

## Atividade regulatória da molécula HLA-G nas leucemias da infância

*Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva*

**Abstract:** HLA-G is a major histocompatibility nonclassical class I molecule, with immunomodulatory properties. HLA-G inhibits the lytic activity of NK cells and cytotoxic T-lymphocytes, as well CD4+ T cell proliferation, induces CD8+ T cell apoptosis and differentiation of regulatory T cells. The 3' untranslated region (3'UTR) of the HLA-G gene has eight well characterized polymorphic sites, of which insertion of 14-bp at position +2961, +3142C/G and +3187A/G were associated with the magnitude of the HLA-G mRNA expression. The role of HLA-G immunomodulation has been studied in pregnancy, autoimmune disease, transplantation and cancer. We aimed to study the regulation exerted by HLA-G in childhood leukemia, by determining the HLA-G 3'UTR haplotypes, and evaluating patient's bone marrow at diagnosis and after the induction stage of therapy in terms of HLA-G mRNA expression, content of the soluble HLA-G protein, and the cytokine profile; and compare the data at diagnosis and after the induction. The presence of minimal residual disease after induction stage of the treatment protocol estimates the patient risk of relapse and adjustment of therapy. Our preliminary results showed that there were no differences on the distribution on HLA-G 3'UTR alleles among 206 children with leukemia (145 with lymphoblastic and 61 with myeloid leukemia) in relation to healthy individuals; IL-8 level was higher at diagnosis, while IL-10 and IL-1B production were higher after induction therapy. HLA-G expression is in process and might explain the relation of IL-10 increase in bone marrow. Since IL-10 induces HLA-G expression, HLA-G and IL-10 maybe involved in leukemia treatment response.

**Introdução:** O antígeno leucocitário humano G (HLA-G) é uma molécula de histocompatibilidade de classe Ib, não-clássica, pouco polimórfica em relação aos HLA clássicos, com propriedades imunomoduladoras. HLA-G inibe a atividade lítica das células NK e T citotóxicas, e a proliferação das T CD4+, também induz a apoptose de células T CD8+ e a diferenciação de células Treg. O efeito inibitório da HLA-G sob a vigilância imunológica tem sido investigada na gravidez, em transplantes, doenças autoimunes, e em diversos tipos de cânceres (Donadi et al., 2011, 2012).

Dos 8 sítios polimórficos da região 3'UTR do gene HLA-G, 3 foram associados a regulação na expressão de HLA-G. A presença de inserção de 14 pb induz a deleção de 92 bases na região 3'UTR do mRNA do HLA-G, que influencia o processamento diferencial e a estabilidade do mRNA, enquanto o alelo "G" na posição +3142C/G ao aumento da afinidade a microRNA específico (miR-148a, miR-148b e miR-152) para o mRNA do HLA-G e, portanto, a diminuição na sua expressão (Hviid et al., 2003; Rousseau et al., 2003; Tan et al., 2007; Veit and Chies 2009). O alelo "A" do sítio polimórfico +3187A/G está relacionado ao aumento da sua degradação do seu RNAm (Yie et al., 2008).

Pouco se sabe sobre a influência dos sítios polimórficos na 3'UTR do gene HLA-G, a expressão de HLA-G e sua ação imunomoduladora em leucemias da infância. Há alguns relatos de aumento na expressão de HLA-G solúvel em plasma de pacientes com leucemia e



Ajudando as  
pessoas a viverem  
vidas saudáveis

linfoma (Gros et al., 2006, Sebti et al., 2007). E o aumento de células com HLA-G de superfície parece estar associada a imunossupressão humoral e celular em leucemia, com diminuição da lise tumoral (Yan et al., 2008), nível de IgG sérico, número total de células T, células CD4+ e expressão de sHLA-G no plasma (Nuckel et al., 2009). Em linfomas, a expressão de HLA-G estava associada a expressão de IL-10 e IL-6, sugerindo a formação de microambiente inibitório com resposta tipo Th2 em linfomas (Sebti et al., 2007).

O presente projeto visa estudar a modulação imune do HLA-G em leucemia da crianças em geral, e, em particular, avaliar o potencial na quantificação do HLA-G como marcador de resposta a tratamento quimioterápico em LLA-B e a longo prazo ver resposta ao transplante dependente de polimorfismo/expressão de HLA-G.

**Objetivo geral:** avaliar o papel do polimorfismo genético e expressão do HLA-G na leucemia linfóide aguda da infância.

**Objetivos específicos:**

1. Classificar as leucemias da infância quanto a linhagem celular e estágio de maturação dos blastos através da identificação de marcadores de superfície e intracitoplasmático pela citometria de fluxo,
2. Identificar a presença de polimorfismo na seqüência 3'UTR do gene HLA-G,
3. Determinar o nível de expressão relativa do mRNA das isoformas de HLA-G através de qPCR na amostra da medula óssea ao diagnóstico e após indução do tratamento,
4. Avaliar a expressão da proteína HLA-G solúvel na MO do paciente antes e após a indução através de ELISA,
5. Avaliar o perfil de citocinas secretadas na MO do paciente antes e após a indução utilizando a tecnologia do CBA,
6. Correlacionar a presença de polimorfismo genético com expressão de mRNA e a presença da proteína HLA-G solúvel em amostras de MO com dados clínicos e laboratoriais e de desfecho da leucemia.

**Metodologia:**

1. População do Estudo e caracterização da leucemia

Serão estudadas pacientes entre 0 a 18 anos com leucemia diagnosticados e tratados no Serviço de Oncologia Pediátrica do hospital do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) em Recife a partir de 2005 que concordaram em participar do estudo conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 00730095000-10).

O diagnóstico de leucemia é dado pelo achado de 25% de células precursora hematológica ou blasto na medula óssea (MO) e pela análise morfológica dessas células baseada na classificação FAB (Franco- Americana-Britânica).

Alíquotas de células frescas da MO são caracterizadas quanto aos marcadores de superfície utilizando os anticorpos CD2, 4, 7, 15, 34, 56, 61, HLA-DR, kappa, lambda-FITC, CD1a, 5, 8, 10, 11b, 13, 14, 19, 22, 33, 99, 42b, 117, glycoporinA-PE, CD3, 34, 45-PerCP, CD3, CD19, CD33, HLA-DRAPC e marcadores intracelulares utilizando os anticorpos MPO-FITC, TdTFITC, CD79a-PE, IgM-PE, cCD3-APC para identificação da linhagem e estágio de maturação das



Ajudando as  
pessoas a viverem  
vidas saudáveis

## Concurso BD Biosciences Pesquisador SBI Projeto Vencedor 2012

células hematopoiéticas pela citometria de fluxo. Após a quimioterapia de indução, a MO do paciente com leucemia linfoblástica aguda (LLA) é novamente avaliada quanto a presença de células leucêmicas residuais, utilizando painel de anticorpos IgG, CD34, CD10, CD19, kappa e lambda. Os pacientes são classificados quanto ao risco de recaída considerando a idade ao diagnóstico, contagem de leucócitos em sangue periférico, a linhagem celular dos blastos, o tipo de translocação cromossômica, índice de DNA, presença de doença extramedular, acometimento do sistema nervoso central e presença de doença residual mínima (DRM) aferida pela citometria de fluxo. A partir dessa classificação a criança receberá tratamento diferenciado de acordo com a faixa de risco. Dados clínico e laboratoriais são mantidos em arquivo eletrônico e impresso.

2. Determinação do polimorfismo do gene HLA-G. DNA genômico será extraído da MO e submetida a PCR com iniciadores específicos para amplificação da região 3'UTR do gene HLA-G que será seqüenciada e conforme descrito em Lucena-Silva et al., 2012.

3. Quantificação da expressão de mRNA de HLA-G. Amostra de MO será submetida a extração de RNA e síntese de cDNA, e posteriormente submetidas a quantificação relativa das isoformas de HLA-G em relação a expressão do gene constitutivo GAPDH no termociclador 7500 da Applied biosystem. A quantificação relativa das isoformas será analisada comparando-se os valores médios de CT (ciclo de threshold).

4. Detecção da proteína solúvel HLA-G (sHLA-G) por ELISA. Plasma obtido de MO de pacientes serão utilizados para aferir a presença de formas solúveis de HLA-G1 e HLA-G5, utilizando o kit para detecção de sHLA-G ( Exbio, Prague, Czech Republic).

5. Detecção do perfil das citocinas. O perfil e concentração de citocinas produzidas no microambiente tumoral da medula óssea será avaliada conforme recomenda o fornecedor do kit CBA (Cytometric Bead Array, BD Bioscience, San Jose, USA). Os resultados serão expressos as pg/mL. Serão avaliados os perfis Th1, Th2, inflamatório, além da expressão de IL-17.

6. Análise estatística. Comparação de variáveis clínicas e laboratoriais em subgrupos de pacientes serão realizadas usando teste não paramétrico Mann-Whitney U para variáveis contínuas e teste do qui quadrado para as variáveis categorizadas. Serão consideradas significantes as diferenças com  $p < 0,05$ .

---

O concurso BD Biosciences Pesquisador SBI visa o reconhecimento e apoio aos pesquisadores que promovem o constante avanço científico através do incentivo à técnica de Citometria de Fluxo com Múltipla Marcação no Brasil.

Saiba mais em [bdbiosciences.com/br/pesquisador](http://bdbiosciences.com/br/pesquisador)