

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/02/2027.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DE MICA E MICB EM INDIVÍDUOS
SAUDÁVEIS: QUANTIFICAÇÃO DE RNA E MOLÉCULAS DE
MEMBRANA**

INGRID MIRANDA FERRAZ

**BOTUCATU – SP
2025**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO MOLECULAR DE MICA E MICB EM INDIVÍDUOS
SAUDÁVEIS: QUANTIFICAÇÃO DE RNA E MOLÉCULAS DE
MEMBRANA

INGRID MIRANDA FERRAZ

Orientadora: Profa Dra CAMILA FERREIRA BANNWART CASTRO

Co-orientador: Prof Dr ERICK DA CRUZ CASTELLI

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como requisito para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Micro-organismos e Imunidade (BMI).

Orientadora: Profa Dra Camila Ferreira Bannwart Castro

Co-orientador: Prof Dr Erick da Cruz Castelli

F381a Ferraz, Ingrid Miranda
Avaliação molecular de MICA e MICB em indivíduos saudáveis:
Quantificação de RNA e moléculas de membrana. / Ingrid Miranda
Ferraz. -- Botucatu, 2025
79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Botucatu
Orientadora: Camila Ferreira Bannwart Castro
Coorientador: Erick da Cruz Castelli

1. MICA. 2. MICB. 3. Monócitos. 4. Ligante NKG2D. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa

Título da dissertação: Avaliação molecular de MICA e MICB em indivíduos saudáveis: Quantificação de RNA e moléculas de membrana.

Impacto social e econômico: Nosso estudo avaliou se alterações genéticas nos genes MICA e MICB produzem formas diferentes de proteínas, pois, quando acopladas na superfície celular, ativam a morte celular e quando liberadas de forma solúvel, impedem essa atividade. São resultados que irão ajudar no rastreamento de gravidade de doenças, direcionando tratamentos mais eficazes, especialmente contra câncer, e até aumentando a sobrevivência de pacientes, beneficiando a saúde pública no Brasil.

Potential impact of this research

Dissertation Title: Molecular Evaluation of MICA and MICB in Healthy Individuals: RNA and Membrane Molecule Quantification.

Social and Economic Impact: Our study assessed whether genetic alterations in the *MICA* and *MICB* genes produce different protein forms. When anchored to the cell surface, these proteins trigger cell death, whereas in their soluble form, they inhibit this activity. These findings will contribute to disease severity screening, guiding more effective treatments, particularly against cancer, and potentially increasing patient survival, ultimately benefiting public health in Brazil.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de Ingrid Miranda Ferraz, discente do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, do Instituto de Biociências - Câmpus de Botucatu.

Aos 25 dias do mês de fevereiro do ano de 2025, às 9h30min, no(a) Sala 7 da Central de Aulas 3, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE Mestrado de INGRID MIRANDA FERRAZ, intitulada **AVALIAÇÃO MOLECULAR DE MICA E MICB EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS: QUANTIFICAÇÃO DE RNA E MOLÉCULAS DE MEMBRANA**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. CAMILA FERREIRA BANNWART CASTRO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Unidade de Pesquisa Experimental da Unesp de Botucatu / Faculdade de Medicina UNESP-Botucatu (FMB), Profa. Dra. CAROLINA HAGER RIBEIRO (Participação Virtual) do(a) Programa de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Faculdade de Medicina / Universidade do Chile, Profa. Dra. LUCIANE ALARCÃO DIAS MELÍCIO (Participação Presencial) do(a) Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.


Profa. Dra. CAMILA FERREIRA BANNWART CASTRO

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha profunda gratidão a Deus por iluminar o meu caminho, me dar forças todos os dias, amparo e inspiração.

Agradeço aos meus pais, Claudionor e Sandra, que desde sempre me apoiaram, e incentivaram para realizar o mestrado e pela educação moral, princípios e valores que me auxiliaram a crescer como pessoa.

Agradeço os meus amigos, principalmente a Ana Beatriz, Giovana, Laura e Karen, que são pessoas que me apoiaram muito nessa jornada e fizeram a minha vida ser mais leve, e que acompanharam o meu crescimento pessoal.

Agradeço a toda a minha família, que, mesmo de longe, sempre acreditou em mim e me incentivou na realização do mestrado, além de estar sempre ao meu lado, oferecendo apoio.

Com gratidão, dedico este trabalho de maneira especial, aos meus orientadores, Professora Camila e Professor Erick. Agradeço profundamente pelos anos de orientação e pela oportunidade concedida para conduzir esta pesquisa com vocês e por todo o ensinamento repassado.

Meus sinceros agradecimentos a todos do Laboratório Genética Molecular e Bioinformática (GeMBio): Marcel, Nayane, Raphaela, Viviane, Gabriela, Joyce, Isabelle, Nathaly, Luise, Maria Beatriz, e Aroldo. Vocês foram essenciais nesses anos, obrigada por tudo.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos os professores que contribuíram significativamente para minha trajetória acadêmica, incentivando-me e oferecendo apoio durante meu percurso rumo ao mestrado. Muito obrigada!

Assim, concluo mais uma etapa significativa da minha vida, com profunda gratidão!

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Brasil (FAPESP) – Processo nº 2021/13672-3 e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Processo 88887.883661/2023-00.

Expresso minha profunda gratidão à Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu e ao Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática (GeMBio) pela infraestrutura disponibilizada. Meu reconhecimento se estende aos colaboradores da UNIPLEX pelo suporte e pelos valiosos ensinamentos durante a condução experimental deste trabalho nos laboratórios de cultivo celular, western blot e Neogene.

Agradeço a professora Marjorie e Aline do Hospital das Clínicas- Laboratório de citometria de fluxo pela parceria com o projeto.

Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada pela oportunidade de desenvolvimento deste projeto.

RESUMO

Os genes MICA e MICB pertencem ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC), considerada a região mais polimórfica do genoma humano. Esses genes codificam proteínas glicosiladas ancoradas à membrana, semelhantes às moléculas de MHC-I, mas que não se ligam à β 2-microglobulina nem apresentam antígenos. MICA/B atuam como ligantes para o receptor ativador NKG2D, encontrado em células natural killer (NK) e linfócitos TCD8+. A interação de MICA/B e NKG2D desencadeia uma resposta citotóxica, com liberação de perforinas e granzimas nas células-alvo transformadas ou infectadas. No entanto, MICA/B possui a isoforma solúvel (sMICA/B) originada por clivagem proteica ou polimorfismo, o que impede a citotoxicidade celular de NK e TCD8+. Sendo assim, pelo fato dessas proteínas desempenharem papéis importantes em várias condições clínicas como disfunções gestacionais, doenças autoimunes, rejeição de transplantes, neoplasias malignas e infecções intracelulares, o objetivo do presente trabalho foi correlacionar os alelos de MICA e MICB de indivíduos saudáveis com o perfil de expressão de mRNA e proteína na superfície de monócitos. Com base no sequenciamento de um projeto anterior, foram selecionados 20 indivíduos com genótipos de interesse (que codificam diferentes isoformas de MICA/B) para o cultivo de monócitos estimulados com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS). As células foram armazenadas com TRIzol para análise de expressão de RNA ou desacopladas com tripsina e marcadas com anticorpos anti-CD14, anti-MICA e anti-MICB para análise por citometria de fluxo. Foram determinados grupos de indivíduos com genótipos semelhantes para as análises. Genótipos semelhantes foram agrupados em indivíduos heterozigotos para o alelo *MICA*008* (*MICA*008* HET), indivíduos homozigotos para *MICA*008* (*MICA*008* HOM), cujos alelos codificam proteínas que podem permanecer retidas no citoplasma (*MICA*010/017* RET) e aqueles que codificam a proteína completa (*MICA*002* MEM). Para MICB, os grupos foram divididos em indivíduos com o alelo *MICB*002* (*MICB*002* RES), indivíduos portadores dos alelos *MICB*004* (*MICB*004* SUSC) e outros genótipos (*MICB*005* UNK). Monócitos estimulados com LPS não aumentaram significativamente a expressão de mRNA de MICA e MICB, nem a expressão dessas moléculas na superfície celular em indivíduos saudáveis. Já quando comparamos os grupos, foi notável a alta porcentagem de positividade de monócitos para MICA no grupo *MICA*008* HOM, o que pode ser explicado pela ancoragem da proteína truncada à membrana por meio do GPI. E uma baixa porcentagem de monócitos expressando MICA na superfície no grupo *MICA*002* MEM, que pode ser explicada pela clivagem da molécula por metaloproteinases. E, por fim, um perfil de positividade de MICB na superfície dos monócitos foi compatível com a literatura, onde indivíduos que carregam o alelo *MICB*004* (grupo *MICB*004* SUSC) apresentou uma redução significativa da porcentagem de expressão na superfície celular. Uma vez que as moléculas de MICA e MICB são importantes mecanismos de ativação imune ou de escape em algumas doenças virais e cânceres, entender seu perfil molecular em pessoas saudáveis, especialmente em população miscigenada como a brasileira, poderá aprimorar diagnósticos e critérios de severidades de doenças, além de impulsionar avanços em imunoterapias futuras.

Palavras-chave: MICA, MICB, monócitos, ligante NKG2D.

ABSTRACT

The *MICA* and *MICB* genes belong to the major histocompatibility complex (MHC), the most polymorphic region of the human genome. These genes encode glycosylated membrane-anchored proteins that resemble MHC-I molecules but do not bind to β 2-microglobulin or present antigens. *MICA/MICB* function as ligands for the activating receptor NKG2D, which is expressed on natural killer (NK) cells and CD8⁺ T lymphocytes. The interaction between *MICA/MICB* and NKG2D triggers a cytotoxic response, leading to the release of perforins and granzymes against transformed or infected target cells. However, *MICA/MICB* also exist in a soluble isoform (s*MICA/B*), generated by proteolytic cleavage or polymorphism, which impairs NK and CD8⁺ T cell cytotoxicity. Given that these proteins play crucial roles in various clinical conditions, including gestational disorders, autoimmune diseases, transplant rejection, malignancies, and intracellular infections, the present study aimed to correlate *MICA* and *MICB* alleles in healthy individuals with mRNA expression profiles and protein surface expression on monocytes. Based on sequencing data from a previous project, 20 individuals with genotypes of interest (encoding different *MICA/MICB* isoforms) were selected for monocyte cultures stimulated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS). The cells were either stored in TRIzol for RNA expression analysis or detached with trypsin and labeled with anti-CD14, anti-*MICA*, and anti-*MICB* antibodies for flow cytometry analysis. Individuals with similar genotypes were grouped for analysis. For *MICA*, groups included heterozygous carriers of the *MICA*008* allele (*MICA*008* HET), homozygous carriers of *MICA*008* (*MICA*008* HOM)—whose alleles encode proteins that may remain intracellularly retained (*MICA*010/017* RET) and those encoding the full-length protein (*MICA*002* MEM). For *MICB*, groups were categorized as carriers of the *MICB*002* allele (*MICB*002* RES), carriers of the *MICB*004* allele (*MICB*004* SUSC), and individuals with other genotypes (*MICB*005* UNK). LPS stimulation of monocytes did not significantly increase *MICA* or *MICB* mRNA expression or surface expression in healthy individuals. However, when comparing groups, a high percentage of monocytes expressing *MICA* was observed in the *MICA*008* HOM group, which may be explained by the anchoring of the truncated protein to the membrane via GPI. In contrast, a low percentage of monocytes expressing *MICA* on the surface was found in the *MICA*002* MEM group, likely due to protein cleavage by metalloproteinases. Lastly, the profile of *MICB* positivity on monocyte surfaces was consistent with the literature, as individuals carrying the *MICB*004* allele (*MICB*004* SUSC group) exhibited a significant reduction in surface expression. Since *MICA* and *MICB* molecules are key mediators of immune activation or immune evasion in certain viral diseases and cancers, understanding their molecular profile in healthy individuals particularly in a genetically diverse population such as the Brazilian population could improve disease diagnosis and severity assessments while driving advancements in future immunotherapies.

Keywords: *MICA*, *MICB*, monocytes, NKG2D ligand.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema das vias de apresentação de antígenos pelas moléculas de HLA- classe I (a) e HLA-classe II (b).

Figura 2: Interação MICA/B com NKG2D. As proteínas *MICA/B*, que sinalizam estresse celular, interagem com o receptor ativador NKG2D, que desencadeia a citotoxicidade celular.

Figura 3: Isoformas de MIC. As proteínas MICA e MICB ancoradas à membrana celular, podem ser clivadas por metaloproteinases, resultando na liberação de MICA/B solúvel. Adicionalmente, alguns polimorfismos genéticos de MICA podem codificar uma molécula truncada, que pode ser liberada na forma solúvel, em exossomos. Esses processos podem levar à internalização ou bloqueio do receptor NKG2D, reduzindo a atividade citotóxica das células citotóxicas .

Figura 4: Localização dos genes *MICA* e *MICB* no braço curto do cromossomo 6, com a representação da estrutura gênica de MICA.

Figura 5: Representação da estrutura das proteínas de superfície celular MICA e MICB, destacando seus respectivos domínios e a cauda citoplasmática.

Figura 6: Ilustração do polimorfismo *MICA A5.1*, mostrando a molécula ancorada na superfície celular por meio de GPI, e sendo capturada por exossomos e liberada de forma solúvel.

Figura 7: Ilustração da retenção intracelular da proteína MICA em células de indivíduos portadores dos alelos *MICA*010* e *MICA*017*.

Figura 8: Representação do dimorfismo MICA-129. A interação com o receptor NKG2D pode sofrer alteração de 10 a 50 vezes na afinidade com a molécula de MICA.

Figura 9: Imagem da estrutura gênica de MICB, com 6 éxons, representados como as caixas pretas, região promotora 5'UTR e região não traduzida 3'UTR.

Figura 10: Ilustração da célula Natural Killer CD56^{bright}CD16⁺.

Figura 11: Ilustração da célula Natural Killer CD56^{dim}CD16⁺.

Figure 12: Flow cytometry dot plot indicating the gate strategy of monocytes (R1 gate), based on side scatter (SSC-Height) and forward scatter (FSC-Height). The events within the R1 gate were used to assess the surface expression of MICA and MICB on monocytes, as demonstrated by the histogram (on the right), which presents the fluorescence corresponding to: (A) MICA expression on monocytes cultured without stimulus (MICA BASAL) and with LPS (MICA LPS) and ted monocytes and (B) MICB expression on surface of monocytes cultured without stimulus (MICB BASAL) and with LPS (MICB LPS).

Figure 13: Flow cytometry dot plot illustrating the gating strategy for lymphocytes cells (R1 population), defined based on side scatter (SSC-Height) and forward scatter (FSC-Height) in the left panel. The R1 population was selected as the primary focus for NK cell analysis. Cells were distinguished using the anti-CD3 antibody to exclude other lymphocytes cells, as observed in the upper right quadrant. The lower plot further subdivides NK cells into subpopulations based on CD56 (FL2-H) and CD16 (FL4-H) expression levels, categorizing them as CD56^{bright}, CD56^{dim} and CD56^{dim}/CD16⁺.

Figure 14: MICA and MICB expression values are expressed as Relative Quantity (RQ) and normalized to the reference gene GAPDH. * (p < 0.05) was considered significant after

Mann-Whitney test for comparisons between two groups or Kruskal-Wallis non-parametric test for more than two groups.

Figure 15: Percentage of monocytes expressing MICA on the surface when cultured without stimulation (CO) and after stimulation with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) at a concentration of 200 ng/mL for 18 hours, separated by groups: *MICA*008* HET group- heterozygous individuals for *MICA*008* allele (n= 6); *MICA*008* HOM group- individuals that possess *MICA*008* allele in the homozygous state, which produces a truncated protein that may be released in a soluble form (n= 4); *MICA*010/017* RET group- individuals with alleles that encode MICA molecules retained in the cytoplasm (n= 3), and *MICA*002* MEM group- individuals with alleles that encode the full protein (n= 8). * ($p < 0.05$) was considered significant after Mann-Whitney test for comparisons between two groups or Kruskal-Wallis non-parametric test for more than two groups.

Figure 16: Percentage of monocytes expressing MICB on the surface when cultured without stimulation (CO) and after stimulation with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) at a concentration of 200 ng/mL for 18 hours, separated by groups: *MICB*002* RES group- individuals carrying the *MICB*002* allele that is described as resistant to infectious diseases such as COVID and dengue (n= 6), *MICB*004* SUSC group- individuals that possess *MICB*004* alleles, which have been described with a higher frequency in cases of severe viral infectious diseases (n=9) and *MICB*005* UNK- individuals carrying alleles that have not known disease associations (n= 6). * ($p < 0.05$) was considered significant after Mann-Whitney test for comparisons between two groups or Kruskal-Wallis non-parametric test for more than two groups.

Figure 17: A- sMICA concentration of monocytes supernatant (pg/mL) cultured without stimulation (CO) and after stimulation with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) at a concentration of 200 ng/mL for 18 hours, separated by groups: *MICA*008* HET group- heterozygous individuals for *MICA*008* allele (n= 5); *MICA*008* HOM group- individuals that possess *MICA*008* allele in the homozygous state, which produces a truncated protein that may be released in a soluble form (n= 4); *MICA*010/017* RET group- individuals with alleles that encode MICA molecules retained in the cytoplasm (n= 3), and *MICA*002* MEM group- individuals with alleles that encode the full protein (n= 8). B- sMICA levels (pg/mL) in the plasma also separated by groups* ($p < 0.05$) was considered significant after Mann-Whitney test for comparisons between two groups or Kruskal-Wallis non-parametric test for more than two groups.

Figure 18: A- sMICA levels of monocytes supernatant (pg/mL) cultured without stimulation (CO) and after stimulation with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) at a concentration of 200 ng/mL for 18 hours and B- sMICA plasmatic levels (pg/mL) of Brazilian individuals with MICA-129 Met/Val genotypes (n=9) and MICA-129 Val/Val (n=10). * ($p < 0.05$) was considered significant after Mann-Whitney test for comparisons between two groups or Kruskal-Wallis non-parametric test for more than two groups.

Figure 19: A- sMICB concentration of monocytes supernatant (pg/mL) cultured without stimulation (CO) and after stimulation with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) at a concentration of 200 ng/mL for 18 hours and B- in the plasma separated by groups: *MICB*002* RES group- individuals that carrying *MICB*002* allele and have been described as resistant to infectious diseases such as COVID and dengue (n= 6), *MICB*004* SUSC group- individuals that possess *MICB*004* alleles, which have been described with a higher frequency in cases of severe viral infectious diseases (n=9) and *MICB*005* UNK- individuals with alleles that have not known disease associations (n= 4). * ($p < 0.05$) was considered significant after Mann-Whitney test for comparisons between two groups or Kruskal-Wallis non-parametric test for more than two groups.

Figure 20: Proportion of NK cell subpopulations from healthy individuals, separated by groups: *MICA*008* HET (n= 5), *MICA*008* HOM (n= 4), *MICA*010/017* RET (n= 3) and *MICA*002* MEM

(n= 7). * ($p < 0.05$) was considered significant after Mann-Whitney test for comparisons between two groups or Kruskal-Wallis non-parametric test for more than two groups.

Figure 21: Percentage of total NK cells and subpopulations from healthy individuals expressing NKG2D receptors in accordance with MICA genotypes: *MICA*008* HET (n= 5), *MICA*008* HOM (n= 4), *MICA*010/017* RET (n= 3) and *MICA*002* MEM. * ($p < 0.05$) was considered significant after Mann-Whitney test for comparisons between two groups or Kruskal-Wallis non-parametric test for more than two groups.

Figure 22: Percentage of total NK cells expressing the NKG2D receptor of Brazilian individuals with MICA-129 Met/Val (n=9) and MICA-129 Val/Val genotypes (n=10). * ($p < 0.05$) was considered significant after Mann-Whitney test for comparisons between two groups.

Figure 23: Proportion of NK cell subpopulations from healthy individuals, separated by groups: *MICB*002* RES (n= 7), *MICB*004* SUSC (n= 8), *MICB*005* UNK (n= 4). * ($p < 0.05$) was considered significant after Mann-Whitney test for comparisons between two groups or Kruskal-Wallis non-parametric test for more than two groups.

Figure 24: Percentage of total NK cells and subpopulations from healthy individuals expressing NKG2D receptors in accordance with MICB genotypes: *MICB*002* RES (n= 7), *MICB*004* SUSC (n= 8), *MICB*005* UNK (n= 4). * ($p < 0.05$) was considered significant after Mann-Whitney test for comparisons between two groups or Kruskal-Wallis non-parametric test for more than two groups.

LISTA DE TABELAS

Table 1: Alleles that belong to each group divided in according to MICA genotypes .

Table 2: Alleles that belong to each group divided in according to MICB genotypes.

Table 3. Correlation of soluble MICA plasma levels divided according to the 129 polymorphism (MICA-129) and percentage of NK cells expressing NKG2D.

Table 1 S: Profile of NK subpopulation cells (%) in accordance with MICA allele-specific groups.

Table 2 S: The mean fluorescence intensity (MFI) of NK cell subpopulations expressing NKG2D receptors (%) in accordance with MICA allele-specific groups.

Table 3 S: Profile of NK subpopulation cells (%) in accordance with MICB allele-specific groups.

Table 4 S: The mean fluorescence intensity (MFI) of NK cell subpopulations expressing NKG2D receptors (%) in accordance with MICB allele-specific groups.

Table 5S: The table presents the average of the main ancestral populations (Europe, Africa, and Asia) for each MICA group.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM - Metaloproteases de Desintegrina
AR - Artrite Reumatoide
Arg- Arginina
ATM - Ataxia telangiectasia mutada
ATR - Ataxia telangiectasia e Rad3-relacionado
CO - Controle
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
ERp5 - Proteína 5 do Retículo Endoplasmático
EVs - Vesículas Extracelulares, ou Extracellular Vesicles
GPI - Glicosilfosfatidilinositol
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
HLA - Human Leukocyte Antigens- Antígenos Leucocitários Humanos
IMGT - The International Immunogenetics Information System®
Kb - Quilobases ou Kilobases
LPS - Lipopolissacarídeo
Met - Metionina, ou Methionine
MHC - Major Histocompatibility Complex - Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIC - Genes de cadeia relacionados à moléculas de histocompatibilidade de classe I
miRNAs - microRNA
MMPs - Metaloproteinases de Matriz
mRNA - Ácido Ribonucleico Mensageiro
NK - Células Natural Killer
NKG2D - Natural Killer Group 2 Member D
PLEK2- Pleckstrin 2
qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA - Ácido Ribonucleico
sMIC - Soluble Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related- Relacionado à Cadeia da Classe I do Complexo Principal de Histocompatibilidade Solúvel.
SNP - Polimorfismo de Nucleotídeo Único
STR - Short Tandem Repeat - Repetição Curta em Tandem
TCD4+ - Células T Auxiliares
TCD8+ - Células T Citotóxicas
Thr - Treonina
TLR4 - Receptor tipo Toll 4
Val - Valina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. HIPÓTESE E RELEVÂNCIA DO TRABALHO	31
3. OBJETIVOS	31
3.1. OBJETIVOS GERAL	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. CAPÍTULO II	32
ARTIGO EM PREPARAÇÃO	32
ABSTRACT	32
INTRODUCTION	33
METHODS	35
Casuistic	35
Sample Size Calculation	36
MICA and MICB groups	36
PBMC cell culture to monocytes analysis	37
RNA extraction	37
cDNA synthesis	37
RT-qPCR	38
Flow cytometry	38
MICA and MICB levels by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	39
NKG2D analysis by flow cytometry	39
Statistical Analysis	40
RESULTS	41
Human NKG2D ligands MICA and MICB were similar between CO and LPS-stimulated monocytes	41
Percentage of monocytes expressing MICA on the surface is higher in MICA*008 HOM group	41
Percentage of monocytes expressing MICB on the surface of MICB*002 RES group was significantly higher than others	42
Plasmatic sMICA levels are extremely higher than supernatant cellular and MICA*008 HOM group posses the highest concentration	43
Profile of sMICA levels of MICA-129 groups in supernatant was totally different from plasma	44
sMICB levels of monocytes supernatant and plasma	45
Percentage of NK cell subpopulations in MICA-groups	46
Percentage of NK Cell subpopulations expressing NKG2D receptors in MICA-groups	46
Similar percentage of NKG2D expression in according to MICA-129 Met/Val and MICA-129 Val/Val	47
Percentage of NK cell subpopulations in MICB-groups	49
Percentage of NK Cell subpopulations expressing NKG2D receptors in MICB-groups	50
DISCUSSION	50

CONCLUSION	56
CONCLUSÕES GERAIS	66
REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

Estudos de associações de variantes genéticas do genoma completo com diversos tipos de doenças demonstram genes com impacto direto na função das células imunes capazes de influenciar na suscetibilidade ou resistência a doenças, fornecendo *insights* sobre a complexa regulação dessas células, potenciais alvos terapêuticos para diversas doenças, especialmente as imunomediadas (RAMOS, 2021; STANKEY; LEE, 2023). Um dos componentes genéticos mais relevantes nessas associações é o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*), localizado no cromossomo 6, na posição 6p21.3. Os genes dessa região codificam moléculas essenciais para a apresentação direta de antígenos às células T, também para a das células Natural Killer (NK), bem como para a comunicação celular através de citocinas pró-inflamatórias, e moléculas de sinalização de estresse celular (CRUVINEL et al., 2010).

O MHC é classificado de maneira didática em três classes distintas. Os genes presentes nas regiões de classe I e classe II codificam moléculas que apresentam peptídeos na superfície celular às células T CD8+ e T CD4+, respectivamente (Figura 1). Essas proteínas são codificadas por genes altamente polimórficos, denominados antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigens*) (GENSTERBLUM; WU; SAWALHA, 2018; PINATIH; SUPADMANABA; WIHANDANI, 2022). A cadeia pesada das moléculas HLA de classe I é expressa de maneira codominante a partir de três genes denominados HLA-A, HLA-B e HLA-C, que codificam moléculas que se fixam na superfície de todas as células nucleadas e desempenham funções importantes na apresentação de antígenos para ativação da imunidade adaptativa (GENG et al., 2018). Proteínas intracelulares endógenas ou originárias de patógenos intracelulares são processadas, geram pequenos peptídeos que são transportados para o retículo endoplasmático e carregados nas moléculas de HLA classe I. Conforme descrito na figura 1, esses peptídeos são transportados para a superfície celular e o complexo peptídeo-HLA classe I interage com o receptor T CD8+. Quando ele é reconhecido como peptídeo não-próprio, uma resposta imune pode ser iniciada (MARÓSTICA et al., 2022).

As cadeias α e β das moléculas HLA de classe II são expressas a partir de três pares de genes: HLA-DR, DP e DQ. Os genes HLA-DRA, HLA-DPA e HLA-DQA codificam as cadeias alfa, enquanto os genes HLA-DRB, HLA-DPB e HLA-DQB codificam as cadeias beta. No caso das moléculas HLA de classe II, o número de combinações possíveis pode ser ainda maior, pois as cadeias α e β codificadas por diferentes genes podem se associar de diversas maneiras, gerando uma maior variedade dessas moléculas HLA na superfície celular de células apresentadoras de antígenos (APCs) (LJUNGGREN; KÄRRE, 1990; HORTON et al., 2004). As proteínas de origem extracelular são endocitadas em vesículas, processadas dentro de endossomos, clivadas nos lisossomos e se ligam a uma molécula de HLA-classe II, no local originalmente ocupado por uma cadeia invariante. O complexo peptídeo-HLA-classe II MHC é então transportado para a superfície celular e interage com receptor CD4+ (MARÓSTICA et al., 2022).

As moléculas de HLA-I e II interagem com os receptores de linfócitos T CD8+ e T CD4+, respectivamente, para apresentar antígenos e, assim, iniciar uma resposta imune adaptativa. Essa resposta estabelece uma memória imunológica com o auxílio da imunidade

inata e possibilita a eliminação mais rápida de patógenos em infecções posteriores (DEMARIA et al., 2019; OLSON et al., 2020; ARNETH, 2021).

A região do MHC classe III inclui vários genes que codificam proteínas envolvidas em diferentes processos imunológicos, como os genes C4A e C2, que codificam componentes o sistema complemento; genes que codificam citocinas como fator de necrose tumoral (TNF) e linfotóxina alfa (LTA) e beta (LTB) (HORTON et al., 2004).

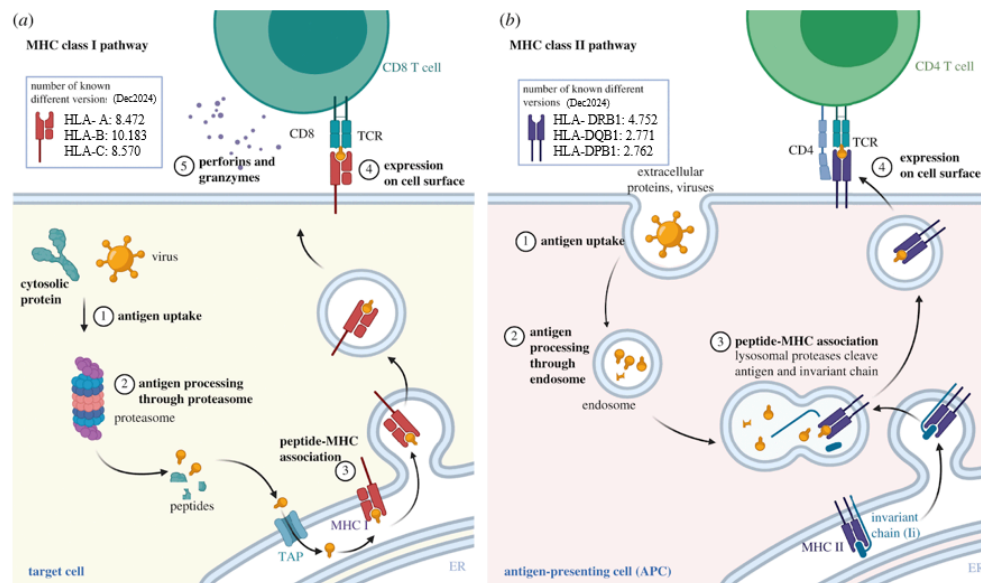


Figura 1: Esquema das vias de apresentação de antígenos pelas moléculas de HLA- classe I (a) e HLA-classe II (b).

Fonte: Adaptado de MARÓSTICA et al., 2022.

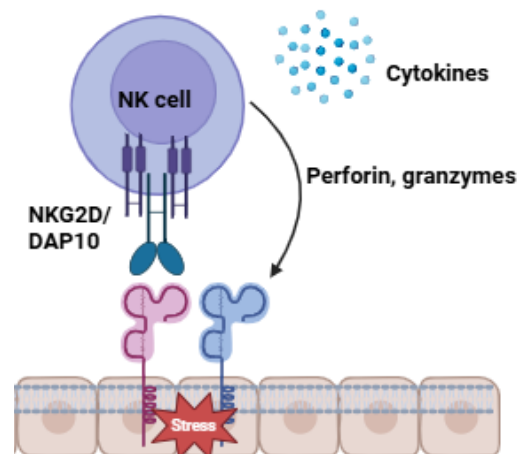
Além desses genes bem caracterizados na região do MHC, no ano de 1994, os pesquisadores Bahram et al. (1994) e Leelayuwat et al. (1994) identificaram, de maneira independente, genes relacionados à cadeia I do MHC (MIC) ou à transcrição do bloco beta de Perth 11 (PERB11). O gene MICA, um membro desta família, foi identificado como o gene não clássico de classe I mais polimórfico, seguido por MICB (BAHRAM et al., 1994; CHOY, PHIPPS, 2010). Outros genes da família MIC, como MICC, MICD, MICE, MICEF e MICG, também foram descritos, porém são caracterizados como pseudogenes, sendo MICA e MICB os únicos funcionais (BAHRAM, 2000).

A expressão das moléculas codificadas pelos genes *MICA* e *MICB* ocorrem de forma constitutiva na superfície de poucos tipos de células como as epiteliais, endoteliais, fibroblastos e células mononucleares no sangue periférico (ZWIRNER; DOLE; STASTNY, 1999). Contudo, todas as células são capazes de expressar essas moléculas de acordo com situações de estresse celular sofrida, como por exemplo células neoplásicas, infectadas intracelularmente e autorreativas, como ocorre em doenças autoimunes (GROH et al., 1996; BAHRAM, 2000; RAULET et al., 2013; YUREVNA; SMIRNOV; SAMOYLOVICH, 2022).

Até o momento foram descritos vias que reconhecem agentes genotóxicos por sensores de dano e, por meio da via de reparo de danos, induzem a expressão de MIC através de quinases de reparo ataxia telangiectasia mutada (ATM) e/ou ataxia telangiectasia e

Rad3-relacionado (ATR) (GASSER et al., 2005). Essa mesma via pode ser ativada por infecções virais (GASSER et al., 2005) ou em células tumorais (EISSMANN et al., 2010). Nos macrófagos, a via ATR/ATM controla a expressão de moléculas MIC por meio de mecanismos translacionais ou pós-transcricionais. A inibição dessa via, por meio de inibidores específicos, reduz a expressão de MIC na superfície celular, mas não interfere na regulação positiva do mRNA de MIC (TANG; REN; CAO, 2008). Outros estudos sugerem que a via ATR/ATM também desempenha um papel na regulação do mRNA (CERBONI et al., 2007; O'NEILL, 2008), indicando que sua função no controle da expressão de mRNA pode variar conforme o tipo de ligante, célula e/ou estímulo específico (TANG et al., 2008).

Contudo, o tempo para essa expressão de MICA/B pode variar dependendo da via de estresse celular ativada e o tempo de estímulo (GROH et al., 1996; BAHRAM, 2000; YUREVNA; SMIRNOV; SAMOYLOVICH, 2022). Um estímulo classicamente utilizado nas pesquisas científicas é o lipopolissacarídeo (LPS), um componente essencial da parede celular de bactérias gram-negativas. Ele se liga ao receptor tipo Toll 4 (TLR4) com a ajuda da proteína de ligação LBP e do receptor CD14, desencadeando uma cascata de sinalização que resulta na ativação de células imunes e na liberação de mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas e citocinas (CIESIELSKA; MATYJEK; KWIATKOWSKA, 2021; AFROZ et al., 2022). Dessa forma, os macrófagos podem expressar as proteínas MICA e MICB após a interação com LPS, que se ancoram na membrana celular (MEDZHITOV, 2008; STERN-GINOSSAR et al., 2008; HU; CHEN; CHEN, 2022). Essa ancoragem permite a interação com o receptor ativador NKG2D, do tipo *C-lectina-like* (NKG2D), e, conseqüentemente, a lise da célula-alvo (LI et al., 2001; RAULET et al., 2013) (Figura 2). Esse receptor está presente em células NK, linfócitos T $\gamma\delta$ e linfócitos T $\alpha\beta$ CD8+ (VULPIS et al., 2022).



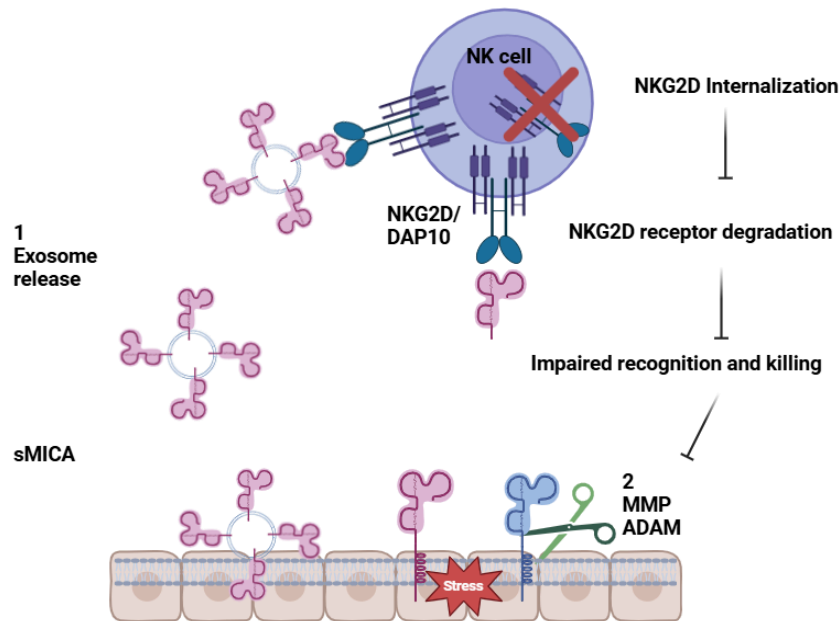
Created in BioRender.com 

Figura 2: Interação MICA/B com NKG2D. As proteínas *MICA/B*, que sinalizam estresse celular, interagem com o receptor ativador NKG2D, que desencadeia a citotoxicidade celular.

Fonte: Autoria própria. [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](https://www.biorender.com), acessado em 30 de abril de 2024.

De acordo com vários estudos, essas moléculas de estresse ancoradas na superfície podem ser clivadas. A liberação de MICA e MICB na forma solúvel ocorre através da clivagem enzimática mediada por metaloproteinases de matriz (MMPs) e proteínas da família ADAM (desintegrinas e metaloproteinases) (BLOBEL, 2005; MATUSALI et al., 2013). As ADAMs, como ADAM17 e ADAM15, frequentemente ligadas à membrana celular, atuam liberando os ectodomínios de proteínas transmembranares da superfície celular por meio de proteólise (GROH et al., 2002; SALIH; RAMMENSEE; STEINLE, 2002; WHITE, 2003; REISS; LAUDWAIG; SAFTIG, 2006; KAISER et al., 2007; WALDHAUER et al., 2008; WANG et al., 2022). Além disso, a proteína 5 do retículo endoplasmático (ERp5), presente no retículo endoplasmático, interage com o domínio $\alpha 3$ de MICA e MICB, desencadeando uma alteração estrutural que facilita a clivagem de MICA/B (WANG et al., 2009). Após a modificação estrutural promovida pela ERp5, as metaloproteinases clivam MICA/B próximo ao domínio $\alpha 3$, liberando as regiões $\alpha 1$ e $\alpha 2$, que servem como sítios de ligação ao receptor NKG2D (RODA-NAVARRO; REYBURN, 2009). Polimorfismos não sinônimos que causam mudanças de aminoácidos nesse domínio podem impedir a liberação de MICA/B na forma solúvel (XING; FERRARI, 2020). A forma solúvel liberada promove o bloqueio dos receptores NKG2D ou ainda a internalização desse receptor, que pode ser direcionado para os lisossomos e, posteriormente, degradado (MOLFETTA et al., 2016) (figura 3). Isso impede a atividade citotóxica das células NK e TCD8+ e suprime as respostas imunes mediada por essas células (MIZUKI et al., 1997; RISTI; BICALHO, 2017; DU et al., 2019; revisado por FUERTES; DOMAICA; ZWIRNER, 2021). A clivagem de MICA e MICB da superfície celular é, portanto, um mecanismo eficaz de escape da resposta imune (PACHANI et al., 2022; KSHERSAGAR et al., 2022; WANG et al., 2023).

Além da clivagem proteica, as moléculas de MICA também podem ser liberadas de maneira solúvel devido a um polimorfismo de ganho de parada que gera um stop códon prematuro, resultando em uma molécula truncada, com ausência parcial da porção transmembrana (MIZUKI et al., 1997; ZOU et al., 2006; GAMBELUNGHE et al., 2006; TANI et al., 2021). Essa variante desperta grande interesse clínico, uma vez que as moléculas codificadas podem se ancorar ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) e serem liberadas em exossomos, que se caracterizam por possuírem várias moléculas de MICA (ASHIRU et al., 2013; CHITADZE et al., 2013a, 2013b). Além disso, ainda acoplada por GPI, pode se fixar na superfície e, devido à sua proximidade ao sítio de clivagem da ADAM17, ela pode ser clivada mais facilmente, resultando em altas concentrações de sMICA (CHEN; GYLLENSTEN, 2014).



Created in BioRender.com 

Figura 3: Isoformas de MIC. As proteínas MICA e MICB ancoradas à membrana celular, podem ser clivadas por metaloproteínas, resultando na liberação de MICA/B solúvel. Adicionalmente, alguns polimorfismos genéticos de MICA podem codificar uma molécula truncada, que pode ser liberada na forma solúvel, em exossomos. Esses processos podem levar à internalização ou bloqueio do receptor NKG2D, reduzindo a atividade citotóxica das células citotóxicas.

Fonte: Autoria própria. [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](https://www.biorender.com), acessado em 30 de abril de 2024.

O gene MICA está localizado a aproximadamente 46,4 kb centroméricos do gene HLA-B no cromossomo humano e possui cerca de 15,5 kb (VAVILOV; SUSLOVA; BURMISTROVA, 2022), enquanto o gene MICB está localizado cerca de 70 kb centroméricos do gene MICA e apresenta uma estrutura genômica e composição de sequências altamente semelhantes ao gene MICA (BAHRAM et al., 1995) (Figura 4). De acordo com a base de dados IPD-IMGT/HLA (versão 3.59.0 2025-01), foram identificados 585 alelos de MICA, os quais codificam 278 proteínas diferentes, e 307 alelos de MICB, que codificam 49 proteínas distintas [<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>].

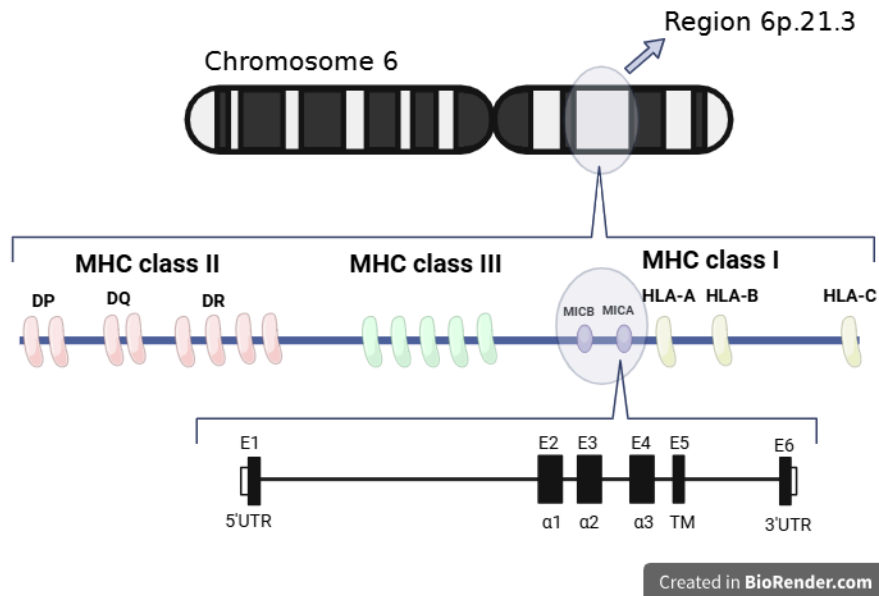
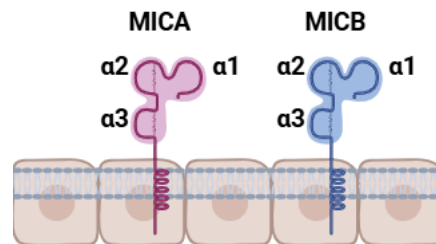


Figura 4: Localização dos genes *MICA* e *MICB* no braço curto do cromossomo 6, com a representação da estrutura gênica de *MICA*.

Fonte: Autoria própria. [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](https://www.biorender.com), acessado em 15 de maio de 2024.

Os genes *MICA* e *MICB* são compostos por seis éxons. O primeiro codifica uma sequência líder, enquanto o segundo, terceiro e quarto éxons codificam, respectivamente, os domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, conforme ilustrado na Figura 5. O quinto éxon codifica a cauda citoplasmática e um segmento transmembrana, enquanto o sexto éxon codifica os últimos resíduos de aminoácidos e a região não traduzida (3'NT) (ANDO et al., 1997; ZHANG et al., 2023).



Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Figura 5: Representação da estrutura das proteínas de superfície celular *MICA* e *MICB*, destacando seus respectivos domínios e a cauda citoplasmática.

Fonte: Autoria própria. [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](https://www.biorender.com), acessado em 28 de abril de 2024.

O gene *MICA* possui uma repetição curta em tandem (STR) composta por repetições de GCT que codificam Alaninas (Ala) no éxon 5, região responsável por codificar a porção transmembrana. Os alelos que possuem 4 Ala nessa região são classificados como *MICA*-A4. Assim, os alelos podem ser classificados de acordo com o número de repetições de Ala em *MICA*-A4, *MICA*-A5, *MICA*-A6, *MICA*-A7, *MICA*-A8, *MICA*-A9, *MICA*-A10 e

MICA-A5.1 (CHOY; PHIPPS, 2010; JARDULI et al., 2013; GUTIÉRREZ-BAUTISTA et al., 2022). Os alelos classificados como *MICA-A5.1*, apresentam, além das cinco repetições de Ala, a inserção de guanina (Gua) na posição 952 (rs1051792). Essa inserção na região transmembrana leva a uma alteração no quadro de leitura, gerando um stop códon prematuro. Isso resulta em uma proteína truncada, que apresenta ausência parcial da cauda citoplasmática (MIZUKI et al., 1997; ZOU et al., 2006; GAMBELUNGHE et al., 2006; TANI et al., 2021). A molécula resultante pode ser acoplada a exossomos e liberada em vesículas extracelulares (EVs) ou se fixar na superfície da membrana por se ligar a uma molécula âncora de GPI (Figura 6) (ASHIRU et al., 2013). O alelo *MICA*008* pertence a essa classificação e é o mais frequente na população brasileira (SOUZA et al., 2011),

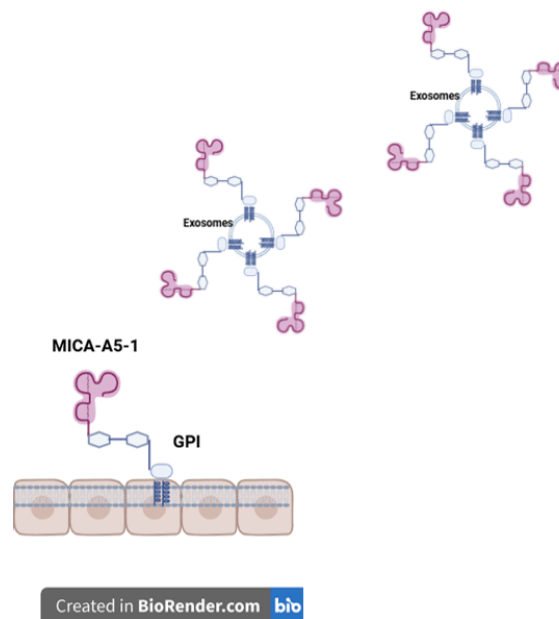
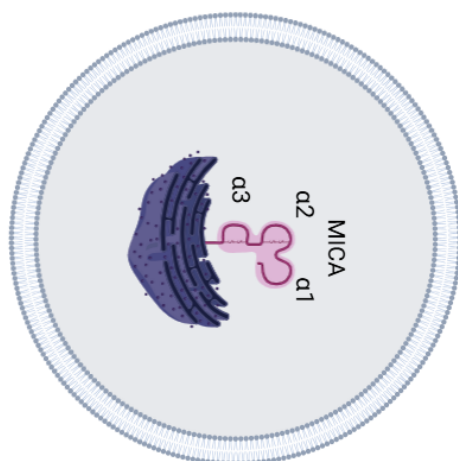


Figura 6: Ilustração do polimorfismo *MICA A5.1*, mostrando a molécula ancorada na superfície celular por meio de GPI, e sendo acoplada por exossomos e liberada de forma solúvel.
Fonte: Autoria própria. [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](#), acessado em 10 de agosto de 2024.

Indivíduos portadores dos alelos *MICA*010* e *MICA*017* apresentam características específicas que afetam a expressão de MICA. O alelo *MICA*010*, caracterizado pela substituição de arginina (Agr) por prolina no éxon 6, que codifica a cauda citoplasmática, tem a funcionalidade da proteína comprometida devido à sua retenção intracelular, impedindo sua expressão na membrana celular (LI et al., 2000; ZHANG et al., 2012). As moléculas codificadas pelo alelo *MICA*017*, devido a uma deleção de guanina no éxon 4, não apresentam cauda citoplasmática e, portanto, parecem não ser expressas na superfície nem de maneira solúvel (Figura 7) (OBUCHI et al., 2001).

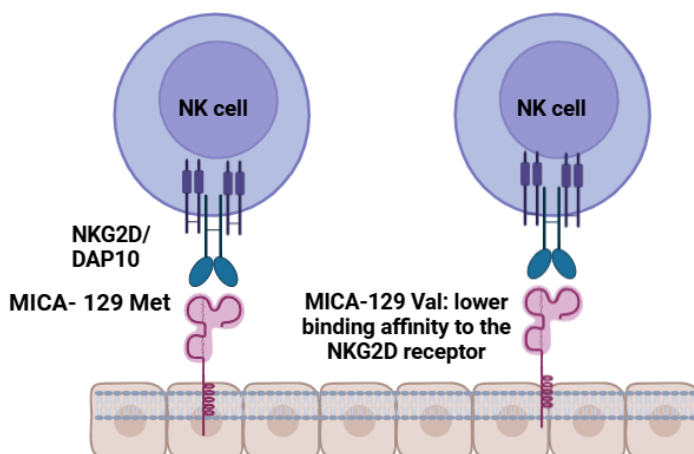


Created in BioRender.com 

Figura 7: Ilustração da retenção intracelular da proteína MICA em células de indivíduos portadores dos alelos *MICA*010* e *MICA*017*.

Fonte: Autoria própria. [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](https://www.biorender.com), acessado em 04 de julho de 2024.

Além dessas importantes variantes, um dos polimorfismos mais estudados devido à sua relevância clínica é o dimorfismo MICA-129 (rs1051792), que ocorre devido à troca de valina (Val) por metionina (Met) no resíduo 129 da proteína MICA, no domínio $\alpha 2$. Esse polimorfismo influencia diretamente a sinalização de NKG2D. As moléculas de MICA contendo Met na posição 129 (MICA-129 Met) foram caracterizadas com afinidade de 10 a 50 vezes maior para se ligar ao NKG2D do que MICA-129 Val (figura 8) (STEINLE et al., 2001; RISTI; BICALHO, 2017). Além disso, indivíduos portadores de MICA-129 Val apresentam maiores níveis de sMICA, pois são altamente suscetíveis à clivagem proteolítica da molécula (ISERNHAGEN et al., 2016; MICHITA et al., 2018).



Created in BioRender.com 

Figura 8: Representação do dimorfismo MICA-129. A interação com o receptor NKG2D pode sofrer alteração de 10 a 50 vezes na afinidade com a molécula de MICA.

Fonte: Autoria própria. [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](#), acessado em 04 de julho de 2024.

Embora MICA e MICB compartilhem 91% de homologia em suas sequências, há diferenças significativas tanto em seus polimorfismos quanto em suas funções (WANG et al., 2016). O gene *MICB* apresenta uma menor diversidade polimórfica em relação ao gene MICA. No entanto, há um número reduzido de estudos focados em MICB, em comparação com MICA. As pesquisas disponíveis frequentemente analisam pequenas amostras e populações específicas, o que pode explicar, em parte, o menor grau de polimorfismo observado em MICB.

MICB possui o primeiro íntron e uma região 3' não traduzida que são significativamente maiores que os de MICA (TAMIYA et al., 2008) (Figura 9). O gene MICB também apresenta uma área de microssatélite denominada C1_2_A no íntron 1, que oscila entre 14 e 28 repetições de dinucleotídeos (CA/TG), com alelos denominados CA14-CA28 (KIMURA et al., 1998; FOLWACZNY et al., 2011). Apesar de essa região ter sido identificada há bastante tempo, poucos estudos examinaram esse polimorfismo em relação a doenças (LU et al., 2006; SIEMASZKO et al., 2024), e a influência desse microssatélite na função do gene ainda não foi completamente analisada.

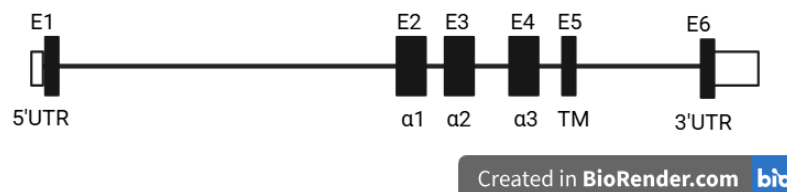


Figura 9: Imagem da estrutura gênica de MICB, com 6 éxons, representados como as caixas pretas, região promotora 5'UTR e região não traduzida 3'UTR.

Fonte: Autoria própria. [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](#), acessado em 04 de julho de 2024.

O gene MICB não apresenta polimorfismos que alterem o tamanho da molécula codificada. Entre os principais alelos de interesse clínico estão o *MICB*002*, associado a resistência à infecções de dengue e COVID-19, além de ser considerado fator protetor em alguns tipos de cânceres pela sua baixa produção de proteínas solúveis (LUANGTRAKOOL et al., 2020; IVANOVA et al., 2021) e o alelo *MICB*004*, que parece estar associado a gravidade de febre hemorrágica da dengue, COVID-19 e artrite reumatoide devido a alta produção de sMICB (LÓPEZ-ARBESU et al., 2007; LUANGTRAKOOL et al., 2020; CASTELLI et al., 2021).

Além dos muitos polimorfismos clinicamente significativos já citados na literatura, a análise de estudos genéticos também deve considerar a possibilidade de deleções parciais ou totais nos genes analisados. Foi identificada uma deleção completa do gene MICA (MICA-del), que pode estar associado com um códon de parada no éxon 3 de MICB codificando uma proteína nula (MICB*009N). Alguns estudos relatam que isso pode estar em desequilíbrio de ligação com o alelo HLA-B*48:01 (KOMATSU-WAKUI et al., 1999, 2001). CIRIACO et al. (2024) confirmaram essas informações e constataram que esse

haplótipo é frequente no Sul da Ásia, Ásia Central e América, mas não na Europa, África e Oceania. Além disso, também descreveram deleções parciais no gene MICA, denominada MICA*parcial, detectada apenas na América e Ásia Central. Essas deleções podem impactar negativamente a expressão de moléculas MICA na superfície ou induzir outros mecanismos compensatórios como aumento da expressão de outros ligantes de NKG2D.

Outro ponto chave na regulação da expressão das proteínas MIC pode ocorrer de maneira pós-transcricional, mediada por microRNAs (miRNAs). Em situação de homeostase, esses miRNAs definem um limite para a expressão, evitando a produção excessiva de MICA e MICB e, assim, prevenindo a morte de células saudáveis (SUEMIZU et al., 2002). No entanto, sob condições de estresse celular, como em infecções, inflamações ou durante o desenvolvimento de tumores, esses miRNAs podem ocasionar mudanças significativas nos níveis de MICA e MICB, influenciando a resposta imunológica (XIE et al., 2014). MiRNAs específicos, como hsa-miR-25, hsa-miR-93, hsa-miR-106a, hsa-miR-106b e hsa-miR-373, foram descritos como moduladores diretos do RNA mensageiro de MICA em células neoplásicas (KISHIKAWA et al., 2013; WU et al., 2014; YANG et al., 2015). O hsa-miR-146b-5p foi associado a células de carcinoma papilar de tireoide provenientes de tumores primários e foi identificado como regulador negativo da expressão de MICA (AL-ABDALLAH et al., 2020); o hsa-miR-519a-3p foi identificado no câncer de mama (BREUNIG et al., 2017); e os hsa-miR-302c e hsa-miR-520c foram encontrados em várias linhagens de células cancerígenas (MIN et al., 2013). Em contrapartida, há relatos de miRNA que amplifica a expressão de MICA, como o miR-125b, cuja regulação negativa eleva os níveis de MICA em células de mieloma humano, potencializando a resposta imunológica contra células tumorais (ABRUZZESE et al., 2016). Portanto, conhecer os alelos e os microRNAs que possam regulá-los abre novas perspectivas de tratamento para doenças cujo eixo NKG2D-MICA/B estejam alterados como em processos de neoplasias malignas e infecções virais.

Nesse contexto, as células NK, que integram a imunidade inata, desempenham um papel relevante na imunidade adaptativa no intuito de eliminar células infectadas, cancerosas ou danificadas, por meio de sinais ativadores que promovem citotoxicidade contra as células-alvo (VIVIER et al., 2011; NETEA et al., 2016). A regulação das células NK ocorre por meio de um equilíbrio entre sinais recebidos de receptores ativadores e inibidores (WANG; MALARKANNAN, 2020). Essas células possuem habilidades citotóxicas semelhantes às das células T CD8+, mas não possuem CD3 nem os receptores de células T (TCRs). Representam cerca de 5-10% das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), mas também são encontradas na medula óssea, em tecidos linfóides, como o baço e diversos outros locais no organismo como a decidua materna (ZHANG et al., 2007; CHERRIER; SERAFINI; DI SANTO, 2018).

As células NK têm origem em células progenitoras linfóides comuns (CLP) na medula óssea, com um ciclo de renovação médio de aproximadamente 2 semanas. Durante seu desenvolvimento, a interação de receptores de NK que possuem motivos inibitórios baseados em tirosina (ITIMs) com o ligantes HLA-I, permite que as células NK se tornem licenciadas e tolerem o ataque a células saudáveis e normais (GUILLEREY; HUNTINGTON; SMYTH, 2016; CHIOSSONE; et al., 2018).

Entre os diversos receptores que regulam a ação das células NK, destacam-se os da família NKG2, com ênfase no receptor ativador NKG2D, que interage com as moléculas MICA, MICB e proteínas ligantes de UL16 (ULBPs) (RAULET et al., 2013; TCHACROME et al., 2022), desencadeando a atividade citotóxica na célula-alvo (Figura 3). A expressão de NKG2D pode ser aumentada por citocinas como IL-2, IL-7, IL-12 (PARK et al., 2011), IL-15 (ROBERTS et al., 2001) e interferon alfa (IFN- α) (MUNTASELL et al., 2010; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2013), enquanto citocinas como TGF- β (CRANE et al., 2010), interferon beta-1 (IFN- β 1) (MUNTASELL et al., 2010), IL-21 (BURGESS et al., 2006), IL-4, IL-12 e IFN- γ (MUNTASELL et al., 2010) têm efeito inibitório sobre a expressão de NKG2D. A regulação negativa também pode ser influenciada pela superexposição a ligantes solúveis MICA, MICB e ULBPs (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2013; RISTI; BICALHO, 2017).

No sangue periférico humano, cinco subpopulações de células NK ($CD56^{bright}CD16^{-}$; $CD56^{bright}CD16^{+}$; $CD56^{dim}CD16^{+}$; $CD56^{dim}CD16^{-}$ e $CD56^{-}CD16^{+}$), podem ser definidas com base na expressão relativa dos marcadores CD16 e CD56. Duas delas são bem descritas pela literatura quanto à função e localização: $CD56^{bright}CD16^{+}$ e $CD56^{dim}CD16^{+}$ (POLI et al., 2009).

As células NK $CD56^{bright}CD16^{+}$ representam apenas 10% das células NK no sangue periférico (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001; CALIGIURI, 2008) mas, após a diferenciação das células-tronco hematopoiéticas em células NK na medula óssea migram preferencialmente para órgãos linfóides secundários e constituem a maioria das células NK nesses tecidos (CHUNG et al., 2008). A migração ocorre provavelmente porque essas células expressam receptores de quimiocinas, como CCR7, e moléculas de adesão (CAMPBELL et al., 2001). As células NK $CD56^{bright}CD16^{+}$ são produtoras abundantes de citocinas, mas são pouco citotóxicas antes da ativação (Figura 10). As principais citocinas liberadas são IFN- γ , o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), o fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos, IL-10 e IL-13. Entretanto, essas células podem exibir papel citotóxico quando estimuladas por IL-15. Elas dependem de receptores CD94/NKG2A para autotolerância (WAGNER et al., 2017).

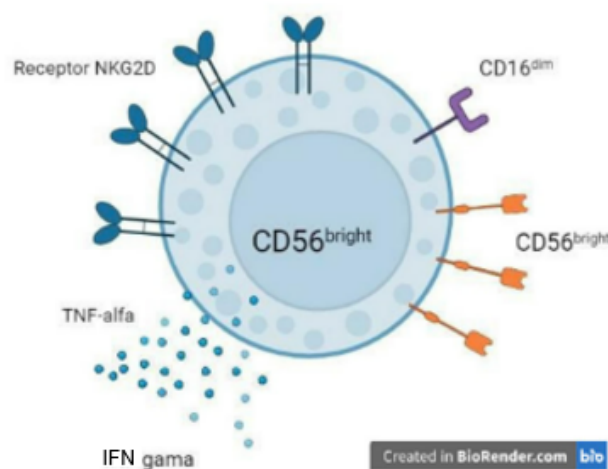
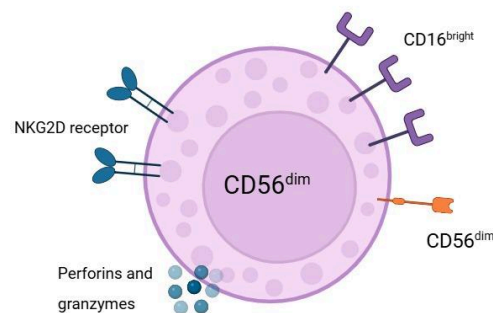


Figura 10: Ilustração da célula Natural Killer $CD56^{bright}CD16^{+}$.

Fonte: Autoria própria. [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](#), acessado em 02 de dezembro de 2024.

Já as células $CD56^{dim}CD16^+$ representam aproximadamente 90% das células NK no sangue periférico (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001; CALIGIURI, 2008), e sua atividade citotóxica é forte em razão da alta concentração citoplasmática de perforinas, granzimas e outros grânulos citolíticos (Figura 11). Sua migração ocorre preferencialmente para locais que estejam com processos de inflamações agudas (POLI et al., 2009). Essa migração se dá pelo repertório de receptores de quimiocina dessas células ser semelhante ao dos neutrófilos (CXCR1 e CX3CR1) (CAMPBELL et al., 2001). Elas expressam receptores inibitórios relacionados à maturidade (receptores semelhantes a imunoglobulinas de células assassinas [KIRs]), e altos níveis de CD16 (Fc γ RIIIa) na superfície, permitindo respostas a alvos opsonizados por anticorpos (WAGNER et al., 2017). Além disso, essas células provavelmente descendem das $CD56^{bright}$. Como mostrado por Chan et al., em 2007, as células $CD56^{dim}$ exibem telômeros mais curtos do que as células $CD56^{bright}$ do sangue periférico e linfonodos. O estudo também comprovou que as células $CD56^{bright}$ purificadas, cultivadas na presença de fibroblastos sinoviais ou de pele, podem se diferenciar em células $CD56^{dim}$.



Created in BioRender.com bbo

Figura 11: Ilustração da célula Natural Killer $CD56^{dim}CD16^+$.

Fonte: Autoria própria. [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](#), acessado em 02 de dezembro de 2024.

Essa diferenciação entre as subpopulações de NK e, conseqüentemente, de tipos de receptores disponíveis para interagir com seus ligantes, destaca a complexidade do sistema imunológico na resposta a processos patológicos. Sendo assim, a interação entre moléculas de MICA e receptores nas células NK têm ganhado atenção, especialmente devido à sua relevância na modulação da resposta imune em situações como o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer.

Um dos alelos clinicamente mais importante nos estudos de MICA é o MICA-129 (rs1051792), cujo polimorfismo resulta em diferente afinidade de interação com o receptor NKG2D, presente em diferentes concentrações nas subpopulações de células NK, células TCD8 e Tgd. OUNI et al. (2020) sugerem que MICA-129 poderia ser um biomarcador genético herdado que contribui para um risco aumentado de câncer de mama em mulheres

tunisianas devido a forte associação entre o genótipo Val/Val e pacientes mais jovens que desenvolveram a doença. O genótipo MICA-129 Val/Val também foi associado ao grupo de pacientes do sul do Brasil com carcinoma cervical ou neoplasia intraepitelial cervical em relação ao grupo controle (VON LINSINGEM et al., 2020). Há também diversas descobertas que indicam uma correlação entre os alelos classificados como *MICA*A5.1*, com o carcinoma espinocelular oral (TAMAKI et al., 2007; TAMAKI et al., 2009; LAVADO-VALENZUELA et al., 2009).

Toledo-Stuardo et al. (2021) identificaram que uma variação no gene MICA, especificamente no resíduo 181 (rs1131897), envolvendo a substituição de treonina (Thr) por arginina (Arg), está ligada ao risco de desenvolvimento de câncer gástrico. A análise molecular do MICA-181 revelou que a presença de Thr aumenta a mobilidade da proteína MICA, facilitando a liberação da molécula solúvel. Isso pode fornecer insights sobre os mecanismos de evasão imunológica utilizados pelo tumor.

Outras proteínas podem favorecer esse mecanismo de evasão imune. Recentemente foi demonstrado que a pleckstrin-2 (PLEK2), uma proteína adaptadora ligada a sobrevivência celular, é uma molécula fundamental na progressão tumoral, promovendo a fosforilação de Sp1 através da via fosfatidylinositol 3-kinase/Protein kinase B (PI3K-AKT). Esse processo resulta na regulação positiva da expressão das metaloproteinases MT1-MMP, que, por sua vez, facilitam a clivagem de MICA. Consequentemente, o PLEK2 foi identificado como um fator que suprime a vigilância imunológica das células NK em pacientes com câncer gástrico, mediada pela clivagem de MICA (MAO et al., 2023). Além disso, Pachani et al. (2022) mostraram que os níveis de sMICA presentes nos fluidos corporais podem ser úteis como ferramentas de diagnóstico ou prognóstico para avaliar a progressão da doença ou a regressão de tumores. Foi observada uma forte associação positiva entre altos níveis plasmáticos de sMICA e progressão do câncer pancreático (ONYEAGHALA et al., 2017).

Embora nenhuma relação direta entre variantes de MICA e Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (GVHD) tenha sido observada, a presença do genótipo MICA rs1051792 GG (Val/Val) correlacionou-se com níveis elevados de sMICA. Esses altos níveis de sMICA são fatores de risco para GvHD crônica em transplante de células tronco hematopoiéticas (HSCT) (SIEMASZKO et al., 2024). No entanto, a presença de anticorpos anti-MICA pode proteger, e há uma relação inversa entre os anticorpos anti-MICA e sMICA, sugerindo uma neutralização dos efeitos deletérios de sMICA (BOUKOUACI et al., 2009). Para reduzir a incidência de rejeição em aloenxertos de órgãos sólidos, medicamentos ou substâncias que modulam a produção de sMICA podem ser considerados como alvos terapêuticos (SUAREZ-ALVAREZ et al., 2006).

Diversos tipos de doenças autoimunes parecem estar relacionadas com alguns polimorfismos dos genes MICA. A presença do dimorfismo MICA-129 em pacientes foi associada a espondilite anquilosante (EA), diabetes mellitus tipo I (T1DM) (RAACHE et al., 2012), doença inflamatória intestinal (ZHAO et al., 2011; LOPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2010), lúpus eritematoso sistêmico (LES) (YOSHIDA, 2011), psoríase (SONG, KIM, LEE, 2014) e síndrome de Sjögren (CARAPITO et al., 2017). Os alelos *MICA*009* do grupo *MICA*A6* foram previamente associados a um risco aumentado de desenvolvimento de artrite reumatoide (AR) na população Han, da China (WANG et al., 2019), enquanto os alelos do

grupo *MICA*44* parecem estar relacionados à suscetibilidade à AR em populações de origem europeia e japonesa (MOK et al., 2003). Estudos em várias populações também apontam o *MICA*007* como um alelo de risco independente para EA (ZHOU et al., 2014). Além disso, foi observada uma correlação entre a homozigose para *MICA*019* e altos níveis de sMICA em pacientes tailandeses, sugerem uma relação entre sMICA e o desenvolvimento de EA (WANG et al., 2021).

Em um estudo realizado pelo nosso grupo, variantes dos genes MICA e MICB foram associadas a infecções sintomáticas por Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2) em casais discordantes. Os alelos *MICA*008*, *MICA*019*, *MICB*004* e a variante rs3131639/A de MICB apresentaram alta prevalência em pacientes sintomáticos, quando comparados aos seus parceiros, que foram expostos ao vírus, mas não infectados. Essas variantes parecem estar associadas a uma expressão elevada de MICA na forma solúvel e a uma expressão reduzida de MICB na superfície celular (CASTELLI et al., 2021). Interessantemente, a frequência dessas mesmas variantes de MICB também foram relacionadas à gravidade da febre hemorrágica da dengue (LUANGTRAKOOL et al., 2020).

Diante de diversos estudos apontando o papel de MICA e MICB na imunidade antitumoral, anti-infecciosa e autoimune, as imunoterapias direcionadas ao eixo MICA/B-NKG2D têm se mostrado promissoras. Essas terapias baseiam-se em restabelecer a interação entre MICA, expressa nas células transformadas ou infectadas, e o receptor NKG2D, presente em células T citotóxicas e NK, o que resulta em citotoxicidade celular (ALBERT et al., 2017; DE MUNTER et al., 2018; XIE et al., 2019; BAO et al., 2021). A clivagem do domínio a3 de MICA/B por proteases como ADAM10 e ADAM17 pode facilitar a evasão imunológica (KAISER et al., 2007; WALDHAUER et al., 2008; LIU et al., 2010; XING; FERRARI DE ANDRADE, 2020). Nesse cenário, o anticorpo monoclonal 7C6, que inibe a clivagem de MICA/B da superfície celular, surge como uma estratégia promissora, mantendo a molécula MICA/B nas superfícies das células e favorecendo a ativação do receptor NKG2D, promovendo a citotoxicidade mediada por células imunes (DE ANDRADE et al., 2018; VERHAAR et al., 2024).

Nanocorpos específicos para MICA podem atuar como agentes terapêuticos inovadores, preservando a presença de MICA nas células tumorais e intensificando a citotoxicidade via ativação do receptor NKG2D (VERHAAR et al., 2024). Devido ao seu tamanho reduzido, os nanocorpos apresentam maior penetração nos tecidos tumorais, possuem baixa imunogenicidade e são mais fáceis de serem produzidos e modificados em comparação com as imunoglobulinas tradicionais (VAN DER LINDEN et al., 1999; TANHA et al., 2001; DREIER et al., 2008; KLARENBECK et al., 2015; KIJANKA et al., 2015; FANG et al., 2018).

Para exercer uma maior atividade citotóxica, os nanocorpos podem ser conjugados a agentes quimioterápicos, criando uma abordagem terapêutica que não apenas favorece a permanência de MICA nas células tumorais, mas também eleva a especificidade e minimiza os efeitos colaterais sistêmicos, graças à rápida eliminação dos conjugados não ligados ao alvo (FU; HO, 2018; FUENTES-ANTRÁS et al., 2023). Estudos mostram que nanocorpos conjugados a inibidores de microtúbulos, como o DM1, aumentam a citotoxicidade de forma mais específica contra células tumorais MICA+ em comparação com a droga isolada (MILENIC; BRADY; BRECHBIEL, 2004; LIN et al., 2021). O desenvolvimento de terapias

que explorem a interação MICA-NKG2D representa um avanço significativo na busca por tratamentos mais eficazes e específicos para o câncer (VERHAAR et al., 2024).

Considerando a dualidade das moléculas de MICA e MICB no sistema imune, os diferentes contextos clínicos, as promissoras abordagens como biomarcadores e alvos de imunoterapia, estudos nessa área contribuem diretamente para a melhor compreensão do comportamento dessas moléculas e suas habilidades de modulação imune. Conhecendo os desafios associados à padronização da detecção dessas moléculas, principalmente em contextos de diagnóstico e rastreamento de diversas doenças, o presente estudo visou correlacionar o perfil de expressão de RNA mensageiro e quantificação de moléculas MICA e MICB na superfície de monócitos de indivíduos saudáveis com alelos conhecidos.

2. HIPÓTESE E RELEVÂNCIA DO TRABALHO

CONCLUSÕES GERAIS

A análise molecular de MICA e MICB na superfície de monócitos de indivíduos saudáveis estimulados com LPS (200 ng/mL) por 18h mostrou que não houve aumento da expressão RNA mensageiro, nem na superfície celular, nem de maneira solúvel nas células estimuladas. Apesar disso, a divisão dos indivíduos em grupos com base nos tipos de alelos e na similaridade das proteínas codificadas permitiu a identificação de alguns padrões importantes. Dentre os grupos estudados, o grupo *MICA*008* HOM, composto por indivíduos homocigotos para o alelo *MICA*008*, apresentou alta porcentagem de monócitos expressando MICA na superfície celular, assim como de níveis plasmáticos de isoforma solúvel. Interessantemente, grupo *MICA*002* MEM apresentou uma baixa porcentagem de monócitos positivos para MICA na superfície celular, o que pode indicar que seja facilmente clivada por metaloproteinases na superfície de célula estudada tempo de cultivo. No contexto de MICB, observou-se que indivíduos portadores do alelo *MICB*004* (grupo *MICB*004* SUSC) apresentaram níveis reduzidos de MICB na superfície de monócitos e uma maior concentração de sMICB no plasma, o que pode estar associado à suscetibilidade a certas doenças e perfil inverso foi observado no grupo *MICB*002* RES. Portanto, este estudo contribui para a melhor compreensão se a expressão de MICA e MICB em indivíduos saudáveis pode estar correlacionada ao tipo de alelo, o que possibilita avanços no

desenvolvimento de métodos inovadores para diagnóstico, com cut-off mais acurado, rastreamento de gravidade de doenças e até indicações para imunoterapias.

REFERÊNCIAS

ABRUZZESE, M. P.; et al. Inhibition of bromodomain and extra-terminal (BET) proteins increases NKG2D ligand MICA expression and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity in multiple myeloma cells: role of cMYC-IRF4-miR-125b interplay. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 9, p. 134, 2016.

AFROZ, R. et al. LPS/TLR4 pathways in breast cancer: insights into cell signalling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 13, p. 2274-2289, 2022.

AL-ABDALLAH, A. et al. Down-regulation of the human major histocompatibility complex class I chain-related gene A (MICA) and its receptor is mediated by microRNA-146b-5p and is a potential mechanism of immunoediting in papillary thyroid carcinoma. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 113, p. 104379, 2020.

ALBERT, S.; et al. A novel nanobody-based target module for retargeting of T lymphocytes to EGFR expressing cancer cells via the modular UniCAR platform. **Oncoimmunology**, v. 6, p. 1–17, 2017. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1287246.

AMANN, E. M., et al. The impact of MICB mismatches in unrelated haematopoietic stem cell transplantation. **HLA: Immune Response Genetics**, v. 103, n. 6, 2024.

AMROUN, H. et al. Early-onset ankylosing spondylitis is associated with a functional MICA polymorphism. **Human Immunology**, Philadelphia, v. 66, n. 10, p. 1057–1061, 2005.

- ANDO, H. et al. Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB). **Immunogenetics**, v. 46, n. 6, p. 499-508, 1997.
- ANG, T.; et al. Nanobody immunostaining for correlated light and electron microscopy with preservation of ultrastructure. **Nature Methods**, v. 15, p. 1029-1032, 2018.
- ARNETH, B. Trained innate immunity. **Immunologic Research**, v. 69, n. 1, p. 1–7, fev. 2021.
- ASHIRU, O. et al. A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA*008. **The Biochemical Journal**, v. 454, n. 2, p. 295–302, 1 set. 2013.
- BAHRAM, S. et al. Genomic structure of the human MHC class I MICB gene. **Immunogenetics**, Basel Institute for Immunology, Tokai University, v. 45, n. 2, pp. 161-162, 31 dez. 1995.
- BAHRAM, S. et al. T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 6259-6263, 1994.
- BAHRAM, S. MIC genes: from genetics to biology. **Advances in Immunology**, v. 76, p. 1–60, 2000.
- BAO, C.; et al. The application of nanobody in CAR-T therapy. **Biomolecules**, v. 11, p. 1–18, 2021.
- BLOBEL, C. P. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 1, p. 32-43, 2005.
- BOUKOUACI, W. et al. MICA-129 genotype, soluble MICA, and anti-MICA antibodies as biomarkers of chronic graft-versus-host disease. **Blood**, v. 114, p. 5216-5224, 2009.
- BREUNIG, C.; et al. MicroRNA-519a-3p mediates apoptosis resistance in breast cancer cells and their escape from recognition by natural killer cells. **Cell Death & Disease**, v. 8, e2973, 2017.
- BURGESS, S. J. et al. IL-21 Down-Regulates NKG2D/DAP10 Expression on Human NK and CD8+ T Cells. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 3, p. 1490-1497, 2006.
- CALIGIURI, M. Human natural killer cells. **Blood**, v. 112, p. 461-469, 2008.
- CAMPBELL, J. J. et al. Unique Subpopulations of CD56+ NK and NK-T Peripheral Blood Lymphocytes Identified by Chemokine Receptor Expression Repertoire1. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 11, p. 6477–6482, 1 jun. 2001.
- CANET, L. M. et al. Genetic variants within immune-modulating genes influence the risk of developing rheumatoid arthritis and anti-TNF drug response: a two-stage case-control study. **Pharmacogenetics and Genomics (Pharmacogenet Genomics)**, v. 25, n. 9, p. 432-443, 31 ago. 2015.

- CARAPITO, R. et al. A new MHC-linked susceptibility locus for primary Sjögren's syndrome: MICA. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 26, n. 13, p. 2565–2576, 2017.
- CASTELLI, E. C. et al. MHC Variants Associated With Symptomatic Versus Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection in Highly Exposed Individuals. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 742881, 2021.
- CERBONI, C.; et al., Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK-cell lysis. **Blood**, v. 110, n. 2, p. 606-615, 2007.
- CHAN, A. et al. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 1, p. 89–94, 1 jul. 2007.
- CHEN, D.; GYLLENSTEN, U. MICA polymorphism: biology and importance in cancer. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 12, p. 2633-2642, dez. 2014.
- CHEN, E. et al. Positive association between MIC gene polymorphism and tuberculosis in Chinese population. **Immunology Letters**, v. 213, p. 62–69, set. 2019.
- CHERRIER, D. E.; SERAFINI, N.; DI SANTO, J. P. Innate lymphoid cell development: A T cell perspective. **Immunity**, v. 48, p. 1091–1103, 2018.
- CHIOSSONE, L.; et al. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, p. 671–688, 2018.
- CHITADZE, G. et al. Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 78, n. 2, p. 120–129, ago. 2013a.
- CHITADZE, G. et al. Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: heterogeneous involvement of the “a disintegrin and metalloproteases” 10 and 17. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 7, p. 1557–1566, 1 out. 2013b.
- CHOY, M. K.; PHIPPS, M. E. MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 16, n. 3, 2010.
- CHUNG, Jin Woong. The regulation of NK cell function and development. **Frontiers in bioscience**, n. 13, p. 6432–6442, 2008.
- CIESIELSKA, A; MATYJEK, M; KWIATKOWSKA, K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, p. 1233-1261, 2021.
- CIRIACO, V. A. O. et al. The MICA deletion across different populations. **Human Immunology**, v. 85, n. 6, p. 111183, 2024.
- COOPER, M. A.; FEHNIGER, T. A.; CALIGIURI, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 11, p. 633-640, 2001.

CRANE, C. A.; et al. TGF- β downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8⁺ T cells in glioma patients. **Neuro-oncology**, v. 12, n. 1, p. 7-13, 2010.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

DE ANDRADE, L. F. et al. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. **Science**, v. 359, n. 6383, p. 1537-1542, 2018.

DE MUNTER, S.; et al. Nanobody based dual specific CARs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 1–11, 2018. DOI: 10.3390/ijms19020403.

DEMARIA, O. et al. Harnessing innate immunity in cancer therapy. **Nature**, v. 574, n. 7776, 2019.

DREIER, T.; et al. Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: Taking advantage of modular Nanobody technology. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, p. 2288-2297, 2008.

DU, C. et al. MICA immune complex formed with alpha 3 domain-specific antibody activates human NK cells in a Fc-dependent manner. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 7, n. 1, p. 207, 1 dez. 2019.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A. et al. DNA demethylation and histone H3K9 acetylation determine the active transcription of the NKG2D gene in human CD8⁺ T and NK cells. **Epigenetics**, v. 8, n. 1, p. 66-78, 2013.

FOLWACZNY, M. et al. Impact of MICA-TM, MICB-C1_2_A and C1_4_1 microsatellite polymorphisms on the susceptibility to chronic periodontitis in Germany. **Tissue Antigens**, v. 77, n. 4, p. 298-304, 31 mar. 2011.

FU, Y.; HO, M. DNA damaging agent-based antibody-drug conjugates for cancer therapy. **Antibody Therapy**, v. 1, p. 43-53, 2018.

FUENTES-ANTRÁS, J.; et al. Antibody–drug conjugates: in search of partners of choice. **Trends in Cancer**, v. 9, p. 339-354, 2023.

FUERTES, M. B.; DOMAICA, C. I.; ZWIRNER, N. W. Leveraging NKG2D Ligands in Immuno-Oncology. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

GAMBELUNGHE, G. et al. MICA A8: a new allele within MHC class I chain-related a transmembrane region with eight GCT repeats. **Human Immunology**, v. 67, n. 12, p. 1005–1007, 2006.

GENG, J. et al. Empty conformers of HLA-B preferentially bind CD8 and regulate CD8⁺ T cell function. **eLife**, v. 7, p. e36341, 2018.

GENSTERBLUM, E.; WU, W.; SAWALHA, A. H. Novel transcriptional activity and extensive allelic imbalance in the human MHC region. **Journal of Immunology**, p. 1-12, 14 fev. 2018.

GROH, V. et al. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 22, p. 12445–12450, 1996.

GROH, V. et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. **Nature**, v. 419, n. 6908, p. 734–738, 17 out. 2002.

GUILLEREY, C.; HUNTINGTON, N. D.; SMYTH, M. J. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. **Nature Immunology**, v. 17, p. 1025–1036, 2016.

HLA-nomenclature homepage. HLA Alleles Numbers, 2024. Disponível em: <http://www.hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>. Acesso em: outubro de 2024.

HORTON, R. et al. Gene map of the extended human MHC. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 889–899, 2004.

HU, X.; CHEN, B.; CHEN, Z. Role of macrophage polarization in the development of sepsis. **Chinese Critical Care Medicine**, v. 34, n. 6, p. 661-665, 2022.

ISERNHAGEN, A. et al. Impact of the MICA-129Met/Val dimorphism on NKG2D mediated biological functions and disease risks. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 588, 2016.

IVANOVA, M. et al. Associations of high-resolution-typing-defined MICA and MICB polymorphisms, and the levels of soluble MICA and MICB with oral squamous cell carcinoma in Bulgarian patients. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 50, n. 8, p. 758–765, 2021.

JARDULI, L. R. et al. Role of HLA, KIR, MICA, and cytokines genes in leprosy. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

KAISER, B. K. et al. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 482–486, 2007.

KIJANKA, M.; et al. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. **Nanomedicine**, v. 10, p. 161-174, 2015.

KIMURA, T. et al. Microsatellite polymorphism within the MICB gene among Japanese patients with Behçet's disease. **Human Immunology**, v. 59, n. 8, p. 500-502, 1998.

KISHIKAWA, T.; et al. Regulation of the expression of the liver cancer susceptibility gene MICA by microRNAs. **Scientific Reports**, v. 3, p. 2739, 2013.

KLARENBECK, A.; et al. Camelid Ig V genes reveal significant human homology not seen in therapeutic target genes, providing for a powerful therapeutic antibody platform. **MAbs**, v. 7, p. 693-706, 2015.

KLOSS, M. et al. Interaction of monocytes with NK cells upon Toll-like receptor-induced expression of the NKG2D ligand MICA. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 10, p. 6711–6719, 15 nov. 2008.

KOMATSU-WAKUI, M. et al. MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype. **Immunogenetics**, v. 49, n. 7–8, p. 620–628, jul. 1999.

- KOMATSU-WAKUI, M. et al. Wide distribution of the MICA-MICB null haplotype in East Asians. **Tissue Antigens**, v. 57, n. 1, p. 1–8, jan. 2001.
- KSHERSAGAR, J. et al. Downregulation of MICA/B tumor surface expressions and augmented soluble MICA serum levels correlate with disease stage in breast cancer. **Breast Disease**, v. 41, n. 1, p. 471–480, 2022.
- KUMAR, N. et al. Major histocompatibility complex class I chain related gene-A microsatellite polymorphism shows secondary association with type 1 diabetes and celiac disease in north Indians. **Tissue Antigens**, v. 80, n. 4, p. 356–362, 2012.
- LAVADO-VALENZUELA, R. et al. MHC class I chain-related gene A transmembrane polymorphism in Spanish women with breast cancer. **Tissue Antigens**, v. 74, p. 46-49, 2009.
- LEELAYUWAT, C. et al. A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. **Immunogenetics**, v. 40, n. 5, p. 339–351, 1994.
- LI, L. et al. Effects of immune cells and cytokines in inflammation and immunosuppression in the tumor microenvironment. **International Immunopharmacology**, v. 88, p. 106939, 2020.
- LI, P. et al. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. **Nature Immunology**, v. 2, n. 5, p. 443-451, 2001.
- LI, Z. et al. A single amino acid substitution causes loss of expression of a MICA allele. **Immunogenetics**, v. 51, n. 3, p. 246–248, 2000.
- LIN, M.; et al. Monoclonal antibody-based radiopharmaceuticals for imaging and therapy. **Current Problems in Cancer**, v. 45, 2021.
- LIU, G. et al. Cutting edge: the membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. **Journal of Immunology**, v. 184, p. 3346–3350, 2010.
- LJUNGGREN, H. G.; KÄRRE, K. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. **Immunology Today**, v. 11, n. 7, p. 237–244, jul. 1990.
- LOPEZ-ARBESU, R. et al. MHC class I chain-related gene B (MICB) is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. **Rheumatology**, v. 46, n. 3, p. 426–430, 2007.
- LOPEZ-HERNÁNDEZ, R. et al. Association analysis of MICA gene polymorphism and MICA-129 dimorphism with inflammatory bowel disease susceptibility in a Spanish population. **Human Immunology**, v. 71, n. 5, p. 512–514, 2010.
- LU, J. et al. Induction of ATM/ATR pathway combined with V γ 2V δ 2 T cells enhances cytotoxicity of ovarian cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 7, p. 1071-1079, 2014.
- LU, M. et al. MICB microsatellite polymorphism is associated with ulcerative colitis in Chinese population. **Clinical Immunology**, v. 120, n. 2, p. 199-204, 2006.

LUANGTRAKOOL, P. et al. Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related A and B (MICA and MICB) Gene, Allele, and Haplotype Associations With Dengue Infections in Ethnic Thais. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 5, p. 840–846, 4 ago. 2020.

MAO, D. et al. Pleckstrin-2 promotes tumour immune escape from NK cells by activating the MT1-MMP-MICA signalling axis in gastric cancer. **Cancer Letters**, v. 572, p. 216351, 28 set. 2023.

MARÓSTICA, A. S. et al. How HLA diversity is apportioned: influence of selection and relevance to transplantation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 377, n. 1844, 2022.

MATUSALI, G. et al. Soluble ligands for the NKG2D receptor are released during HIV-1 infection and impair NKG2D expression and cytotoxicity of NK cells. **FASEB Journal**, v. 27, n. 6, p. 2440–2450, 2013.

MATZARAKI, V. K. et al. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. **Genome Biology**, v. 18, p. 76, 2017.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MICHITA, R. T. et al. A Valine Mismatch at Position 129 of MICA Is an Independent Predictor of Cytomegalovirus Infection and Acute Kidney Rejection in Simultaneous Pancreas–Kidney Transplantation Recipients. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2618, 2018.

MILENIC, D. E.; BRADY, E. D.; BRECHBIEL, M. W. Antibody-targeted radiation cancer therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 488-498, 2004.

MIN, D.; et al. Downregulation of miR-302c and miR-520c by 1,25(OH)2D3 treatment enhances the susceptibility of tumour cells to natural killer cell-mediated cytotoxicity. **British Journal of Cancer**, v. 109, p. 723–730, 2013.

MIZUKI, N. et al. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 4, p. 1298–1303, 18 fev. 1997.

MOK, J. W. et al. Association of MICA polymorphism with rheumatoid arthritis patients in Koreans. **Human Immunology**, v. 64, n. 12, p. 1190–1194, 2003.

MOLFETTA, R. et al. Regulation of NKG2D Expression and Signaling by Endocytosis. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 11, p. 790–802, 2016.

MUNTASELL, A. et al. Inhibition of NKG2D expression in NK cells by cytokines secreted in response to human cytomegalovirus infection. **Blood**, v. 115, n. 25, p. 5170-5179, 2010.

NETEA, M. G.; et al.. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. **Science**, v. 352, p. aaf1098, 2016.

- OBUCHI, N. et al. Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4. **Tissue Antigens**, v. 57, n. 6, p. 520–535, jun. 2001.
- OLSON, E.; GENG, J.; RAGHAVAN, M. Polymorphisms of HLA-B: influences on assembly and immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 64, p. 137-145, 2020.
- O'NEILL, L. A. J. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. **Immunological Reviews**, v. 226, n. 1, p. 10-18, 2008.
- ONYEAGHALA, G.; et al. Soluble MICA is elevated in pancreatic cancer: Results from a population-based case-control study. **Molecular Carcinogenesis**, v. 56, n. 9, p. 2158-2164, 2017.
- OUNI, N. et al. MICA-129 Met/Val polymorphism could be a genetic biomarker for familial breast cancer in the Tunisian population. **International Journal of Immunogenetics**, v. 47, n. 5, p. 406-413, 2020.
- PACHANI, P. et al. A comparative study of sMICA in various body fluids of diagnosed cervical cancer patients and healthy women. **Obstetrics & Gynecology Science**, v. 65, n. 1, p. 37–45, jan. 2022.
- PARK, Y. P. et al. Complex regulation of human NKG2D-DAP10 cell surface expression: opposing roles of the yc cytokines and TGF-β1. **Blood**, v. 118, n. 11, p. 3019-3027, 2011.
- PINATIH, K. J. P.; SUPADMANABA, I. G. P.; WIHANDANI, D. M. MHC polymorphism in the immune system. **Indonesia Journal of Biomedical Science**, v. 16, n. 2, p. 148-151, 29 dez. 2022.
- POLI, A. et al. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. **Immunology**, v. 126, n. 4, p. 458–465, 2009.
- RAACHE, R. et al. Association of major histocompatibility complex class 1 chain-related gene a dimorphism with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults in the Algerian population. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 4, p. 557–561, 2012.
- RAMOS, P. S. Unravelling the complex genetic regulation of immune cells. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 17, n. 3, p. 131-132, 28 fev. 2021.
- RAULET, D. H. et al. Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 413-441, 2013.
- REISS, K.; LUDWIG, A.; SAFTIG, P. Breaking up the tie: Disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 3, p. 985–1006, 2006.
- RISTI, M.; BICALHO, M. DA G. MICA and NKG2D: Is There an Impact on Kidney Transplant Outcome? **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 179, 2017.
- ROBERTS, A. I. et al. Cutting edge: NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 10, p. 5527-5530, 2001.

- ROBINSON, J. et al. MICA sequences 2000. **Immunogenetics**, v. 53, n. 2, p. 150–169, 2001.
- RODA-NAVARRO, P.; REYBURN, H. T. The Traffic of the NKG2D/Dap10 Receptor Complex during Natural Killer (NK) Cell Activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 24, p. 16463–16472, 2009.
- RODRÍGUEZ-RODERO, S. et al. Transcriptional regulation of MICA and MICB: A novel polymorphism in MICB promoter alters transcriptional regulation by Sp1. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 7, p. 1938-1953, 2007.
- SALIH, H. R.; RAMMENSEE, H. G.; STEINLE, A. Cutting Edge: Down-Regulation of MICA on Human Tumors by Proteolytic Shedding. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 8, p. 4098–4102, 2002.
- SIEMASZKO, J. et al. MICB Genetic Variants and Its Protein Soluble Level Are Associated with the Risk of Chronic GvHD and CMV Infection after Allogeneic HSCT. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 72, n. 1, 2024.
- SIEMASZKO, J. et al. Soluble MICA concentrations and genetic variability of MICA and its NKG2D receptor as factors affecting Graft-versus-Host Disease development after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. **Human Immunology**, 2024.
- SONG, G. G.; KIM, J. H.; LEE, Y. H. Associations between the major histocompatibility complex class I chain-related gene A transmembrane (MICA-TM) polymorphism and susceptibility to psoriasis and psoriatic arthritis: a meta-analysis. **Rheumatology International**, v. 34, n. 1, p. 117–123, 2014.
- SOUZA, C. F. et al. HLA and MICA genes in patients with tuberculosis in Brazil. **Wiley Online Library**, v. 79, p. 58-63, 2021.
- STANKEY, C. T.; LEE, J. Translating non-coding genetic associations into a better understanding of immune-mediated disease. **Disease Models & Mechanisms**, v. 16, n. 3, 28 fev. 2023.
- STEINLE, A. et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. **Immunogenetics**, v. 53, n. 4, p. 279–287, 2001.
- STEN-GINOSSAR, N. et al. Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. **Nature Immunology**, v. 9, n. 9, p. 1065-1073, 2008.
- SUAREZ-ALVAREZ, B. et al. The predictive value of soluble major histocompatibility complex class I chain-related molecule A (MICA) levels on heart allograft rejection. **Transplantation**, v. 82, p. 354-361, 2006.
- SUEMIZU, H. et al. A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 5, p. 2971-2976, 2002.
- TAMAKI, S. et al. An association between the MICA-A5.1 allele and an increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma in Japanese patients. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 36, p. 351-356, 2007.

- TAMAKI, S. et al. Relationship between soluble MICA and the MICA A5.1 homozygous genotype in patients with oral squamous cell carcinoma. **Clinical Immunology**, v. 130, p. 331-337, 2009.
- TAMIYA, G. et al. Twenty-six new polymorphic microsatellite markers around the HLA-B, -C and -E loci in the human MHC class I region. **Tissue Antigens**, v. 51, n. 4, p. 337-346, 2008.
- TANHA, J.; et al. Optimal design features of camelized human single-domain antibody libraries. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 24774-24780, 2001.
- TANI, R. et al. MICA A5.1 homozygous genotype is associated with a risk for early-onset oral cancer. **Oral Oncology**, v. 116, p. 105256, 2021.
- TCHACROME, I. et al. Diseases association with the polymorphic major histocompatibility complex class I related chain A: MICA gene. **Transplant Immunology**, v. 75, p. 101665, 2022.
- TOLEDO-STUARDO, K. et al. Major Histocompatibility Complex Class I-Related Chain A (MICA) Allelic Variants Associate With Susceptibility and Prognosis of Gastric Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 645528, 2021.
- VAN DER LINDEN, R. H. J.; et al. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1431, p. 37-46, 1999.
- VAVILOV, M. N.; SUSLOVA, T.; BURMISTROVA, A. L. Frequency and parameters of linkage disequilibrium of the two-locus HLA-B~MICA haplotypes in Russians from Chelyabinsk region. **Russian Journal of Immunology: RJI**, v. 25, n. 2, p. 139-146, 31 ago. 2022.
- VERHAAR, E. R. et al. MICA-specific nanobodies for diagnosis and immunotherapy of MICA+ tumors. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1368586, 2024.
- VIVIER, E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44-49, 2011.
- VULPIS, E. et al. Impact on NK cell functions of acute versus chronic exposure to extracellular vesicle-associated MICA: Dual role in cancer immunosurveillance. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 11, n. 1, p. e12176, 2022.
- WAGNER, J. A. et al. CD56bright NK cells exhibit potent antitumor responses following IL-15 priming. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 11, p. 4042–4058, 1 nov. 2017.
- WAGNER, J. A. et al. CD56bright NK cells exhibit potent antitumor responses following IL-15 priming. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 11, p. 4042–4058, 1 nov. 2017.
- WALDHAUER, I. et al. Tumor-Associated MICA Is Shed by ADAM Proteases. **Cancer Research**, v. 68, n. 15, p. 6368–6376, 2008.

- WANG, C. M. et al. MICA*019 allele and soluble MICA as biomarkers for ankylosing spondylitis in Taiwanese. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 6, 2021.
- WANG, D.; MALARKANNAN, S. Transcriptional regulation of natural killer cell development and functions. **Cancers**, v. 12, n. 6, p. 1591, 2020.
- WANG, K. et al. Immunomodulatory role of metalloproteinase ADAM17 in tumor development. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 16 nov. 2022.
- WANG, S. et al. Associations between MICA and MICB Genetic Variants, Protein Levels, and Colorectal Cancer: Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC). **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 32, n. 6, p. 784–794, 1 jun. 2023.
- WANG, W. Y. et al. MICA, MICB Polymorphisms and Linkage Disequilibrium with HLA-B in a Chinese Mongolian Population. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 83, n. 6, p. 456-462, 2016.
- WANG, X. et al. An six amino acid motif in the $\alpha 3$ domain of MICA is the cancer therapeutic target to inhibit shedding. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 387, n. 3, p. 476-481, 2009.
- WANG, Y. et al. MICB002 and MICB014 protect against rheumatoid arthritis, whereas MICA009 and MICAA6 are associated with rheumatoid arthritis in a Hainan Han Chinese population. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 22, n. 1, p. 90–95, 2019.
- WHITE, J. M. ADAMs: modulators of cell–cell and cell–matrix interactions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 5, p. 598–606, 2003.
- WU, J.; et al. Hepatitis B surface antigen inhibits MICA and MICB expression via induction of cellular miRNAs in hepatocellular carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 35, p. 155–163, 2014.
- XIE, J.; et al. Ovarian tumor-associated microRNA-20a decreases natural killer cell cytotoxicity by downregulating MICA/B expression. **Cell & Molecular Immunology**, v. 11, p. 495–502, 2014.
- XIE, Y. J. et al. Nanobody-based CAR T cells that target the tumor microenvironment inhibit the growth of solid tumors in immunocompetent mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, p. 7624–7631, 2019.
- XING, S.; FERRARI, A. L. NKG2D and MICA/B shedding: A ‘tag game’ between NK cells and malignant cells. **Clinical & Translational Immunology**, v. 9, n. 12, p. 1230, 2020.
- YANG, D.; et al. Silencing circular RNA VANGL1 inhibits progression of bladder cancer by regulating miR-1184/IGFBP2 axis. *Cancer Medicine*, v. 9, p. 700–710, 2020.
- YOSHIDA, K. et al. Role of the MICA polymorphism in systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatology**, v. 63, n. 10, p. 3058–3066, 2011.
- YUREVNA, S. A.; SMIRNOV, I. V.; SAMOYLOVICH, M. P. Stress-induced MICA and MICB molecules in oncology. **Medical Immunology**, v. 24, n. 3, p. 31-39, 2022.

ZHANG, J. et al. Novel role of immune-related non-coding RNAs as potential biomarkers regulating tumour immunoresponse via MICA/NKG2D pathway. **Biomarker Research**, v. 11, n. 1, p. 86, 2023.

ZHANG, S. et al. Identification of a novel allele MICA*010:02. **Tissue Antigens**, v. 79, n. 3, p. 216–217, 2012.

ZHANG, Y. et al. In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. **Immunology**, v. 121, p. 258–265, 2007.

ZHAO, J. et al. Functional MICA-129 polymorphism and serum levels of soluble MICA are correlated with ulcerative colitis in Chinese patients. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 26, n. 3, p. 593–598, 2011.

ZHOU, X. et al. MICA, a gene contributing strong susceptibility to ankylosing spondylitis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 73, n. 8, p. 1552–1557, 2014.

ZOU, Y. et al. MICA allele-level typing by sequence-based typing with computerized assignment of polymorphic sites and short tandem repeats within the transmembrane region. **Human Immunology**, v. 67, n. 3, p. 145–151, 2006.

ZWIRNER, N. W.; DOLE, K.; STASTNY, P. Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. **Human Immunology**, v. 60, p. 323–330, 1999.