a presença da enzima cre-recombinase.

Foram utilizados os seguintes reagentes para a reação de PCR: Taq 5U/ μ L (Promega GO Taq DNA Polymerase), Buffer 5X ($MgCl_2$ -1.5mM), desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs 1.25 μ M cada) e os oligonucleotídeos na concentração de 10 μ M. Os *primers* utilizados e os programas de temperatura de cada reação são descritos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. As reações foram realizadas no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosciences, Foster City, CA, EUA). A análise genotípica $Jak2$ e $vavCre$ foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 2,5% (Figuras 4 e 5).

Tabela 1 - Primers e sequências dos iniciadores

Primers	Sequência 5'-3'
<i>Jak 2.1</i>	CGTGCATAGTGTCTGTGGAAGTC
<i>Jak 2.2</i>	CGTGGAGAGTCTGTAAGGCTCAA
<i>vav-Cre F</i>	AGATGCCAGGACATCAGGAACCTG
<i>vav-Cre R</i>	ATCAGCCACACCAGACACAGAGATC

Tabela 2 - Programas utilizados para as reações de PCR

35 ciclos						
Gene	Desnaturação	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Resfriamento
<i>Jak2</i>	95° 3'	95° 30''	64° 60''	72° 60''	72° 2'	4-10° ∞
<i>vav-Cre</i>	95° 3'	95° 30''	60° 60''	72° 60''	72° 2'	4-10° ∞

Figura 4. Ilustração da genotipagem para a presença do alelo *Jak2* mutado no modelo murino *Jak2*^{V617F} por meio de PCR de DNA genômico obtido do fragmento da orelha (gel de agarose 2,5%). As amostras J59, J60, J61 e J62 apresentam apenas uma banda forte de aproximadamente 250pb, compatíveis com o genótipo wt/wt. As amostras J63 e J64 apresentam uma banda de 250pb e uma banda de 350 pb, compatíveis com o genótipo wt/FI. Controles J8 wt/wt e J9 wt/wt. O marcador utilizado foi de 50pb.

Fonte: próprio autor.

Figura 5. Ilustração da genotipagem para a presença do alelo *vavCre* no modelo murino *Jak2*^{V617F} por meio de PCR de DNA genômico obtido do fragmento da orelha (gel de agarose 2,5%). As amostras murinas V25, V27, V28 e V29 apresentam uma banda forte de 236 pb e são *vavCre* positivas. Demais amostras são *vavCre* negativas. Controle Tg406 *vavCre* positivo. Controle Tg422 *vavCre* negativo. O marcador utilizado foi de 50pb.

Fonte: próprio autor.

3.5 Obtenção de amostras murinas

Pares de animais com sexo e idade semelhantes, Jak2 wt/VF e Jak2 wt/wt, foram observados até 10 a 12 semanas, e então foram sacrificados para coleta de sangue periférico e 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 à coleta de sangue e, ao final da punção, deslocamento cervical. O sangue foi coletado do plexo venoso facial utilizando-se um tubo de micro-hematócrito e submetido a contagem em Coulter T890 (Coulter Corporation, EUA) para aquisição dos valores de hemoglobina, hematócrito, glóbulos brancos e plaquetas. Os animais eutanasiados tiveram o baço extraído para pesagem 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 Coulter T890.

3.6 Obtenção de amostras humanas

As amostras humanas foram obtidas a partir do sangue periférico dos pacientes portadores de NMP em seguimento no Ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP e de indivíduos saudáveis que compareceram ao Hospital das Clínicas para realização de hemograma, ambos mediante a prévia assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos B e C) e a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (Anexo A); foram incluídos indivíduos com idade entre 18 e 85 anos. Foram coletadas amostras de sangue periférico de 67 pacientes com diagnóstico de NMP, de acordo com a Classificação da Organização Mundial de Saúde revisada em 2016 (ARBER et al., 2016) na ocasião de realização de hemograma para os retornos de consulta ambulatorial já previstos e desde que não estivessem em uso

de medicação quimioterápica. Amostras de sangue de 35 voluntários foram obtidas na ocasião de coleta de hemograma cuja expectativa de resultado fosse normal como, por exemplo, pré-operatórios de cirurgias eletivas de baixo risco e exames periódicos de funcionários do HC; os indivíduos foram recrutados no momento da coleta de sangue, mas as amostras foram processadas apenas se as contagens sanguíneas estivessem dentro dos valores de referência de normalidade do laboratório. Todas as amostras de sangue periférico humano utilizadas foram adquiridas do restante de material já coletado para os procedimentos diagnósticos de rotina; todo o volume restante do tubo de hemograma foi utilizado para a análise, portanto não houve necessidade de armazenamento de amostras em biorrepositório.

3.7 Caracterização imunofenotípica das células NK dos animais Jak2 wt/VF

A caracterização das células NK dos animais Jak2 wt/VF foi realizada por meio da técnica de citometria de fluxo das células mononucleares obtidas da maceração do baço, já que a quantidade de células NK no sangue periférico murino é mínima, impossibilitando a avaliação. Após realização da contagem celular, a suspensão de células esplênicas foi centrifugada e ressuspensa em uma solução de anticorpos diluídos em PBS nas proporções recomendadas pelo fabricante. Para marcação, utilizamos os anticorpos biotinilados definidores de linhagem 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) seguidos pela marcação com anticorpos fluorescentes anti-streptavidin-PE (Biolegend), anti-CD3e-APC (clone 145-2C11, Biolegend) e anti-NK1.1-PECy5 (clone PK136, Biolegend) para identificação das células NK. Após a incubação com a solução de anticorpos por 20 minutos no escuro e lavagem com PBS 1X, as células foram ressuspensas em PBS + 2% de SBF. As células foram também incubadas com controles isotipo negativos e controles positivos para cada fluorocromo utilizado no experimento. Foi realizada a aquisição de pelo menos 10.000 eventos por tubo no citômetro de fluxo JSAN Cell Sorter (Bay Bioscience). A estratégia de análise consistiu em excluir as células eritroides residuais e linfócitos B e T (linhagem negativa), depois analisar as células negativas para o CD3 e positivas para o antígeno NK1.1, que identifica as células NK verdadeiras, excluindo as células CD3 e NK1.1 duplo positivas, correspondentes aos linfócitos T/NK.

Para quantificação da expressão dos receptores NK, a mesma técnica acima foi realizada, adicionando-se à solução os anticorpos dirigidos aos receptores NKG2D (clone 1D11, Biolegend), Ly49H (clone 3D10, Biolegend) e Ly49D (clone 4E5, Biolegend) (receptores de ativação) e ao receptor NKG2A (clone 16A11, Biolegend) (receptor de inibição). A aquisição dos dados foi realizada no citômetro FACSCanto II (BD Biosciences). A análise dos dados gerados pela citometria de fluxo foi realizada utilizando o software Flowjo versão X.

3.8 Caracterização das células NK de pacientes portadores de NMP

A caracterização das células NK de pacientes portadores de NMP e dos controles foi realizada por meio de citometria de fluxo. Após contagem de células do material, um máximo de 1×10^6 células por tubo foi incubado com os anticorpos anti-CD19-FITC (clone HIB19, BD Biosciences), anti-CD16-PE (clone 3G8, BD Biosciences), anti-CD56-PE (clone 159, BD Biosciences), anti-CD45-PercP (clone 2D1, BD Biosciences) e anti-CD3-APC (clone UCHT1, BD Biosciences) assim como controles isotipo negativos e controles positivos para os fluorocromos utilizados. Após a incubação, as células foram submetidas à lise de glóbulos vermelhos, centrifugadas, lavadas com PBS Azida (PBS + 2,5% SBF + 0,1% Azida) e ressuspensas com PBS 1X com 1% de Formol para leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences). Para análise, em média 100.000 eventos foram adquiridos. As células NK foram caracterizadas na janela de linfócitos (FSC de baixa intensidade e CD45 de alta intensidade de expressão), como negativas para o CD19 e, posteriormente, como CD3 negativas e CD16 e CD56 positivas.

Para quantificação da expressão dos receptores NK, a mesma técnica acima foi realizada, adicionando-se à solução os anticorpos dirigidos aos receptores NKG2D-APC (clone 1D11, BD Biosciences) e NKp46-PECy7 (clone 9-E2, BD Biosciences) (receptores de ativação) e aos receptores NKG2A-APC (clone DX22, Biolegend) e KIR2DL-PECy7 (clone DX27, Biolegend) (receptores de inibição). A aquisição dos dados foi realizada pelo citômetro de fluxo JSAN Cell Sorter (Bay Bioscience). A análise dos dados gerados pela citometria de fluxo foi realizada utilizando o software Flowjo versão X.

3.9 Isolamento e cultura de células NK dos animais Jak2 wt/VF

A população de células NK murinas foi isolada do baço dos animais controle (Jak2 wt/wt) e Jak2 mutados (wt/VF) obedecendo os seguintes passos:

a) obtenção de suspensão de células esplênicas submetidas à lise de glóbulos vermelhos (já detalhada anteriormente);

b) depleção imunomagnética de células eritróides, B e T, usando anticorpos biotinilados 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), seguido de ligação da biotina beads estreptavidina (*Streptavidin MicroBeads* - Myltenyi Biotec) e seleção imunomagnética negativa por meio do uso do equipamento automático Auto-MACS *Pro Separator*;

c) marcação da suspensão de células negativas para as linhagens eritroide, B e T com anticorpos anti-streptavidin-PE (Biolegend), anti-CD3e-APC (clone 145-2C11, Biolegend) e anti-NK1.1-PECy5 (clone PK136, Biolegend);

d) separação da população de células linhagem negativa, CD3 negativas e NK1.1 positivas por meio de *sorting* utilizando o equipamento JSAN *Cell Sorter* (Bay Bioscience).

Foram obtidas de 200-400.000 células NK de cada animal, 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 a coleta do sobrenadante da cultura das células NK murinas para análise do perfil de citocinas, 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 a rápida lise com 750 µL do reagente Trizol (Invitrogen) para posterior isolamento do RNA.

3.10 Estudo do perfil de citocinas secretadas pelas células NK murinas

Após a cultura das células murinas dos animais controle (Jak2 wt/wt) e Jak2 mutados (wt/VF) durante 24 horas, o sobrenadante da cultura foi coletado e utilizado para a detecção de citocinas por meio de ensaio imunoenzimático utilizando o kit *Murine Cytokine Array Panel A* (R&D Systems) conforme as orientações do fabricante.

3.11 Determinação funcional das células NK murinas

Por meio de procedimentos semelhantes aos descritos anteriormente, células NK murinas de animais controle (Jak2 wt/wt) e Jak2 mutados (wt/VF) foram isoladas por *sorting*, cultivadas em RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF e IL-2 (concentração de 500U/mL) por 24 horas; em seguida, foram recuperadas e contadas. Como células-alvo, utilizamos as células YAC-1, linhagem de célula tumoral murina induzida pela inoculação do vírus da leucemia Moloney (do inglês *Moloney Leukemia Virus*, MLV) em receptores recém-nascidos (KIESSLING; KLEIN; WIGZELL, 1975). As células YAC-1 foram recebidas como doação do Laboratório da Prof^a. Mary Queiroz em colaboração com a Prof^a. Cristiane Okuda Torello da Universidade de Campinas – UNICAMP e cultivadas em meio RPMI 1640 + 10% de SBF, lavadas com PBS e contadas em azul de tripan antes de seu uso. Estas células-alvo foram marcadas com o reagente CTO (*Cell Tracker OrangeTM CMTMR*, Invitrogen, Eugene, Oregon) de acordo com os procedimentos orientados pelo fabricante. O reagente CTO consiste em uma sonda fluorescente que ultrapassa a membrana celular e, uma vez no interior das células, se transforma num composto impermeável, que pode ser mensurado por meio de citometria de fluxo. As células-alvo marcadas com CTO foram coincubadas com as células efetoras (NK) murinas nas razões de células-efetoras:células-alvo (CE:CA) de 1:1, 5:1 e 10:1 por 3 horas a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%; por fim, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS 1X e marcadas com DAPI (marcador de viabilidade celular 4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride); tubos controle de células YAC-1 e de células NK foram incubados nas mesmas condições. Para análise foram adquiridos 20.000 eventos CTO+ utilizando o citômetro de fluxo FACSCanto (BD Biosciences). A análise dos dados foi realizada utilizando o software Flowjo versão X.

3.12 Extração do RNA total

Após a coleta do sobrenadante das células NK murinas para análise do perfil de citocinas, 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 novos tubos, aos quais foram adicionados 500 µL de isopropanol gelado; as amostras foram incubadas por 1h em temperatura -80°C; em seguida, após incubação em temperatura ambiente por 10 minutos, foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos a 4-25°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 ressuspense em 15 µL de água livre de RNase.

A quantificação do RNA total foi realizada por leitura de densidade óptica (DO) em *Nanovue* 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.

3.13 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.

3.14 PCR em tempo real das células NK murinas

Amplificação em tempo real das amostras murinas 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 Jak2 wt/wt e Jak2 wt/VF dos seguintes genes: TGF- β , TNF- α , TLR4, IRAK4, GM-CSF, MyD88 e IFN- γ . 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 simultâneos). 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.

3.15 Análise estatística

A análise estatística dos parâmetros hematimétricos e do peso do baço dos animais foi realizada pelo teste não paramétrico de *Mann-Whitney*; a análise da quantificação de células NK murinas, de expressão de seus receptores e da expressão gênica foi feita pelo teste-t.

A análise estatística da quantificação de linfócitos e seus subtipos e da quantificação de células NK nas amostras humanas foi realizada pelo método não paramétrico de *Kruskal-Wallis*; a análise dos subtipos de células NK humanas e da expressão de seus receptores foi feita pelo teste não paramétrico de *Mann-Whitney*.

Para as análises, utilizamos o *software GraphPad Prism* versão 6. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização fenotípica dos animais Jak2 wt/VF

Os animais Jak2^{wt/FI} vavCre⁺ (a partir deste ponto identificados como Jak2 wt/VF por razões didáticas) desenvolvem uma NMP letal com 100% de penetrância a partir de quatro semanas de vida, com sobrevida média de 100 a 150 dias. A doença caracteriza-se por elevação do hematócrito (Ht), leucocitose, esplenomegalia e eritropoese extramedular proeminente, assemelhando-se à PV humana. A Figura 4 mostra a caracterização inicial dos animais do modelo Jak2^{VF} x vavCre (portanto Jak2 wt/VF) em comparação com o animal controle (Jak2 wt/wt). Vale ressaltar que, segundo a descrição prévia do modelo semelhante gerado com a recombinação por meio de E2ACre, a letalidade desses animais está relacionada a eventos trombóticos que ocorrem a partir do terceiro e até o sexto mês de vida. Não se observa mielofibrose ou transformação leucêmica devido à letalidade precoce.

Figura 6. Comparação fenotípica entre os animais Jak2 wt/VF e controle Jak2 wt/wt. A. O animal Jak2 wt/VF apresenta pele e vísceras de coloração mais avermelhada (compatível com a policitemia) e esplenomegalia. **B.** Comparação do tamanho do baço entre os animais; os animais Jak2 wt/VF apresentam baço em média 4,5 vezes maior do que os animais controles Jak2 wt/wt.

Fonte: próprio autor.

Animais com sexo e idade semelhantes, Jak2 wt/VF e Jak2 wt/wt, foram observados até 10 a 12 semanas, e então foram sacrificados para coleta de dados

(idade, sexo, contagem completa do sangue periférico, presença de sinais clínicos de doença e peso do baço). No total foram sacrificados 126 animais, 51 Jak2 mutados e 75 controles, conforme apresentado na Tabela 3. Os animais Jak2 wt/VF apresentaram mediana de hemoglobina (Hb) de 24g/dL, variando de 17,5 a 26 g/dL; hematócrito (Ht) de 72,9%, variando de 53,4% a 91,1%. A mediana de leucócitos foi $11,4 \times 10^6/\text{L}$ e de plaquetas $2379 \times 10^6/\text{L}$. Nos animais controle Jak2 wt/wt, a mediana de hemoglobina (Hb) foi 13,4 g/dL, com variação de 10,9 a 15,4 g/dL, e hematócrito (Ht) de 44,6%, variando de 44% a 57,4%. A mediana de leucócitos foi $4,9 \times 10^6/\text{L}$ e de plaquetas $319,5 \times 10^6/\text{L}$. O peso do baço nos animais com mutação Jak2 apresentou mediana de 0,37g, contrastando com a mediana de 0,08g nos controles.

Como pode ser observado pelos dados apresentados, os animais Jak2 wt/VF apresentam níveis de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), leucócitos, plaquetas e peso do baço significativamente maiores quando comparados com o grupo de animais controle (Figuras 7 e 8).

Tabela 3. Caracterização genotípica, laboratorial e fenotípica no modelo murino

Jak2^{V617F} (wt/VF) e controles (wt/wt)		
	Policitemia vera	Controle
Animais	51	75
<i>Jak2^{V617F}</i>	wt/FI	wt/wt
<i>vavCre</i>	positivo	positivo
Sexo (machos/fêmeas)	21/30	36/39
Parâmetros hematimétricos, mediana (variação)		
Hemoglobina (g/dL)	24(17,5-26)	13,4(10,9-15,4)
Hematócrito (%)	72,9(53,4-91,1)	44,6(44-57,4)
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mL}$)	11,4(2,0-30,2)	4,9(1,3-17,3)
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mL}$)	2379(927-4532)	319,5(114-1268)
Peso baço (g), mediana (variação)	0,37(0,18-0,6)	0,08(0,01-0,22)

Fonte: próprio autor.

Figura 7. Comparação dos parâmetros hematimétricos dos animais Jak2 wt/VF (fenótipo de PV) e dos animais Jak2 wt/wt (controles). Comparação dos níveis de hemoglobina (A), hematócrito (B), leucócitos (C) e plaquetas (D) dos animais Jak2 wt/VF e Jak2 wt/wt, utilizando o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*.

Fonte: próprio autor.

Figura 8. Comparação do peso do baço (g) entre os animais Jak2 wt/VF (fenótipo de PV) e os animais Jak2 wt/wt (controles). Para a comparação utilizamos o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*.

Fonte: próprio autor.

4.2 Caracterização clínica e laboratorial dos pacientes portadores de NMP

Durante o estudo foram incluídas amostras de sangue periférico de 73 pacientes com suspeita de NMP. Posteriormente, 6 pacientes foram excluídos; 5 apresentavam policitemia secundária e 1 plaquetose resolvida. Dessa forma, 67 pacientes confirmaram o diagnóstico de NMP pelos critérios propostos para a revisão do diagnóstico de NMP pela Organização Mundial de Saúde 2016 (BARBUI et al., 2015; ARBER et al., 2016). Vinte e oito pacientes (42%) tiveram o diagnóstico de PV, 16 (24%) de TE e 23 (34%) de MFP. Com relação ao risco, na PV 9 pacientes (32%) tinham baixo risco e 19 (68%) alto risco; na TE os pacientes de muito baixo, baixo, intermediário e alto risco foram 3 (19%), 4 (25%), 1 (6%) e 7 (44%), respectivamente; na MFP 2 pacientes (9%) apresentaram baixo risco, 10 (43%) risco intermediário-1, 5 (22%) risco intermediário-2 e 5 (22%) alto risco de acordo com o IPSS (do inglês *International Prognostic Scoring System*). Um paciente portador de TE e um de MFP não foram classificados quanto ao risco por ausência de dados suficientes, visto que realizaram o seguimento e tratamento em outro serviço. A mediana de idade foi de 62 anos, variando de 25 a 85 anos. Vinte e oito (28) pacientes (42%) eram do sexo masculino e 39 (58%) do sexo feminino. Em 39 pacientes (58%) foi detectada a mutação $JAK2^{V617F}$; na PV a mutação foi encontrada em 19 pacientes (68%), na TE em 8 pacientes (50%) e na MFP em 12 pacientes (52%). Mutações da calreticulina foram detectadas em 8 pacientes que eram negativos para a mutação $JAK2^{V617F}$ (1 paciente com TE e 7 com MFP). Com relação à presença de visceromegalias, 17 pacientes (26%) apresentavam esplenomegalia. A presença de um ou mais eventos tromboembólicos foi relatada em 19 pacientes (29%), 9 no grupo da PV (32%), 3 no grupo da TE (20%) e 7 nos portadores de MFP (32%). Com relação aos parâmetros hematimétricos, os portadores de NMP apresentaram mediana de Hb de 14,4 g/dL, variando de 5,0 a 23,1 g/dL. A mediana de Hb na PV, TE e MFP foi 17,3, 12,9 e 11,9 g/dL, respectivamente. O hematócrito variou de 16 a 68,6%, com mediana de 43%; 52% no grupo da PV, 39% na TE e 36,5% na MFP. O valor mediano de leucócitos foi $11,4 \times 10^6/L$. Com relação à contagem de plaquetas, a mediana para os portadores de NMP foi $688 \times 10^6/L$ e, em cada grupo, $442 \times 10^6/L$ na PV, $982 \times 10^6/L$ na TE e $662 \times 10^6/L$ na MFP (Tabela 4).

No mesmo período do estudo, realizamos um levantamento de todos os casos de NMP em seguimento no Ambulatório de Hematologia do HCFMRP. Até o momento, são acompanhados 171 pacientes portadores de NMP, 67 (39%) portadores de PV, 38 (34%) de TE, 40 (23%) de MFP, 1 portador de Leucemia Neutrofílica Crônica e 5 com NMP ainda não-classificada. Dentre os pacientes atualmente em seguimento ambulatorial, 137 apresentavam todos os dados clínicos atualizados e analisáveis até a data da redação deste material. Os dados clínicos e laboratoriais obtidos são mostrados na Tabela 5. Destes 137 pacientes, 59 (43%) têm o diagnóstico de PV, 40 (29%) de TE e 38 (28%) de MFP. Com relação ao risco, na PV, 16 pacientes (27%) têm baixo risco e 43 (73%) alto risco; na TE, os pacientes de muito baixo, baixo, intermediário e alto risco foram 5 (12,5%), 7 (17,5%), 3 (7,5%) e 25 (62,5%), respectivamente; na MFP, 8 pacientes (21%) apresentaram baixo risco, 17 (45%) risco intermediário-1, 6 (16%) intermediário-2 e 7 (18%) alto risco de acordo com o IPSS (*International Prognostic Scoring System*). A idade mediana é de 66 anos, variando de 30 a 90 anos. No grupo de NMP, 50 pacientes (36%) são do sexo masculino e 87 (64%) do sexo feminino. Do total, 90 pacientes (66%) apresentam mutação $JAK2^{V617F}$, 49 (83%) no subgrupo de PV, 19 (47,5%) na TE e 22 (58%) na MFP. Doze pacientes negativos para a mutação $JAK2^{V617F}$ foram positivos para a pesquisa de mutação da calreticulina, 6 portadores de TE e 6 de MFP. Em relação à presença de visceromegalias, 33 pacientes (24%) apresentaram esplenomegalia. A presença de um ou mais eventos tromboembólicos foi referida em 42 pacientes (31%), 22 no subgrupo da PV (37%), 8 no subgrupo da TE (20%) e 12 nos portadores de MFP (32%). Com relação aos parâmetros hematimétricos, os portadores de NMP apresentaram mediana de Hb de 14,6 g/dL, variando de 7,0 a 23 g/dL. A mediana de Hb na PV, TE e MFP foi 17,4, 13,8 e 12,9 g/dL, respectivamente. O hematócrito variou de 20 a 70%, com mediana de 45%; 53,1% na PV, 40% na TE e 39% na MFP. A contagem de leucócitos mediana foi $9,6 \times 10^6/L$. O valor mediano de plaquetas para os portadores de NMP foi $702 \times 10^6/L$ e, em cada grupo, $441 \times 10^6/L$ na PV, $980 \times 10^6/L$ na TE e $748 \times 10^6/L$ na MFP.

Tabela 4. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com NMP incluídos no estudo (2014-2017).

	Total	PV	TE	MFP
Pacientes	67	28	16	23
Sexo (masculino/feminino)	28/39	13/15	5/11	10/13
Idade em anos, mediana (variação)	62(25-85)	57(31-73)	57(25-85)	68(46-81)
Risco*	NA	9/19	3/4/1/7	2/10/5/5
Visceromegalia (sim/não)**	17/48	4/24	1/14	12/10
Eventos tromboembólicos (sim/não)***	19/46	9/19	3/12	7/15
Mutação JAK2 ^{V617F} (positiva/negativa)	39/26	19/9	8/7	12/10
Mutação CALR	8	NA	1	7
Mutação Éxon 12	0	0	0	0
Parâmetros hematimétricos, mediana (variação)				
Hemoglobina (g/dL)	14,4(5-23,1)	17,3(12,7-23,1)	12,9(11,4-16)	11,9(5-19,1)
Hematócrito (%)	43(16-68,6)	52(40-68,6)	39(35-47)	36,5(16-56)
Leucócitos (x10⁶/L)	11,4(1,6-50,1)	11,2(6,9-47)	10,9(7,2-14,4)	11,7(1,6-50,1)
Plaquetas (x10⁶/L)	688(28-1659)	442(170-1296)	982(530-1323)	662(28-1659)

*Risco: PV baixo/alto, TE muito baixo/baixo/intermediário/alto, MFP baixo/intermediário-1/ intermediário-2/alto

**Hepatomegalia ou esplenomegalia detectadas ao exame físico ou por ultrassonografia de abdômen

***Eventos isquêmicos, trombóticos ou embólicos, sem outra causa associada aparente

Tabela 5. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com NMP do HCFMRP (2014-2017).

Pacientes	Total	PV	TE	MFP
Sexo (masculino/feminino)	137	59	40	38
Idade em anos, mediana (variação)	50/87	23/36	12/28	15/23
Risco*	66(30-90)	64(30-90)	64(30-86)	71(38-84)
Visceromegalia (sim/não)**	NA	16/43	5/7/3/25	8/17/6/7
Eventos tromboembólicos (sim/não)***	33/104	18/41	2/38	13/25
	42/95	22/37	8/32	12/26
Mutação <i>JAK2</i> ^{V617F} (positivo/negativo)	90/47	49/10	19/21	22/16
Mutação <i>CALR</i>	12	NA	6	6
Mutação <i>Éxon 12</i>	0	0	0	0
Parâmetros hematimétricos, mediana (variação)				
Hemoglobina (g/dL)	14,6(7-23)	17,4(12,5-23)	13,8(10,5-16,5)	12,9(7-20)
Hematócrito (%)	45(20-70)	53,1(36-70)	40(32-50)	39(20-62)
Leucócitos (x10 ⁶ /L)	9,6(2,1-18,8)	9,7(4,3-41,7)	8,5(3,9-18,8)	11,9(2,1-56,2)
Plaquetas (x10 ⁶ /L)	702(49-2466)	441(158-1502)	980(412-2466)	748(49-1677)

*Risco: PV baixo/alto, TE muito baixo/baixo/intermediário/alto, MFP baixo/intermediário-1/ intermediário-2/alto

**Hepatomegalia ou esplenomegalia detectadas ao exame físico ou por ultrassonografia de abdômen

***Eventos isquêmicos, tromboóticos ou embólicos, sem outra causa associada aparente

4.3 Caracterização imunofenotípica das células NK dos animais $Jak2^{V617F}$

4.3.1 Análise quantitativa das células NK

A caracterização das células NK dos animais $Jak2$ wt/wt e $Jak2$ wt/VF foi realizada por meio da técnica de citometria de fluxo das células mononucleares obtidas da maceração do baço. A estratégia de análise consistiu em excluir as células eritroides residuais e linfócitos B e T (linhagem negativas), depois analisar as células negativas para o CD3 e positivas para o antígeno NK1.1, que identifica as células NK verdadeiras, excluindo as células CD3 e NK1.1 duplo positivas, correspondentes aos linfócitos T/NK (Figura 9).

A média do número absoluto de esplenócitos foi significativamente maior nos animais $Jak2$ wt/VF em comparação com os animais controles ($129,7 \times 10^6$ versus $62,8 \times 10^6$ células, respectivamente; $p=0,02$) (Figura 10A). A porcentagem de células NK (CD3⁻NK1.1⁺) nos animais $Jak2$ wt/VF foi significativamente menor do que a encontrada nos animais controle (5,6% versus 12,4%; $p=0,001$) (Figura 10B). Para obter os valores absolutos de células NK, multiplicou-se as porcentagens de células viáveis, linhagens negativas e CD3⁻NK1.1⁺ pelo número total de células do baço de cada animal. Realizamos as análises de duas formas. Na primeira, foram incubadas 1×10^6 células esplênicas após lise de glóbulos vermelhos com o painel de anticorpos já descrito anteriormente, e adquiridos 50.000 eventos no citômetro de fluxo. Desta forma, não encontramos diferença quantitativa das células NK entre os dois grupos ($Jak2$ wt/wt= $1,21 \times 10^6$ células, $Jak2$ wt/VF= $1,36 \times 10^6$ células; $p>0,05$) (Figura 10C). Na segunda forma de análise, cerca de 2×10^6 de células esplênicas foram incubadas e todas as células foram analisadas durante a leitura pela citometria de fluxo. Com este segundo experimento, identificamos menor número de células NK nos animais portadores da mutação $Jak2$, embora significância estatística não tenha sido observada ($Jak2$ wt/wt= 674.561 células, $Jak2$ wt/VF= 244.081 células; $p>0,05$) (Figura 10D).

Figura 9. Estratégia de imunofenotipagem de células NK murinas. As células mononucleares dos animais Jak2 wt/VF e seus controles Jak2 wt/wt foram marcadas com os anticorpos murinos biotinizados anti-Ter119, CD19, CD4 e CD8a, e anticorpos fluorescentes anti-estreptavidina, CD3e e NK1.1 (para a quantificação NK) e anti-NKG2A, NKG2D, Ly49H e Ly49D (para a análise de receptores). A estratégia de *gating* consistiu em excluir as células eritroides residuais e linfócitos B e T (linhagens negativas), depois analisar as células negativas para o CD3 e positivas para o antígeno NK1.1, identificando as células NK. Em seguida, foram analisadas as células NK positivas para cada receptor.

Fonte: próprio autor.

Figura 10. Análise da porcentagem e número de esplenócitos e células NK de animais portadores da mutação *Jak2*^{V617F} e controles. **A. Comparação da média do número absoluto de esplenócitos entre os animais *Jak2* wt/VF e *Jak2* wt/wt.** O número absoluto de esplenócitos foi significativamente maior nos animais *Jak2* wt/VF quando comparados aos animais controle. **B. Análise da porcentagem de células NK nos animais *Jak2* wt/VF e nos controles.** A porcentagem de células NK nos animais *Jak2* wt/VF foi significativamente menor quando comparada à dos animais controle. **C e D. Análise do valor absoluto das células NK nos animais *Jak2* wt/VF e nos controles.** O gráfico em C demonstra análise comparativa quando um número fixo de eventos foi adquirido no estudo de imunofenotipagem (n=6); e o gráfico em D representa a análise de todas as células adquiridas para cada animal (n=3). A quantificação absoluta foi calculada em relação ao número total de células do baço de cada animal. O teste estatístico utilizado para estas comparações foi o teste t.

Fonte: próprio autor.

4.3.2 Análise de expressão de receptores

Para o experimento de quantificação da expressão dos receptores NK, a mesma técnica descrita no item anterior foi realizada, adicionando-se ao painel de anticorpos previamente descrito aqueles dirigidos aos receptores NKG2D (clone 1D11, Biolegend), Ly49H (clone 3D10, Biolegend) e Ly49D (clone 4E5, Biolegend) (receptores de ativação) e ao receptor NKG2A (clone 16A11, Biolegend) (receptor de inibição). A estratégia de análise para a identificação das células NK foi semelhante àquela descrita anteriormente e, em seguida, foram analisadas as células positivas para cada receptor (Figura 9). Observamos que a expressão dos receptores NKG2A foi significativamente maior nas células NK dos animais Jak2 wt/VF em comparação aos animais controle (Jak2 wt/VF= 39,5% *versus* Jak2 wt/wt= 26,4%, n=3 por grupo, $p=0,03$). Embora tenha havido uma tendência, não houve diferença significativa de expressão dos receptores NKG2D, Ly49H e Ly49D (Figura 11). A expressão dos receptores NKG2D, Ly49H e LY49D nas células NK revelou a seguinte porcentagem média nos animais Jak2 wt/wt e Jak2 wt/VF, respectivamente: 5,9% *versus* 16,3%; 36,8% *versus* 21,3%; 40% *versus* 19,5%.

Figura 11. Análise da expressão dos receptores de células NK nos animais Jak2 wt/wt e Jak2 wt/VF. Comparação da expressão percentual dos receptores NKG2A (A), NKG2D (B), Ly49H (C) e Ly49D (D) de células NK entre os animais Jak2 wt/wt e Jak2 wt/VF. Para as comparações utilizamos o teste-t.

Fonte: próprio autor.

4.4 Caracterização imunofenotípica das células NK dos pacientes portadores de NMP

4.4.1 Análise quantitativa das células NK

A caracterização das células NK dos pacientes portadores de NMP e seus controles foi realizada por meio de citometria de fluxo. Para a análise quantitativa das células NK foram utilizadas amostras de sangue periférico de 39 pacientes portadores de NMP e 31 controles; dentre os pacientes, 23 (59%) apresentavam a mutação $JAK2^{V617F}$ enquanto 16 (41%) eram negativos. Quatorze (14) pacientes tiveram o diagnóstico de PV (36%), dos quais 9 apresentavam a mutação $JAK2^{V617F}$ e 5 eram negativos; 9 (23%) tiveram o diagnóstico de TE, 4 portadores da mutação $JAK2^{V617F}$ e 5 sem mutação; 16 (41%) pacientes foram diagnosticados com MFP, 10 com mutação $JAK2^{V617F}$ positiva e 6 com esta pesquisa de mutação negativa. Para esta análise, em média 100.000 eventos foram adquiridos e as células NK foram caracterizadas na janela de linfócitos (FSC de baixa intensidade e CD45 de alta intensidade de expressão), como negativas para o CD19 e, posteriormente, como CD3 negativas e CD16 positivas, como demonstrado na Figura 12.

Figura 12. Estratégia de imunofenotipagem de células NK humanas. As células mononucleares dos pacientes portadores de NMP e controles foram marcadas com os anticorpos humanos anti-CD19, CD16, CD56, CD45 e CD3. A estratégia de *gating* consistiu em selecionar a janela de linfócitos (FSC de baixa intensidade e CD45 de alta intensidade de expressão) seguida das células negativas para o CD19 e, posteriormente, CD3 negativas e CD16 positivas.

Fonte: próprio autor.

De acordo com nossas observações, a porcentagem de linfócitos totais foi menor nos pacientes com NMP quando comparados ao grupo controle (13% versus 29,6%; $p < 0,001$), e esta relação permaneceu reduzida quando observamos

separadamente os pacientes com mutação $JAK2^{V617F}$ positiva e negativa (13% e 16,5%, respectivamente). Quando comparados por diagnóstico, a porcentagem de linfócitos foi significativamente menor na MFP (9,5%; $p<0,001$) e na PV (17,5%; $p<0,01$) em relação aos controles (29,6%). Nos pacientes com mutação $JAK2^{V617F}$, separados por doença, a porcentagem de linfócitos também foi significativamente menor na MFP (7,95%; $p<0,001$) e na PV (13,5%; $p<0,01$) em relação aos controles (29,6%), enquanto no grupo não mutado essa diferença permaneceu apenas para a MFP (11,9%, $p<0,01$). Analisando cada doença separadamente, pela presença ou não da mutação $JAK2^{V617F}$, a porcentagem de linfócitos totais foi significativamente menor nos portadores de MFP, independente da mutação $JAK2^{V617F}$ em relação aos controles (MFP com mutação $JAK2^{V617F}$ positiva= 7,95%, $p<0,001$; MFP com mutação $JAK2^{V617F}$ negativa= 11,9%, $p<0,01$). A porcentagem de linfócitos foi menor nos portadores de PV positivos para mutação $JAK2^{V617F}$ em relação aos controles (13,5% *versus* 29,6%, $p<0,001$) (Figura 13).

Analisando os valores absolutos de linfócitos, não houve diferença estatística quando comparamos os dois grupos (controle= 190.000; NMP= 166.650; $p>0,05$), independentemente da presença da mutação $JAK2^{V617F}$ (controle= 190.000; NMP $JAK2^{V617F}$ positivo= 160.000; NMP $JAK2^{V617F}$ negativo= 220.000; $p>0,05$). Quando comparados por diagnóstico, os portadores de MFP e de PV apresentaram valores absolutos de linfócitos significativamente menores que os portadores de TE (119.400, 162.400 e 260.000, respectivamente; $p<0,01$). Nos pacientes com mutação $JAK2^{V617F}$, separados por doença, o número absoluto de linfócitos foi significativamente menor na MFP em relação aos controles (102.700 *versus* 190.000; $p<0,01$) e em relação à TE (102.700 *versus* 262.050; $p<0,01$). No grupo não mutado, o número de linfócitos foi menor na PV comparativamente à TE (141.650 *versus* 260.000; $p<0,05$). Analisando cada doença separadamente, pela presença ou não da mutação $JAK2^{V617F}$, o número absoluto de linfócitos totais foi significativamente menor nos portadores de MFP positivos para a mutação $JAK2^{V617F}$ em relação pacientes com MFP negativos para a mutação (mutação $JAK2^{V617F}$ positiva= 102.700; negativa= 221.800; $p<0,05$) e aos controles (mutação $JAK2^{V617F}$ positiva= 102.700; controles= 190.000; $p<0,01$). O número absoluto de linfócitos foi menor nos portadores de TE $JAK2^{V617F}$ negativos em relação aos controles (260.000 e 190.000, respectivamente; $p<0,05$). Não houve diferença no número absoluto de linfócitos entre os portadores de PV e os controles (Figura 14).

Figura 13. Análise da porcentagem de linfócitos totais nos pacientes com NMP e controles. Comparação da porcentagem de linfócitos totais entre todos os portadores de NMP e controles **(A)**, separados pela presença ou não da mutação *Jak2* **(B)** e separados de acordo com as patologias PV, TE e MFP **(C)**. Comparação da porcentagem de linfócitos totais no grupo de pacientes não mutado **(D)** e mutado **(E)**, de acordo com cada comorbidade. Comparação da porcentagem de linfócitos totais entre os portadores de PV **(F)**, TE **(G)** e MFP **(H)** em relação aos controles. Para as comparações utilizamos o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*.

Fonte: próprio autor.

Figura 14. Análise do número absoluto de linfócitos totais nos pacientes com NMP e controles. Comparação do número absoluto de linfócitos totais entre todos os portadores de NMP e controles **(A)**, separados pela presença ou não da mutação *Jak2* **(B)** e separados de acordo com as patologias PV, TE e MFP **(C)**. Comparação do número absoluto de linfócitos totais no grupo de pacientes não mutado **(D)** e mutado **(E)**, de acordo com cada comorbidade. Comparação do número absoluto de linfócitos totais entre os portadores de PV **(F)**, TE **(G)** e MFP **(H)** em relação aos controles. Para as comparações utilizamos o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*.

Fonte: próprio autor.

Analisando apenas o número de células NK-CD16⁺, conforme estratégia de *gating* mencionada anteriormente, os portadores de NMP apresentaram menor número absoluto de células quando comparados aos controles (8.609 *versus* 12.033; *p*=0,03). Com relação à porcentagem de linfócitos NK-CD16⁺, embora tenha havido uma tendência à redução nos pacientes com NMP (5,19% *versus* 7,48% nos controles), não houve significância estatística (*p*=0,07). Quando comparamos os grupos de pacientes com mutação *JAK2*^{V617F} e sem a mutação com os indivíduos controles, não foi observada diferença na quantidade absoluta ou percentual de

células NK-CD16⁺ ($p>0,05$). Quando comparados por diagnóstico, a quantidade absoluta de células NK-CD16⁺ foi significativamente menor nos portadores de MFP em relação aos controles (5.979 *versus* 12.033; $p<0,05$) e em relação aos portadores de TE (5.979 *versus* 23.020; $p<0,05$) e menor nos pacientes com PV em relação à TE (5.797 *versus* 23.020; $p<0,05$); o valor percentual não diferiu entre os grupos ($p>0,05$). Quando analisamos apenas o subgrupo com mutação *JAK2*^{V617F} positiva, separando por doença, os pacientes com MFP apresentaram valor absoluto de células NK-CD16⁺ menor que os controles (5.340 e 12.033, respectivamente; $p<0,001$) e menor que a TE (5.340 *versus* 21.161; $p<0,01$). Na análise apenas do subgrupo não mutado, separando por doença, não houve diferença estatística na quantidade absoluta ou percentual das células NK-CD16⁺. Analisando-se cada doença separadamente, pela presença ou não da mutação *JAK2*^{V617F}, o valor absoluto das células NK-CD16⁺ foi significativamente menor nos portadores de MFP positivos para a mutação *JAK2*^{V617F} em relação aos controles (5.340 *versus* 12.033; $p<0,05$) e nos portadores de PV negativos para mutação *JAK2*^{V617F} em relação aos controles (3.486 *versus* 12.033; $p<0,05$). Não houve diferença nos portadores de TE. Os valores percentuais de células NK-CD16⁺ não foram estatisticamente diferentes entre os grupos analisados (subtipos de NMP e presença ou não da mutação *JAK2*^{V617F}). Esses dados são ilustrados nas Figuras 15 e 16.

Figura 15. Análise do número absoluto de células NK-CD16⁺ nos pacientes com NMP e controles. Comparação do número absoluto de células NK-CD16⁺ entre todos os portadores de NMP e controles **(A)**, separados pela presença ou não da mutação *Jak2* **(B)** e separados de acordo com as patologias PV, TE e MFP **(C)**. Comparação do número absoluto de células NK-CD16⁺ no grupo de pacientes não mutado **(D)** e mutado **(E)**, de acordo com cada comorbidade. Comparação do número absoluto de células NK-CD16⁺ entre os portadores de PV **(F)**, TE **(G)** e MFP **(H)** em relação aos controles. Para as comparações utilizamos o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*.

Fonte: próprio autor.

Figura 16. Análise da porcentagem das células NK-CD16⁺ nos pacientes com NMP e controles. Comparação da porcentagem de células NK-CD16⁺ entre todos os portadores de NMP e controles **(A)**, separados pela presença ou não da mutação *Jak2* **(B)** e separados de acordo com as patologias PV, TE e MFP **(C)**. Comparação da porcentagem de células NK-CD16⁺ no grupo de pacientes não mutado **(D)** e mutado **(E)**, de acordo com cada comorbidade. Comparação da porcentagem de células NK-CD16⁺ entre os portadores de PV **(F)**, TE **(G)** e MFP **(H)** em relação aos controles. Para as comparações utilizamos o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*.

Fonte: próprio autor.

Para a análise dos subtipos clássicos de células NK, utilizamos amostras de 18 pacientes com NMP e 10 controles. Dentre os pacientes, 9 tinham o diagnóstico de PV, dos quais 7 eram *JAK2*^{V617F} positivos e 2 negativos; 2 tinham o diagnóstico de TE com mutação *JAK2*^{V617F} positiva; e 7 eram portadores de MFP, 5 com mutação *JAK2*^{V617F} positiva e 2 negativa. Identificamos os seguintes subtipos de células NK: (1) CD56^{bright}CD16⁻; (2) CD56^{bright}CD16^{dim}; (3) CD56^{dim}CD16⁻; (4)

CD56^{dim}CD16^{bright} e (5) CD56⁻CD16^{bright}. Para a análise, utilizamos a mesma estratégia de identificação das células NK descrita anteriormente e, a seguir, identificamos a intensidade expressão do CD56 e CD16, conforme ilustrado na Figura 17.

Figura 17. Estratégia de identificação dos subtipos de células NK humanas. As células mononucleares dos pacientes portadores de NMP e controles foram marcadas com os anticorpos humanos anti-CD19, CD16, CD56, CD45 e CD3. A estratégia de *gating* consistiu em selecionar a janela de linfócitos (FSC de baixa intensidade e CD45 de alta intensidade de expressão) seguida das células negativas para o CD19 e, posteriormente, CD3 negativas; por fim, identificamos a intensidade de expressão do CD56 e CD16, permitindo a identificação de 5 subtipos de células NK: 1. CD56^{bright}CD16⁻; 2. CD56^{bright}CD16^{dim}; 3. CD56^{dim}CD16⁻; 4. CD56^{dim}CD16^{bright} e 5. CD56⁻CD16^{bright}.

Fonte: próprio autor.

Observamos redução percentual do subtipo CD56^{bright}CD16⁻ nos portadores de NMP em relação aos controles (0,47% versus 3,2%, $p < 0,001$), independente da presença da mutação $JAK2^{V617F}$. Analisando por doença, os portadores de PV e MFP apresentaram porcentagem reduzida deste subtipo de NK (PV= 0,2%; MFP= 0,52%; CT= 3,2%; $p < 0,01$). Os portadores de TE não apresentaram diferença

significativa. Não observamos diferença na porcentagem dos demais subtipos de NK entre o grupo de NMP e os controles (Figura 18).

Com relação aos valores absolutos dos subtipos de NK, identificamos redução do subtipo CD56^{bright}CD16⁻ nos pacientes com NMP em relação aos controles (129,7 *versus* 889,8; $p<0,05$). Quando analisados de acordo com a presença da mutação *JAK2*^{V617F}, apenas o subgrupo portador da mutação apresentou valores menores destas células (160,2 *versus* 889,8; $p<0,05$). De acordo com a patologia, os portadores de PV e MFP apresentaram valores menores deste subtipo (PV= 48,2; CT= 889,8; $p<0,01$ / MFP= 99,42; CT= 889,8; $p<0,05$). Os portadores de TE não apresentaram valores significativamente diferentes. Observamos ainda redução na quantidade absoluta do subtipo CD56⁻CD16^{bright} nos pacientes com MFP em relação aos controles ($p<0,05$). Os demais subtipos de NK não foram diferentes entre os pacientes e os controles (Figura 19).

Figura 18. Análise da porcentagem dos subtipos de células NK nos pacientes com NMP e controles. Comparação da porcentagem do subtipo CD56^{bright}CD16⁻ dos portadores de NMP em relação aos controles **(A)** e separados pela presença ou não da mutação *JAK2* **(B)**. Comparação da porcentagem do subtipo CD56^{bright}CD16⁻ dos portadores de PV **(C)** e MFP **(D)** em relação aos controles. Comparação da porcentagem do subtipo CD56⁻CD16^{bright} dos portadores de NMP em relação aos controles **(E)**. Comparação da porcentagem do subtipo CD56^{bright}CD16^{dim} dos portadores de NMP em relação aos controles **(F)**. Comparação da porcentagem do subtipo CD56^{dim}CD16⁻ dos portadores de NMP em relação aos controles **(G)**. Comparação da porcentagem do subtipo CD56^{dim}CD16^b dos portadores de NMP em relação aos controles **(H)**. Para as comparações utilizamos o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*.

Fonte: próprio autor.

Figura 19. Análise dos valores absolutos dos subtipos de células NK nos pacientes com NMP e controles. Comparação dos valores absolutos do subtipo $CD56^{bright}CD16^{-}$ dos portadores de NMP em relação aos controles (A) e separados pela presença ou não da mutação $JAK2$ (B). Comparação dos valores absolutos do subtipo $CD56^{bright}CD16^{-}$ dos portadores de PV (C) e MFP (D) em relação aos controles. Comparação dos valores absolutos do subtipo $CD56^{-}CD16^{bright}$ dos portadores de MFP em relação aos controles (E). Comparação dos valores absolutos do subtipo $CD56^{bright}CD16^{dim}$ dos portadores de NMP em relação aos controles (F). Comparação dos valores absolutos do subtipo $CD56^{dim}CD16^{-}$ dos portadores de NMP em relação aos controles (G). Comparação dos valores absolutos do subtipo $CD56^{dim}CD16^{bright}$ dos portadores de NMP em relação aos controles (H). Para as comparações utilizamos o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*.

Fonte: próprio autor.

Estes dados permitiram, ainda, a análise de outros subtipos de linfócitos, como os linfócitos T/NK, T e B. Identificamos número significativamente maior de linfócitos T/NK, tanto em valores percentuais quanto em valores absolutos, nos portadores de NMP, independente do *status* mutacional (controles= 0; NMP= 0,17%/ 197; $JAK2^{V617F}$ positivos= 0,17%/ 257; $JAK2^{V617F}$ negativos= 0,16%/ 186), como ilustrado na Figura 20. Não houve diferença quantitativa de linfócitos T nos pacientes portadores de NMP (Figura 21). Os portadores de NMP apresentaram redução quantitativa dos linfócitos B em relação aos controles, tanto em valores percentuais

quanto em valores absolutos (controles= 11,1%/ 20.815; NMP= 7,1%/ 12.240; $p<0,01$). O valor percentual dos linfócitos B foi menor no grupo das NMP independente da mutação $JAK2^{V617F}$ (controles= 11,1%; $JAK2^{V617F}$ positivos= 8,2%; $JAK2^{V617F}$ negativos= 6,7%; $p<0,05$). Na comparação dos valores absolutos, apenas o subgrupo mutado apresentou menor número de linfócitos B em relação aos controles (controles= 20.815; $JAK2^{V617F}$ positivos= 12.784; $JAK2^{V617F}$ negativos= 14.050; $p<0,05$) (Figura 22).

Figura 20. Análise dos valores percentuais (linha superior) e absolutos (linha inferior) de linfócitos T/NK nos pacientes com NMP (PV, TE e MFP) e controles. Comparação dos valores percentuais dos linfócitos T/NK dos portadores de NMP em relação aos controles (A) e separados pela presença ou não da mutação $JAK2$ (B). Comparação dos valores absolutos dos linfócitos T/NK dos portadores de NMP em relação aos controles (C) e separados pela presença ou não da mutação $JAK2$ (D). Para as comparações utilizamos o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*.

Fonte: próprio autor.

Figura 21. Análise dos valores percentuais (linha superior) e absolutos (linha superior) de linfócitos T nos pacientes com NMP (PV, TE e MFP) e controles. Comparação dos valores percentuais dos linfócitos T dos portadores de NMP em relação aos controles **(A)** e separados pela presença ou não da mutação *JAK2* **(B)**. Comparação dos valores absolutos dos linfócitos T dos portadores de NMP em relação aos controles **(C)** e separados pela presença ou não da mutação *JAK2* **(D)**. Para as comparações utilizamos o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*.

Fonte: próprio autor.

Figura 22. Análise dos valores percentuais (linha superior) e absolutos (linha inferior) de linfócitos B nos pacientes com NMP (PV, TE e MFP) e controles. Comparação dos valores percentuais dos linfócitos B dos portadores de NMP em relação aos controles **(A)** e separados pela presença ou não da mutação *JAK2* **(B)**. Comparação dos valores absolutos dos linfócitos B dos portadores de NMP em relação aos controles **(C)** e separados pela presença ou não da mutação *JAK2* **(D)**. Para as comparações utilizamos o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*.

Fonte: próprio autor.

4.4.2 Avaliação da expressão de receptores

De forma semelhante à descrita anteriormente, as células NK foram caracterizadas na janela de linfócitos (FSC de baixa intensidade e CD45 de alta intensidade de expressão), como negativas para o CD19 e, posteriormente, como CD3 negativas e CD16 ou CD56 positivas; em seguida, foram analisadas as células NK positivas para cada receptor com os anticorpos anti-NKG2D-APC anti-NKp46-PECy7, anti-NKG2A-APC e anti-KIR2DL-PECy7, tanto nas células NK-CD16⁺ quanto nas células NK-CD56⁺ (Figura 23).

Figura 23. Estratégia de análise da expressão dos receptores de células NK humanas. As células mononucleares dos pacientes portadores de NMP e dos controles foram marcadas com os anticorpos humanos anti-CD19, CD16, CD56, CD45, CD3 para quantificação de células NK e com os anticorpos anti-NKG2D, NKp46, NKG2A e KIR2DL para a avaliação da expressão dos receptores. As células NK humanas foram identificadas selecionando a janela de linfócitos (FSC de baixa intensidade e CD45 de alta intensidade de expressão) seguida das células negativas para o CD19 e, posteriormente, CD3 negativas e CD16 ou CD56 positivas; posteriormente, foram identificadas as células NK positivas para cada receptor.

Fonte: próprio autor.

Avaliamos a expressão de dois receptores de ativação das células NK, NKG2D e NKp46, e dois de inibição, NKG2A e KIR2DL.

Para a avaliação da expressão dos receptores de ativação NKG2D e NKp46, utilizamos amostras de 17 pacientes portadores de NMP e 10 controles. Dentre os pacientes, 13 eram portadores da mutação $JAK2^{V617F}$ e 4 eram negativos. Oito (8) tiveram o diagnóstico de PV (6 com mutação $JAK2^{V617F}$ positiva e 2 negativa), 2 de TE positivos para a mutação $JAK2^{V617F}$ e 7 de MFP (5 positivos para a mutação $JAK2^{V617F}$ e 2 negativos). A análise do receptor NKG2D não evidenciou diferença de expressão entre os portadores de NMP e os controles (19% e 39,3%, respectivamente; $p>0,05$). Analisando os pacientes por diagnóstico, houve menor expressão deste receptor nos portadores de PV em relação aos controles (controles= 39,3%; PV= 16,6%; $p<0,05$), e essa redução se confirmou no subgrupo positivo para a mutação $JAK2^{V617F}$ (controles= 39,3%; PV $JAK2^{V617F}$ positivo= 10,4%; $p<0,01$). Não houve diferença na expressão do receptor NKG2D nos portadores de TE e MFP em relação aos controles (controles= 39,3%; TE= 43,7%; MFP= 33,6%; $p>0,05$) como pode ser visto na Figura 24.

Figura 24. Análise de expressão do receptor NKG2D em pacientes com NMP e controles. Comparação da expressão do receptor NKG2D entre os portadores de NMP e os controles (A) e dos pacientes separados pela presença ou não da mutação $JAK2$ (B). Comparação da expressão do receptor NKG2D entre os portadores de PV e os controles (C) e dos pacientes com PV separados pela presença ou não da mutação $JAK2$ (D). Comparação da expressão do receptor NKG2D entre os portadores de TE (E) e MFP (F) em relação aos controles. Para as comparações utilizamos o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*.

Fonte: próprio autor.

Com relação à análise do receptor NKp46, observamos redução da expressão nos portadores de NMP em relação aos controles (37,4% versus 57,4%; $p<0,05$). Analisando os pacientes pelo *status* mutacional, o grupo portador de NMP positivo para a mutação $JAK2^{V617F}$ apresentou menor expressão do receptor NKp46 em comparação aos controles (controles= 57,4%; NMP $JAK2^{V617F}$ positivos= 37,4%; NMP $JAK2^{V617F}$ negativos= 38,1%; $p<0,01$). Analisando os pacientes por diagnóstico, houve menor expressão deste receptor nos portadores de MFP em relação aos controles (controles= 57,4%; MFP= 32,1%; $p<0,05$), e essa redução se confirma no subgrupo positivo para a mutação $JAK2^{V617F}$ (controles= 57,4%; MFP $JAK2^{V617F}$ positivo= 32,1%; $p<0,05$). Não houve diferença na expressão do receptor NKp46 nos portadores de PV e TE em relação aos controles (controles= 57,4%; PV= 40,7%; TE= 53,1%; $p>0,05$) (Figura 25).

Figura 25. Análise de expressão do receptor NKp46 em pacientes com NMP e controles. Comparação da expressão do receptor NKp46 entre os portadores de NMP e os controles (A) e dos pacientes separados pela presença ou não da mutação $JAK2$ (B). Comparação da expressão do receptor NKp46 entre os portadores de MFP e os controles (C) e dos pacientes com MFP separados pela presença ou não da mutação $JAK2$ (D). Comparação da expressão do receptor NKp46 entre os portadores de PV (E) e TE (F) em relação aos controles. Para as comparações utilizamos o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Fonte: próprio autor.

Para a avaliação da expressão do receptor de inibição NKG2A utilizamos amostras de 23 pacientes com NMP e 19 controles. Dentre os pacientes, 17 eram portadores da mutação $JAK2^{V617F}$ e 6 eram negativos. Onze (11) tiveram o diagnóstico de PV (9 com mutação $JAK2^{V617F}$ positiva e 2 negativa), 5 de TE (3 positivos para a

mutação $JAK2^{V617F}$ e 2 negativos) e 7 de MFP (5 positivos para a mutação $JAK2^{V617F}$ e 2 negativos). A análise do receptor NKG2A não evidenciou diferença de expressão entre os portadores de NMP e os controles (73,3% e 74,8%, respectivamente; $p>0,05$). Analisando os pacientes por diagnóstico, houve menor expressão deste receptor nos portadores de TE em relação aos controles (controles= 74,8%; TE= 60,2%; $p<0,05$), e essa redução se confirma no subgrupo negativo para a mutação $JAK2^{V617F}$ (controles= 74,8%; TE $JAK2^{V617F}$ positivo= 68,1%; TE $JAK2^{V617F}$ negativo= 39,2%; $p<0,05$). Não houve diferença na expressão do receptor NKG2A nos portadores de PV e MFP em relação aos controles (controles= 74,8%; PV= 80,3%; MFP= 81,4%; $p>0,05$) como pode ser visto na Figura 26.

Figura 26. Análise de expressão do receptor NKG2A em pacientes com NMP e controles. Comparação da expressão do receptor NKG2A entre os portadores de NMP e os controles (A) e dos pacientes separados pela presença ou não da mutação $JAK2$ (B). Comparação da expressão do receptor NKG2A entre os portadores de TE e os controles (C) e dos pacientes com TE separados pela presença ou não da mutação $JAK2$ (D). Comparação da expressão do receptor NKG2A entre os portadores de PV (E) e MFP (F) em relação aos controles. Para as comparações utilizamos o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*.

Fonte: próprio autor.

Por fim, para a avaliação da expressão do receptor de inibição KIR2DL foram utilizadas amostras de 9 pacientes com NMP e 9 controles; destes, 7 eram portadores da mutação $JAK2^{V617F}$ e 2 eram negativos. De acordo com o diagnóstico, 6 pacientes eram portadores de PV, todos com mutação $JAK2^{V617F}$ positiva, e 3 de TE (1 positivo para a mutação $JAK2^{V617F}$ e 2 negativos). A análise do receptor

KIR2DL não evidenciou diferença de expressão entre os portadores de NMP e os controles (22,1% e 29,3%, respectivamente; $p>0,05$). Analisando os pacientes separadamente, de acordo com o diagnóstico, não houve diferença de expressão deste receptor nos portadores de PV e TE em relação aos controles (controles= 29,3%; PV= 28,5%; TE= 17,3%; $p>0,05$), como ilustra a Figura 27.

Figura 27. Análise de expressão do receptor KIR2DL em pacientes com NMP e controles. Comparação da expressão do receptor KIR2DL entre os portadores de NMP e os controles (A) e dos pacientes portadores de PV (B) e de TE (C) em relação aos controles. Para as comparações utilizamos o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*.

Fonte: próprio autor.

4.5 Análise do perfil de citocinas secretadas por células NK murinas

Conforme descrito previamente, 200.000 células NK de 4 animais (2 animais Jak2 wt/wt e 2 Jak2 wt/VF) foram obtidas por meio de *sorting*, cultivadas em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SBF e IL-2 para estímulo das células NK. Após 24 horas, o sobrenadante das células NK murinas foi coletado e utilizado para a detecção de citocinas por meio de ensaio imunoenzimático. Cada membrana de nitrocelulose do kit de detecção de citocinas foi incubada com o sobrenadante das células NK de cada animal e reveladas no aparelho Fluor Chem FC3 (*Protein Simple*, Orchard Parkway, San Jose, Califórnia, EUA) (Figura 28). A imagem foi analisada por software capaz de converter a intensidade de *pixels* das membranas em valor numérico. Por meio de uma transparência de sobreposição foi possível identificar que houve reação de quimioluminescência em dois pares de citocinas: IL-2 (pontos B23 e B24) e MIP-1 α (CCL3) (pontos D15 e D16). Não foram considerados para análise os pontos correspondentes à IL-2, já que foi uma citocina adicionada ao meio de cultura das células NK durante o experimento. Determinamos o sinal médio da densidade de pixels de cada par de pontos duplicados correspondentes à citocina MIP-1 α (CCL3) e subtraímos um sinal médio de fundo de cada ponto (*background*).

Os animais Jak2 wt/VF apresentaram média de intensidade relativa de quimioluminescência para a citocina MIP-1 α menor que os animais controle Jak2 wt/wt (Figura 29).

Figura 28. Membranas de nitrocelulose do ensaio de citocinas murinas *Mouse Cytokine Array* Panel A. Imagem obtida das 4 membranas de nitrocelulose para avaliação do perfil de citocinas secretadas pelas células NK. Os locais assinalados correspondem à reação de quimioluminescência ocorrida nos pontos correspondentes à citocina MIP-1 α (CCL3). Observamos sinal de menor intensidade nas membranas dos animais Jak2 wt/VF em relação aos animais controle Jak2 wt/wt. Os três pares de pontos periféricos em cada membrana correspondem aos pontos de referência.

Fonte: próprio autor.

Figura 29. Média de intensidade relativa de MIP-1 α nas células NK dos animais Jak2 wt/VF e controles.

Fonte: próprio autor.

4.6 Avaliação funcional das células NK murinas

A avaliação funcional das células NK murinas foi realizada pela técnica de citometria de fluxo. As células NK de um *pool* de 4 animais Jak2 wt/wt (controle) e 2 animais Jak2 wt/VF foram isoladas por *sorting* e cultivadas em RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF e IL2 (concentração de 500 U/mL) por 24 horas. Em seguida, as células-alvo (linhagem celular YAC-1) foram marcadas com o reagente CTO (*Cell Tracker OrangeTM CMTMR*, Invitrogen, Eugene, Oregon) e coincubadas com as células efetoras (NK) murinas nas razões de células-efetoras:células-alvo (CE:CA) de 1:1, 5:1 e 10:1 durante 3 horas. A estratégia de análise consistiu em identificar as células CTO⁺ e, em seguida, as células DAPI⁺, que correspondem às células YAC-1 mortas, como ilustra a Figura 30. O cálculo da porcentagem de morte celular específica para cada razão avaliada foi realizado pela seguinte fórmula:

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

A porcentagem de morte espontânea das células YAC-1 foi 62,1%. Como mostra a Tabela 6, os resultados obtidos não evidenciaram diferença na porcentagem de células CTO⁺DAPI⁺ entre as razões estudadas, tampouco entre os animais controle e os portadores da mutação *Jak2^{V617F}*.

Figura 30. Estratégia de *gating* para a análise funcional das células NK murinas. A estratégia de análise consistiu em identificar as células CTO⁺ e em seguida as células DAPI⁺, correspondentes à porcentagem de células YAC-1 mortas.

Fonte: próprio autor.

Tabela 6. Porcentagem de morte celular específica das células YAC-1 nos animais Jak2 wt/wt e Jak2 wt/VF

CE:CA	% de morte celular específica
CT 1:1	30,6
CT 5:1	37,3
CT 10:1	32,1
PV 1:1	29
PV 5:1	37,9
PV 10:1	30,9

Fonte: próprio autor.

4.7 Análise da expressão gênica das células NK murinas

A análise da expressão gênica dos genes *TGF-β*, *TNF-α*, *TLR4*, *IRAK4*, *GM-CSF*, *MyD88* e *IFN-γ* em células NK de animais Jak2 wt/wt e animais Jak2 wt/VF (n=4 por grupo) foi realizada por meio de RT-PCR em tempo real.

A expressão do gene *MyD88* foi significativamente maior nos animais portadores da mutação *Jak2*^{V617F} (média de expressão relativa=2,1) em relação aos controles ($p=0,03$). A expressão dos demais genes *TGF-β*, *TNF-α*, *TLR4*, *IRAK4*, *GM-CSF* e *IFN-γ* não mostrou ser diferente entre os dois grupos (Figura 31).

Figura 31. Média de expressão relativa dos genes *MyD88* (A), *IRAK4* (B), *TLR4* (C), *TNF-α* (D), *IFN-γ* (E) e *TGF-β* (F) em células NK de animais portadores da mutação *Jak2* (Jak2 wt/VF) e controles (Jak2 wt/wt). Para a comparação foi utilizado o teste estatístico teste-t.

Fonte: próprio autor.

5 DISCUSSÃO

As neoplasias mieloproliferativas (Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária) positivas para a mutação *JAK2*^{V617F} exibem variados quadros clínicos associados a diferentes níveis de expressão alélica da mutação. Esse dado levanta a questão de como uma única mutação seria capaz de gerar diferentes doenças e sugere que outros eventos adquiridos seriam necessários para o desenvolvimento e manutenção das NMP, tais como o papel desempenhado pelo microambiente da medula óssea e, ainda, a influência de outras células sobre os precursores hematopoéticos, determinando as diferenças na expressão fenotípica da doença. Assim, pode-se dizer que a fisiopatologia das NMP não se encontra completamente elucidada. Os efeitos da ativação de macrófagos, células dendríticas e linfócitos T mediados por citocinas NK são bem estudados; no entanto, os mecanismos pelos quais as células NK seriam capazes de regular as funções das células progenitoras hematopoéticas, de forma independente do autorreconhecimento dos antígenos HLA, permanecem ainda não explorados. Tampouco são conhecidos os potenciais efeitos das células NK no controle da célula-tronco hematopoética neoplásica ou inicializadora.

Com a finalidade de investigar a possibilidade de que disfunções imunológicas das células NK pudessem estar envolvidas na inicialização ou contribuindo para a patogênese das NMP, utilizamos um modelo murino *knockin* de expressão heterozigótica condicional da mutação *Jak2*^{V617F} bem como células primárias do sangue periférico de pacientes com diagnóstico de NMP, portadores ou não da mutação, para avaliar fenotípica e funcionalmente as células NK.

A caracterização imunofenotípica das células NK dos animais *Jak2* wt/VF por meio de análise quantitativa e de expressão de receptores foi realizada pela primeira vez neste estudo. O número absoluto de esplenócitos foi maior nos animais *Jak2* wt/VF em comparação com os animais controle. A porcentagem de células NK nos animais *Jak2* wt/VF foi menor do que a encontrada nos controles. Esse achado pode ser interpretado como uma consequência da expansão de células mieloides no baço (hematopoese extramedular), característica das NMP, que resultaria em redução relativa do componente linfóide. Com relação ao valor absoluto de células NK, em ambas as análises realizadas, não encontramos diferença quantitativa entre os dois grupos. Acreditamos que o volume esplênico aumentado nos animais *Jak2* wt/VF

comparativamente ao dos controle compense a diferença na redução percentual de células NK observada, tornando a quantidade absoluta de células NK semelhante entre os dois grupos. Também é plausível que o número pequeno de amostras analisadas com leitura de todas as células marcadas com o painel de células NK tenha dificultado a obtenção de significância estatística. De fato, o cálculo necessário para se determinar os valores absolutos (multiplicações das percentagens das *gates* de análise pelo número de células esplênicas de cada animal) pode aumentar a variabilidade dos resultados individuais e comprometer a análise estatística. Em relação à expressão de receptores das células NK, houve maior expressão do receptor inibitório NKG2A nos animais Jak2 wt/VF em comparação com os animais controle. Não houve diferença de expressão dos receptores NKG2D, Ly49H e Ly49D. Acreditamos que o número reduzido das amostras não nos permitiu obter uma significância estatística; experimentos semelhantes devem ser realizados para que conclusões mais fidedignas possam ser obtidas. De qualquer forma, o achado de menor quantidade de células NK combinado ao predomínio de um dos receptores inibitórios favorece a hipótese de que exista uma potencial disfunção NK nas NMP.

As células NK nas neoplasias hematopoéticas foram objeto de estudo de vários pesquisadores, mais marcadamente em relação à LMC. Entretanto, poucos se dedicaram a avaliar as células NK nas NMP negativas para o rearranjo t(9;22)/BCR-ABL1. No presente estudo, realizamos análise quantitativa das células NK, bem como expressão de receptores ativatórios e inibitórios em pacientes com o diagnóstico de NMP, portadores ou não da mutação *JAK2*^{V617F}, e nos controles, por meio de citometria de fluxo. Os portadores de NMP apresentaram menor número absoluto de células NK-CD16⁺ quando comparados aos controles. Ademais, a quantidade absoluta de células NK-CD16⁺ foi significativamente menor nos portadores de MFP do que nos controles e em relação aos portadores de TE e menor nos pacientes com PV em relação à TE. Gersuk e colaboradores publicaram resultados concordantes com os nossos, demonstrando redução de células NK-CD16⁺ em portadores de MFP, embora esta redução tenha sido percentual e não em valores absolutos (GERSUK et al., 1993). Estudo mais recente também evidenciou diminuição de células NK em portadores de NMP virgens de tratamento (RILEY et al., 2015).

De forma inédita, nossa avaliação se estendeu à correlação entre a quantificação das células NK e a presença da mutação *JAK2*^{V617F}, a mais frequente dentre as mutações determinadoras do fenótipo nas NMP. Os pacientes com MFP e mutação *JAK2*^{V617F} positiva apresentaram valor absoluto de células NK-CD16⁺ menor do que os controles e menor do que aqueles portadores de TE com *JAK2* mutada. Esse achado da MFP foi confirmado quando a análise foi feita por doença, separadamente, havendo menor número de células NK nos portadores de MFP positivos para a mutação *JAK2*^{V617F} em relação aos controles, achado não confirmado nos pacientes com MFP negativos para esta mutação em relação aos controles. Curiosamente, na PV, a ausência de expressão da mutação mostrou-se relacionada a menor quantidade de células NK, sugerindo que outros fatores interfiram na fisiopatologia da doença e não somente a presença da mutação *JAK2*^{V617F}. Estes dados sugerem uma desvantagem numérica das células NK nos portadores de NMP, particularmente na MFP; a presença da mutação *JAK2*^{V617F} aparentemente está relacionada à redução destas células na MFP.

Com relação à expressão dos receptores de células NK, não houve diferença de expressão do NKG2D entre os portadores de NMP e os controles; entretanto, analisando os pacientes por diagnóstico, houve menor expressão deste receptor nos portadores de PV positivos para a mutação *JAK2*^{V617F}, mas não nos portadores de TE ou MFP. Também observamos redução da expressão do receptor NKp46 nos portadores de todas as NMP analisadas conjuntamente em relação aos controles, particularmente no subgrupo portador da mutação *JAK2*^{V617F}. Houve menor expressão deste receptor nos portadores de MFP em relação aos controles, e essa redução se confirmou no subgrupo de MFP positivo para a mutação *JAK2*^{V617F}. Não houve diferença na expressão do receptor NKp46 nos portadores de PV e TE. A análise dos receptores NKG2A e KIR2DL não evidenciou diferença de expressão entre os portadores de NMP e os controles. Quando a análise foi feita por subgrupo de doença, encontrou-se apenas menor expressão de NKG2A nos portadores de TE em relação aos controles, particularmente no subgrupo negativo para a mutação *JAK2*^{V617F}, mas não houve diferenças nos portadores de PV e MFP. Conjuntamente, esses dados nos mostram que houve menor expressão de receptores de ativação (NKG2D e NKp46) na PV e na MFP *JAK2*^{V617F} positivas, reforçando a hipótese de que a redução de expressão dos receptores ativatórios das células NK favoreça uma inibição funcional destas células, especialmente na PV e na MFP.

Os achados de redução percentual e absoluta do subtipo de células NK CD56^{bright}CD16⁻ nos portadores de NMP em relação aos controles, especialmente na presença da mutação *JAK2*^{V617F} é bastante interessante visto que este é o subtipo de NK mais envolvido com a função secretória de citocinas. Assim como os demais achados de frequência das células NK, este achado foi evidente nos pacientes com PV e MFP mas não foi observado em pacientes com TE. Na MFP, além da diminuição da população CD56^{bright}CD16⁻ (secretora), também verificou-se redução na quantidade absoluta do subtipo CD56⁻CD16^{bright} (citotóxica), sugerindo que os dois defeitos poderiam contribuir para o escape da célula-tronco hematopoética à regulação NK.

Em nosso estudo, também quantificamos linfócitos totais e subtipos linfocitários B/T/T-NK em pacientes com NMP. Verificamos que a porcentagem de linfócitos totais foi menor nos pacientes com NMP em relação aos controles, independentemente da presença de mutação *JAK2*^{V617F}. Quando comparados por diagnóstico, a quantificação percentual e absoluta dos linfócitos foi menor na MFP e na PV em relação aos controles. Nos subgrupo de pacientes portadores da mutação *JAK2*^{V617F}, a porcentagem de linfócitos também foi menor na MFP e na PV em relação aos controles, enquanto no grupo não mutado essa diferença permaneceu apenas para a MFP. Analisando os valores absolutos de linfócitos, não houve diferença entre os pacientes com NMP conjuntamente e os controles. Quando comparados por diagnóstico, os portadores de MFP e de PV novamente apresentaram valores absolutos de linfócitos significativamente menores que os portadores de TE. O número absoluto de linfócitos totais foi menor nos portadores de MFP positivos para a mutação *JAK2*^{V617F} em relação aos pacientes com MFP negativos para a esta mutação e aos controles. O número absoluto de linfócitos foi menor nos portadores de TE *JAK2*^{V617F} negativos em relação aos controles. Não houve diferença no número absoluto de linfócitos entre os portadores de PV e os controles.

Identificamos ainda número maior de linfócitos T/NK, tanto em valores percentuais quanto em valores absolutos, nos portadores de NMP, independente do *status* mutacional. Por outro lado, não detectamos diferença quantitativa de linfócitos T nos pacientes portadores de NMP. Por fim, os portadores de NMP apresentaram menor número de linfócitos B em relação aos controles, tanto em valores percentuais quanto em valores absolutos. Esses dados podem indicar que não há

desvantagem numérica de linfócitos T nas NMP, corroborando a hipótese de que a inibição de células NK pode contribuir para a fisiopatologia da doença de forma independente dos linfócitos T, que também controlam sinais e processos citotóxicos direta ou indiretamente envolvidos na imunovigilância do câncer. O aumento de linfócitos T/NK pode ser reacional e, assim como a redução dos linfócitos B, merece melhor investigação futura.

Nossos resultados mostraram que as células NK de animais *Jak2*^{V617F} mutados apresentaram menor capacidade de secreção da citocina MIP-1 α em relação aos animais controle. A quimiocina *Macrophage Inflammatory Protein-1 α* (MIP-1 α), também chamada de CCL3, foi identificada em 1976 na medula óssea de camundongos por inibir a progressão do ciclo celular das células progenitoras hematopoéticas (CPH) e foi denominada “inibidor de célula-tronco”. Em 1990, foi confirmada a identidade desta proteína como sendo MIP-1 α . Esta quimiocina é produzida por várias células, particularmente macrófagos, células dendríticas e linfócitos. O MIP-1 α expressa seu efeito biológico se ligando a receptores de superfície celulares CC. Os membros da família MIP-1 são responsáveis por desencadear respostas inflamatórias agudas e crônicas por meio do recrutamento de células pró-inflamatórias. Descobriu-se que tanto o MIP-1 α humano quanto o murino são capazes de inibir a célula-tronco hematopoética, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Aparentemente, a atividade inibitória do MIP-1 α pareceu se restringir às unidades formadoras de colônias (CFU) esplênicas e *in vitro*, células progenitoras multipotentes, células progenitoras granulocíticas-macrofágicas e células progenitoras eritroides (BROXMEYER; KIM, 1999; MAURER; VON STEBUT, 2004; MENTEN; WUYTS; VAN DAMME, 2002). Nossos achados sugerem que a menor capacidade de secreção de MIP-1 α pelas células NK dos animais *Jak2* wt/VF possa favorecer os mecanismos de proliferação celular das CPH característicos da doença. O conhecimento sobre citocinas e quimiocinas pode ser utilizado em vários aspectos funcionalmente relevantes de utilidade clínica. Além disso, as quimiocinas e citocinas podem ser modificadas laboratorialmente com a finalidade de melhorar seu desempenho *in vitro* e *in vivo*.

Ainda com o objetivo de avaliar funcionalmente as células NK murinas, foi realizado ensaio de citotoxicidade das células NK sorteadas e coincubadas com células-alvo YAC-1. Não foi possível demonstrar diferença de capacidade citotóxica entre os grupos *Jak2* wt/wt e *Jak2* wt/VF, embora limitações da técnica tenham

dificultado uma análise ideal desta função. Os resultados na literatura ainda são discrepantes. Sanchez et al. (2015) não encontraram diferença na expressão do CD107a, que avalia a degranulação NK, e de perforina e granzima B, moléculas citolíticas, entre portadores de PV e controles (SANCHEZ, C.; BAIER; et al., 2015). Por outro lado, Schönberg et al. (2015) demonstraram atividade citotóxica reduzida das células NK em pacientes com NMP (SCHÖNBERG et al., 2015).

De forma geral, em comparação aos nossos achados, alguns estudos prévios são conflitantes, o que se deve provavelmente às diferentes metodologias de análise e estratificação deste grupo de pacientes. A própria mudança recente na Classificação da Organização Mundial de Saúde pode justificar diferenças entre nossos resultados e as poucas evidências de que linfócitos do tipo NK possam participar da fisiopatologia das NMP. Por exemplo, alguns estudos observaram aumento na porcentagem de células NK na PV, mas valores absolutos semelhantes, o que difere de nossos achados; outros não mostraram diferença de expressão dos receptores de ativação e de inibição das células NK nem tampouco de citotoxicidade; e o número absoluto de linfócitos totais foi semelhante entre a PV e os controles, mas houve redução dos valores percentuais e absolutos dos linfócitos B e T (SANCHEZ, C.; BAIER; et al., 2015; SANCHEZ, C.; LE TREUT; et al., 2015).

Finalmente, com a finalidade de avaliar a expressão gênica de alvos relacionados à função das células NK, realizamos PCR em Tempo Real das células NK sorteadas dos animais Jak2 wt/wt e Jak2 wt/VF para os genes *TGF-β*, *TNF-α*, *TLR4*, *IRAK4*, *GM-CSF*, *MyD88* e *IFN-γ*, os quais correspondem aos genes de importantes citocinas e moléculas sinalizadoras envolvidas na regulação da célula-tronco e também secretadas por células NK. Encontramos expressão significativamente aumentada do gene *MyD88* nos animais mutados em relação aos controles ($p=0,03$). *MyD88* (do inglês *Myeloid Differentiation primary-response protein 88*) é uma molécula adaptadora que media a sinalização de receptores do tipo Toll (TLR, *Toll-Like Receptors*) desencadeando respostas pró-inflamatórias (AKIRA; TAKEDA, 2004; LEE; KANG; CHOI, 2017; LIM et al., 2015; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003). Sabe-se que os TLR são expressos por células hematopoéticas maduras do sangue periférico humano e que a ligação destes receptores aos seus ligantes desencadeia um processo de diferenciação celular como resposta à infecção por diversos patógenos. Entretanto, a sinalização via *MyD88* nem sempre causa inflamação. Mais recentemente, observou-se que as CTH

normais expressam TLR e que a sinalização intracelular por estes desencadeada pode participar do controle das principais funções das CTH, tais como quiescência, autorrenovação e diferenciação. Agudamente, o estímulo dessa via de sinalização (TLR4/MyD88) é conhecido por desencadear inflamação e diferenciação necessária à resposta imune (NAGAI et al., 2006); mas o estímulo crônico pode levar à exaustão da célula-tronco hematopoética, prejudicando sua função (ESPLIN et al., 2011). O achado de aumento de expressão desse mediador pode sugerir participação dessa via no controle funcional da célula-tronco neoplásica. Os experimentos aqui realizados não permitem concluir além dessa conjectura, mas sugerem que este seja um alvo potencial de regulação entre células NK e células-tronco hematopoéticas.

Nossos resultados sugerem haver uma desregulação do número e sinalização das células NK nas NMP. Consideramos que este trabalho poderá permitir uma maior compreensão sobre a fisiopatologia das NMP bem como favorecer a elucidação de novos alvos terapêuticos.

6 CONCLUSÕES

6.1. Utilizamos pela primeira vez na Instituição um modelo murino *knockin* de expressão heterozigótica condicional da mutação $Jak2^{V617F}$ para avaliar fenotípica e funcionalmente as células NK.

6.2. A porcentagem de células NK nos animais $Jak2$ wt/VF foi menor quando comparada à dos animais controle.

6.3. Houve maior expressão do receptor inibitório NKG2A nos animais $Jak2$ wt/VF em comparação com os animais controle. A expressão dos demais receptores das células NK (NKG2D, Ly49H e Ly49D) não diferiu significativamente dos animais controle.

6.4. Na análise imunofenotípica humana, os portadores de NMP apresentaram número absoluto de células NK-CD16⁺ reduzido em relação aos controles; o número de células NK-CD16⁺ foi menor na MFP em relação aos controles e à TE; pacientes com TE apresentaram quantidades de células NK-CD16⁺ significativamente maiores do que aqueles com PV ou MFP; a quantidade de NK-CD16⁺ foi menor nos portadores de MFP positivos para a mutação $JAK2^{V617F}$ e nos portadores de PV negativos para esta mutação.

6.5. Encontramos expressão significativamente menor do receptor de ativação NKG2D nos portadores de PV positivos para a mutação $JAK2^{V617F}$ em relação aos controles. Houve menor expressão do receptor de ativação NKp46 nas células NK-CD16⁺, particularmente no subgrupo portador da mutação $JAK2^{V617F}$, e menor expressão deste receptor nos portadores de MFP positivos para a mutação $JAK2^{V617F}$. Observamos menor expressão do receptor NKG2A nos portadores de TE em relação aos controles, particularmente no subgrupo negativo para a mutação $JAK2^{V617F}$.

6.6. Detectamos quantificação percentual de linfócitos reduzida nos pacientes com NMP em relação aos controles, independentemente da mutação $JAK2^{V617F}$. A porcentagem de linfócitos totais foi significativamente menor nos portadores de MFP, independente da mutação $JAK2^{V617F}$. A porcentagem de linfócitos foi menor nos portadores de PV positivos para a mutação $JAK2^{V617F}$. Observamos número absoluto de linfócitos reduzido nos portadores de MFP $JAK2^{V617F}$ positivos e de TE $JAK2^{V617F}$ negativos. Com relação aos subtipos de linfócitos, encontramos número maior de

linfócitos T/NK, tanto em valores percentuais quanto em valores absolutos, nos portadores de NMP, independente da presença da mutação *JAK2*^{V617F}.

6.7. Encontramos redução percentual e absoluta do subtipo de células NK CD56^{bright}CD16⁻ nos portadores de NMP em relação aos controles, especialmente na presença da mutação *JAK2*^{V617F}, nos pacientes com PV e MFP. Verificamos redução na quantidade absoluta do subtipo CD56⁻CD16^{bright} nos portadores de MFP.

6.8. As células NK dos animais Jak2-mutados apresentaram menor capacidade de secreção da citocina MIP-1α em relação aos animais controle.

6.9. Não houve diferença de capacidade citotóxica entre os grupos Jak2 wt/wt e Jak2 wt/VF, embora limitações da técnica tenham dificultado uma análise ideal desta função.

6.10. Encontramos expressão significativamente aumentada do gene *MyD-88* nos animais mutados em relação aos controles.

Em conjunto, nossos achados sugerem que alterações quantitativas e de expressão de receptores das células NK, bem como produção e secreção da citocina MIP-1α e hiperexpressão do gene *MyD88* estejam relacionados com a efetividade antineoplásica destas células nas neoplasias mieloproliferativas. É plausível que o papel das células NK nas NMP seja distinto a depender da doença em questão e da presença da mutação da *JAK2*^{V617F}. Embora não tenhamos detectado deficiência de citotoxicidade com os métodos aqui empregados, não se pode excluir que a frequência diminuída de células NK, em particular dos subtipos secretores de citocinas, possa contribuir para regulação anômala das células-tronco iniciadoras desse grupo de neoplasias. Estudos complementares devem ser encorajados para elucidar os mecanismos de desregulação das células NK nestas neoplasias. Por fim, acreditamos que o reestabelecimento da função regulatória normal das células NK possa consistir em estratégia terapêutica futura mais efetiva para o tratamento das neoplasias mieloproliferativas, em combinação com outras modalidades terapêuticas.

REFERÊNCIAS

ARBER, D.A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-405, May 2016.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 499-511, Jul 2004.

BACHER, U. et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells remain of recipient origin after allogeneic SCT and do not harbor the JAK2V617F mutation in patients with myelofibrosis. **Clin Exp Med**, v. 10, n. 3, p. 205-8, Sep 2010.

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.

BARBUI, T. et al. Rationale for revision and proposed changes of the WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. **Blood Cancer J**, v. 5, n. 8, e337, Aug 2015.

BAXTER, E. J. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet**, v. 365, n. 9464, p. 1054-61, Mar 19-25 2005.

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.

BOGANI, C. et al. B-, T-, and NK-cell lineage involvement in JAK2V617F-positive patients with idiopathic myelofibrosis. **Haematologica**, v. 92, n. 2, p. 258-9, Feb 2007.

BRANDAU, S. et al. NK cells are essential for effective BCG immunotherapy. **Int J Cancer**, v. 92, n. 5, p. 697-702, Jun 01 2001.

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 19 1998.

BROXMEYER, H. E.; KIM, C. H. Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. **Exp Hematol**, v. 27, n. 7, p. 1113-23, Jul 1999.

BRUNSTEIN, C. G. et al. Negative effect of KIR alloreactivity in recipients of umbilical cord blood transplant depends on transplantation conditioning intensity. **Blood**, v. 113, n. 22, p. 5628-34, May 28 2009.

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.

CAMPBELL, P. J. et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. **Lancet**, v. 366, n. 9501, p. 1945-53, Dec 03 2005.

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.

CERVANTES, F. et al. Autologous activated natural killer cells suppress primitive chronic myelogenous leukemia progenitors in long-term culture. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2476-85, Mar 15 1996.

CHEN, C. I. et al. NK cells are dysfunctional in human chronic myelogenous leukemia before and on imatinib treatment and in BCR-ABL-positive mice. **Leukemia**, v. 26, n. 3, p. 465-74, Mar 2012.

COLOMBO, M. P.; TRINCHIERI, G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 13, n. 2, p. 155-68, Apr 2002.

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

DAVIES, S. M. et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. **Blood**, v. 100, n. 10, p. 3825-7, Nov 15 2002.

DEGLI-ESPOSTI, M. A.; SMYTH, M. J. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 2, p. 112-24, Feb 2005.

DELHOMMEAU, F. et al. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. **Blood**, v. 109, n. 1, p. 71-7, Jan 01 2007.

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.

ESPLIN, B.L. et al. Chronic exposure to a TLR ligand injures hematopoietic stem cells. **J Immunol**, v. 186, n. 9, p. 5367-75, May 01 2011.

EL-GAZZAR, A. et al. Effects on tumor development and metastatic dissemination by the NKG2D lymphocyte receptor expressed on cancer cells. **Oncogene**, v. 33, n. 41, p. 4932-40, Oct 09 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.

FEHNIGER, T. A.; COOPER, M. A.; CALIGIURI, M. A. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 13, n. 2, p. 169-83, Apr 2002.

FLAVELL, R. A. et al. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 8, p. 554-67, Aug 2010.

FROOM, P. et al. Decreased natural killer (NK) activity in patients with myeloproliferative disorders. **Cancer**, v. 64, n. 5, p. 1038-40, Sep 01 1989.

FRUCHTMAN, S. M. et al. From efficacy to safety: a Polycythemia Vera Study group report on hydroxyurea in patients with polycythemia vera. **Semin Hematol**, v. 34, n. 1, p. 17-23, Jan 1997.

FUJII, H. et al. In vivo control of acute lymphoblastic leukemia by immunostimulatory CpG oligonucleotides. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2008-13, Mar 01 2007.

GARCON, L. et al. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. **Blood**, v. 108, n. 5, p. 1551-4, Sep 01 2006.

GARRIDO, F. et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. **Immunol Today**, v. 18, n. 2, p. 89-95, Feb 1997.

GERSUK, G. M. et al. Quantitative and functional studies of impaired natural killer (NK) cells in patients with myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera. I. A potential role for platelet-derived growth factor in defective NK cytotoxicity. **Nat Immun**, v. 12, n. 3, p. 136-51, May-Jun 1993.

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.

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

GUERRA, N. et al. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 571-80, Apr 2008.

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

HAYAKAWA, Y.; SMYTH, M. J. Innate immune recognition and suppression of tumors. **Adv Cancer Res**, v. 95, p. 293-322, 2006.

HAYASHI, T. et al. Molecular mechanisms whereby immunomodulatory drugs activate natural killer cells: clinical application. **Br J Haematol**, v. 128, n. 2, p. 192-203, Jan 2005.

HEINE, A.; BROSSART, P.; WOLF, D. Ruxolitinib is a potent immunosuppressive compound: is it time for anti-infective prophylaxis? **Blood**, v. 122, n. 23, p. 3843-4, Nov 28 2013.

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.

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.

IMAGAWA, J. et al. Discontinuation of dasatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained deep molecular response for longer than 1 year (DADI trial): a multicentre phase 2 trial. **Lancet Haematol**, v. 2, n. 12, p. e528-35, Dec 2015.

JAMES, C. et al. Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. **Leukemia**, v. 20, n. 2, p. 350-3, Feb 2006.

JAMIESON, C. H. et al. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 16, p. 6224-9, Apr 18 2006.

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.

KIJIMA, M.; GARDIOL, N.; HELD, W. Natural killer cell mediated missing-self recognition can protect mice from primary chronic myeloid leukemia in vivo. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27639, 2011.

KLAMPFL, T. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. **N Engl J Med**, v. 369, n. 25, p. 2379-90, Dec 19 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.

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.

LAKSO, M. et al. Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 12, p. 5860-5, Jun 11 1996.

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.

LARSEN, T. S. et al. The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. **Br J Haematol**, v. 136, n. 5, p. 745-51, Mar 2007.

LEE, Y. K.; KANG, M.; CHOI, E. Y. TLR/MyD88-mediated Innate Immunity in Intestinal Graft-versus-Host Disease. **Immune Netw**, v. 17, n. 3, p. 144-151, Jun 2017.

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.

LIM, J. Y. et al. Attenuation of Hepatic Graft-versus-host Disease in Allogeneic Recipients of MyD88-deficient Donor Bone Marrow. **Immune Netw**, v. 15, n. 3, p. 125-34, Jun 2015.

LINK, B. K. et al. Oligodeoxynucleotide CpG 7909 delivered as intravenous infusion demonstrates immunologic modulation in patients with previously treated non-Hodgkin lymphoma. **J Immunother**, v. 29, n. 5, p. 558-68, Sep-Oct 2006.

LIU, R. B. et al. Densely granulated murine NK cells eradicate large solid tumors. **Cancer Res**, v. 72, n. 8, p. 1964-74, Apr 15 2012.

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.

LONG E.O. et al. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 227-58, 2013.

LOPEZ-SOTO, A. et al. NKG2D signaling in cancer immunosurveillance. **Int J Cancer**, v. 136, n. 8, p. 1741-50, Apr 15 2015.

MAMESSIER, E.; BOURGIN, C.; OLIVE, D. When breast cancer cells start to fend the educational process of NK cells off. **Oncoimmunology**, v. 2, n. 12, p. e26688, Dec 01 2013.

MAMESSIER, E. et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. **J Clin Invest**, v. 121, n. 9, p. 3609-22, Sep 2011.

MANSHOURI, T. et al. Bone marrow stroma-secreted cytokines protect JAK2(V617F)-mutated cells from the effects of a JAK2 inhibitor. **Cancer Res**, v. 71, n. 11, p. 3831-40, Jun 01 2011.

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.

MARTIN-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.

MAURER, M.; VON STEBUT, E. Macrophage inflammatory protein-1. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 10, p. 1882-6, Oct 2004.

MEDYOUNG, H. The microenvironment in human myeloid malignancies: emerging concepts and therapeutic implications. **Blood**, v. 129, n. 12, p. 1617-1626, Mar 23 2017.

MENTEN, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J. Macrophage inflammatory protein-1. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 13, n. 6, p. 455-81, Dec 2002.

MERCIER, F. et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells of patients with myeloproliferative disorders do not carry the JAK2-V617F mutation. **Exp Hematol**, v. 37, n. 3, p. 416-20, Mar 2009.

MILLER, J. S. et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. **Blood**, v. 105, n. 8, p. 3051-7, Apr 15 2005.

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, Jan-Feb 2003.

MORETTA, A. et al. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. **Annu Rev Immunol**, v. 14, p. 619-48, 1996.

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.

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 28 2004.

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.

MULLALLY, A. et al. Physiological Jak2V617F expression causes a lethal myeloproliferative neoplasm with differential effects on hematopoietic stem and progenitor cells. **Cancer Cell**, v. 17, n. 6, p. 584-96, Jun 15 2010.

NAGAI, Y. et al. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. **Immunity**, v. 24, n. 6, p. 801-12, Jun 2006.

NANGALIA, J. et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. **N Engl J Med**, v. 369, n. 25, p. 2391-405, Dec 19 2013.

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.

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

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

PLATONOVA, S. et al. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. **Cancer Res**, v. 71, n. 16, p. 5412-22, Aug 15 2011.

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.

REA, D. et al. Natural killer cell counts are associated with molecular relapse-free survival after imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia: the IMMUNOSTIM study. **Haematologica**, May 18 2017.

RILEY, C. H. et al. Expansion of circulating CD56bright natural killer cells in patients with JAK2-positive chronic myeloproliferative neoplasms during treatment with interferon-alpha. **Eur J Haematol**, v. 94, n. 3, p. 227-34, Mar 2015.

ROLLISON, D. E. et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. **Blood**, v. 112, n. 1, p. 45-52, Jul 01 2008.

ROSENBERG, S. A. Interleukin-2 and the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. **Cancer J Sci Am**, v. 6 Suppl 1, p. S2-7, Feb 2000.

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.

RUGGERI, L. et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, v. 94, n. 1, p. 333-9, Jul 01 1999.

SANCHEZ, C. et al. Natural killer cells in patients with polycythemia vera. **Hum Immunol**, v. 76, n. 9, p. 644-50, Sep 2015.

SANCHEZ, C. et al. Distribution of lymphocyte subpopulations in patients with polycythemia vera. **Hum Immunol**, v. 76, n. 6, p. 414-6, Jun 2015.

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.

SAVANI, B. N. et al. Factors associated with early molecular remission after T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 107, n. 4, p. 1688-95, Feb 15 2006.

SCHEPERS, K.; CAMPBELL, T.; PASSEGUÉ, E. Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. **Cell Stem Cell**, v. 16, n. 3, p. 254-267, Mar 05 2015.

SCHMITT-GRAEFF, A. H.; NITSCHKE, R.; ZEISER R. The hematopoietic niche in myeloproliferative neoplasms. **Mediators Inflamm**, v. 2015, 2015.

SCHONBERG, K. et al. JAK Inhibition Impairs NK Cell Function in Myeloproliferative Neoplasms. **Cancer Res**, v. 75, n. 11, p. 2187-99, Jun 01 2015.

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.

SEKE ETET, P. F. et al. Normal hematopoiesis and hematologic malignancies: role of canonical Wnt signaling pathway and stromal microenvironment. **Biochim Biophys Acta**, v. 1835, n. 1, p. 1-10, 2013.

SOCOLOVSKY, M. et al. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. **Cell**, v. 98, n. 2, p. 181-91, Jul 23 1999.

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.

SPIVAK, J. L. Myeloproliferative Neoplasms. **N Engl J Med**, v. 376, n. 22, p. 2168-2181, Jun 01 2017.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 335-76, 2003.

TEFFERI, A. JAK inhibitors for myeloproliferative neoplasms: clarifying facts from myths. **Blood**, v. 119, n. 12, p. 2721-30, Mar 22 2012.

TEFFERI, A. Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. **Am J Hematol**, v. 91, n. 1, p. 50-8, Jan 2016.

TEFFERI, A.; BARBUI, T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. **Am J Hematol**, v. 90, n. 2, p. 162-73, Feb 2015.

TEFFERI, A. et al. The JAK2(V617F) tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. **Br J Haematol**, v. 131, n. 3, p. 320-8, Nov 2005.

TITMARSH, G. J. et al. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. **Am J Hematol**, v. 89, n. 6, p. 581-587, 2014.

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

TU, M. M. et al. Ly49 family receptors are required for cancer immunosurveillance mediated by natural killer cells. **Cancer Res**, v. 74, n. 14, p. 3684-94, Jul 15 2014.

VAKIL, E.; TEFFERI, A. BCR-ABL1--negative myeloproliferative neoplasms: a review of molecular biology, diagnosis, and treatment. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 11 Suppl 1, p. S37-45, Jun 2011.

VANNUCCHI, A. M. et al. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. **N Engl J Med**, v. 372, n. 5, p. 426-35, Jan 29 2015.

VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937-51, Jul 30 2009.

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.

WALZER, T. et al. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2252-8, Oct 01 2005.

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.

WU, J.; LANIER, L. L. Natural killer cells and cancer. **Adv Cancer Res**, v. 90, p. 127-56, 2003.

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.

YONG, A. S. et al. Primitive quiescent CD34+ cells in chronic myeloid leukemia are targeted by in vitro expanded natural killer cells, which are functionally enhanced by bortezomib. **Blood**, v. 113, n. 4, p. 875-82, Jan 22 2009.

ZHAO, R. et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. **J Biol Chem**, v. 280, n. 24, p. 22788-92, Jun 17 2005.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Humanos

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 070/2015, sobre o projeto intitulado “*Caracterização do papel das células natural killer nas neoplasias mieloproliferativas*”, 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 14 de dezembro de 2015.

We certify that the protocol nº 070/2015, entitled “*The role of the natural killers cells in the myeloproliferative neoplasms*”, 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 12/14/2015.

Ribeirão Preto, 14 de dezembro de 2015.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente 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 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Pacientes)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULOwww.hcrp.fmrp.usp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: “Caracterização das células Natural Killer nas Neoplasias Mieloproliferativas associadas à Muta da JAK2V617F”

*Institui: Divis de Hematologia / Departamento de Clnica Mdica
Hospital das Clnicas da Faculdade de Medicina de Ribeiro Preto - USP*

Investigadores: Adriana Queiroz Arantes, Cristina Tavares Leal, Leonardo Carvalho Palma, Belinda Pinto Simes, Eduardo Magalhes Rego, Lorena Lobo de Figueiredo Pontes.

Atravs deste documento, solicitamos sua autoriza para fazer parte de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar o papel das clulas chamadas *Natural Killer* (clulas normais que atuam como vigilantes do nosso sistema imunolgico contra o aparecimento de tumores) na origem da sua doena (Doena Mieloproliferativa Crnica). Acreditamos que a fun destas clulas esteja alterada neste grupo de doenas e, se isso for confirmado, podemos pensar no futuro em tratamentos que recuperem a fun destas clulas.

Para participar do estudo, necessrio que uma parte da amostra do seu sangue (4-8 mL), colhida para os exames necessrios ao seu diagnstico ou acompanhamento, seja utilizada para os experimentos da pesquisa. Reiteramos que a amostra do seu sangue ser utilizada apenas para esta pesquisa.

Esta doa totalmente voluntria e ser realizada no dia em que voc for realizar o exame j indicado pelo seu mdico e, portanto, n haver ressarcimentos em rela ao seu transporte ou alimenta. Os potenciais riscos e complica desta doa esto relacionados coleta do sangue perifrico j indicada pelo seu mdico e incluem: mal-estar, leve desconforto e/ou dor pela picada da agulha, forma de hematoma no local da coleta e, mais raramente, pun acidental de uma artria, possibilidade de desenvolvimento de um processo infeccioso no local da venopun e les de algum nervo. A equipe assistente e de pesquisa fornecer o atendimento mdico necessrio caso alguma les complica ocorra decorrente da coleta da amostra.

As informa obtidas por este trabalho poder auxiliar no melhor entendimento da origem e resposta da sua doena aos tratamentos disponveis e contribuir para a descoberta de novas op teraputicas para as Doenas Mieloproliferativas Crnicas. O senhor(a) n ter nenhum benefcio imediato por participar do estudo e pode recusar-se a participar da pesquisa ou mesmo retirar o seu consentimento em qualquer fase da mesma, sem penaliza alguma e sem prejuzo ao seu cuidado e tratamento.

Vale ressaltar ainda que os dados obtidos nessa pesquisa sero mantidos em sigilo e usados apenas para este fim, e se, aps a leitura destas informa, o(a) senhor(a) autorizar o seu uso, assinando este termo de consentimento.

Uma via do presente termo assinada e rubricada em todas as pginas pelo Senhor(a) e pelo pesquisador ser fornecida ao Senhor(a), e se houver alguma dvida sobre a pesquisa ou sobre sua

permanência na mesma, poderá entrar em contato com os investigadores pelo telefone (16) 3602-2294. Para dúvidas éticas, contato do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP pelo telefone (16) 3602-2228.

Após ter recebido as informações sobre a participação no estudo, concordo em ceder parte do material colhido para o acompanhamento laboratorial da minha doença para a pesquisa acima.

Assinatura do participante ou responsável legal

Data

Nome do participante ou responsável legal

Assinatura do investigador

Data

Nome do investigador

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Controles)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: “Caracterização das células Natural Killer nas Neoplasias Mieloproliferativas associadas à Mutações da JAK2V617F”

*Instituição: Divisão de Hematologia / Departamento de Clínica Médica
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP*

Investigadores: Adriana Queiroz Arantes, Cristina Tavares Leal, Leonardo Carvalho Palma, Belinda Pinto Simões, Eduardo Magalhães Rego, Lorena Lobo de Figueiredo Pontes.

Através deste documento, solicitamos sua autorização para fazer parte de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar o papel das células chamadas *Natural Killer* (células normais que atuam como vigilantes do nosso sistema imunológico contra o aparecimento de tumores) na origem de uma doença (Doença Mieloproliferativa Crônica). Acreditamos que a função destas células esteja alterada neste grupo de doenças e, se isso for confirmado, podemos pensar no futuro em tratamentos que recuperem a função destas células.

Para comparação com as amostras de indivíduos portadores dessa doença, precisamos de amostras de sangue periférico normal, motivo pelo qual estamos solicitando a sua colaboração. Para participar do estudo, é necessário que você concorde em doar uma amostra de sangue (4-8 mL) para os experimentos da pesquisa. Reiteramos que a amostra do seu sangue será utilizada apenas para esta pesquisa.

A doação deste material para a pesquisa é totalmente voluntária. Não haverá ressarcimento financeiro, pois a participação não implica em nenhum procedimento ou comparecimento extra ao hospital. Os potenciais riscos e complicações desta doação estão relacionados à coleta do sangue periférico e incluem: mal-estar, leve desconforto e/ou dor pela picada da agulha, formação de hematoma no local da coleta e, mais raramente, punção acidental de uma artéria, possibilidade de desenvolvimento de um processo infeccioso no local da venopunção e lesão de algum nervo. A equipe assistente e de pesquisa fornecerá o atendimento médico necessário caso alguma lesão ou complicação ocorra decorrente da coleta da amostra.

O senhor (a) não terá nenhum benefício imediato por participar do estudo e pode recusar-se a participar da pesquisa ou mesmo retirar o seu consentimento em qualquer fase da mesma, sem penalização alguma. Vale ressaltar ainda que os dados obtidos nessa pesquisa serão mantidos em sigilo e usados apenas para este fim, e se, após a leitura destas informações, o(a) senhor(a) autorizar o seu uso, assinando este termo de consentimento.

As informações obtidas por este trabalho poderão auxiliar no melhor entendimento da origem das neoplasias mieloproliferativas e contribuir para a descoberta de novas opções terapêuticas.

Uma via do presente termo assinada e rubricada em todas as páginas pelo Senhor(a) e pelo pesquisador será fornecida ao Senhor(a), e se houver alguma dúvida sobre a pesquisa ou sobre sua permanência na mesma, poderá entrar em contato com os investigadores pelo telefone (16) 3602-

2294. Para dúvidas éticas, contato do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP pelo telefone (16) 3602-2228.

Após ter recebido as informações sobre a participação no estudo, concordo em ceder amostra de sangue para a pesquisa acima.

Assinatura do participante ou responsável legal

Data

Nome do participante ou responsável legal

Assinatura do investigador

Data

Nome do investigador

ANEXO D - Parecer do Comitê de Ética em Animais

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 20 de julho de 2016

Ofício nº 2499/2016
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS NATURAL KILLER NAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS” – Versão 3, de 09/07/2016**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 432ª Reunião Ordinária, realizada em 18/07/2016 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – SP – Normal – Versão 3, de 09/07/2016 e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – NMP – Versão 3, de 09/07/2016, de acordo com o Processo HCRP nº 390/2015.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^a. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
LORENA LOBO DE FIGUEIREDO PONTES
ADRIANA QUEIROZ ARANTES (Orientanda)
Depto. de Clínica Médica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP

FWA-00002733; IRB-00002186 e

Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440

(016) 3602-2228

cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br