



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

AMANDA FERNANDES DE OLIVEIRA COSTA

Caracterização fenotípica e funcional de células *natural killer* no diagnóstico e avaliação pós-tratamento de leucemia mieloide aguda

Phenotypic and functional characterization of natural killer cells at diagnosis and post treatment evaluation of acute myeloid leukemia

RIBEIRÃO PRETO

2022

AMANDA FERNANDES DE OLIVEIRA COSTA

Caracterização fenotípica e funcional de células *natural killer* no diagnóstico e avaliação pós-tratamento de leucemia mieloide aguda

Phenotypic and functional characterization of natural killer cells at diagnosis and post-treatment evaluation of acute myeloid leukemia

Versão Simplificada

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Célula-Tronco e Terapia Celular.

Thesis presented to Ribeirão Preto Medical School at the University of São Paulo, as part of the requirements to obtain the title of Doctor in Philosophy by the Graduate Program in Clinical Oncology, Stem Cells, and Cell Therapy

Orientadora: Prof^a Dr^a Lorena Lobo de Figueiredo Pontes

RIBEIRÃO PRETO

2022

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

Costa, Amanda Fernandes de Oliveira

Caracterização fenotípica e funcional de células *Natural Killer* no diagnóstico e avaliação pós-tratamento de leucemia mieloide aguda – Ribeirão Preto, 2022.

121p

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Programa de Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia de Ribeirão Preto/USP.

Orientador: Figueiredo-Pontes, Lorena Lobo de

1. Leucemia Mieloide Aguda. 2. Células *Natural Killer*. 3. Células-tronco leucêmicas. 4. Citometria de Fluxo Multiparamétrica.

Amanda Fernandes de Oliveira Costa

Caracterização fenotípica e funcional de células natural killer no diagnóstico e avaliação pós-tratamento de leucemia mieloide aguda

Tese 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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr^a.: Lorena Lobo de Figueiredo Pontes

Instituição: FMRP-USP

Assinatura:

Prof. Dr.: Eduardo Magalhães Rego

Instituição: FM- USP

Julgamento:

Assinatura:

Prof. Dr.: Thiago Mattar Cunha

Instituição: FMRP-USP

Julgamento:

Assinatura:

Prof. Dr: Alex Freire Sandes

Instituição: UNIFESP

Julgamento:

Assinatura:

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, **Adonis**, por todo o incentivo, a parceria e o amor partilhados nessa jornada.

A minha mãe, **Ana Emilia**, e minha avó, **Maria José**, pelo apoio e pelo amor incondicional. Vocês são as responsáveis por tudo.

Aos meus orientadores na caminhada científica, **Dulce, Lorena e Rob**, por me fazerem cientista. Com vocês eu aprendi lições que levarei por toda vida

AGRADECIMENTOS

Ao finalizar o meu mestrado, terminei a minha página de agradecimentos dizendo: “Esse é só o início” e mal sabia eu da profundidade das minhas palavras escritas naquele momento de emoção em que finalizei o primeiro estágio da vida acadêmica. Hoje, finalizando mais uma etapa da minha vida científica, continuo sentindo a mesma coisa e cada dia tenho mais certeza de que, como diz o provérbio popular: “Só os tolos sabem de tudo, os sábios aprendem algo novo todos os dias”.

A gratidão é o único tesouro dos humildes, dizia Shakespeare. E eu serei eternamente grata a Deus por ter guiado minha vida até aqui e me dado a oportunidade de continuar aprendendo todos os dias e me apresentado pessoas que engrandeceram e facilitaram a minha jornada.

Primeiramente, agradeço as duas pessoas mais importantes da minha vida, minha mãe Ana Emilia, e minha avó, Maria José. Para vocês, as palavras NUNCA serão suficientes. Vocês são responsáveis por tudo que eu sou. Muito obrigada por terem me dado um lar de amor, uma educação da qual me orgulho, princípios e valores morais. Por terem me ensinado o que é certo e errado e por me darem apoio incondicional e acreditarem em tudo que me proponho a fazer. Por serem casa onde quer que eu esteja, por serem colo e conforto, por serem base, base forte. Que sorte a minha por Deus ter me apresentado vocês como parte de mim.

Agradeço ao meu parceiro, amigo, amor e marido, Adonis. Você é fortaleza e segurança. Sem o seu incentivo, eu não estaria aqui. Te agradeço imensamente por segurar na minha mão e não soltar. Por se dispor a me seguir para qualquer lugar do mundo para que eu realize os meus sonhos, por ter suportado todos os meus momentos de ansiedade, de estresse, prazos expirando, madrugadas sem dormir, muita reclamação, choro com saudade da família, síndrome do impostor. Não foi fácil. Mas obrigada também por comemorar minhas vitórias, pequenas ou grandes, por me fazer completa e feliz. Como sempre, no sufoco e no sossego, por toda a vida.

Agradeço a Dulce Marta Schimieguel Mascarenhas Lima. A pessoa que fez eu me apaixonar pela hematologia e pela ciência. Como sempre disse, você sempre será parte de tudo que eu conquistar. Muito obrigada.

A minha orientadora, Lorena Lobo de Figueiredo Pontes, toda minha gratidão ainda é pouco. Por ter acreditado em mim desde o início, mesmo com a minha falta de experiência. Por sempre ter me escutado com seriedade, me incentivado e me dado suporte. Por ter sido parte fundamental no meu desenvolvimento científico, me deixar livre para pensar e expressar minhas ideias, mesmo no meu ritmo acelerado. Por ter confiado em mim a oportunidade mais

incrível da minha vida quando me permitiu fazer o estágio no exterior. Fico imensamente feliz de ter a certeza que ainda iremos trabalhar muito juntas e que essa parceria na vida e na ciência irá seguir em frente. Nada teria acontecido, senão por você. Obrigada.

Ao Rob, meu orientador no exterior e agora meu chefe. Você não tem ideia do quanto contribuí para que eu esteja, hoje, recebendo o título de Doutora. Provavelmente, o resultado do tempo que passei no seu laboratório me trouxe o retorno científico e pessoal mais inesperado de toda essa jornada de 4 anos e meio. Ao chegar nos EUA, eu senti medo. Medo de não me encaixar, de não ser boa o suficiente, de não dar conta. Mas logo, você, com seu jeito particular de ser, começou a me fazer pensar e ver a ciência de uma perspectiva diferente. E você não só me acolheu como parte do laboratório, mas me deu amigos de trabalho e da vida, e achando pouco, decidi me aceitar para ficar mais uns anos por aí. Thank you so much.

Sou grata aos meus colegas de laboratório. Do Brasil, Izabela e Larissa, por fazerem parte do meu dia a dia e deixarem a caminhada mais fácil. Agradeço especialmente a Leticia, que desde o início foi uma parceira importante durante todo o processo. Me ajudou, aconselhou e aprendemos a ter uma dinâmica de trabalho colaborativa e produtiva. E a mais nova integrante, Camila, que chegou e em pouco tempo já se dispôs a ajudar e dar suporte ao que precisei nessa fase final. Dos EUA, agradeço a Alana, Francesca e Paran, que em tão pouco tempo me ensinaram tanto sobre ciência e amizade e a Lera, com quem trabalhei junto na maior parte do tempo, além de ter se tornado uma verdadeira amiga, que felizmente está aqui hoje para ver esse dia acontecer.

Por último, mas não menos importante, aos meus amigos de uma vida, que acompanharam toda a minha trajetória, minhas mudanças, meus perrengues e minhas alegrias. Daiane, que sempre está lá, para o que eu precisar, não importa onde. Lucio, um amigo querido que o mestrado me deu e que está sempre presente, compartilhando momentos de alegria e os desesperos da vida acadêmica. E, Jack e Mari, vocês são amor. Serei eternamente grata por termos construído uma amizade leal e verdadeira. Vocês não têm ideia de como deixaram tudo mais fácil. Amo vocês demais. Muito obrigada.

Finalmente, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – 88887.136411/2017-00 - 465539/2014-9, a qual também dedico meus sinceros agradecimentos.

E agora... vamos encarar mais uma aventura. Continua sendo só o início de tudo.

RESUMO

Costa, AFO. Caracterização fenotípica e funcional de células *Natural Killer* no diagnóstico e avaliação pós-tratamento de leucemia mieloide aguda. 2022. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2022.

As células Natural Killer (NK) são membros da família dos linfócitos capazes de eliminar células reconhecidas como não-próprias e produzir rapidamente fatores solúveis com ações antimicrobianas ou sobre outras células do sistema imune. Sabe-se que as NK desempenham importante papel na proteção antitumoral, porém, os mecanismos ligados ao controle das neoplasias hematológicas não estão completamente elucidados. Nas leucemias mieloides agudas (LMAs), doenças clonais do tecido hematopoético com proliferação exacerbada de blastos mieloides e parada de maturação, o papel do sistema imunológico em regular a leucemogênese é pouco estudado, embora seja de grande importância. É possível que a função das células NK bem como a distribuição de seus subtipos funcionais estejam relacionadas ao controle e progressão da LMA. Estudos recentes sugerem que as células NK, em pacientes com LMA, apresentam padrão de expressão antigênica anormal, o que prejudica sua função e favorece a expansão dos blastos leucêmicos. Considerando que as células-tronco hematopoéticas (CTH) normais respondem a estímulos mediados pelas células NK, acreditamos que uma deficiência funcional dessas células contribua para expansão e resistência das células-tronco leucêmicas (CTL). Assim, no presente projeto, foi avaliada a frequência e o fenótipo das células NK e seus subtipos, na LMA, por meio de imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica (CFMP), ao diagnóstico e nos pontos de monitoramento de doença residual mensurável (DRM) no decorrer do tratamento. Os achados fenotípicos foram correlacionados às características clínicas, morfológicas e genético-moleculares da coorte de pacientes com LMA estudada. Observamos que o fenótipo das células NK na LMA está associado a um mau prognóstico, com citotoxicidade e atividade antileucêmica comprometidas, além de menores taxas de sobrevida. Fechar essas lacunas no conhecimento da evasão imune mediada por NK na LMA é de interesse significativo para possíveis intervenções terapêuticas e para o desenvolvimento de imunoterapias mediada por células NK.

Palavras-Chave: leucemia mieloide aguda; células *natural killer*; células-tronco leucêmicas, citometria de fluxo multiparamétrica.

ABSTRACT

Costa, AFO. Phenotypic and functional characterization of Natural Killer cells at diagnosis and post-treatment evaluation of acute myeloid leukemia. 2022. Thesis (Ph.D. in Health Science). Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, 2020.

Natural Killer (NK) cells are members of the lymphocyte family, which can recognize and eliminate transformed cells and rapidly produce soluble factors with antimicrobial actions or effects on other cells of the immune system. It is known that NK activity is also relevant in antitumor protection, but the mechanisms underlying the control of hematopoietic neoplasms by NK cells are not yet well elucidated. In acute myeloid leukemia (AML), a clonal disease of the hematopoietic tissue with exacerbated myeloid blast proliferation and maturation arrest, the role of the immune system in regulating hematopoiesis has rarely been addressed. Therefore, it is possible that the function of NK cells as well as the distribution of their functional subtypes could be related to the control and progression of AML. Recent studies suggest that in AML, NK cells have an abnormal pattern of antigenic expression, which impairs their function and favors the expansion of leukemic blasts. Considering that normal hematopoietic stem cells may respond to NK-mediated stimulation, we hypothesized that a functional deficiency of these cells contributes to the expansion and resistance of leukemic stem cells (LSC). Thus, in the present project, we evaluated the frequency and phenotype of NK cells and their subtypes in AML patients, by multiparametric flow cytometry, at diagnosis and measurable residual disease (MRD) follow-up and correlated it to clinical, morphological, and molecular-genetic characteristics. As result, we demonstrated that the NK cell phenotype in AML is associated with poor prognosis, with compromised cytotoxicity and anti-leukemic activity, in addition to lower survival rates. Closing these gaps in the knowledge of NK-mediated immune evasion in AML is of significant interest for potential therapeutic interventions and the development of NK cell-mediated immunotherapies.

Keywords: acute myeloid leukemia, natural killer cells, leukemic stem cells, multiparametric flow cytometry.