FLÁVIA AMOROSO MATOS E SILVA

**ESTUDO DO COMPARTIMENTO DE LINFÓCITOS T
CD4⁺ EM PACIENTES COM LLC-B: DISTRIBUIÇÃO
DAS SUBPOPULAÇÕES TH1, TH2, TH17 E TREG E
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FAS E FASL**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2014

FLÁVIA AMOROSO MATOS E SILVA

**Estudo do compartimento de linfócitos T CD4⁺ em
pacientes com LLC-B: distribuição das subpopulações
Th1, Th2, Th17 e Treg e avaliação da expressão de FAS e
FASL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Amarante-
Mendes

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Flávia Amoroso Matos e.

Estudo do compartimento de linfócitos T CD4+ em pacientes com LLC-B: distribuição das subpopulações Th1, Th2, Th17 e Treg e avaliação da expressão de FAS e FASL / Flávia Amoroso Matos e Silva. — São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Controle molecular da morte celular no câncer e no sistema imune.

Versão do título para o inglês: Study of the CD4+ T lymphocytes compartment in B-CLL patients: distribution of the Th1, Th2, Th17 and Treg subpopulation and evaluation of expression of FAS and FASL.

1. Linfócitos T 2. Linfócitos T efetores 3. Leucemia Linfocítica crônica 4. Receptores de morte 5. Fatores de prognóstico 6. Apoptose I. Mendes, Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0159/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Flávia Amoroso Matos e Silva.

Título da Tese: Estudo do compartimento de linfócitos T CD4+ em pacientes com LLC-B: distribuição das subpopulações Th1, Th2, Th17 e Treg e avaliação da expressão de FAS e FASL.

Orientador(a): Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 27 de abril de 2010.

PARECER 939/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 27.04.2010 APROVOU o projeto intitulado: "*Estudo da expressão de FasL, TNF- α e TRAIL em neoplasias hematológicas*" sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. João Gustavo P. Amarante Mendes e a aluna Flávia Amoroso Matos.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em 27.04.2011

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO MARINHO ANDRADE ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

São Paulo, 30 de março de 2011.

Processo CEP/Einstein nº. 11/1509 Projeto de Grupo II – Genética humana

Título: "Estudo do compartimento de linfócitos T CD4 em pacientes oncohematológicos: avaliação da expressão de FasL, TNF- α e TRAIL e distribuição das subpopulações TH1, Th2, Th17, Treg e células de memória." Protocolo apresentado sem número de versão e data, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1 de 18 de março de 2011.

Pesquisador Responsável: Nelson Hamerschlak

Instituição proponente: IIEP do Hospital Israelita Albert Einstein

Instituição colaboradora: Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da USP

Responsável institucional: Sonia Jancar Negro – Chefe do Departamento de Imunologia

Equipe: Flávia Amoroso Matos e Silva, Rodolfo Patussi Correia, João Gustavo Pessini Amarante-Mendes, Nydia Strachman Bacal, Luiz Vicente Rizzo.

Fontes de financiamento: FAPESP, CNPq, CAPES, INCT/CNPq, IIEP

PARECER CEP/EINSTEIN Nº 052/2011

O protocolo pretende estudar cinco grupos de doenças hematológicas: LMA, LLA, Linfomas (agressivo e indolente), MM e SMD com previsão de quinze pacientes em cada doença. Os pacientes serão procedentes do HIAE. O grupo controle será formado por indivíduos normais, doadores de sangue proveniente do banco de sangue. Os dados clínico-laboratoriais serão obtidos a partir da revisão dos prontuários. O sangue periférico será a fonte de linfócitos T periféricos. Será investigada a expressão de FasL, TRAIL, TNF- α e a distribuição das células T naíves e subgrupos de células T de memória em linfócitos CD4.

O protocolo encontra-se instruído conforme o item VI da Res. CNS 196 e atende aos requisitos das Resoluções CNS 340 e 347.

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein no cumprimento de suas atribuições, **analisou** as respostas às pendências elencadas no Parecer CEP/Einstein 011/2011 e considerou que foram atendidas pelo pesquisador. Assim sendo, **aprovou** o projeto de pesquisa supracitado, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Aproveitamos a oportunidade para orientar o pesquisador sobre os seguintes itens:

- Dados genéticos humanos coletados em pesquisa com determinada finalidade só poderão ser utilizados para outros fins se for obtido o consentimento prévio do indivíduo doador ou seu

ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

representante legal e mediante a elaboração de novo protocolo de pesquisa, com aprovação do CEP e, se for o caso, da CONEP (Res. CNS 340, item III.12).

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 196 Item III. 3z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4).
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Ao pesquisador cabe elaborar e apresentar ao CEP/Einstein os relatórios semestrais e o relatório final (Res. CNS 196, IX.2.c), inicialmente em 30 de setembro de 2011, conforme o modelo padronizado disponível em <http://apps.einstein.br/forms/pesquisa/form-padr.html>

Prof. Dr. José Pinus
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
do Hospital Israelita Albert Einstein

Ao meu esposo Michael, meu grande amor
Á milha filha Alice, meu amor incondicional

AGRADECIMENTOS

Á Deus

Ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Amarante-Mendes, agradeço a orientação científico-acadêmica durante o desenvolvimento da pesquisa, pelo incentivo, pela paciência diante de minha ansiedade e, principalmente, por contribuir para o meu crescimento acadêmico e profissional. A você, meus sinceros e profundos agradecimentos.

Ao Dr. Nelson Hamerschlag e a Dra. Nydia S. Bacal, os meus sinceros agradecimentos pela viabilização das amostras para o estudo, pela colaboração ativa, pela amizade, pelo constante incentivo.

Ao Dr. Rodrigo Santucci e ao Dr. Felipe Magalhães Furtado, pelo apoio incontestável na realização e bom andamento do projeto, fornecendo grande parte das amostras e informações clínicas e patológicas necessárias dos pacientes.

Agradeço ao Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, especialmente ao Banco de Sangue e aos setores de Citometria de Fluxo e Hematologia do Laboratório Clínico.

Ao Dr. Paulo Vidal Campregher pelo apoio nas amostras dos indivíduos controles e discussões científicas, meu muito obrigada.

Aos meus amigos de laboratório, obrigada pela amizade, companheirismo, paciência, experiência e ensinamentos transmitidos. Aos que ainda permanecem no laboratórios, Luciana, Júlia, Tiago, Juninho, Maria Emília, Bárbara Melo, Jackie, Nath, Sandy, Carol, Bárbara Saty, Jenifer e aqueles que passaram deixando sempre uma boa amizade, Cris, Rodolfo, Paola, Inaê, Priscila, entre tantos outros...Muitíssimo obrigada pelos momentos vividos ao lado de vocês.

Aos pacientes e seus familiares que concordaram livremente em participar da pesquisa científica.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para minha formação científica.

À FAPESP, agradeço a bolsa de doutorado, que permitiu minha dedicação integral para a realização deste trabalho, e também os recursos da reserva técnica, que garantiram completo suporte financeiro para a execução deste projeto.

À Universidade de São Paulo, em especial ao Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas, pelo programa de pós-graduação e pela estrutura oferecida.

Agradeço a todos os profissionais do Departamento de Imunologia que, além de desempenharem suas atividades com excelência, contribuíram muito para minha formação profissional e pessoal.

Aos meus queridos pais, Sebastião e Márcia, que orientaram meus passos e sempre lutaram pela minha felicidade, que com seu amor, dedicação e princípios morais balizaram minha vida pessoal e deram o suporte para a minha vida profissional, me ensinaram coisas essenciais da vida que, me permitiram trilhar este caminho.

Às minhas queridas irmãs, Gislaine e Elisama, pelo apoio incondicional em todos os momentos, por todo o carinho, por todos os momentos de convivência, pela nossa união e amizade.

À minha família de coração, Michel, Cris, João Paulo, Matheus e Ivanilde, pela amizade, companheirismo. Obrigada por tudo!

Ao meu querido e amado esposo, Michael, que com seu imenso amor me fortaleceu e incentivou-me a cada momento, pois sem ele, simplesmente eu não teria conseguido. Sua companhia e suas palavras de incentivo me deram forças nos momentos difíceis e me motivaram a continuar sempre. Obrigada pelo conforto, carinho e amor que tanto me fazem bem.

À minha princesa Alice, que chegou na metade do meu doutorado, não vou negar o quanto foi difícil conciliar a vida de mãe e de doutoranda, mas foi você, minha pequena, que com sua alegria contagiante e seu sorriso mais puro, me fez lutar e chegar até aqui. Obrigada por você existir em minha vida!.

RESUMO

MATOS E SILVA, F. A. **Estudo do compartimento de linfócitos T CD4⁺ em pacientes com LLC-B: distribuição das subpopulações Th1, Th2, Th17 e Treg e avaliação da expressão de FAS e FASL.** 2014. 102 f. Dissertação (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

LLC-B é uma neoplasia hematológica derivada de uma população de linfócitos B maduros CD5⁺ localizados na zona do manto dos folículos linfóides e é a mais comum das doenças linfoproliferativas. É uma doença clinicamente heterogênea na qual certos pacientes apresentam quadros indolentes que durante muitos anos podem ser controlados com pouco ou nenhum tratamento. Relatos da literatura sugerem que os linfócitos T na LLC-B podem ser incapazes de iniciar, manter e concluir uma resposta imune para a célula B maligna e outros antígenos, e podem estar diretamente envolvidos na manutenção do tumor. Os linfócitos são ativados, proliferam e polarizam sua resposta para padrões pro-inflamatórios ou anti-inflamatórios, aumentando sua população e tornando-se capazes para realizar suas funções efectoras. Embora o processo de ativação dos linfócitos *Th* seja indispensável para a defesa do hospedeiro, é necessário que haja um equilíbrio homeostático, onde as células auto-reativas ou recorrentemente ativadas sejam eliminadas. A esse último mecanismo de manutenção do equilíbrio imunológico, dá-se o nome de Tolerância Periférica, sendo que o processo de morte celular induzida por ativação (AICD) constitui um dos principais mecanismos para sua manutenção. Neste trabalho também foram analisados membros do grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (*tumor necrosis factor receptor*, TNFR). Esta família TNFR inclui diversos receptores, entre eles o FAS (CD95) e seu ligante FASL. O objetivo central foi investigar alterações no compartimentos de linfócitos T como, Th1, Th2, Th17 e Treg, bem como membros da via extrínseca de morte, FAS e FASL nos linfócitos T CD4⁺. Os resultados mostraram que a frequência relativa dos linfócitos T CD3⁺ e CD4⁺ diminui em comparação com o grupo controle, mas o número absoluto destes linfócitos não apresentaram diferença. A subpopulação Th1 apresentou aumento significativo na LLC-B através da expressão de IFN- γ nos linfócitos T CD4⁺ e citocinas IFN- γ , TNF- α e IL2 no sobrenadante de PBMC destes pacientes. Em relação a expressão de FAS, os resultados não mostraram diferenças significativas, mas FASL está aumentado nos linfócitos T CD4⁺ em comparação com grupo controle. Os resultados deste trabalho não apresentaram correlação com os fatores de prognósticos ZAP-70 e CD38. Ainda há muito para ser investigado, mas podemos sugerir que os pacientes com estadiamento clínico Binet A apresentam aumento nas citocinas com perfil Th1 e de acordo com a literatura, estas citocinas são favoráveis para a progressão lenta da doença.

Palavras-chave: Leucemia Linfocítica Crônica. Linfócitos T CD4⁺. Apoptose. Fatores de prognósticos.

ABSTRACT

MATOS E SILVA, F. A. **Study of the CD4+ T lymphocytes in B-CLL patients: distribution of Th1, Th2, Th17 and Treg and expression of FAS and FASL.** . 2014. 102 p. Ph D thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

B-CLL is a hematologic malignancy derived from a mature population of CD5+ B lymphocytes located in the mantle zone of the lymphoid follicles and is the most common lymphoproliferative disorders. It is a clinically heterogeneous disorder in which patients show indolent disease for many years that can be controlled with little or no treatment. Literature reports suggest that T lymphocytes in B-CLL may be unable to initiate, sustain and complete an immune response to the malignant B cell and may be directly involved in tumor maintenance. The lymphocytes are activated, proliferate and polarize their response patterns to pro-inflammatory or anti-inflammatory, increasing its population and becoming able to perform their effector functions. Although the process of Th lymphocyte activation is essential for host defense, there must be a homeostatic balance, where autoreactive or recurrently activated cells are eliminated. The mechanism of maintenance of immune balance at the periphery is known as Peripheral Tolerance, and the process of activation-induced cell death (AICD) is a major mechanism for its maintenance. In this work, we also analyzed the expression of members of the superfamily of membrane receptors of tumor necrosis factor receptors (TNFR). The TNFR family includes many receptors, including FAS (CD95) and its ligand FasL. The main objective was to investigate changes in T lymphocyte compartments (Th1, Th2, Th17 and Treg), as well as the expression of FAS and FASL in CD4+ lymphocytes. The results showed that the relative frequency of CD3+ and CD4+ lymphocytes decreased in comparison with the healthy donor but the absolute number of these lymphocytes did not differ. The Th1 subpopulation was increased in B-CLL, as shown by the expression of IFN- γ in CD4+ and the release of IFN- γ , TNF- α and IL-2 in the supernatant of PBMC of these patients. Our results showed no significant difference regarding the expression of FAS, but an increased expression of FASL in CD4+ T lymphocytes, compared with healthy donors. The results of this study showed no correlation with CD38 and ZAP-70 prognostic factors. Much remains to be investigated, but we suggest that patients with clinical stage Binet A have an increase in Th1 cytokine profile and according to the literature, these cytokines are favorable for the slow progression of the disease.

Keywords: Chronic Lymphocytic Leukemia. CD4+ T lymphocytes. Apoptosis. Factors prognostic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Desenho esquemático das subpopulações de linfócitos T CD4+.....	18
FIGURA 2	Desenho esquemático da via extrínseca de morte.....	26
FIGURA 3	Estratégia de análise utilizada para identificar a subpopulações de células Th1, Th2 e Th17 em PBMC proveniente de um indivíduo controle.....	47
FIGURA 4	Estratégia de análise utilizada para identificar a subpopulações de células Th1, Th2 e Th17.....	48
FIGURA 5	Estratégia de análise utilizada para identificar a subpopulações de células Th1, Th2 e Th17 em PBMC proveniente de um paciente com LLC-B.....	49
FIGURA 6	Estratégia de análise utilizada para identificar a subpopulações de células Treg em PBMC proveniente de um paciente portador de LLC-B.....	50
FIGURA 7	Estratégia de análise utilizada para identificar a expressão de FAS e FASL em linfócitos T CD4+ em indivíduos controles e pacientes com LLC-B.....	52
FIGURA 8	Avaliação do perfil dos linfócitos T CD3+ e CD4+ do grupo controle do estudo.....	56
FIGURA 9	Avaliação das subpopulações de linfócitos T <i>helper</i> (Th1, Th2 e Th17) no grupo controle.....	57
FIGURA 10	A distribuição das subpopulações de linfócitos T CD4+ é independente da idade.....	59
FIGURA 11	Distribuição dos linfócitos T CD4+ caracterizados fenotipicamente como Th1, Th2 e Th17 do grupo controle.....	60
FIGURA 12	Distribuição dos linfócitos T CD3+ e CD4+ nos pacientes com LLC-B em comparação com grupo controle.....	62
FIGURA 13	Razão entre os linfócitos T CD4+ e CD8+ em pacientes com LLC-B e indivíduos do grupo controle.....	63
FIGURA 14	Distribuição dos linfócitos Th1 nos pacientes com LLC-B em comparação com o grupo controle.	64
FIGURA 15	Distribuição dos linfócitos Th2 nos pacientes com LLC-B em comparação com o grupo controle.	65
FIGURA 16	Distribuição dos linfócitos Th17 nos pacientes com LLC-B em comparação com o grupo controle.....	65
FIGURA 17	Correlação dos linfócitos T CD3+ e CD4+ com a idade e tempo da doença nos pacientes com LLC-B.referente ao grupo controle do estudo.....	66

FIGURA 18	Correlação dos linfócitos Th1 e Th2 com a idade e tempo da doença nos pacientes com LLC-B.....	67
FIGURA 19	Dosagem das citocinas Th1, Th2 e Th17 em sobrenadantes de PBMC.....	69
FIGURA 20	Avaliação dos linfócitos T CD4 ⁺ expressando CD25 ⁺ e CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ em pacientes com LLC-B comparados com indivíduos controle.....	71
FIGURA 21	Correlação dos linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ e CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ com a idade e tempo da doença nos pacientes com LLC-B.....	72
FIGURA 22	Avaliação da expressão do receptor de morte FAS e seu ligante FASL nos linfócitos T CD4 ⁺ de indivíduos controles e pacientes com LLC-B.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Citocinas e fatores de transcrição dos principais subtipos de linfócitos T CD4+....	20
Tabela 2	Características das células neoplásicas B na LLC-B.....	29
Tabela 3	Alterações quantitativas e qualitativas nos Linfócitos T mediado pelas células da LLC-B.....	29
Tabela 4	Estatística Nacional de Leucemias para os anos de 2008, 2010 e 2012.....	31
Tabela 5	Sistema de estágio clínico proposto por Rai et al (1975 e 1987).....	34
Tabela 6	Sistema de estágio clínico proposto por Binet et al., 1981.....	35
Tabela 7	Características gerais dos indivíduos doadores de sangue saudáveis – Grupo Controle.....	38
Tabela 8	Dados do hemograma dos indivíduos do grupo controle.....	38
Tabela 9	Valores de referência do hemograma de indivíduos saudáveis.....	39
Tabela 10	Características gerais dos pacientes com LLC-B.....	40
Tabela 11	Dados clínicos-laboratoriais dos pacientes com LLC-B.....	42
Tabela 12	Descrição dos anticorpos monoclonais para fenotipagem dos linfócitos T CD4+..	45
Tabela 13	Painéis de anticorpos monoclonais para marcação de PBMC de controle e pacientes com LLC-B.....	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Considerações Gerais	17
1.1.1 Linfócitos T.....	17
1.1.2 Subpopulação de Linfócitos T CD4+.....	18
1.1.3 Morte Celular dos Linfócitos T.....	23
1.1.4 Linfócitos T e Neoplasias Hematológicas.....	26
1.2 Neoplasias Hematológicas.....	30
1.2.1 Leucemia Linfocítica Crônica (LLC): Critérios clínicos e diagnósticos	31
1.2.2 ZAP-70 e CD38 – ferramentas prognósticas	32
1.2.3 Estadiamento clínico da LLC	33
2 OBJETIVOS E METAS	36
2.1 Objetivos Gerais.....	36
2.2 Metas Específicas.....	36
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	37
3.1 Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos (CEP)	37
3.2 Grupo Controle	37
3.3 Pacientes com LLC-B	39
3.4 Critérios de exclusão do grupo controle e pacientes com LLC-B	43
3.5 Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> - PBMC)	43
3.6 Quantificação do PBMC total e viabilidade celular	43
3.7 Frequência e número absoluto dos linfócitos T CD4+	44
3.8 Estimulação <i>in vitro</i> das células mononucleadas de sangue periférico	44
3.9 Anticorpos	45
3.10 Marcação celular de superfície e intracelular com anticorpos monoclonais	46
3.11 Análise do receptor e ligante de morte celular, FAS e FASL	51
3.12 Detecção dos níveis de citocinas em sobrenadante de PBMC.....	53
3.13 Detecção da expressão antigênica de ZAP-70 intracitoplasmático	53
3.14 Análises Estatísticas	53
4 RESULTADOS	55
4.1 Perfil fenotípico do grupo controle	57
4.2 Perfil fenotípico dos pacientes com LLC-B	60
4.3 Quantificação de citocinas Th1, Th2 e Th17 em sobrenadante de PBMC.....	68
4.4 Avaliação fenotípica da população de células T reguladoras	69
4.5 Expressão de FAS e FASL em linfócitos T CD4+.....	72

5 DISCUSSÃO	75
5.1 Considerações Iniciais.....	75
5.2 Compartimento dos linfócitos T CD4+ em indivíduos saudáveis.....	75
5.3 Compartimento dos linfócitos T nos pacientes com LLC-B.....	77
5.4 Expressão de FAS e FASL nos linfócitos T CD4+.....	83
6 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS	87
APÊNDICE - Involvement of memory T-cells in the pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

1.1.1 *Linfócitos T*

Os linfócitos T são células que desempenham importantes funções na resposta imune adaptativa e compõem um dos principais mecanismos reguladores e executores da imunidade celular.

Células-tronco hematopoiéticas precursoras de linfócitos T deixam a medula óssea e migram para o timo, local em que ocorrerá estímulos cruciais para a maturação e desenvolvimento. O timo proporciona um microambiente adequado com a combinação de células estromais, citocinas e quimiocinas, favorecendo a geração dos linfócitos T funcionais. Este processo permite o rearranjo sequencial e expressão dos genes do receptor de linfócitos T (TCR) e dos correceptores CD4 e CD8, proliferação, seleção positiva e negativa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Na resposta imune contra determinados patógenos, as células apresentadoras de antígenos (APCs), principalmente as células dendríticas (DCs), fazem o primeiro contato com o microrganismo estranho, a partir da ligação dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR- *Pattern Recognition Receptor*), tais como membros da família *toll like receptor* (TLR) ou *NOD like receptors* (NLR), com padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (AKIRA et al., 2006).

A ativação dos linfócitos T naíve ocorre através da apresentação de peptídeos pelas APCs nos órgãos linfóides secundários e caracteriza-se por ativação gênica, proliferação e diferenciação dessas células em células efetoras e de memória, sendo responsáveis por aumentar a capacidade reativa do sistema imune a cada sucessiva exposição ao antígeno. Esta ativação ou estimulação antigênica é dependente de etapas como interação do TCR com MHC-peptídeo (primeiro sinal de ativação), de sinais de coestimulação via interação de moléculas CD28 dos linfócitos T com CD80/CD86 das APCs (segundo sinal de ativação), e de sinais derivados de citocinas (terceiro sinal), que por fim, resultam em ativação e expansão de clones específicos de linfócitos T efetores, os quais por sua vez tem a capacidade de migrarem para o foco infeccioso e combater micro-organismos estranhos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). O processo de ativação dos linfócitos T é indispensável para a defesa do hospedeiro, mas é necessário que ocorra um equilíbrio imunológico, em que as células autorreativas ou

linfócitos T recorrentemente ativados, sejam eliminados. Os linfócitos T CD4⁺ após terem sido ativados e diferenciados em subtipos de células efetoras distintas, desempenham um papel importante na mediação da resposta imune através da secreção de citocinas específicas.

1.1.2 Subpopulações de Linfócitos T CD4⁺

Como descrito anteriormente, os linfócitos T CD4⁺ têm um papel central na resposta imune a diversos patógenos microbianos através da diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ auxiliares ou T *helpers* (Th) em subtipos especializados frente a diferentes citocinas produzidas por APCs.

Atualmente, sabemos da existência de pelo menos três subpopulações de linfócitos T efetores, denominadas Th1, Th2, Th17, além de uma população reguladora chamada Treg (**figura 1**). Além destas, vários estudos relacionados com o desenvolvimento e diferenciação de linfócitos T CD4⁺ proporcionaram outras subpopulações derivadas Th3, Th9, Th22 e Th foliculares.

Figura 1 – Desenho esquemático das subpopulações dos linfócitos T CD4⁺.

As funções, produções de citocinas, seus fatores de transcrição característicos, e citocinas cruciais para sua determinação de destino. Adaptado de (ZHU; PAUL, 2008).

As células Th1 secretam principalmente IFN- γ , linfotóxina α (LT α) e IL-2, estão envolvidas na eliminação de patógenos intracelulares e associadas a patogênese de muitas doenças

autoimunes, como esclerose múltipla e artrite reumatoide (DEL PRETE, 1992). IFN- γ é essencial na ativação de fagócitos mononucleares, incluindo macrófagos, microglias e leva a potencialização de atividades fagocíticas (MURRAY et al., 1985). LT α está associada com doenças autoimunes e com grande importância na inflamação, e por fim, a citocina IL-2 induz a proliferação das células T e promove a atividade citolítica dos linfócitos T CD8+ (GATTINONI et al., 2005).

As citocinas IL-12 e IFN- γ são cruciais na diferenciação das células Th1 (TRINCHIERI et al., 2003). A secreção de IL-12 ocorre principalmente em grande escala pelas APCs após a ativação por PRR (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004; STEINMAN et al., 2003; TRINCHIERI; SHER, 2007), que por sua vez, induz as células *natural killer* (NK) produzirem IFN- γ . Vários fatores de transcrição induzem a diferenciação total dos linfócitos Th1 (**tabela 1**), sendo T-bet o principal responsável pela diferenciação destas células não somente pela capacidade de ativar genes que promovem a diferenciação fenotípica, mas também por suprimir o desenvolvimento dos outros subtipos de linfócitos T *helper* (Th2 e Th17) através da produção de IFN- γ (AFKARIAN et al., 2002; LAZAREVIC et al., 2011). A expressão de T-bet é dependente do sinal de transdução e ativador de transcrição 1 (STAT 1), que por sua vez é ativado por IFN- γ (AFKARIAN et al., 2002; LIGHVANI et al., 2001). T-bet potencializa a produção de IFN- γ pelas células em diferenciação, amplificando assim a sua própria expressão e regulando positivamente a expressão de IL12R β 2. As células mais tardias neste processo podem ser selecionadas pela IL-12 abundante nas APCs, garantindo assim, a expansão seletiva das células diferenciadas em Th1 (AFKARIAN et al., 2002). STAT4 ativada por IL-12 também é um fator de transcrição envolvido na diferenciação de Th1, em que induz a produção de IFN- γ , formando um ciclo de *feedback* positivo aumentando a expressão de T-bet e IL12R β 2. No entanto, STAT4 e T-bet não funcionam de forma linear na diferenciação dos linfócitos Th1, com cada um tendo sua única via de sinalização. Mas, para que a diferenciação destas células seja completa, os fatores de transcrição específicos necessitam de operar em conjunto com os outros fatores de transcrição (THIEU et al., 2008). Em fases posteriores de diferenciação, IL-12/STAT4 caminham regulando positivamente IL-18R α , e estas duas citocinas, IL-12 e IL-18, juntamente com IFN- γ induzem a produção independente na ativação do TCR, propiciando desta maneira, uma via de sinalização para aumentar a resposta de Th1.

Outros fatores de transcrição como Runx1 e Runx3 também participam na diferenciação deste processo na promoção da diferenciação das células Th1 (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004; KOHU et al., 2009). Runx3 em cooperação com T-bet se liga ao promotor de IFN- γ silenciando os genes que codificam IL-4, levando a inibição da diferenciação de Th2 através da

interação com GATA-3 favorecendo assim, a diferenciação de Th1. Por outro lado, a interação de Runx1 e T-bet inibe o desenvolvimento das células Th17 pela interação com seu principal regulador ROR γ t (LAZAREVIC et al., 2011).

Tabela 1 – Citocinas e fatores de transcrição dos principais subtipos de linfócitos T CD4+

Subtipos de CD4+	Citocinas	Fatores de Transcrição	Fatores de transcrição inibitórios
Th1	IL-12, IFN- γ	<u>T-bet</u> , STAT1, STAT4, Runx3, Eomes, Hlx	GATA-3
Th2	IL-4, IL-2	<u>GATA-3</u> , STAT6, STAT5, Gfi-1, c-Maf, IRF4	T-bet, Runx3
Th17	IL-6, IL-21, IL-23, TGF- β	<u>RORγt</u> , STAT3, ROR α , Runx1, Batf, IRF4, AHR	T-bet, Runx1, Smad3, Runx1, FOXP3
Th9	TGF- β , IL-4	IRF4	
iTreg	TGF- β , IL-12	<u>FOXP3</u> , Smad2, STAT5, NFAT, IRF4	

*os fatores de transcrição principais estão sublinhados

Os linfócitos T com perfil Th2 estão envolvidos em respostas a parasitas extracelulares, incluindo os helmintos, asma e doenças alérgicas (DEL PRETE, 1992; SOKOL et al., 2009). Estas células promovem um microambiente anti-inflamatório através da secreção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-10, IL-25, sendo que a IL-4 é a principal citocina envolvida no processo de inflamação alérgica e promoção do *switch* e secreção de IgE pelos linfócitos B (STEINKE; BORISH, 2001).

As citocinas IL-4 e IL-2 são cruciais na diferenciação destes linfócitos com perfil Th2 e o principal fator de transcrição envolvido é o GATA-3 (GLIMCHER; MURPHY, 2000). No entanto, GATA-3 não é capaz de regular sozinho toda a especificidade gênica de Th2, mas atua em cooperação com STAT6 (HORIUCHI et al., 2011), e apesar da necessidade das citocinas IL4 e IL-2 no perfil Th2 *in vitro*, existem evidências de que esta diferenciação *in vivo* pode ser independente de IL-4, mas necessariamente dependente de GATA-3, sugerindo assim, a existência de uma via de sinalização por GATA-3 independente de IL-4 (BOEHM et al., 1997). Com isso, vários estudos mostraram que a diferenciação de Th2 envolve outros fatores de transcrição que ativam *downstream* várias citocinas como IL-2, IL-6 e IL-21 (**tabela 1**).

A citocina IL-6 produzida abundantemente por APCs bem como por outras células, possui papel duplo no desenvolvimento de Th2, levando a indução da diferenciação e simultaneamente a inibição do perfil Th1. A sinalização *downstream* de IL-6 nesta diferenciação é dependente de IL-4, uma vez que IL-6 potencializa a produção de IL-4 nos linfócitos T CD4+ naíve através da *upregulação* de NFAT (*nuclear fator of activated T cells*). A inibição de Th1 ocorre quando a expressão de SOCS-1 (*supressor of cytokine signaling-1*) é ativada por IL-6 interferindo, assim na ativação de STAT1 e sinalização via IFN- γ (DIEHL et al., 2000; DIEHL; RINCON, 2002).

Já as células com perfil Th9 foram inicialmente caracterizadas como um subconjunto de células do tipo Th2 mas, recentemente estudos tendem a classificar as células secretoras de IL-9 como Th9, sendo um subconjunto distinto dos linfócitos T CD4+. TGF- β (*transforming growth factor beta*) pode agir desviando a diferenciação de Th2 para o desenvolvimento dos linfócitos Th9 e, além disso, em combinação com IL-4 induz diretamente a diferenciação destas células (VELDHOEN et al., 2008). IRF4 também desempenha um papel importante através da ligação direta ao promotor de IL-9 (STAUDT et al., 2010), e apesar destas características, mais estudos precisam ser realizados para esclarecer sobre os linfócitos Th9, antes de serem classificadas como uma linhagem distinta de linfócitos T CD4+.

Por sua vez, os linfócitos Th17 são importantes personagens na resposta a determinados tipos de fungos e também na ativação e recrutamento de neutrófilos, amplificando a inflamação tecidual. Estes subtipos de linfócitos T CD4+ estão fortemente associados a diversas síndromes autoimunes, que anteriormente eram descritas como consequência da desregulação de linfócitos Th1, tais como a artrite reumatoide, doença de Alzheimer e colite. Essa subpopulação de linfócitos se diferencia na presença de IL-6, IL-21, IL-23 e TGF- β juntamente com o fator de transcrição primordial ROR γ t. O processo de diferenciação destas células se dá através de 3 estágios, a fase mediada por TGF- β e IL-6, autoamplificação por IL-21 e estabilização por IL-23. TGF- β é uma citocina crucial na sinalização de Th17, mas também tem papel importante no desenvolvimento das células iTreg, sendo estas duas linhagens relacionadas antagonicamente (VELDHOEN et al., 2006; VOLPE et al., 2008). TGF- β sozinha em altas concentrações, pode dirigir a diferenciação celular para o perfil de iTreg (células T reguladora induzida) através da ativação de FOXP3 (CHEN et al., 2003a; ZHOU et al., 2008). No entanto, em baixas concentrações e na presença de IL-6, TGF- β induz o desenvolvimento de Th17 por ativação de ROR γ t, produção de IL-21 e *up-regulação* na expressão de IL-23R (BETTELLI et al., 2006; VELDHOEN et al., 2008; ZHOU et al., 2008). Apesar do ROR γ t ser crucial no

desenvolvimento destas células, outros fatores de transcrição são necessários para a diferenciação total do perfil Th17 (**tabela 1**), mas, por outro lado uma deficiência neste “regulador *master*” não possibilita estas células completar seu perfil fenotípico e produção de suas citocinas IL-17A e IL-17F (IVANOV et al., 2006; YANG et al., 2008).

Os linfócitos T reguladores (Treg) possuem duas categorias: as que surgem naturalmente no timo, sendo CD4⁺CD25⁺ (nTreg); e as iTreg que são induzidas por TGF- β e produzidas na periferia. Ambas as populações participam da manutenção da tolerância periférica e na prevenção de doenças autoimunes (CHEN et al., 2003b). O fator de transcrição *Forkhead* (FOXP3) é especificamente expresso em linfócitos Treg CD4⁺CD25⁺ e é o principal fator de transcrição específico na diferenciação das iTreg (YAGI et al., 2004; YOSHIMURA; MUTO, 2011). FOXP3 é induzido *downstream* na sinalização de TGF- β , após a interação com TCR (CHEN et al., 2003a; YOSHIMURA; MUTO, 2011).

Para a manutenção destas subpopulações, enquanto exercem suas funções efectoras e reguladoras, no caso da Treg, é necessário que haja a presença de fatores de sobrevivência para estas células no microambiente no qual a resposta está acontecendo, um destes fatores é a IL-2, produzida pelos linfócitos T ativados que age nestas mesmas células, mas também será captada pelas Tregs, por possuírem uma expressão maior de CD25, a cadeia alfa do receptor de IL-2 (IL-2R). Estudos *in vitro* demonstraram que a IL-2 é muito importante não apenas na manutenção, mas na geração de células T reguladoras (ZHENG et al., 2007). A manutenção das células Th17 é garantida pela IL-23, importante para a manutenção da expressão do fator de transcrição ROR γ t e, conseqüentemente, suas funções.

Uma característica interessante no fenômeno de polarização dos linfócitos T é a plasticidade que há entre essas subpopulações. Era comum se pensar que quando uma resposta imunológica desviava-se para um determinado padrão efector, a célula estaria comprometida com aquele padrão até sofrer o processo de apoptose. Atualmente, diversos estudos têm demonstrado que os linfócitos T efetores podem mudar seus padrões de resposta se o microambiente também mudar. Tanto Th17 quanto Tregs necessitam de TGF- β para sua geração durante uma resposta imunológica, o que determina a polarização para Th17 é justamente o balanço de citocinas pró-inflamatórias presentes. Níveis mais elevados de IL-6, em conjunto com TGF- β , desviarão para o padrão Th17, porém se, durante a resposta, o microambiente apresentar níveis cada vez menores de IL-6, a célula antes Th17 pode adquirir características mais reguladoras do que efectoras (GHORESCHI et al., 2011).

Estudos recentes têm sugerido que Th17 têm um impacto importante sobre os tumores sólidos. No entanto, a natureza destas células em neoplasias hematológicas ainda é pouco

conhecida. Recentemente, foram investigadas a frequência destas células e secreção de citocinas relacionadas em pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA). Primeiro, foi observado que a frequência destas células foi aumentada significativamente nas amostras de sangue periférico de pacientes não tratados em comparação com indivíduos normais, sugerindo que os linfócitos Th17 podem desempenhar um papel na patogênese deste tipo de leucemia. Também, foi observado que a frequência destas células foi reduzida quando os pacientes obtiveram remissão completa após quimioterapia, sugerindo que a frequência de Th17 pode ter valor clínico na avaliação do efeito terapêutico (WU et al., 2009a).

O aumento na frequência de células T reguladoras (Treg) foi observado em sangue periférico de pacientes com carcinoma brônquico, em comparação com indivíduos saudáveis (WOO et al., 2001), e em seguida, resultados similares foram relatados em pacientes com outros de tipos de cânceres. Evidências mostraram que células T reguladoras desempenham um papel importante na promoção de um microambiente imunoprivilegiado no tumor, promovendo assim a progressão tumoral (ZOU et al., 2001) e o número e distribuição de Treg no microambiente do tumor está correlacionado com a progressão clínica (CURIEL et al., 2004).

Além dos mecanismos que regem a diferenciação e polarização dos linfócitos T CD4+, a manutenção e a retração destas diferentes subpopulações de linfócitos T CD4+ efectoras tem um grande impacto no estabelecimento de uma resposta imune focada e eficiente na eliminação dos patógenos e também para a manutenção desta resposta dentro de níveis não deletérios para o organismo. Um dos mecanismos responsáveis pela retração populacional dos linfócitos previamente ativados e expandidos durante uma resposta imune é denominada AICD (*Activation-induced cell death*). Originalmente descrita em hibridomas de linfócitos T, esta via também foi encontrada em Th1, Th2 e Th17 (BRUNNER et al., 1995; RAMSDELL et al., 1994; ZHANG et al., 2008).

1.1.3 Morte celular dos linfócitos T

Morte celular induzida por ativação (AICD) foi o nome dado para o processo de apoptose de linfócitos T desencadeados pela reestimulação via TCR/CD3, sendo inicialmente descrito em hibridomas de linfócitos T (BRUNNER et al., 1995). Posteriormente, o mesmo mecanismo foi encontrado em linfócitos T maduros pré-ativados e em todas as sub-populações de linfócitos T CD4+ (ASHWELL et al., 1987; RUSSELL et al., 1991). Atualmente, se aceita que a principal via de AICD é dependente de um aumento dos níveis de FASL (CD95L) e da interação desta molécula com seu receptor FAS (CD95) na superfície das células alvo, seja de

maneira autócrina, isto é, na própria célula que passou a expressar CD95L, ou de maneira parácrina, caracterizando o chamado fratricídio de linfócitos T (BRUNNER et al., 1995; DHEIN et al., 1995).

Existem duas grandes e bem estabelecidas vias de morte celular por apoptose. A via intrínseca, que pode ser estimulada por diferentes sinais, tais como irradiação, agentes quimioterápicos, ausência de fatores de crescimento, dano ao DNA e vírus, os quais geram estresses intracelulares ativando proteínas que vão induzir apoptose diretamente pela via mitocondrial. E a via extrínseca que ocorre através da interação de receptores de morte (DRs – *death receptors*) com seus respectivos ligantes, ou seja, através de sinais externos, e pode ocorrer com ou sem a participação da mitocôndria (AMARANTE-MENDES; GREEN, 1999).

A via mitocondrial, seja ela ativada pela via intrínseca ou extrínseca, é controlada pela família BCL-2 (*B-cell CLL/Lymphoma 2*), composta por proteínas pró- (BIM, BID, BAX, BAK) e antiapoptóticas (BCL-2, BCL-XL). Ambas as vias resultam em uma via comum de morte e contam com a participação de caspases (*cysteine-aspartic proteases*). As caspases iniciadoras após serem ativadas, ativam as caspases efetoras (BARNHART et al., 2003), que são responsáveis pela clivagem de diversos substratos apoptóticos resulta na morte da célula (ENARI et al., 1998; KAUFMANN et al., 1993).

A subfamília dos DRs, responsáveis pela ativação da via extrínseca, pertence à família dos receptores de TNF (*tumor necrosis factor*) e compreende, por exemplo, TNF-R1 ou DR-4 (*tumor necrosis factor receptor 1*), TRAIL-R2 ou DR-5 (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing receptor*) e FAS (CD95/APO-1), o protótipo dos receptores de morte, expresso constitutivamente na maioria dos tecidos celulares e, assim como os demais DRs, é caracterizado pela presença de um a seis domínios ricos em cisteína nas suas porções extracelulares, que medeiam a interação deste com FASL (CD95L/Apo-1L) (ADAM-KLAGES et al., 2005). Esta interação resulta na ativação de uma cascata de sinalização intracelular, a qual tem início com a agregação dessas moléculas na superfície, culminando na morte da célula que expressa o receptor de morte FAS (ITOH; NAGATA, 1993).

Após a interação entre receptor-ligante, ocorre o recrutamento de proteínas adaptadoras chamadas FADD (*fas-associated death domain protein*). Uma característica importante, comum a todos os DRs, é a presença do domínio DD (*death domain*), através do qual ocorrem diversas interações, inclusive entre FAS e FADD (CHINNAIYAN et al., 1995). Há também o recrutamento da pró-caspase-8 que interage com FADD através de outro domínio, o DED (*death effector domain*) (MUZIO et al., 1998), formando um complexo que é denominado de DISC (*death-inducing signaling complex*), o qual permite a ativação da caspase-8 (KISCHKEL

et al., 1995). Já foi descrito que a caspase-10 também é capaz de se associar ao FADD no complexo DISC, sendo a única, além da caspase-8, a possuir o domínio DED (BARNHART et al., 2003).

Há, ainda, outra molécula capaz de interagir com o complexo DISC, a proteína c-FLIP (*cellular FLICE-like inhibitory protein*). Dentre as três isoformas existentes, há uma longa (c-FLIP_L) e duas curtas (c-FLIP_S e c-FLIP_R), sendo que todas apresentam um domínio DED semelhante ao domínio DED da caspase-8, competindo com a mesma pelo sítio de ligação ao FADD no complexo DISC e inibindo o processo de apoptose. Entretanto, c-FLIP_L possui ainda outro domínio, homólogo ao domínio catalítico da caspase-8, e embora esse domínio seja inativo (IRMLER et al., 1997), acredita-se que a associação de c-FLIP_L ao complexo DISC possa atuar estimulando a apoptose ou até redirecionar sinais de morte rumo às vias de sobrevivência e proliferação, o que parece estar diretamente relacionado a concentração dessa proteína na célula (BUDD, 2002; YU; SHI, 2008).

Dados mais recentes mostram que a sinalização via FAS pode estar implicada não somente com o processo de apoptose, como também com o crescimento e a proliferação celular. Essas funções parecem estar relacionadas com níveis basais de FAS/FASL, uma vez que a redução destes leva a uma diminuição da massa tumoral, enquanto o aumento não é capaz de causar nenhuma alteração perceptível. Além disso, foi demonstrado que a concentração de FAS necessária para induzir apoptose é mil vezes maior do que para induzir sinais não-apoptóticos. A participação de FAS também foi observada no processo de regeneração hepática, mostrando que em uma hepatectomia parcial não há uma completa recuperação do órgão na ausência do receptor, provavelmente sendo essa a ligação existente entre FAS e o desenvolvimento de hepatocarcinogênese (CHEN et al., 2010).

doença, como a evidência recente que sugere que um acúmulo de células T de memória pode estar associado a uma doença de evolução mais agressiva (HOFBAUER et al., 2011; TINHOFER et al., 2009).

Após as primeiras descrições de anormalidades dos linfócitos T em LLC-B há mais de 30 anos (CALLERY et al., 1980; HERRMANN et al., 1982; KAY et al., 1979), houve um progresso lento na investigação das relações entre essas células linfoides malignas e seu microambiente imunológico "normal". Em meados dos anos 90, as investigações têm-se intensificado, juntamente com o aumento da compreensão das relações entre os diferentes tipos de células na resposta imune normal, através de interações celulares e vias de sinalização (ROBEY; ALLISON, 1995), e extensas investigações começaram a revelar potenciais mecanismos da patogênese, com implicações para o futuro no sucesso do tratamento, incluindo a imunoterapia adotiva (GODDARD et al., 2001).

Os números absolutos dos linfócitos T estão normais (CATOVSKY et al., 1974), ou geralmente mais aumentados em pacientes com LLC-B (KIMBY et al., 1989). Qualquer linfocitopenia de células T é devido ao efeito de diluição de grandes números de células B CD5+. Quando ocorre o aumento dos linfócitos T é principalmente devido ao aumento da subpopulação de linfócitos T CD8+, resultando em uma relação anormal CD4/CD8 (SEMENZATO et al., 1983), e de acordo com Totterman et al. (1989) o aumento de CD8 pode estar relacionado com a progressão da doença (TOTTERMAN et al., 1989).

Mudanças na rede de citocinas podem ser responsáveis pelo acúmulo de células B malignas em LLC-B. Achados indicam que populações de células T, em vez de células B malignas, são a fonte de IFN- γ nestes pacientes e parecem desempenhar um papel especial na progressão da doença, sendo assim, investigações mais precisas devem elucidar seu papel como um marcador de prognóstico em LLC-B e um alvo para estratégias terapêuticas (PODHORECKA et al., 2004).

Além de IFN- γ , outras citocinas vem se destacando na patogênese da LLC. Por exemplo, podemos destacar a interleucina-10 (IL-10) que é uma citocina produzida pela células T *helper* (Th2) e pode estimular a proliferação e diferenciação dos linfócitos B. Já foi demonstrado que os níveis séricos desta citocina estão aumentados na LLC, correlacionando-se com as características da doença e sobrevivência reduzida (FAYAD et al., 2001). A origem desta IL-10 não está clara, mas existem evidências de que é produzido pelas células B policlonais não leucêmicas, em vez das próprias células leucêmicas. Existem também dados contraditórios sobre o efeito da IL-10 nas células tumorais, sugerindo que esta citocina inibe a proliferação e induz a apoptose nos linfócitos B da LLC (FLUCKIGER et al., 1994) (TANGYE et al., 1998),

já outros estudos sugerem que a IL-10 protege contra morte celular por apoptose (KITABAYASHI et al., 1995).

Outras citocinas, tais como IL-4 e IL-6, também mostraram ter um papel imunomodulador importante, pois o aumento nos níveis de IL-6 foi relacionado com um mal prognóstico e proteção das células B leucêmicas da apoptose espontânea (REITTIE et al., 1996). IL-4 presente no microambiente da LLC-B e produzida pelos linfócitos T CD4⁺ dos pacientes (MAINOU-FOWLER et al., 1995), tem-se mostrado com um considerável papel na proteção da apoptose das células leucêmicas, uma vez que os níveis aumentados estão associados com a *up*-regulação de BCL-2 (DANCESCU et al., 1992; PANAYIOTIDIS et al., 1993). Além disso, o aumento de IL-4 permite a regulação positiva de CD30 em células T, o que impede a troca de classe das células B não malignas através da interação CD30-CD30L, e esta interação contribui para os defeitos humorais encontrados nesta doença (CERUTTI et al., 2001). Ao que tudo indica, parece que há uma predominância de citocinas do perfil Th2 na LLC-B favorecendo a progressão do tumor, já que os linfócitos Th1 estariam diminuídos e, consequentemente, a resposta ao tumor também.

As Tabelas 2 e 3 resumizam algumas características dos linfócitos T e B normais e neoplásicos, respectivamente, na qual pode ter importância na patofisiologia da LLC-B (CORREIA et al., 2014).

Tabela 2 – Características das células neoplásicas B na LLC-B.

Características	Implicações
Redução na expressão de CD80/CD86	Células B na LLC são pobres com APCs
Expressão de CD200	Inibição de Th1 e indução de Treg
Expressão de FASL e <i>dowregulation</i> de FAS	Proteção da morte via FAS nas células da LLC-B e indução da apoptose nos linfócitos T
Aumento de FAS solúvel	Progressão da LLC
Secreção de IL2R solúvel e IL-10	Inibição da diferenciação de Th1
Secreção de IL-6	Proteção dos LB da apoptose espontânea, secreção de IL-4 pelos LT e consequência positiva na sobrevivência dos LB na LLC-B

Tabela 3 – Alterações quantitativas e qualitativas nos Linfócitos T mediado pelas células da LLC-B.

Alterações nos LT	Descrição
Aumento no número absoluto dos LT CD4+ e CD8+	Resultado da leucocitose
Inversão da razão CD4/CD8	LT CD4+ são mais sensíveis a apoptose mediado por FAS
Deficiência adquirida na expressão de CD40L	LB da LLC induz a <i>dowregulation</i> de CD40L nos LT
Alterações genéticas no citoesqueleto	Defeitos na sinapse imunológica
Alterações citotoxicidade dos LT CD8+	Citotoxicidade dos LT CD8+ ineficiente

1.2 Neoplasias Hematológicas

As neoplasias humanas de maneira geral, apresentam característica de serem clonais, pois derivam de uma célula que sofreu alterações críticas em seus genes e transmite estas alterações a todas as suas descendentes. Apesar desta clara definição, atualmente se discute e aceita a heterogeneidade clonal, o que pode implicar diretamente em sua evolução e adaptação da doença (GERLINGER et al., 2012).

Por muitos anos o câncer foi considerado uma doença dos países desenvolvidos, porém, a situação vem mudando, e a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos. Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. Em vista disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente com câncer, e o maior efeito desse aumento vai incidir em países em desenvolvimento (INCA, 2010).

Neoplasia hematológica é o termo utilizado para designar as diferentes formas de câncer que acometem a medula óssea, sangue periférico e tecido linfático. A heterogeneidade destas neoplasias é uma característica marcante, pois podem acometer as linhagens linfoides T e B, linhagem mieloide em diferentes estágios de maturação e diferenciação, os macrófagos e seus precursores, e os mastócitos, diferindo não apenas no quadro citomorfológico, mas também quanto aos aspectos clínicos, evolução, prognóstico e resposta ao tratamento (SANTOS et al., 2004).

A **Tabela 4** fornece a estatística nacional da estimativa de novos casos e número de mortes para leucemias, estas informações foram retiradas do banco de dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012). Entre as neoplasias hematológicas estão às doenças mieloproliferativas, leucemias, linfomas, mieloma múltiplo e mielodisplasias.

Tabela 4. Estatística Nacional de Leucemias para os anos de 2008, 2010 e 2012.

Ano	Estimativa de novos casos	Número de mortes
008	-	5.686 (3.028 homens e 3.940 mulheres)
010	-	5.935 (3.202 homens e 2.733 mulheres)
012	8.510 (4.570 homens e 2.733 mulheres)	-

Fonte: Instituto Nacional do Câncer.

1.2.1 Leucemia Linfocítica Crônica (LLC): Critérios clínicos e diagnósticos.

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é uma neoplasia hematológica derivada de uma população de linfócitos B maduros CD5⁺ localizados na zona do manto dos folículos linfoides. É a mais comum das doenças linfoproliferativas e trata-se de uma doença em que as taxas de proliferação celular não são acompanhadas por taxas semelhantes de apoptose, resultando em acúmulo das células neoplásicas em linfonodos, medula óssea e sangue periférico (GARICOCHEA, 2005). A leucemia linfocítica crônica foi durante muito tempo entendida como uma doença relativamente homogênea causada pelo acúmulo de linfócitos B monoclonais, imunoincompetentes e com graves distúrbios nos mecanismos normais de apoptose.

Atualmente, sabe-se que a LLC é uma doença clinicamente heterogênea. Certos pacientes apresentam quadros clínicos indolentes que durante muitos anos podem ser controlados com pouco ou nenhum tratamento. Outros apresentam doenças catastróficas, de rápida evolução e de difícil controle terapêutico. Estes dois extremos de apresentação clínica têm correlatos biológicos hoje bem definidos. O divisor de águas é a presença de mutações somáticas nos genes da região variável de imunoglobulinas (IgV), na qual, pacientes com mutações em IgV apresentam maior sobrevida do que aqueles sem mutações, e este é hoje o fator de prognóstico mais relevante em LLC. CD38 e ZAP-70 são dois outros marcadores associados à sobrevida e que se correlacionam diretamente ao estado mutacional de IgV. Pacientes com IgV não mutado apresentam frequentemente a expressão anormal de CD38 e ZAP-70, sugerindo que este subgrupo de indivíduos, que corresponde a cerca de 40% de todos os casos de LLC, trata-se de uma população bastante homogênea (FERRARINI; CHIORAZZI, 2004).

O diagnóstico é feito quando o paciente apresenta linfocitose persistente acima de $10 \times 10^9/L$ e linfocitose $> 40\%$ no mielograma, independente da presença ou não de linfonodo, hepato e/ou esplenomegalia, anemia e/ou plaquetopenia. Raramente, pode se apresentar apenas como tumor nodal ou extranodal, sem infiltração medular e linfocitose periférica. Nas situações de linfocitoses clonais discretas, em que não encontramos organomegalias, o paciente deverá ser detalhadamente esclarecido sobre o potencial evolutivo desta linfocitose, bem como do impacto deste achado sobre o seu risco, já que pacientes com esta linfocitose têm sobrevida igual à da população geral sem linfocitose (LORAND-METZE, 2005).

Juntamente com o quadro clínico e os dados do hemograma, a imunofenotipagem é a principal avaliação diagnóstica e permite o diagnóstico diferencial com as outras síndromes linfoproliferativas (MULLER-HERMELINK et al., 2001). Os linfócitos da LLC expressam CD19, CD5, CD23 e, fracamente, imunoglobulinas de superfície com caráter clonal (só cadeia *kappa* ou só *lambda*). Estes achados permitem fazer o diagnóstico diferencial com outros linfomas B leucemizados (MULLER-HERMELINK et al., 2001).

A avaliação concomitante dos linfócitos T (CD4 e CD8) no sangue periférico com o intuito inclusive de excluir linfoproliferações T, nos permite notar que eles frequentemente estão aumentados, especialmente os CD3/CD8, o que pode expressar um mecanismo de reação do hospedeiro contra o tumor (OLIVEIRA et al., 2001). Nota-se uma correlação inversa, especialmente dos CD3/CD8 com o estágio da doença.

1.2.2 ZAP-70 e CD38 – ferramentas prognósticas

A proteína zeta-associada de 70 kD (ZAP-70) é uma tirosina-quinase essencial para o disparo de sinais promovidos pela ativação do receptor de linfócitos T. Apesar de não ser encontrada em linfócitos B normais, ZAP-70 é expressa nessas células de LLC em que o gene VH não está mutado. Linfócitos de LLC com mutação em VH raramente mantêm a expressão desta proteína (ROSENWALD et al., 2001). A expressão de ZAP-70 associa-se a doença com pior prognóstico, mas ainda não se sabe com certeza se a expressão de ZAP-70 indica uma origem celular distinta do clone ou se ela representa estados de ativação distintos das células leucêmicas.

Estudos realizados por Naylor *et al* (1999) demonstraram que a análise das expressões de CD38 e IgD pode ser utilizada para diferenciar os linfócitos B “virgens”, que estão localizados no manto folicular e as células B de memória, que já passaram pelo centro germinativo. A expressão de CD38 ocorre em várias células do sistema hematopoiético, bem

como de outros tecidos não-hematopoiéticos (NAYLOR; CAPRA, 1999). A expressão de CD38 nas células hematopoiéticas é variável e ocorre principalmente nas células progenitoras CD34+, nos precursores mielóides, nos linfócitos T e B ativados, células NK, células plasmáticas, monócitos e células endoteliais. CD38 é uma glicoproteína do tipo II de linhagem não específica e está envolvida na ativação de linfócitos, desempenha também várias funções incluindo adesão ao endotélio celular e tem papel importante no *homing* dos linfócitos, entretanto sua função nas células B não está claramente definida (HAMBLIN, 2002)

A expressão de CD38 é variável. Em 1999, Damle *et al* demonstraram que tanto a porcentagem de células CD38+ quanto a intensidade média de fluorescência da expressão deste antígeno, tinham forte correlação inversa com a porcentagem de mutações do gene V (VH e VL) das imunoglobulinas. De fato, havia dois grupos com expressão significativamente diferente e que correspondiam ao tipo não mutado (>30% células CD38+). Estes autores verificaram que o perfil de expressão do CD38 permanece constante ao longo da doença, o que não foi confirmado em outros trabalhos (DAMLE et al., 1999). Dados mais recentes de perfil de expressão gênica demonstram, porém, que se trata de duas formas variantes originárias da mesma célula-tronco, e não de duas doenças como se tem questionado (MARGALIT et al., 2005).

Nos últimos anos, tem sido investigado se a expressão de CD38 nas células B da LLC está correlacionada com o estado mutacional dos genes VH Ig e a evolução clínica dos pacientes (DAMLE et al., 1999). Vários estudos mostraram que células B da LLC com mutações somáticas no gene VH Ig e associados com baixa ou nenhuma expressão de CD38, exibiam um curso clínico favorável da doença. Por outro lado, os casos sem mutações somáticas nos genes VH Ig e com alta expressão de CD38 exibiam um pior prognóstico (D'ARENA et al., 2001; DURIG et al., 2002).

1.2.4 Estadiamento clínico da LLC

O curso clínico da LLC é bastante variável. Alguns pacientes são assintomáticos e sobrevivem por longos períodos sem a necessidade de terapia, enquanto outros evoluem rapidamente apesar de tratamento agressivo. Baseando-se nas características clínicas, tais como aumento do linfonodo, presença ou ausência de esplenomegalia e/ou hepatomegalia e avaliação hematológica do sangue periférico, vários sistemas de estadiamento clínico foram propostos para identificar a extensão da doença nos pacientes com LLC, avaliar o prognóstico e desta forma programar melhor a estratégia terapêutica (GEISLER et al., 1986). Os dois sistemas mais

utilizados na prática clínica são o sistema de estágio clínico de Rai (1975) e o de Binet (1981) (BINET, 1981b; RAI et al., 1975).

O sistema de estágio clínico proposto por Rai et al (1975) considerava: i) linfocitose absoluta maior que $15.000/\text{mm}^3$ no sangue, associada ou não a adenomegalia, esplenomegalia e/ou hepatomegalia; ii) anemia definida como taxa de hemoglobina menor que 11g/dl ; iii) plaquetopenia definida como contagem de plaquetas menor que $100.000/\text{mm}^3$. Esse sistema classificava os pacientes em 5 categorias 0 a IV. Em 1987, esse sistema foi modificado pelos mesmos autores, e dividido em três categorias: de baixo risco (estádio 0), de risco intermediário (estádios I e II) e de alto risco (estádios V e VI). A **Tabela 5** sumariza estas características de acordo com o sistema de Rai (RAI; MONTSERRAT, 1987).

Tabela 5 – Sistema de estágio clínico proposto por Rai et al (1975 e 1987).

Estádio	Área comprometidas	Hb (g/dl)	Plaquetas/ mm^3	Prognóstico
0	não	$>11,0$	>100.000	Baixo risco
I	linfonodos	$>11,0$	>100.000	Baixo risco
II	Fígado e/ou baço	$>11,0$	>100.000	Risco intermediario
III	Indiferente	$<11,0$	>100.000	Alto risco
IV	Indiferente	indiferente	<100.000	Alto risco
0	não	$>11,0$	>100.000	Baixo risco
I e II	Linfonodos+fígado e/ou baço	$>11,0$	>100.000	Risco intermediario
III e IV	indiferente	$<11,0$	<100.000	Alto risco

O sistema de estágio clínico de Binet *et al* (1981) subdivide os pacientes em três categorias (**Tabela 5**). Os pacientes em estágio clínico A (EC-A) são considerados de baixo risco e clinicamente sem evidências de anemia ou plaquetopenia e com até duas cadeias ganglionares afetadas. Os pacientes em estágio clínico B (EC-B) diferem do grupo A, por apresentarem três ou mais cadeias ganglionares comprometidas e são consideradas de risco intermediário. Os pacientes classificados como estágio C (EC-C) apresentam anemia e plaquetopenia (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Sistema de estágio clínico proposto por Binet et al., 1981.

Estádio	Área comprometidas	Hb (g/dl)	Plaquetas/mm³	Sobrevida média (anos)	Prognóstico
EC-A	< 3 áreas	>10,0	>100.000	>10	Baixo risco
EC-B	= 3 áreas	>10,0	>100.000	7	Risco intermediário
EC-C	Indiferente	<10,0	=100.000	1,5	Alto risco

Em 2002, foi relatado na literatura que os pacientes com LLC-B indolente (progressão lenta), apresentaram um predomínio da subpopulação Th1. Em contraste, as células T CD4⁺ dos pacientes com a doença mais progressiva apresentaram predominantemente a subpopulação Th2 (PODHORECKA et al., 2002). Com os avanços no conhecimentos em relação as novas descoberta dos subtipos de linfócitos T CD4⁺, vários trabalhos mostraram que, além de Th1 e Th2, os linfócitos com perfil Th17 e regulador estão envolvidos na patofisiologia de tumores sólidos e hematológicos. Porém, pouco se sabe sobre o papel e relação de Th17 e Treg nas fases de progressão da LLC-B. Sendo assim, a nossa hipótese é que estas subpopulações celulares também estão diferencialmente expressas na LLC-B e contribuem para a patofisiologia da doença

2 OBJETIVOS E METAS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo central desta proposta é estudar a distribuição das diferentes subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (Th1, Th2, Treg, Th17) e a expressão do receptor de morte FAS e do seu ligante FASL e em indivíduos saudáveis doadores de sangue (grupo controle) e em pacientes com a doença hematológica LLC-B.

2.2 Metas Específicas

- I) Determinar fenotipicamente a frequência dos linfócitos T CD4⁺ Th1, Th2, Th17 e Treg em indivíduos saudáveis e em pacientes com LLC-B.
- II) Dosar as citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 no sobrenadante de PBMC dos indivíduos saudáveis e pacientes.
- II) Determinar a expressão basal e após o estímulo de FAS e FASL no compartimento de linfócitos T CD4⁺ nos grupos do estudo.
- III) Relacionar os achados com os critérios clínicos do prontuário dos pacientes e com os fatores de prognósticos.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este estudo tem a colaboração do grupo de onco-hematologia e do laboratório clínico do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), São Paulo, liderados pelo Dr. Nelson Hamerschlag e Dra. Nydia Strachman Bacal e pelo Dr. Rodrigo Santucci do Hospital Estadual Mario Covas (HEMC) e diretor médico do Instituto de Ensino e Pesquisa São Lucas – Hemomed.

3.1 Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos (CEP)

O projeto e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEPSH) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e do Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE. Por atender as atribuições da Resolução CNS 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, o parecer foi favorável ao desenvolvimento da pesquisa.

3.2 Grupo Controle

Neste estudo foram incluídas 40 amostras de indivíduos saudáveis doadores de sangue provenientes do banco de sangue do HIAE e voluntários saudáveis com faixa etária acima dos 60 anos. Para as análises estatísticas o grupo controle foi pareado com os pacientes de LLC-B de acordo com a idade. Um dos critérios de inclusão destes indivíduos foi apresentar idade acima de 45 anos. Os critérios de exclusão estão descritos mais abaixo.

Para análise experimental, as amostras de sangue periférico (SP) foram coletadas em tubos contendo heparina sódica como anticoagulante (WU et al., 2009b; a; ZHANG et al.) em um volume de 10 ml. A casuística dos participantes deste grupo está resumida na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Características gerais dos indivíduos doadores de sangue saudáveis – Grupo Controle

Parâmetros	No. Doadores (%)
Número total	45(100)
Gênero:	
Masculino	30 (67)
Feminino	15(33)
Idade:	
Mediana	63
Range	20– 80

Dos 45 indivíduos controles, conseguimos obter o hemograma de apenas 20. A tabela a seguir resume os dados do hemograma destes indivíduos (**Tabela 8**).

Tabela 8 - Dados do hemograma dos indivíduos do grupo controle.

Parâmetros	Gênero		Total
	Feminino	Masculino	
Número	8	12	20
Idade			
Média	61	63	62
Mediana	62	63	62
Range	50-80	50-74	50-80
Leucócitos			
Media	6122 ± 476,1	5888 ± 563,5	5924 ± 290,3
Range	4670 – 7520	4720 – 8480	4670 – 8480
Linfócitos			
Media	2027 ± 148,8	1933 ± 141	1976 ± 100,3
Range	1400 – 2500	929 – 2660	929 – 2660

Todos os indivíduos do grupo controle estão dentro da normalidade em relação ao número de linfócitos. A **Tabela 9** mostra os valores de referência utilizada pelo HIAE e por Torres et al., (2013) que descreveram o perfil de linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+ na população brasileira (TORRES et al., 2013). Estes dados foram importantes para o

estabelecimento de um dos critérios de inclusão dos indivíduos saudáveis no grupo controle do estudo.

Tabela 9 – Valores de referência do hemograma de indivíduos saudáveis.

Parametros	HIAE		Torres et al., 2013	
	%	Cel/UI	%	Cel/uL
Leucócitos	100	3500 – 10500	-	-
Linfócitos	20 - 47	900 – 2900	-	-
Linfócitos T CD3+	60 - 85	900 – 3000	72	1025 – 2904
Linfócitos T CD4+	30 – 60	400 – 1500	43	540 – 1731
Linfócitos T CD8+	12 – 39	200 – 1200	28	263 – 1189

3.3 Pacientes com LLC-B

Foram analisadas 40 amostras de SP de pacientes portadores de LLC-B provenientes do HIAE, HEMC e Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto. Amostras de SP foram coletadas em tubo contendo anticoagulante heparina sódica.

Em todos os casos estudados o diagnóstico foi realizado utilizando os critérios estabelecidos e revisados pelo *The International Workshop on CLL* (1989) e pelo National Cancer Institute – *Sponsored Working Group* (CHESON et al., 1996), respectivamente. Foram considerados portadores de LLC os pacientes com:

- I) Linfocitose absoluta em sangue periférico $>$ de $5.000/\text{mm}^3$ e morfologia de células linfóides maduras;
- II) Fenótipo de células B (CD19+, CD20+, CD23+) com coexpressão de CD5, monoclonalidade para uma das cadeias leves da imunoglobulina (κ ou λ) e baixa densidade de expressão da Ig de superfície;
- III) Aspirado de medula óssea evidenciando células linfóides $\geq$ a 30% (de todas as células nucleadas) com celularidade normal ou hiper celularidade.

De acordo com os dados clínicos e laboratoriais, obtidos nos serviços de origem, os pacientes foram classificados clinicamente de acordo com os sistemas de estadiamento clínico (EC) de Binet et al (1981).

As amostras de pacientes com tratamento prévio foram excluídas do estudo. As **Tabelas 10 e 11** mostram as características resumidas e as informações clínicas e laboratoriais referentes aos pacientes portadores de LLC-B incluídos neste estudo, respectivamente.

Tabela 10 – Características gerais dos pacientes com LLC-B.

Parâmetros	Gênero		Total
	Feminino	Masculino	
Número	9	26	35
Idade			
Média	62	67	65
Mediana	66	66	66
Range	45-79	44-90	44-90
Leucócitos ($\times 10^3$)			
Media	33,18 $\pm$ 6,5	40,74 $\pm$ 7,9	38,8 $\pm$ 6,12
Range	10,31 – 75,8	12,65 – 222,5	10,31 – 222,5
Linfócitos			
Media	25150 $\pm$ 6199	24930 $\pm$ 3221	24990 $\pm$ 2836
Range	3400 – 63700	6050 – 60400	3400 – 63700

Tabela 11 – Dados clínicos-laboratoriais dos pacientes com LLC-B.

<i>ID</i>	<i>Idade</i>	<i>Gênero</i>	<i>EC</i>	<i>Tempo da doença (anos)</i>	<i>Hb g/dl</i>	<i>plaquetas (10³/ul)</i>	<i>leucócitos (10³/ul)</i>	<i>linfócitos (cel/ul)</i>	<i>CD38</i>	<i>ZAP-70</i>
P1	45	F	Binet A	6	14,6	225	25	20000	NEG	POS
P2	53	M	Binet A	6	15,9	136	28,4	24700	NEG	NEG
P3	63	M	Binet A	10	16,7	221	28	22000	NEG	NEG
P4	51	M	Binet A	9	16,2	246	21,1	11000	NEG	NEG
P5	56	M	Binet A	N/D	14	193	18	6050	NEG	NEG
P6	66	M	Binet A	3	15,1	198	22	16700	NEG	NEG
P7	44	M	Binet A	1	13	72	61	53700	NEG	POS
P8	72	M	Binet A	3	16,7	255	46	38760	NEG	NEG
P9	74	M	Binet A	3	15,7	182	12,65	9740	NEG	NEG
P10	90	M	Binet A	3	14,1	256	16,72	11200	NEG	NEG
P11	80	M	Binet A	2	14,7	214	66,93	53540	POS	NEG
P12	66	F	Binet A	3	13,6	167	10,31	5170	NEG	NEG
P13	58	F	Binet A	3	11,2	111	32,92	25020	NEG	NEG
P14	44	M	Binet A	1	14,4	313	24,7	13070	NEG	NEG
P15	69	M	Binet A	8	14,4	178	13	6890	NEG	NEG
P16	66	M	Binet B	1	14,3	166	55,71	47350	NEG	NEG
P17	64	M	Binet A	1	13,8	232	31	22330	NEG	NEG
P18	89	M	Binet A	1	15,2	135	29,4	16170	NEG	NEG
P19	79	F	Binet A	7	11	225	17,58	13449	NEG	NEG
P20	67	F	Binet A	7	10,1	90	20	3400	NEG	NEG
P21	64	M	Binet A	N/D	8,9	65	222,5	N/D	N/D	N/D
P22	57	M	Binet A	N/D	12,2	127	52,8	N/D	POS	NEG

P23	49	F	Binet A	N/D	14,7	311	29,7	23600	NEG	NEG
P24	61	M	Binet A	1	12,6	168	27	22900	NEG	NEG
P25	69	M	Binet A	5	13,7	260	19,3	13100	NEG	NEG
P26	66	F	Binet A	3	13	255	46,3	37900	NEG	POS
P27	80	M	Binet A	2	13,7	146	42,1	32600	POS	NEG
P28	73	F	Binet A	4	12,6	158	75,8	63700	NEG	NEG
P29	75	M	Binet A	3	15,9	226	25,5	17600	NEG	NEG
P30	67	M	Binet A	4	13,1	128	29,2	23800	NEG	NEG
P31	59	F	Binet A	6	12,6	120	41	34100	NEG	NEG
P32	67	M	Binet A	10	15	125	43,2	38000	NEG	NEG
P33	81	M	Binet A	3	10,7	212	24	15400	POS	POS
P34	73	M	Binet A	1	14,8	237	71,8	60400	NEG	NEG
P35	66	M	Binet A	7	15,5	117	27,3	21200	POS	NEG

* N/D informação não disponível.

3.4 Critérios de exclusão do grupo controle e pacientes com LLC-B

- a) História clínica de quadros infecciosos/inflamatórios prévios e/ou atuais;
- b) Coinfecção com vírus da imunodeficiência humana (HIV);
- c) Coinfecção com HTLV;
- d) Uso de corticosteróides e outros imunossuppressores no período antecedente a pesquisa.

3.5 Obtenção de células mononucleadas do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* – PBMC)

Para estudar as subpopulações de interesse neste estudo, utilizamos uma técnica bem descrita na literatura para a obtenção de células mononucleares, ou do inglês *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC). De maneira geral, esta técnica consiste em utilizar um reagente comercial Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) que quando misturado com o sangue e em condições adequadas de centrifugação, permite o isolamento do PBMC através de um gradiente de densidade específico para estas células (1.077 ± 0.001 g/mL). O volume total do sangue é dobrado com PBS (*phosphate buffered saline*) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB), o qual foi adicionado lentamente sobre o volume de Ficoll previamente aliquoteado em tubo falcon e submetido a uma centrifugação de $1.200 \times g$ por 20 minutos a temperatura ambiente. A fração correspondente ao PBMC foi retirada e submetida a mais duas lavagens com PBS 2% SFB. Estas células foram analisadas frescamente e/ou congeladas e armazenadas em criotubos no nitrogênio líquido.

3.6 Quantificação do PBMC total e viabilidade celular

Após a obtenção do PBMC total descrito acima, foi necessário quantificar as células e determinar a viabilidade celular para assim iniciarmos etapas experimentais subsequentes. Esta análise foi feita com auxílio de microscópio óptico, câmara de Neubauer, e do reagente azul de *trypan*. Para tanto, foi feita uma diluição do PBMC com azul de *trypan* 0,2%, e adicionada na câmara de Neubauer e analisada em microscópio óptico.

Dessa forma, determinamos o número de células por mililitro e também a viabilidade celular, que por sua vez, foi realizada através da observação de que as células mortas, com a membrana

celular comprometida, tornaram-se permeáveis ao azul de *trypan*, o qual cora estas células com tonalidade de azul. Já as células viáveis mantêm suas características de coloração preservada.

3.7 Frequência e número absoluto dos linfócitos T CD4+

Como a técnica utilizada foi a citometria de fluxo, sabe-se que a mesma gera uma porcentagem/frequência das populações analisada conforme a estratégia de *gates* sequenciais.

A partir destes dados de frequência e concentração do PBMC, conseguimos estimar o número absoluto dos linfócitos T CD4+, bem como das suas populações fenotipicamente caracterizadas como Th1, Th2, Th17 e Treg, conforme as fórmulas 1 e 2.

$$\frac{\text{Células totais do PBMC}}{\text{Volume de partida de SP}} = \frac{\text{Células/mL}}{1000} = \text{Células /mm}^3$$

Fórmula (1)

$$\frac{\text{Células/mm}^3 \times \% \text{ da população de interesse}}{100} = \text{número absoluto/mm}^3$$

Fórmula (2)

O número absoluto também foi calculado a partir dos dados do hemograma de 20 indivíduos controles e estes números foram utilizados para realização das análises de comparação com os dados dos pacientes com LLC-B.

3.8 Estimulação *in vitro* das células mononucleadas de sangue periférico

Para cada análise populacional foram utilizadas 1×10^6 células viáveis obtidas de indivíduos normais e de pacientes com LLC-B e distribuídas em placa de 96 poços com fundo “U” em um volume de 200 μL por poço. As células foram estimuladas utilizando 50 ng/mL de PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*), 1 $\mu\text{g/mL}$ de ionomicina na presença de 10 $\mu\text{g/mL}$ de brefeldina A quando fenotipadas para linfócitos T *helper*. Brefeldina A é responsável pela inibição da secreção de

proteínas pelas células, permitindo assim que fosse possível a posterior marcação intracelular das citocinas de interesse.

Em todos os casos, o estímulo foi realizado por um período de 5 horas mantido a 37°C e 5% de CO₂. O tempo ótimo de estimulação *in vitro* foi definido por estudo de cinética no qual foram testados os seguintes tempos: 0, 4, 6 e 18 horas. Após completado o tempo de ativação as células foram marcadas com anticorpos monoclonais e fluorocromos de interesse utilizados para fenotipagem dos linfócitos T CD4+. O processo de marcação de superfície e intracelular estão descrito a seguir.

3.9 Anticorpos

As **Tabelas 12 e 13** listam os anticorpos utilizados neste estudo para a identificação de subpopulações de linfócitos T CD4+.

Tabela 12 - Descrição dos anticorpos monoclonais para fenotipagem dos linfócitos T CD4+

Anticorpos Monoclonais	Fluorocromos	Empresa	Clone
CD3	PerCP/PE	ExBio	HIT3a/UCHT1
CD4	APC-Cy7	BD Pharmingen	RPA-T4
CD25	PE-Cy7	BD Pharmingen	BC96
CD95(FAS)	FITC	BD Pharmingen	DX2
CD95L (FASL)	PE	BD Pharmingen	NOK-1
IFN- γ	AlexaFluor 488	BD Pharmingen	B27
IL-4	PE-Cy7	BD Pharmingen	8D4-8
IL-17A	PerCP-Cy5.5	BD Pharmingen	N49-653
FoxP3	AlexaFluor 488	eBioscience	150D/E4

Tabela 13 - Painéis de anticorpos monoclonais para marcação de PBMC de controle e pacientes com LLC-B

Painel	Anticorpos				
A	CD3-PE	CD4-APC-Cy7	IL4-PECy7	IL17A-PerCP-Cy5.5	IFN- γ -AlexaFluor 488
B	CD3-PE	CD4-APC-Cy7	CD25- PECy7	FoxP3-Alexa Fluor 488	
C	CD3-PerCP	CD4-APC-Cy7	FAS-FITC	FASL-PE	

3.10 Marcação celular de superfície e intracelular com anticorpos monoclonais

A principal abordagem experimental do presente estudo foi a caracterização fenotípica, por citometria de fluxo, dos linfócitos T CD4⁺. Após o estímulo, 1x10⁶ células totais de PBMC foram marcadas com anticorpos monoclonais e fluorocromos específicos e descritos na **tabela XII**. As células foram distribuídas em uma placa de cultura de fundo “V” de 96 poços, lavadas duas vezes com tampão de marcação (*staining buffer* – PBS 1x 2% soro bovino fetal (FBS) e 0,1% azida) e centrifugadas a 500 xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado por inversão da placa e o excesso de líquido foi eliminado em papel absorvente. As células foram incubadas com os anticorpos de marcação de superfície por 30 minutos e após este período foram lavadas novamente duas vezes.

Para a realização da marcação intracelular com os anticorpos IL-4, IL-17A e IFN- γ , as células foram permeabilizadas e fixadas com *Cytofix/cytoperm solution* (BD Biosciences) e incubadas por 20 minutos protegidas da luz. Realizada a etapa de fixação, as células foram lavadas 2x em *Perm/Wash solution* 1x (BD Biosciences – Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). Seguiu-se por 30 minutos de incubação com anticorpos e após este período as células foram lavadas novamente por duas vezes com *Perm/Wash* e fixadas em 1% de paraformaldeído e em até 24 horas as células foram adquiridas no citômetro de fluxo modelo FACS Canto II (BD Biosciences). Os dados foram analisados pelo *software* FlowJo (Tree Star, Inc.). As **figuras 3, 4 e 5** detalham as estratégias de análises utilizadas para identificar as populações de linfócitos T CD4⁺ e as subpopulações de linfócitos Th1, Th2 e Th17 em PBMC provenientes de um indivíduo controle e de um paciente portador de LLC-B. Os *gates* para identificar as subpopulações Th1, Th2 e Th17

através da expressão de IFN- γ , IL-4 e IL17, respectivamente, foram realizados a partir das amostras não estimuladas.

Figura 3 – Estratégia de análise utilizada para identificar a subpopulações de células Th1, Th2 e Th17 em PBMC proveniente de um indivíduo controle.

Para realizar a estratégia de *gate*, as células não receberam estímulo. (A) Seleção de células *singlets* através das características de altura (FSC-H) e área (FSC-A); (B) Seleção de linfócitos através das características celulares de tamanho (FSC) e granulosidade e complexidade (SSC); (C) Seleção dos linfócitos T CD4+ através das expressão de CD3 e CD4. (D, E, F) *Gate* realizado a partir da não expressão de IFN- γ , IL-4 e IL-17A pelos linfócitos T CD4+, respectivamente. Esta estratégia foi utilizada para todos os experimentos, tanto para o grupo controle como para os pacientes.. Experimento realizado em duplicada e análise por citometria de fluxo (FACS Canto II BD Bioscience).

Figura 4 – Estratégia de análise utilizada para identificar a subpopulações de células Th1, Th2 e Th17.

As células receberam estímulo com PMA e ionomicina na presença de brefeldina A. (A) Seleção de células *singlets* através das características de altura (FSC-H) e área (FSC-A); (B) Seleção de linfócitos através das características celulares de tamanho (FSC) e granulosidade e complexidade (SSC); (C) Seleção dos linfócitos T CD4⁺ através das expressão de CD3 e CD4. (D, E, F) *Gate* realizado a partir das células não estimuladas como mostra a figura anterior (figura 3) e aplicado as demais amostras que receberam o estímulo. Experimento realizado em duplicada e análise por citometria de fluxo (FACS Canto II BD Bioscience).

Figura 5 - Estratégia de análise utilizada para identificar a subpopulações de células Th1, Th2 e Th17 em PBMC proveniente de um paciente com LLC-B.

Para realizar a estratégia de *gate*, as células receberam estímulo com PMA e ionomicina na presença de brefeldina A. (A) Seleção das células *singlets* através das características de altura (FSC-H) e área (FSC-A); (B) Seleção de linfócitos através das características celulares de tamanho (FSC) e granulosidade e complexidade (SSC); (C) Seleção dos linfócitos T CD4⁺ através das expressão de CD3 e CD4. (D, E, F) *Gate* realizado a partir das células não estimuladas como mostra a figura anterior (figura 3). Experimento realizado em duplicada e análise por citometria de fluxo (FACS Canto II BD Bioscience).

Para amostras destinadas a análises de identificação da subpopulação de Treg, procedeu-se a marcação intranuclear FOXP3 utilizando-se um kit comercializado (eBioscience, San Diego, CA, USA). Os criotubos contendo PBMC foram descongelados rapidamente, em banho-maria a 37 °C, utilizando-se 1,0 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB inativado (Gibco, Carsbad, USA). A suspensão celular foi transferida para um tubo de 15 mL, contendo 10 mL de meio RPMI-1640 suplementado, seguindo-se de centrifugação a 250 xg durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 2,0 mL de meio completo. A viabilidade celular foi averiguada utilizando-se azul de tripan, e o número de células viáveis foi estimado em contagem na câmara hemocitométrica de Neubauer (diluição 10X). As células foram

imediatamente marcadas de acordo com o protocolo descrito no kit *FoxP3 Fixation/Permeabilization* (eBioscience). A **figura 6** detalha a estratégia de *gate* utilizada para identificar a população de células Treg em PBMC.

Figura 6 - Estratégia de análise utilizada para identificar a subpopulações de células Treg.

Foi realizada a estratégia de *gates* sequenciais a partir da seleção dos linfócitos por meio de suas características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), seguindo a seleção da população CD4⁺ a partir da população CD3⁺. A caracterização das células Treg foi por meio da expressão simultânea de CD25⁺FOXP3⁺; (A) *Gate* realizado a partir de FMO (*FluorescenceMinusOne*) para FOXP3. (B) Expressão de CD25⁺FOXP3⁺ em indivíduo controle; (C) Expressão de CD25⁺FOXP3⁺ em paciente portador de LLC-B.

3.11 Análise do receptor e ligante de morte celular, FAS e FASL

A expressão do receptor de morte celular FAS e seu ligante FASL foi analisada através da marcação de anticorpos monoclonais acoplados a diferentes fluorocromos como mostram as **tabelas XII e XIII**. Para estas marcações, foi utilizado PBMC criopreservado em nitrogênio líquido, em que no momento do experimento as células foram descongeladas rapidamente, em banho-maria a 37° C, utilizando-se meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB inativado (Gibco, Carsbad, USA). As células receberam estímulos de 50 ng/ml de PMA e 1 ug/ml de ionomicina por 5 horas mantidas em condições de cultura a 37 °C e 5% de CO₂. A estratégia de análise realizada foi através da seleção de *gates* sequenciais e para identificar a expressão de FAS e FASL utilizou-se um tubo contendo FMO (*Fluorescence Minus One*) para FAS e outro para FASL (**figura 7**).

Figura 7 - Estratégia de análise utilizada para identificar a expressão de FAS e FASL em linfócitos T CD4+ em indivíduos controles e pacientes com LLC-B.

Foi realizado a estratégia de *gates* sequenciais a partir da seleção dos linfócitos por meio de suas características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), seguindo a seleção da população dupla positiva CD3⁺CD4⁺. A caracterização das células que expressam FAS e FASL foi por meio *Gate* realizado a partir de FMO (*FluorescenceMinusOne*) para FAS e FASL. (A) Expressão de FAS e FASL em indivíduo controle; (B) Expressão de FAS e FASL em paciente portador de LLC-B.

3.12 Detecção dos níveis de citocinas em sobrenadante de PBMC

Os níveis de citocinas Th1, Th2 e Th17 em sobrenadante de cultura de PBMC foram quantificados utilizando-se o sistema *Cytometric Bead Array* (CBA), *Becton Dickinson* (BD), que emprega uma mistura de esferas de poliestireno de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas e são detectadas na citometria de fluxo. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes da amostra. Seguimos o protocolo descrito no *data sheets* do kit *BDTM Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (Catalog No. 560484)*.

Para obtenção do sobrenadante, PBMC de indivíduos controles e pacientes, foram estimuladas com 50 ng/ml de PMA e 1 µg/ml de ionomicina em condições de cultura a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas. Após este período as células foram centrifugadas a 500 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C até a realização do experimento.

O kit CBA adquirido (*Human Th1/Th2/Th17 Cytokine CBA Kit*) continha as seguintes citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, INF-γ e IL-17A. A aquisição das amostras foi realizada através do FACS Accuri C6 (BD) e as análises foram através do *software FCAP Array v3* (Soft Flow, Inc.).

3.13 Detecção da expressão antigênica de ZAP-70 intracitoplasmático

A detecção da expressão intracitoplasmática de ZAP-70 em linfócitos T e B, foi realizada no setor de citometria de fluxo do laboratório clínico do HIAE. Esta detecção foi feita tanto em indivíduos normais como em pacientes com LLC, utilizando a técnica de citometria de fluxo através do aparelho Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter) - *CXP Analysis*.

3.14 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* computacional *Graphpad Prism*, da companhia *Graphpad Software Incorporation*, versão 5.0. Para as comparações entre o grupo controle e pacientes com LLC-B foram utilizado teste estatístico não-

paramétricos seguido pelo teste Mann-Whitney. As análises de correlações foram realizadas a partir coeficiente de correlação de Spearman (r). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Perfil fenotípico do grupo controle

Para melhor compreender o perfil fenotípico de pacientes com LLC-B, inicialmente, caracterizamos o grupo controle de indivíduos saudáveis, o qual foi utilizado na comparação com os resultados obtidos a partir das amostras de sangue periférico dos pacientes com LLC-B.

Com base nos resultados fenotípicos da população de linfócitos T através da citometria de fluxo e combinação policromática de anticorpos monoclonais já descritos, obtivemos o perfil do grupo controle do estudo, no que diz respeito ao *status* fenotípico de células T CD4+ *helper* (Th1, Th2, Th17) e células T reguladoras. Vale ressaltar que o grupo controle é formado por indivíduos saudáveis doadores de sangue e por voluntários também saudáveis com mais de 60 anos, com um total de 45 indivíduos conforme descrição na **Tabela 4**.

No início deste projeto, recebemos amostras de sangue periférico obtidas do banco de sangue do HIAE provenientes de doadores com idade acima de 18 anos e abaixo de 60 anos, um dos critérios utilizados pelo banco de sangue. Sendo assim, temos os resultados do perfil fenotípico de todos os indivíduos saudáveis incluindo os mais jovens e acima de 60 anos. Como uma das características dos pacientes com LLC-B é idade média acima de 60 anos, realizamos a comparação do grupo controle incluindo todas as idades e aqueles com idades acima de 45 anos, idade do paciente mais jovem do nosso estudo. Esta análise tem como objetivo verificar se existem diferenças estatisticamente significativas quanto a frequência e número absoluto dos linfócitos T totais e as populações CD4+ do grupo controle em relação a idade. Como mostra a **Figura 8**, a frequência dos linfócitos T totais do grupo controle abaixo de 45 anos ($68,04 \pm 1,68$; n=17) não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada com o grupo controle acima de 45 anos ($66,26 \pm 1,5$; n=28). Resultados semelhantes também foram obtidos em relação ao número absoluto de linfócitos T totais entre os grupos com menos de 45 anos ($1556 \pm 92,4$; n=17) e com mais de 45 anos de idade ($1610 \pm 71,94$; n=28). Também não houve diferença estatisticamente significativa ao analisarmos a frequência relativa dos linfócitos T CD4+ ($61,6 \pm 2,0$; n=17) e número absoluto ($965,4 \pm 72,2$; n=17) nos indivíduos com menos de 45 anos quando comparados com o grupo a cima de 45 anos, tanto para a frequência relativa ($64,6 \pm 1,7$; n=17) quanto em relação ao número absoluto ($1051 \pm 63,4$; n=28).

Figura 8 – Avaliação do compartimento de linfócitos T CD3+ e CD4+ no grupo controle.

O grupo controle deste estudo foi estratificado em duas partes, uma representada por indivíduos abaixo de 45 anos e outra representada por indivíduos acima de 45 anos. (A) frequência relativa e (B) número absoluto dos linfócitos T CD3+. (C) frequência relativa e (D) número absoluto dos linfócitos T CD4+. Os resultados representados nestes gráficos não mostraram diferença estatisticamente significativa entre dos grupos baixo e acima de 45 anos ($p > 0,1$). PBMCs foram marcadas com anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos para CD3 e CD4, a aquisição das amostras foram através de citometria de fluxo (FACS Canto II, BD) e a análise dos eventos foram realizada pelo *software* FlowJo (Tree Star, Inc.).

Da mesma maneira analisamos as subpopulações de linfócitos T CD4+ com perfil fenotípico Th1, Th2 e Th17. Como podemos observar na **Figura 9** não houve diferença estatísticas em relação aos grupos de indivíduos com menos ou mais de 45 anos.

Figura 9 – Avaliação das subpopulações de linfócitos T *helper* (Th1, Th2 e Th17) no grupo controle.

O grupo controle deste estudo foi estratificado em duas partes, uma representada por indivíduos abaixo de 45 anos e outra representada por indivíduos acima de 45 anos. (A) frequência relativa e (B) número absoluto dos linfócitos T CD4⁺ com perfil Th1. (C) frequência relativa e (D) número absoluto dos linfócitos T CD4⁺ com perfil Th2. (E) frequência relativa e (F) número absoluto dos linfócitos T CD4⁺ com perfil Th17. Os resultados representados nestes gráficos não mostraram diferença estatisticamente significativa entre dos grupos baixo e acima de 45 anos ($p > 0,1$). PBMCs foram marcadas com anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos para CD3, CD4, IFN- γ , IL-4 e IL-17A, a aquisição das amostras foram através de citometria de fluxo (FACS Canto II, BD) e a análise dos eventos foram realizada pelo *software* FlowJo (Tree Star, Inc.).

A respeito dos resultados obtidos das análises dos indivíduos selecionados para o grupo controle, podemos dizer que de maneira geral os resultados de perfil de linfócitos T totais e CD4⁺

corroboraram com outros já publicados e com critérios de normalidade do ponto de vista imunológico, tornando esses dados confiáveis como grupo controle.

Mesmo que o número absoluto destes linfócitos não tenham apresentado diferenças estatísticas nos grupos estratificados em abaixo e acima de 45 anos, fomos investigar se nossos resultados apresentavam alguma correlação entre a distribuição destes linfócitos T com a idade dos indivíduos do grupo controle, pois, dados na literatura sugerem que, devido a situações como redução da função tímica, maior exposição antigênica, e mecanismos homeostáticos de regulação, a proporção de células T *naive*, efectoras e de memória podem sofrer mudanças em sua distribuição com a idade.

A **Figura 10** mostra o gráfico de dispersão para analisar se existe uma correlação entre o número absoluto das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ Th1, Th2 e Th17 e a idade dos indivíduos saudáveis. Os gráficos desta figura compreendem a determinação do grau de relação entre duas variáveis, dado pelo coeficiente de Spearman (r), também chamado de coeficiente de correlação, ou ainda, simplesmente correlação para os pares de variáveis. Este coeficiente de correlação expressa o grau de dependência linear entre duas variáveis e tem valores entre -1 e $+1$, sendo negativa quando uma variável diminui com o aumento da outra variável, e positiva quando uma variável aumenta com o aumento da outra. Como podemos observar todas as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ não apresentaram correlações estatisticamente significativas. Portanto, podemos sugerir que o número absoluto das subpopulações de linfócitos T CD3⁺, CD4⁺, Th1 e Th17 não correlaciona com a idade dos indivíduos saudáveis que compõe o grupo controle deste estudo e que Th2 correlaciona fracamente ($r=3$).

Figura 10 – A distribuição das subpopulações de linfócitos T CD4+ é independente da idade.

Distribuição idade-dependente (19 – 72 anos) no número dos linfócitos T CD3+ (A), CD4+ (B), Th1 (C), Th2 (D) e Th17 (E) referente ao grupo controle do estudo. Estas análises estatísticas foram avaliada usando teste do correlação de Pearson (r), com valores de $r < 3$ (correlação fraca), $4 > r > 6$ (correlação moderada) e $r > 7$ (correlação forte). Diferença estatisticamente significativa representada por $p < 0,05$.

Mesmo não observando uma dependência estatística em relação ao número de células e a idade dos indivíduos saudáveis, para melhor compararmos nossos resultados, usaremos somente os dados resultantes dos indivíduos controles pareado com a idade dos pacientes, ou seja, idade acima de 45 anos.

Partindo-se da população total de células T CD4+ selecionadas por meio de análise fenotípica em citômetro de fluxo, observamos que em indivíduos saudáveis, a frequência relativa das células T CD4+ *helper* tipo 1 (Th1) têm predominância sobre as células Th2 e Th17, o que foi medido através da expressão de IFN- γ , IL-4 e IL-17 respectivamente (**Figura 11A**).

Figura 11 – Distribuição dos linfócitos T CD4⁺ caracterizados fenotipicamente como Th1, Th2 e Th17 do grupo controle.

Representação gráfica da frequência relativa (A) e número absoluto (B) dos linfócitos T CD4⁺ que expressam IFN- γ (Th1), IL-4 (Th2), IL-17 (Th17). realizada por citometria de fluxo (FACS Canto II BD). PBMCs foram marcadas com anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos para CD3, CD4, IFN- γ , IL-4 e IL-17A, a aquisição das amostras foram através de citometria de fluxo (FACS Canto II, BD) e a análise dos eventos foram realizada pelo *software* FlowJo (Tree Star, Inc.).

Quando a frequência das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ foi convertida em número absoluto de linfócitos, a partir do número de células obtidas no processamento do sangue periférico para a obtenção do PBMC, notamos que a subpopulação de linfócitos T CD4⁺ com expressão de IFN- γ , também foi predominante em relação as outras subpopulações Th2 e Th17 (**Figura 11B**).

4.2 Perfil fenotípico nos pacientes com LLC-B

Os 31 pacientes com LLC-B estudados neste projeto e descritos na **Tabela 5**, apresentaram resultados relevantes em relação às subpopulações estudadas no compartimento dos linfócitos T CD4⁺, quando comparados com o grupo controle.

Como descrito em materiais e métodos, inicialmente os resultados de número absoluto foram realizados a partir do número de células mononucleadas (PBMC) em relação ao volume de sangue periférico coletado, demonstrado através da fórmula descrita no item 3.7. Levando em conta as informações dos hemogramas de alguns indivíduos do grupo controle, verificamos que estes dados não apresentaram diferenças significativas em relação aos dados obtidos através do uso da fórmula descrita acima. Para obtermos resultados fidedignos na comparação com o grupo de

pacientes, que também temos as informações do hemograma, optamos por mostrar os resultados de linfócitos T totais e as suas subpopulações através dos números obtidos pelo hemograma.

Dados da literatura relatam que parte dos pacientes diagnosticados com LLC-B apresentam diminuição na contagem absoluta e redução da frequência de linfócitos T CD4+ e aumento acentuado no número absoluto dos linfócitos T CD8+ (HERRMAN et al., 1982; SEMENZATO et al., 1983). Em contrapartida, outros estudos mostraram aumento na população de linfócitos T CD4+ e diminuição dos linfócitos T CD8+. Sendo assim, investigamos as populações de linfócitos T totais CD3+ e CD4+ nas amostras de células mononucleadas de sangue periférico dos pacientes com LLC-B e nos controles saudáveis. Os *gates* selecionados para a realização destas análises estão demonstrados nas **Figuras 3 e 4**.

Primeiramente verificamos uma diminuição acentuada na frequência relativa dos linfócitos T totais dos pacientes ($9,9 \pm 1,7$; $n=31$; $p<0,0001$) quando comparados ao grupo controle ($64,6 \pm 1,75$; $n=20$) (**Figura 12A**). Porém, essa diferença não se reproduziu em relação ao número absoluto destes linfócitos e como mostra a **Figura 12B**, podemos observar que nos indivíduos do grupo controle ($1542 \pm 91,17$; $n=20$) não houve diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo de pacientes ($1849 \pm 196,0$; $n=31$). Os gráficos C e D da **Figura 12**, nos mostram que a frequência relativa de linfócitos T CD4+ do grupo de pacientes com LLC-B ($6,5 \pm 5$; $n=31$) também apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle ($63,01 \pm 2,17$; $n=20$). Mas, não observamos diferença quanto ao número absoluto destes linfócitos T CD4+ nos pacientes LLC-B ($1118 \pm 134,7$; $n=31$) quando comparado com o grupo controle ($974,9 \pm 70,4$; $n = 20$).

Figura 12 – Distribuição dos linfócitos T CD3+ e CD4+ nos pacientes com LLC-B em comparação com grupo controle.

Frequência (A e C) e número absoluto (B e D) dos linfócitos T totais e linfócitos T CD4+ do grupo controle e dos pacientes com LLC-B, respectivamente. PBMCs foram marcadas com anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos para CD3, CD4, IFN- γ , IL-4 e IL-17A, a aquisição das amostras foram através de citometria de fluxo (FACS Canto II, BD) e a análise dos eventos foram realizada pelo *software* FlowJo (Tree Star, Inc.). Grupo controle n = 20; LLC-B n = 31. Valores de *p* estatisticamente significantes são representados por (***) $p < 0,0001$.

Dados de outro trabalho do nosso grupo, mostraram que a frequência dos linfócitos T CD8+ estão diminuídas, mas em relação ao número absoluto não foi possível verificar diferença em relação ao grupo controle (CORREIA, P. C., 2012).

Com estes dados, foi possível analisar a razão entre o compartimento de linfócitos T CD4+ e CD8+ nos pacientes com LLC-B e comparar com o grupo controle. Como mostra a **Figura 13**, apenas 1 paciente, *PI6* (0,8) apresentou a relação CD4/CD8 abaixo de 0,9 que representa o limite inferior aceito como valor de referência para este parâmetro e como pode ser observado na **Figura 13B**, o grupo de pacientes com LLC-B apresentou razão CD4/CD8 sem diferença estatisticamente significativa ($2,44 \pm 0,2$; n = 17; $p = 0,878$) quando comparado ao grupo controle ($2,39 \pm 0,18$; n = 26).

Figura 13 – Razão entre os linfócitos T CD4+ e CD8+ em pacientes com LLC-B e indivíduos do grupo controle.

(A) Razão calculada a partir do número absoluto dos linfócitos TCD4+ e CD8+ dos pacientes de LLC-B. (B) Razão CD4/CD8 dos pacientes comparados com o grupo controle não mostra diferença estatisticamente significativa ($p > 0,01$).

As **Figuras 14, 15 e 16** representam uma análise comparativa das diferentes subpopulações de linfócitos T CD4+ em indivíduos controles saudáveis e o grupo de pacientes com LLC-B.

Como podemos observar na **Figura 14**, nos pacientes com LLC-B, a frequência dos linfócitos T CD4+ que expressam IFN- γ , caracterizados pela subpopulação de células Th1, estão

significativamente aumentados ($13,1 \pm 1,45$; $n=31$; $p<0,0001$) em comparação com o grupo controle ($4,8 \pm 0,5$; $n=20$). Esta diferença se repete ao observarmos o número absoluto dos pacientes ($162,9 \pm 34,2$; $n=31$; $p<0,001$) em relação ao grupo controle ($43,9 \pm 4,6$; $n=20$) (**Figura 14A e 14B**, respectivamente).

Figura 14. Distribuição dos linfócitos Th1 nos pacientes com LLC-B em comparação com o grupo controle.

(A) Aumento na frequência e (B) número absoluto dos linfócitos T CD4+IFN-γ⁺ (Th1) do grupo controle e dos pacientes com LLC-B. PBMCs foram marcadas com anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos para CD3, CD4, IFN-γ, a aquisição das amostras foram através de citometria de fluxo (FACS Canto II, BD) e a análise dos eventos foram realizada pelo *software*FlowJo (Tree Star, Inc.). Grupo controle $n = 20$; LLC-B $n = 31$. Valores de p estatisticamente significantes são representados por (***) $p<0,0001$ e (**) $p<0,001$.

Agora, analisando o perfil dos linfócitos Th2, podemos verificar que tanto a frequência relativa quanto o número absoluto, não existe diferença estatisticamente significativa na comparação do grupo de pacientes com o grupo de indivíduos controles (**Figura 15A e 15B**, respectivamente).

Figura 15. Distribuição dos linfócitos Th2 nos pacientes com LLC-B em comparação com o grupo controle.

(A) Frequência e (B) número absoluto dos linfócitos T CD4⁺IL-4⁺ (Th2) do grupo controle e dos pacientes com LLC-B. PBMCs foram marcadas com anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos para CD3, CD4, IL-4, a aquisição das amostras foram através de citometria de fluxo (FACS Canto II, BD) e a análise dos eventos foram realizada pelo *software*FlowJo (Tree Star, Inc.). Grupo controle n = 20; LLC-B n = 31.

Também verificamos a expressão da citocina IL-17 pelos linfócitos T CD4⁺ e observamos, pelos nossos resultados, que a frequência desta subpopulação de células é diminuída tanto nos pacientes quanto no grupo controle (**Figura 16A e 16B**, respectivamente).

Figura 16. Distribuição dos linfócitos Th17 nos pacientes com LLC-B em comparação com o grupo controle.

(A) Frequência e (B) número absoluto dos linfócitos T CD4⁺IL-17⁺ (Th17) do grupo controle e dos pacientes com LLC-B. PBMCs foram marcadas com anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos para CD3, CD4, IL-17, a aquisição das amostras foram através de citometria de fluxo (FACS Canto II, BD) e a análise dos eventos foram realizada pelo *software*FlowJo (Tree Star, Inc.). Grupo controle n = 20; LLC-B n = 31.

Analisando os pacientes com LLC-B, podemos observar uma distribuição heterogênea em relação ao número absoluto nos linfócitos T totais, CD4⁺ e nas subpopulações Th1 e Th2. Estes

resultados foram correlacionados com alguns critérios e dados clínicos dos pacientes como idade, tempo da doença e marcadores de prognósticos ZAP-70 e CD38.

Como podemos observar, a figura abaixo representa um gráfico de dispersão que construímos para analisar se existe correlação entre a idade dos pacientes e o tempo da doença com a distribuição dos linfócitos T CD3+ e CD4+. Para estes linfócito T não foi possível observar uma correlação em relação a estes dois critérios (**Figura 17**).

Figura 17 – Correlação dos linfócitos T CD3+ e CD4+ com a idade e tempo da doença nos pacientes com LLC-B.

Gráficos representativos da correlação do número absoluto dos (A) linfócitos T CD3+ e (B) CD4+ com a idade (à esquerda) e tempo da doença (à direita) nos pacientes com LLC-B. Para estas duas populações não observamos uma correlação estatisticamente significativa. As análises estatísticas foram avaliadas através do teste de correlação de Pearson (r), com valores de $r < 3$ (correlação fraca), $4 > r > 6$ (correlação moderada) e $r > 7$ (correlação forte). Diferença estatisticamente significativa representada por $p < 0,05$.

Quando analisamos as subpopulações de linfócitos T CD4+ Th1 e Th2, verificamos que existe correlação fraca em relação ao tempo da doença, sendo uma negativa e uma positiva para as subpopulações Th1 ($r = -0,36$) e Th2 ($r = 0,41$), respectivamente (**Figura 18**). Estas correlações

foram estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e de acordo com a classificação de Dancey e Reidy (2005) podemos considerar uma relação fraca entre o número absoluto e o tempo da doença para Th1 e moderada para a subpopulação Th2 (DANCEY; REIDY, 2005).

Figura 18 – Correlação dos linfócitos Th1 e Th2 com a idade e tempo da doença nos pacientes com LLC-B.

Gráficos representativos da correlação do número absoluto dos (A e B) linfócitos Th1 e (C e D) Th2 com a idade (à esquerda) e tempo da doença (à direita) nos pacientes com LLC-B. As análises estatísticas foram avaliadas através do teste de correlação de Pearson (r), com valores de $r < 3$ (correlação fraca), $4 > r > 6$ (correlação moderada) e $r > 7$ (correlação forte). Diferença estatisticamente significativa representada por $p < 0,05$.

Não foi possível observar uma correlação dos dados obtidos com os fatores de prognósticos

ZAP-70 e CD38 em nenhum dos parâmetros analisados.

4.3 Quantificação de citocinas Th1, Th2 e Th17 em sobrenadante de PBMC de indivíduos saudáveis e pacientes com LLC-B

Para comprovarmos qual a predominância das subpopulações de linfócitos T CD4+ *helper* nos pacientes com LLC-B em relação ao grupo controle, tentamos avaliar por expressão gênica as citocinas IFN- γ , IL-4 e IL17A nos linfócitos T CD4+. Após a coleta de sangue periférico, uma parte das amostras foram processadas para obtenção dos linfócitos T CD4+ purificados a partir do protocolo do *kit RosetteSep™ Human CD4+ T cell* (STEMCELL Technologies Inc, Vancouver, Canada), na qual, tem como princípio isolar as células de interesse do sangue periférico total por seleção negativa, onde células indesejadas são removidas através do reconhecimento com um complexo de anticorpos tetraméricos e quando centrifugados por um meio de densidade como Ficoll, as células CD4+ ficam na interface entre o plasma e o Ficoll. A partir deste procedimento foi realizado o processo de extração de RNA destes linfócitos tanto dos indivíduos saudáveis e como dos pacientes. Ocorreu que nos pacientes, a frequência desta população de linfócitos é diminuída, sendo assim, não foi possível obter a quantidade necessária de RNA para produção de cDNA e por fim a verificação da expressão genética das citocinas Th1, Th2 e Th17.

Portanto, outra metodologia foi utilizada para verificarmos as citocinas com padrão Th1, Th2 e Th17. As citocinas analisadas foram: IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17, através da técnica de CBA (*Cytometric Bead Array - Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit*), descrito em materiais e métodos. Analisamos estas citocinas em sobrenadante de PBMC que receberam estímulo com PMA e ionomicina por um período de 24 horas (DJURDJEVIC et al., 2009). Os gráficos da **Figura 19**, nos mostram em pg/mL que as citocinas IFN- γ (4405 ± 555 ; N=20), IL-2 (8937 ± 1496 ; N=20), TNF- α ($1193 \pm 349,7$; N=18) com padrão Th1, estão aumentados nos pacientes com LLC-B em relação aos indivíduos saudáveis ($281 \pm 62,03$; N=15 / $972 \pm 405,7$; N=15 / $110,4 \pm 31,15$; N=15, respectivamente). Estes resultados corroboram com os dados de citometria de fluxo em que observamos um aumento na expressão de IFN- γ nos linfócitos T CD4+.

Já para as citocinas com perfil Th2, não foi possível observar uma grande diferença estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes com LLC-B e o grupo controle, exceto a citocina IL-6, na qual podemos observar um aumento ($2161 \pm 805,2$; N=15) nos pacientes em comparação com o grupo controle ($139,6 \pm 21,25$; N=15). A citocina IL-17 que representa o perfil Th17 também nos mostrou um aumento significativo nos pacientes ($127,7 \pm 45,35$; N=15) em comparação com o grupo controle ($10,35 \pm 3,2$; N=15).

Figura 19 – Dosagem das citocinas Th1, Th2 e Th17 em sobrenadantes de PBMC.

Quantificação das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 em sobrenadante de PBMC após o estímulo com 50 ng/mL de PMA e 1 μ g/mL de ionomicina. O ensaio foi realizado através do kit *Cytometric Bead Array (CBA) - Human Th1/Th2/Th17* da BD. Aquisição foi realizada através do FACS Accuri C6 (BD) e os dados analisados pelo software FCAP array v3. Valores de p estatisticamente significantes são representados por (***) $p < 0,0001$, (**) $p < 0,001$ e (*) $p < 0,05$.

4.4 Avaliação fenotípica da população de células T reguladoras

Uma análise no compartimento dos linfócitos T CD4⁺ representada pelas células T reguladoras foram avaliadas nos indivíduos controles e nos pacientes com LLC-B deste estudo. Esta subpopulação de linfócitos T foi classificada fenotipicamente com base na expressão das moléculas de superfície CD3, CD4 e CD25, e pela expressão do fator de transcrição FOXP3. Primeiramente, analisamos os linfócitos T CD4⁺ com expressão de CD25⁺ e dentro desta população verificamos a expressão de FOXP3. Como mostra a **Figura 20**, não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes e controle, tanto na frequência

quanto no número absoluto de células com expressão de CD25 nos linfócitos T CD4+ (**Figura 20 A e B**).

Com relação a população de células T reguladoras caracterizadas pela expressão concomitante de CD25 e FOXP3, foi verificado um aumento significativo na frequência relativa desta população nos pacientes com LLC-B ($47,7 \pm 4,8$; $n = 29$; $p < 0,0001$) quando comparados com o grupo controle ($20,5 \pm 3,1$; $n = 20$). Em relação ao número absoluto, não foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa nos linfócitos T CD4+CD25+FOXP3+ (**figura 20 C e D**).

Figura 20 – Avaliação dos linfócitos T $CD4^+$ expressando $CD25^+$ e $CD25^+FOXP3^+$ em pacientes com LLC-B comparados com indivíduos controle.

(A)

Frequência e (B) número absoluto dos linfócitos T $CD4^+CD25^+$. (C) Frequência e (D) número absoluto dos linfócitos T $CD4^+CD25^+FOXP3^+$. PBMCs foram marcadas com anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos para CD3, CD4, CD25 e FOXP3, a aquisição das amostras foram através de citometria de fluxo (FACS Canto II, BD) e a análise dos eventos foram realizada pelo *software* FlowJo (Tree Star, Inc.). Grupo controle n = 20; LLC-B n = 29. Valores de p estatisticamente significantes são representados por (***) p < 0,0001.

Mesmo não observando uma diferença significativa no número absoluto entre os grupos de pacientes *versus* controles, verificamos se existe uma correlação destas subpopulações em relação a idade e tempo da doença. Como mostra a figura abaixo, não houve diferença estatisticamente significativa entre as subpopulações $CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ em relação a idade dos pacientes e tempo da doença. (**Figura 21**).

Figura 21 – Correlação dos linfócitos T CD4+CD25+ e CD4+CD25+FOXP3+ com a idade e tempo da doença nos pacientes com LLC-B.

Gráficos representativos da correlação do número absoluto dos (A e B) linfócitos T CD4+CD25+ e (C e D) CD4+CD25+FOXP3+ com a idade (à esquerda) e tempo da doença (à direita) nos pacientes com LLC-B. As análises estatísticas foram avaliadas através do teste de correlação de Pearson (r), com valores de $r < 3$ (correlação fraca), $4 > r > 6$ (correlação moderada) e $r > 7$ (correlação forte). Diferença estatisticamente significativa não foram observada nestes testes.

4.5 Expressão de FAS e FASL em linfócitos T CD4+

Um dos mecanismos responsáveis pela retração populacional dos linfócitos previamente ativados e expandidos durante uma resposta imune é denominada AICD. A principal via de AICD é dependente de um aumento dos níveis de FASL (CD95L) e da interação desta molécula com seu receptor FAS (CD95) na superfície das células alvo (BRUNNER et al., 1995; DHEIN et al., 1995).

Sendo assim, fomos investigar a expressão do receptor de morte FAS e do ligante FASL nos linfócitos T CD4+. Como mostra a **Figura 22A**, a frequência dos linfócitos T CD4+ com

expressão de FAS não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos pacientes com LLC-B ($61,66 \pm 4,2$; $n = 21$) quando comparados com o grupo controle ($56,23 \pm 1,6$; $n = 13$). Da mesma maneira, não observamos diferença estatística em relação ao número absoluto entre o grupo de pacientes ($680,8 \pm 97,6$; $n = 21$) e os grupo de indivíduos saudáveis ($492,3 \pm 45$; $n = 13$).

Na expressão de FASL, foi observado um aumento estatisticamente significativo na frequência relativa nos pacientes com LLC-B ($20,67 \pm 4,7$; $n = 21$; $p = 0,05$) em relação ao grupo controle ($10,1 \pm 1,1$; $n = 13$). Esta diferença se repete quando analisamos o número absoluto dos linfócitos T CD4+ com expressão de FASL nos pacientes (278 ± 83 ; $n = 21$) quando comparados com o grupo controle ($92,28 \pm 12,24$; $n = 13$) (**Figura 22B**).

Figura 22 – Avaliação da expressão do receptor de morte FAS e seu ligante FASL nos linfócitos T CD4⁺ de indivíduos controles e pacientes com LLC-B.

(A) Frequência e (B) número absoluto dos linfócitos T CD4⁺ com expressão de FAS (C) Frequência e (D) número absoluto dos linfócitos T com expressão de FASL. PBMCs foram marcadas com anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos para CD3, CD4, FAS e FASL, a aquisição das amostras foram através de citometria de fluxo (FACS Canto II, BD) e a análise dos eventos foram realizada pelo *software* FlowJo (Tree Star, Inc.). Grupo controle n =13; LLC-B n = 21. Valores de *p* estatisticamente significantes são representados por (*) *p*<0,005.

5 DISCUSSÃO

5.1 Considerações iniciais

No início deste projeto tínhamos como objetivo identificar as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ Th1, Th2, Th17 e Treg em diferentes doenças onco-hematológicas (Leucemia Mielóide Aguda, Leucemia Linfocítica Crônica, Linfomas, Mielodisplasia e Mieloma Múltiplo) e correlacionar com os dados clínicos e fatores de prognósticos. No decorrer do projeto nos deparamos com dificuldades como alcançar o número desejável de pacientes em cada caso e abordar os pacientes antes do tratamento, e assim optamos por focar em apenas uma doença, a Leucemia Linfocítica Crônica de células B (LLC-B), que é entre as neoplasias hematológicas, a com maior incidência. Mesmo assim, houve grande dificuldade em obtermos estes 36 casos, visto que um dos critérios de inclusão de pacientes neste estudo era ser livre de tratamento, e as vezes, na suspeita da doença, o paciente já entrava em tratamento. Temos alguns resultados de Mieloma Múltiplo e Mielodisplasia, mas não foram apresentados neste trabalho devido ao número de pacientes muito pequeno para ser confiáveis estatisticamente.

A partir da definição da doença a ser estudada, os indivíduos do grupo controle foram selecionados de acordo com a idade dos pacientes com LLC-B, acima de 45 anos, mas como tínhamos em mãos os resultados de doadores saudáveis do banco de sangue do HIAE com menos de 45 anos, apresentados no início dos resultados, aproveitamos para mostrar os dados de todos os indivíduos (19 a 80 anos) e correlacionar com a idade dos mesmos.

5.2 Compartimento dos linfócitos T CD4⁺ em indivíduos saudáveis

Dados na literatura evidenciam que a interação entre os linfócitos T, B e sinais do microambiente são fatores importantes que controlam a expansão, diferenciação, sobrevivência e função efetora de células B normais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Esses eventos podem ser visualizados também em certas doenças linfoproliferativas crônicas de células B, como é o caso da LLC, e neste caso, qualquer alteração nas células B neoplásicas bem como nas células T normais residuais podem interferir nos processos de expansão, diferenciação e sobrevivência destas células.

Em indivíduos saudáveis, a frequência dos linfócitos T e a relação CD4/CD8 são bem descritos e definidos, pois sabe-se que em condições fisiológicas normais no sangue periférico, os linfócitos T CD4⁺ têm uma frequência de duas a quatro vezes maior que os linfócitos T CD8⁺, o que confere também uma relação CD4/CD8 numericamente entre 1,0 e 5,0 (ZOU, ROLLISON et al. 2009). Neste contexto, nossos achados revelaram que os linfócitos T CD4⁺ dos indivíduos saudáveis realmente correspondem à maior fração entre os linfócitos T do sangue periférico, e a relação CD4/CD8 de todos os indivíduos normais selecionados também esteve aceitável.

Recebemos amostras de indivíduos saudáveis doadores de sangue com idade a partir de 19 anos, realizamos a comparação entre dois grupos, um com menos de 45 anos e outro com mais de 45 anos (idade menor entre os pacientes). Como mostrados nos resultados, não há diferença estatisticamente significativa em relação aos linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e as subpopulações Th1, Th2 e Th17, nestes dois grupos divididos pela idade. Realizamos também um teste de correlação de Spearman (r), com o objetivo de verificar se a idade dos indivíduos correlacionavam com os números destes linfócitos. Podemos observar que todas as correlações foram fracas, sendo menor que 30%. Para as populações de linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺, os valores de referências estão bem estabelecidos e utilizamos como critérios de inclusão no estudo os indivíduos que estavam dentro destes valores. Não foi possível a obtenção do hemograma para todos os indivíduos. Portanto, os resultados mostrados na caracterização do perfil fenotípico do grupo controle foram realizados a partir do número de células mononucleadas do sangue periférico e volume de sangue periférico coletado. Com isto, a frequência obtida na citometria de fluxo foi utilizada para realizar o cálculo do número absoluto de cada subpopulação celular. Os números dos linfócitos totais estão bem próximos dos valores do hemograma e dentro da faixa de valores de referências e de acordo com relatos da literatura. Vários trabalhos mostraram os níveis populacionais dos linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ na população de vários países.

No Brasil, Torres et al. (2013), estabeleceram os valores de referências para as subpopulações de linfócitos T em crianças e adultos (TORRES, ANGELO et al. 2013). Até então, não existiam dados nacionais da variação normal para estes parâmetros em adultos e crianças brasileiras, pois no nosso país eram baseados em dados originados de outros países. Estes autores avaliaram a variação normal encontrada em doadores de sangue de cinco grandes cidades brasileiras em diferentes regiões. Todas as amostras foram processadas por citometria de fluxo e os resultados foram analisados de acordo com a região, gênero e estilo de vida dos doadores. Um

total de 641 adultos (63% homens) e 280 crianças (58% meninos) participaram do estudo. Valores absolutos de CD3+ e CD4+ foram significativamente maiores no gênero feminino (adultos e crianças). Maiores valores de CD4+ em adultos foram associados com tabagismo, enquanto que maiores valores de CD8+ foram encontrados entre crianças do sexo feminino. Adultos das regiões sul e sudeste apresentaram maiores valores absolutos para todas as células T enquanto que adultos da região norte, apresentaram valores menores. Indivíduos residentes no nordeste e centro-oeste obtiveram contagens intermediárias para todas as populações de linfócitos T. Entretanto, estas diferenças entre as regiões não demonstraram significância estatística. No Brasil, gênero e tabagismo foram os principais determinantes para diferenças em valores de referências de linfócitos T (TORRES, ANGELO et al. 2013). De acordo com os nossos dados, o hemograma dos indivíduos saudáveis mostraram que a média do número absoluto dos leucócitos e linfócitos estão aumentados no sexo feminino em relação ao sexo masculino, mas sem significância estatística e estão dentro dos valores de referencia citado por Torres e colaboradores (2013).

5.3 Compartimento dos linfócitos T nos pacientes com LLC-B

Agora, ao analisarmos os pacientes com LLC-B, a frequência relativa dos linfócitos T CD4+ mudaram em relação ao grupo controle. Observamos que houve uma diminuição estatisticamente significativa tanto nos linfócitos T CD4+ ao compararmos com o grupo controle. Porém, quando o número de linfócitos T CD4+ foi corrigido para valor absoluto (células/ul), não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Muitas alterações no compartimento dos linfócitos T em pacientes com LLC-B foram previamente descritas, como aumento anormal do número absoluto de linfócitos T CD4+ e CD8+, inversão da relação CD4/CD8, redução de células T CD4+ circulantes que contrasta com o aumento destas nos linfonodos e medula óssea, diminuição de moléculas coestimuladoras, expressão elevada do receptor de morte FAS, e perfil de produção de receptores de citocinas anormal (TINHOFER, et al. 2009; RICHES, et al. 2010). Neste sentido, somente um paciente, *P16*, apresentou a inversão da relação CD4/CD8, cujo paciente tem o estadiamento Binet B, o qual apresenta características de uma doença mais progressiva em relação a outros pacientes com estadiamento Binet A.

A participação de linfócitos T durante o curso de certas neoplasias hematológicas vem sendo descrita como um mecanismo importante e relacionado a um complexo microambiente de

interações imunológicas que podem ter efeitos pró ou antitumorais, e uma possível participação na fisiopatologia, evolução e prognóstico destas doenças. Dentre as mais descritas com o envolvimento imunológico importante estão a LLC-B, Linfomas não Hodgkin de Células B (LNH-B) e Síndrome Mielodisplásica (SMD). Pelo lado das células B neoplásicas da LLC-B, algumas evidências sugerem que estas células são responsáveis por interferir negativamente na interação entre linfócitos T e B, principalmente por serem consideradas APCs ineficientes, por terem baixa expressão de moléculas coestimuladoras CD80 e CD86, por expressarem CD200, uma glicoproteína transmembrana que age como um potente imunossupressor tanto por regular negativamente a resposta dos linfócitos T CD4⁺ com perfil Th1, como por induzir linfócitos T reguladores e, por produzir ou induzir a produção de citocinas, como IL-10, IL-4 e IL-6 que influenciam muito na patogênese da LLC-B (RICHERS, et al. 2010).

Esses achados falam a favor de que a interação imunológica entre os linfócitos B neoplásicos da LLC-B e linfócitos T CD4⁺ pode acontecer de maneira diferente e refletir possíveis diferenças na ativação dos linfócitos T CD4⁺ dependendo da agressividade da doença, sendo que quanto mais agressiva, maior a ativação com consequente aumento das células T CD4⁺ com fenótipo de memória.

De acordo com a literatura, a progressão da doença LLC-B está associada com imunodeficiência secundária e com um aumento do risco de infecções (FREEDMAN e NADLER, 1990), que pode estar relacionado à alterações em subconjuntos de células T e produção de citocinas (GALE, et al. 1994). As células B leucêmicas são influenciadas por citocinas produzidas pelas células T, tais como IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-15, TNF- α , TGF- β , IFN- γ . E assim, mudanças na rede de citocinas entre células malignas e linfócitos T residuais poderia sustentar a expansão do clone de células B leucêmicas. De fato, as redes de citocinas alteradas nestes pacientes podem modular a proliferação celular e apoptose (GALLEGO, et al. 2003). Algumas citocinas têm sido descritas como capazes de influenciar a vida útil das células LLC-B *in vivo*, tanto por meio da indução de proliferação como pela proteção contra apoptose (MAINOU-FOWLER, et al. 1995). TNF- α promove a proliferação destas células leucêmicas e acredita-se desempenhar um papel na progressão do tumor, bem como IFN- γ pode ter um papel anti-apoptótico em linfócitos B da LLC e ser responsável pelo acúmulo destas células no microambiente da medula óssea e eventualmente favorecendo a progressão da doença nos pacientes com LLC-B (BUSCHLE, et al. 1993; MAINOU-FOWLER, et al. 1995; LAGNEAUX, et al. 1998).

IFN- γ é produzida principalmente por linfócitos ativados, particularmente Th1 e pelas células NK. Praticamente todos os tipos de células expressam seu receptor, exercendo múltiplos efeitos biológicos. Aumento na produção de IFN- γ está associada com imunidade mediada por células na defesa contra patógenos intracelulares e doenças autoimunes conectadas com hipersensibilidade do tipo tardia (BILLIAU, *et al.* 2001). Os resultados apresentados neste estudo mostraram que de fato existe um aumento na expressão da citocina inflamatória IFN- γ na maioria dos pacientes em estudo e que esta pode estar envolvida com a patogênese da doença. Outras citocinas com perfil Th1 analisadas em sobrenadantes de PBMC após receber o estímulo com PMA e ionomicina, foram analisadas por citometria de fluxo através da técnica CBA (*Cytometric Bead Array - Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit*), mostrando mais uma vez o aumento significativo de IFN- γ além de TNF- α e IL-2.

Um dos efeito anti-tumoral dos linfócitos TCD4⁺ se dá através da atividade das citocinas IFN- γ e TNF- α (FRANSEN, *et al.* 1986; QIN e BLANKENSTEIN, 2000; CORTHAY, *et al.* 2005). IFN- γ pode regular positivamente moléculas de MHC e aumentar o número de complexos MHC-II/peptídeo das mesmas, assim como pode alterar a maquinaria de processamento antigênico, resultando em maior apresentação de antígenos e maior número de lise celular (DIGHE, *et al.* 1994). O TNF- α age juntamente com o IFN- γ causando dormência nas células tumorais prevenindo o possível mecanismo de escape do tumor, portanto, na ausência dessas duas citocinas pode haver uma maior progressão tumoral e transformação maligna. A ação combinada dessas duas citocinas pode ainda induzir células dendríticas (DCs) a produzirem quimiocinas anti-angiogênicas, como CXCL10 e CXCL9, na tentativa de impedir o crescimento tumoral (COUGHLIN, *et al.* 1998; MULLER-HERMELINK, *et al.* 2008).

Para as citocinas com perfil Th2, a citocina IL-4 não apresentou diferença estatisticamente significativa tanto nos resultados realizado por marcação intracitoplasmática dos linfócitos T CD4⁺ como pelas análises realizadas a partir do sobrenadante de PBMC por CBA. Já a citocina IL-6 mostrou maior abundância no sobrenadantes das células dos pacientes após o estímulo com PMA e ionomicina.

Podhorecka e colaboradores, em 2002, relataram que os pacientes com LLC-B indolente (progressão lenta), apresentaram um predomínio da subpopulação Th1. Em contraste, as células T CD4⁺ dos pacientes com a doença mais progressiva apresentaram predominantemente a subpopulação Th2 (PODHORECKA, *et al.* 2002). O impacto dos subtipos Th1 e Th2 na regulação

da imunidade tumoral ainda não está clara, mas uma mudança de Th1 para um padrão de citocinas tipo 2 tem sido descrita em vários tumores em animais e humanos. Esta mudança pode contribuir para a capacidade de células cancerígenas para escapar vigilância imunológica. As manifestações clínicas evidentes da disfunção imune em pacientes com LLC-B tomados em conjunto com o aumento no número de células T circulantes levou à hipótese que as células T estão envolvidos na fisiopatologia desta leucemia. Embora o nosso grupo de pacientes com LLC-B apresentem a forma indolente da doença através da classificação Binet A, nossos resultados corroboram os dados de Podhorecka et al. (2002), na qual existe uma predominância dos linfócitos T CD4+ com perfil Th1 nestes pacientes.

Sabe-se que a evolução clínica da LLC-B é extremamente variável, com tempo de sobrevivência de meses a décadas, visto que em alguns casos a doença tem um curso indolente, e os pacientes eventualmente morrem devido a causas não relacionadas com a doença, e em outros casos tem um curso clínico mais agressivo. Também existe uma estimativa que cerca de 50% dos pacientes que se apresentarem com estadio inicial da doença irão evoluir agressivamente, com rápida progressão e morte prematura pela LLC-B, sendo assim, de grande importância a busca de novos fatores de prognóstico contribuindo na identificação de pacientes com estágio clínico não avançado, mas com alto risco de rápida progressão da doença. Com esta finalidade, verificamos em nossos resultados a existência de uma correlação das citocinas com perfil Th1, Th2 e Th17 com o tempo da doença, uma vez que é notória a evolução da doença no decorrer do tempo. O que podemos observar foi uma correlação negativa, embora fraca, no número de células Th1, ou seja, com o tempo da doença esta subpopulação de linfócitos T CD4+ diminui. Em relação ao perfil Th2, observamos uma correlação fraca, mas positiva, sugerindo que esta população poderá aumentar com o decorrer do tempo da doença.

O papel do sistema imunológico no desenvolvimento do câncer é sem dúvida de suma importância, embora ainda não completamente entendido. Recentemente, novas descobertas a respeito das subpopulações de linfócitos T CD4+ com fenótipos reguladores (Treg) e Th17 têm tido grande avanço no entendimento de suas funções na imunidade tumoral. Neste sentido, vários trabalhos mostraram a presença destas subpopulações e suas relevância na patofisiologia em uma variedade de tumores (JAIN, et al. 2012) tanto sólidos (KRYCZEK, et al. 2009; MARUYAMA, et al. 2010; ZHOU, SHA et al. 2010; WANG, et al. 2011) como em neoplasias hematológicas (KORDASTI, et al. 2009; WU, et al. 2009b).

Relatos na literatura indicam a possibilidade das células Th17 funcionarem de acordo com a causa do câncer, tipo e localização, bem como o estágio da doença, uma vez que evidências sugerem que estas células podem induzir inflamação e promover a iniciação do crescimento inicial de alguns tumores (ZOU e RESTIFO, 2010; WILKE, KRYCZEK *et al.*, 2011). Recentemente evidenciou-se que o aumento significativo das células Th17 nos pacientes em estágios clínicos iniciais da LLC, em comparação com os estágios mais avançados pode ser um dos mecanismos do sistema imunológico responsável pela proteção contra a proliferação de clones leucêmicos, o que permite manter o controle em estágios clínicos precoces (HUS, et al. 2013). Podemos dizer a este respeito que também observamos um aumento significativo da citocina IL-17 no sobrenadante das células mononucleadas do sangue periférico dos pacientes com LLC-B, apesar de não evidenciar este resultado através da marcação intracitoplasmática dos linfócitos T CD4+.

Em relação aos linfócitos T reguladores, observamos um aumento na frequência relativa nos pacientes em relação ao grupo controle, mas quanto ao número absoluto destas células, não podemos verificar tal diferença. Alguns trabalhos relatam a importância destas células nos tumores sólidos e em neoplasias hematológicas, principalmente em casos mais avançados da doença. Especificamente nas LLC-B dados mostraram o aumento significativo de acordo com a progressão dos estágios clínicos desta neoplasia hematológica (GIANNOPOULOS, et al. 2008; LINDQVIST, et al. 2011).

Hus et al., (2013) sugeriram que a progressão da LLC está associada a baixos níveis de Th17 e expansão das células Treg. Relações adversas entre Th17 e Treg foram descritos no microambiente de tumores sólidos, tais como câncer da mama e gástrico (HUS, et al. 2013). Em estágios clínicos iniciais, a porcentagem de células Th17 foi significativamente maior em comparação com a doença avançada, ao contrario, os linfócitos T reguladores acumularam de acordo com a progressão da doença (MARUYAMA, et al. 2010; WANG, et al. 2011). Ambas as populações parecem exercer efeitos reversíveis na imunidade tumoral, de forma análoga à inflamação autoimune, em que as células Th17 e Treg desempenham papéis críticos e os seus mecanismos de ação são opostas uma à outra (DE JONG, et al. 2010).

O sistema de classificação de estágio clínico desenvolvido por Binet et al.(1981) e Rai et al.(1987) tem sido usado por décadas para avaliar prognóstico e tratamentos dos pacientes. No entanto, este sistema não distingue entre o estágio estável e progressivo da doença, e assim marcadores de prognósticos tem sido investigados e detectados nos últimos anos (BINET, 1981b;

RAI e MONTSEERRAT, 1987). Entre os mais importantes avanços no entendimento da LLC-B está a identificação de fatores de prognósticos na qual, entre eles destaca-se a expressão de ZAP-70 e CD38. Os linfócitos B de indivíduos normais, normalmente não expressam ZAP-70. Essas células utilizam outra proteína da família tirosina quinase, a SYK, para a ativação do linfócito B pelo complexo BCR. As proteínas ZAP-70 e SYK tem papéis semelhantes na sinalização do receptor de antígeno na membrana celular, entretanto, o significado funcional da expressão de ZAP-70 nas células B na LLC-B ainda não é bem conhecido. Portanto, acredita-se que a expressão de ZAP-70 está associada com o aumento da sinalização pelo aumento de BCR e pode estar associado ao curso clínico mais agressivo da doença (CHEN, et al. 2002).

Entre os 35 pacientes com LLC-B estudados neste trabalho, somente quatro apresentaram a expressão acima de 20% indicando positividade de agressividade da doença em relação a expressão de ZAP-70. Os quatro pacientes (*P1*, *P7*, *P26* e *P33*) com fator de prognóstico ruim não apresentaram correlação com aumento ou diminuição nas subpopulações de linfócitos T CD4+ analisados por citometria de fluxo e nem com as citocinas verificadas no sobrenadante de PBMC por CBA.

A nossa compreensão em relação aos aspectos biológicos e a heterogeneidade clínica na LLC-B ainda permanece obscura. A patogênese desta doença é complexa e parece ser explicado pelas características intrínsecas das células B leucêmicas, assim como, pelo meio ambiente fornecido pelas células do sistema imunológico.

O entendimento dos mecanismos biológicos para identificar a probabilidade de progressão da doença nestes pacientes permanece pouco clara. No entanto, a expressão ZAP-70 é postulada por modular a ativação da sinalização do receptor da célula B (BCR) e subsequentemente, os efeitos nas interações celulares da LLC-B com o microambiente celular e antigênico (EFREMOV, et al. 2007; GOBESSI, et al. 2007). A expressão de ZAP-70 e a estimulação do BCR têm sido associados com ativação na via de sinalização de Akt e ERK, necessárias para a indução de várias proteínas anti-apoptóticas incluindo Mcl-1, Bcl-xL, e de XIAP, e assim, fornecendo mecanismo de sobrevivência para as células leucêmicas (CHEN, et al. 2005; GOBESSI, et al. 2007).

Há muitos anos foi descrito na literatura que pacientes com ZAP-70 positivo apresentavam disfunção no compartimento dos linfócitos T CD8+, defeito na atividade lítica da função citotóxica e alteração na produção de citocinas (REYES, et al. 1998). O nosso grupo de pesquisa recentemente, mostrou que existe uma associação entre a expressão de ZAP-70 e aumento da

subpopulação de linfócitos T CD4+ de memória (CORREIA, 2012). Outro trabalho publicado no início deste ano, mostra que a expressão de ZAP-70 nos linfócitos B da LLC está associada a diferentes padrões de distribuição das subpopulações de linfócitos T CD4+, como aumento dos linfócitos T CD4+ naïve e TEM (*efector memory*) em pacientes com estágio inicial não tratados (MONSERRAT, et al. 2014).

De acordo com a literatura, a produção das citocinas IL-4, IL-10, TNF- α pelos linfócitos T CD4+ em pacientes com expressão aumentada de ZAP-70, pode favorecer o crescimento e sobrevivência das células leucêmicas da LLC-B. Em contraste, o perfil Th1 através da produção das citocinas IFN- γ e IL-2 em pacientes ZAP-70 negativo pode promover uma resposta antitumoral pelos linfócitos T CD8 citotóxico e células NK (MONSERRAT, et al. 2014).

5.4 Expressão de FAS e FASL nos linfócitos T CD4+

Durante o desenvolvimento, os linfócitos estão destinados a morrer, mas podem ser resgatados através da sinalização desencadeada pelos chamados “receptores de antígenos”, os quais são produzidos através de rearranjos gênicos. Assim, células contendo receptores capazes de reconhecer antígenos próprios com alta afinidade são eliminadas por apoptose em uma tentativa de gerar tolerância e prevenir o desenvolvimento de autoimunidades, protegendo o organismo de um ataque inapropriado. Linfócitos maduros são ainda submetidos a morte apoptótica após uma resposta imune normal, durante a qual há uma expansão de clones específicos de linfócitos, a fim de manter a homeostasia, regulando linfócitos ativados. Foi pensando nesta homeostasia dos linfócitos T que investigamos o receptor de morte (*DR death receptors*) FAS e seu ligante FASL envolvidos na via extrínseca de morte celular.

Investigamos 13 indivíduos saudáveis que apresentaram um grupo homogêneo quanto a expressão de FAS e FASL. Após a ativação dos linfócitos T com PMA e ionomicina, em média, a frequência da expressão de FAS nos linfócitos T CD4+ foi de 56% e a expressão de FASL foi de 10%. Já o grupo de 21 pacientes com LLC-B não apresentaram diferença estatisticamente significativa tanto da frequência relativa, quanto no número absolutos dos linfócitos T CD4+ com expressão de FAS. Estudos anteriores tem mostrado que em linfócitos T CD4+ e CD8+ há um aumento pronunciado de FAS em pacientes com LLC-B em comparação com indivíduos controles,

e este aumento está associado com sensibilidade a apoptose dos linfócitos T CD4⁺ (TINHOFER, et al. 2009).

Em relação a expressão de FASL nos linfócitos T CD4⁺, verificamos que existe um aumento na frequência relativa e no número absoluto nos pacientes com LLC-B em comparação com o grupo controle. Podemos sugerir que o aumento na expressão de FASL nos linfócitos T CD4⁺ dos pacientes com LLC-B pode ser um dos mecanismos do sistema imune no combate às células B tumoral através da apoptose via FAS/FASL. Apesar da aparente característica de longevidade dos linfócitos B malignos na LLC, estas células frequentemente sofrem apoptose espontânea logo após estarem isoladas *in vitro*. Isto implica em alguns fatores extrínsecos *in vivo* que são essenciais para a sobrevivência e resistência à apoptose e que não somente as suas peculiaridade intrínseca à malignidade das células leucêmicas B (CHIORAZZI, et al. 2005; PLANDER, et al. 2011). Cada vez mais há a necessidade de novas descobertas no entendimento do microambiente que compõe as células malignas e assim, buscando novos alvos e abordagens para a terapia tumoral.

Kiaii et al. (2013) mostraram evidências de que células T de pacientes com LLC suportam a sobrevivência e impedem a indução da apoptose das células B leucêmicas *in vitro* e o efeito dos linfócitos T parecem ser mediado através de fatores solúveis, bem como o contato célula-célula (KIAII, et al. 2006). Outros trabalhos também descrevem que linfócitos T CD4⁺ isolados impede a apoptose dos linfócitos B na LLC (TINHOFER, et al. 2009). Romano et. al., em 2005 relataram que IFN- γ modula a expressão de FAS em linfócitos B da LLC-B, na qual estas células na presença de linfócitos T ativados com aumento na expressão de IFN- γ tem aumento na expressão de FAS. No momento em que foi adicionado anti-IFN- γ neutralizando sua ação observou-se uma diminuição significativa na expressão de FAS nos linfócitos B (ROMANO, et al. 2005). IFN- γ é uma das principais citocinas efetoras da imunidade mediada por células e outros estudos sugerem que IFN- γ também desempenha um papel no controle homeostático de células T (REFAELI, et al. 2002).

As células B neoplásicas da LLC-B estão envolvidas em vários processos de evasão e supressão do sistema imune, que além de fazer parte do desenvolvimento da doença, são processos necessários para que a LLC se torne um tumor com massa clinicamente detectável. Todo esse ambiente supressor acaba interferindo negativamente na interação supracitada, principalmente por modular negativamente as respostas dos linfócitos T antitumorais. Dessa forma, conhecer os

mecanismos já descritos e investigar novos mecanismos pode gerar conhecimento suficiente e aplicável a novas ferramentas diagnósticas e terapêuticas.

6 CONCLUSÃO

Nos pacientes com LLC-B com estadiamento Binet A, existe uma maior distribuição dos linfócitos T CD4+ com perfil Th1 em comparação com o grupo controle do estudo.

Resumos dos achados:

- Não existe diferença significativa na distribuição das subpopulações de linfócitos T CD4+ em relação à idade seja no grupo controle ou nos pacientes estudados.
- Os dados obtidos em relação a distribuição das subpopulações de linfócitos T CD4+ não demonstraram correlação com os fatores de prognósticos ruins, tais como, ZAP-70 e CD38.
- A expressão de FASL nos linfócitos T CD4+ está aumentada nos pacientes em comparação com o grupo de indivíduos saudáveis.
- As citocinas com perfil Th1, IFN- γ , TNF- α e IL-2, estão aumentadas nos pacientes com LLC-B.

REFERÊNCIAS*

- ADAM-KLAGES, S. et al. Death receptors and caspases: role in lymphocyte proliferation, cell death, and autoimmunity. **Immunol. Res.**, v. 33, n. 2, p. 149-166, 2005.
- AFKARIAN, M. et al. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. **Nature Immunology**, v. 3, n. 6, p. 549-557, 2002.
- AKIRA, S. et al. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006.
- AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz J Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 9, p. 1053-1061, 1999.
- ASHWELL, J. D. et al. Cell growth cycle block of T cell hybridomas upon activation with antigen. **J. Exp. Med.**, v. 165, n. 1, p. 173-194, 1987.
- BARNHART, B. C. et al. The death effector domain protein family. **Oncogene**, v. 22, n. 53, p. 8634-8644, 2003.
- BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235-238, 2006.
- BILLIAU, A. D. et al. The graft-versus-leukemia effect in allogeneic irradiation bone marrow chimeras: possible suppressive role of irradiation-induced TGF-beta. **Transplant Proc.**, v. 33, n. 1-2, p. 336-337, 2001.
- BINET, J. L. [New data on the prognosis of chronic lymphoid leukemia ; anatomo-clinical classification]. **Acquisitions Medicales Recentes**, v. 198, p. 191-200, 1981a.
- _____. [New data on the prognosis of chronic lymphoid leukemia ; anatomo-clinical classification]. **Acquis. Med. Recent.**, v. 198, p. 191-200, 1981b.
- BOEHM, U. et al. Cellular responses to interferon-gamma. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 749-795, 1997.
- BRUNNER, T. et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. **Nature**, v. 373, n. 6513, p. 441-444, 1995.
- BUDD, R. C. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. **J. Clin. Invest.**, v. 109, n. 4, p. 437-441, 2002.
- BUSCHLE, M. et al. Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. **J. Exp. Med.**, v. 177, n. 1, p. 213-218, 1993.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CALLERY, R. T. et al. Functional abnormalities associated with T lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 17, n. 3, p. 451-458, 1980.

CATOVSKY, D. et al. Clinical significance of T-cells in chronic lymphocytic leukaemia. **Lancet.**, v. 2, n. 7883, p. 751-752, 1974.

CERUTTI, A. et al. Dysregulation of CD30+ T cells by leukemia impairs isotype switching in normal B cells. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 2, p. 150-156, 2001.

CHEN, L. et al. CD95 promotes tumour growth. **Nature**, v. 465, n. 7297, p. 492-496, 2010.

_____. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 100, p. 4609-4614, 2002.

CHEN, W. et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 12, p. 1875-1886, 2003a.

_____. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **J. Exp. Med.**, v. 198, n. 12, p. 1875-1886, 2003b.

CHEN, Z. et al. Loss of Zap-70 and low molecular weight phosphotyrosine phosphatase occurs after therapy in a patient with B-chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, v. 19, n. 8, p. 1503-1505, 2005.

CHESON, B. D. et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. **Blood**, v. 87, n. 12, p. 4990-4997, 1996.

CHINNAIYAN, A. M. et al. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. **Cell**, v. 81, n. 4, p. 505-512, 1995.

CHIORAZZI, N. et al. Chronic lymphocytic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 8, p. 804-815, 2005.

CORREIA, R. P. **Estudo da distribuição de células T naive e subtipos de células T de memória em neoplasias hematológicas.** 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CORREIA, R. P. et al. Involvement of memory T-cells in the pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 36, n. 1, p. 60-64, 2014.

CORTHAY, A. et al. Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. **Immunity**, v. 22, n. 3, p. 371-383, 2005.

COUGHLIN, C. M. et al. Tumor cell responses to IFN γ affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. **Immunity**, v. 9, n. 1, p. 25-34, 1998.

CURIEL, T. J. et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nat. Med.**, v. 10, n. 9, p. 942-949, 2004.

D'ARENA, G. et al. CD38 expression correlates with adverse biological features and predicts poor clinical outcome in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 42, n. 1-2, p. 109-114, 2001.

DAMLE, R. N. et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 94, n. 6, p. 1840-1847, 1999.

DANCESCU, M. et al. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. **J. Exp. Med.**, v. 176, n. 5, 1, p. 1319-1326, 1992.

DE JONG, E. et al. Translational mini-review series on Th17 cells: development of mouse and human T helper 17 cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 159, n. 2, p. 148-158, 2010.

DEL PRETE, G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. **Allergy**, v. 47, n. 5, p. 450-455, 1992.

DHEIN, J. et al. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). **Nature**, v. 373, n. 6513, p. 438-441, 1995.

DIEHL, S. et al. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. **Immunity**, v. 13, n. 6, p. 805-815, 2000.

DIEHL, S.; RINCON, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Molecular immunology**, v. 39, n. 9, p. 531-536, 2002.

DIGHE, A. S. et al. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors. **Immunity**, v. 1, n. 6, p. 447-456, 1994.

DJURDJEVIC, P. et al. Role of decreased production of interleukin-10 and interferon- γ in spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia lymphocytes in vitro. **Archives of Medical Research**, v. 40, n. 5, p. 357-363, 2009.

DURIG, J. et al. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. **Leukemia**, v. 16, n. 1, p. 30-35, 2002.

EFREMOV, D. G. et al. Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, n. 2, p. 102-108, 2007.

ENARI, M. et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 43-50, 1998.

- FAYAD, L. et al. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. **Blood**, v. 97, n. 1, p. 256-263, 2001.
- FERRARINI, M.; CHIORAZZI, N. Recent advances in the molecular biology and immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. **Semin. Hematol.**, v. 41, n. 3, p. 207-223, 2004.
- FLUCKIGER, A. C. et al. Interleukin 10 induces apoptotic cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 1, p. 91-99, 1994.
- FRANSEN, L. et al. Recombinant tumor necrosis factor: species specificity for a variety of human and murine transformed cell lines. **Cellular Immunology**, v. 100, n. 1, p. 260-267, 1986.
- FREEDMAN, A. S.; NADLER, L. M. The relationship of chronic lymphocytic leukemia to normal activated B cells. **Leuk. Lymphoma**, v. 1, n. 5-6, p. 293-300, 1990.
- GALE, R. P. et al. Recent progress in chronic lymphocytic leukemia. International Workshop on chronic Lymphocytic Leukemia. **Leukemia**, v. 8, n. 9, p. 1610-1614, 1994.
- GALLEGO, A. et al. Production of intracellular IL-2, TNF-alpha, and IFN-gamma by T cells in B-CLL. **Cytometry B Clin. Cytom.**, v. 56, n. 1, p. 23-29, 2003.
- GATTINONI, L. et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 6, p. 1616-1626, 2005.
- GEISLER, C. et al. The bone marrow histological pattern has independent prognostic value in early stage chronic lymphocytic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 62, n. 1, p. 47-54, 1986.
- GERLINGER, M. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. **N. Engl. J. Med.**, v. 366, n. 10, p. 883-892, 2012.
- GHORESCHI, K. et al. T helper 17 cell heterogeneity and pathogenicity in autoimmune disease. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 9, p. 395-401, 2011.
- GIANNOPOULOS, K. et al. Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Oncology Reports**, v. 20, n. 3, p. 677-682, 2008.
- GLIMCHER, L. H.; MURPHY, K. M. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. **Genes & Development**, v. 14, n. 14, p. 1693-1711, 2000.
- GOBESSI, S. et al. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2032-2039, 2007.
- GODDARD, R. V. et al. Generation in vitro of B-cell chronic lymphocytic leukaemia-proliferative and specific HLA class-II-restricted cytotoxic T-cell responses using autologous dendritic cells pulsed with tumour cell lysate. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 126, n. 1, p. 16-28, 2001.

- HAMBLIN, T. Chronic lymphocytic leukaemia: one disease or two? **Ann. Hematol.**, v. 81, n. 6, p. 299-303, 2002.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.
- HERRMANN, F. et al. Imbalance of T cell subpopulations in patients with chronic lymphocytic leukaemia of the B cell type. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 49, n. 1, p. 157-162, 1982.
- HOFBAUER, J. P. et al. Development of CLL in the TCL1 transgenic mouse model is associated with severe skewing of the T-cell compartment homologous to human CLL. **Leukemia**, v. 25, n. 9, p. 1452-1458, 2011.
- HORIUCHI, S. et al. Genome-wide analysis reveals unique regulation of transcription of Th2-specific genes by GATA3. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 11, p. 6378-6389, 2011.
- HUS, I. et al. Th17/IL-17A might play a protective role in chronic lymphocytic leukemia immunity. **PloS One**, v. 8, n. 11, p.e78091, 2013.
- IRMLER, M. et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. **Nature**, v. 388, n. 6638, p. 190-195, 1997.
- ITOH, N.; NAGATA, S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 15, p. 10932-10937, 1993.
- IVANOV, II, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121-1133, 2006.
- IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 5, n. 10, p. 987-995, 2004.
- JAIN, P. et al. Th17 and non-Th17 interleukin-17-expressing cells in chronic lymphocytic leukemia: delineation, distribution, and clinical relevance. **Haematologica**, v. 97, n. 4, p. 599-607, 2012.
- KAUFMANN, S. H. et al. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. **Cancer Res.**, v. 53, n. 17, p. 3976-3985, 1993.
- KAY, N. E. et al. T-cell subpopulations in chronic lymphocytic leukemia: abnormalities in distribution and in in vitro receptor maturation. **Blood**, v. 54, n. 2, p. 540-4, 1979.
- KIAI, S. et al. Signaling molecules and cytokine production in T cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: long-term effects of fludarabine and alemtuzumab treatment. **Leukemia & Lymphoma**, v. 47, n. 7, p. 1229-1238, 2006.
- KIMBY, E. et al. Differences in blood T and NK cell populations between chronic lymphocytic leukemia of B cell type (B-CLL) and monoclonal B-lymphocytosis of undetermined significance (B-MLUS). **Leukemia**, v. 3, n. 7, p. 501-504, 1989.

KISCHKEL, F. C. et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **Embo J.**, v.14, n.22, p. 5579-5588, 1995.

KITABAYASHI, A. et al. The role of interleukin-10 (IL-10) in chronic B-lymphocytic leukemia: IL-10 prevents leukemic cells from apoptotic cell death. **International Journal of Hematology**, v. 62, n. 2, p.99-106, 1995.

KOHU, K. et al. The Runx3 transcription factor augments Th1 and down-modulates Th2 phenotypes by interacting with and attenuating GATA3. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 12, p.7817-24, 2009.

KORDASTI, S. Y. et al. IL-17-producing CD4(+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome. **British Journal of Haematology**, v. 145, n. 1, p. 64-72, 2009.

KRYCZEK, I. et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. **Blood**, v. 114, n. 6, p. 1141-1149, 2009.

LAGNEAUX, L. et al. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. **Blood**, v. 91, n. 7, p. 2387-2396, 1998.

LAZAREVIC, V. et al. T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR-gammat. **Nature Immunology**, v. 12, n. 1, p. 96-104, 2011.

LIGHVANI, A. A. et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 26, p. 15137-15142, 2001.

LINDQVIST, C. A. et al. Both CD4⁺ FoxP3⁺ and CD4⁺ FoxP3⁻ T cells from patients with B-cell malignancy express cytolytic markers and kill autologous leukaemic B cells in vitro. **Immunology**, v. 133, n. 3, p. 296-306, 2011.

MAINOU-FOWLER, T. et al. Effect of interleukins on the proliferation and survival of B cell chronic lymphocytic leukaemia cells. **J. Clin. Pathol.**, v. 48, n. 5, p. 482-487, 1995.

MARGALIT, O. et al. Microarray-based gene expression profiling of hematologic malignancies: basic concepts and clinical applications. **Blood Rev.**, v. 19, n. 4, p. 223-234, 2005.

MARUYAMA, T. et al. Distribution of Th17 cells and FoxP3(+) regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. **Cancer Science**, v. 101, n. 9, p. 1947-1954, 2010.

MONSERRAT, J. et al. Distinctive patterns of naive/memory subset distribution and cytokine expression in CD4 T lymphocytes in ZAP-70 B-chronic lymphocytic patients. **Cytometry. Part B, Clinical cytometry**, v. 86, n. 1, p. 32-43, 2014.

MULLER-HERMELINK, H. K. et al. Pathology of lymphoma progression. **Histopathology**, v. 38, n. 4, p. 285-306, 2001.

MULLER-HERMELINK, N. et al. TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. **Cancer Cell**, v. 13, n. 6, p. 507-518, 2008.

MURRAY, H. W. et al. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 134, n. 3, p. 1982-1988, 1985.

MUZIO, M. et al. An induced proximity model for caspase-8 activation. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 5, p. 2926-2930, 1998.

NAYLOR, M.; CAPRA, J. D. Mutational status of Ig V(H) genes provides clinically valuable information in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 94, n. 6, p. 1837-1839, 1999.

OLIVEIRA, G. B. et al. Spontaneous apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and its relationship to clinical and cell kinetic parameters. **Cytometry**, v. 46, n. 6, p. 329-335, 2001.

PANAYIOTIDIS, P. et al. Interleukin-4 inhibits apoptotic cell death and loss of the bcl-2 protein in B-chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. **Br. J. Haematol.**, v. 85, n. 3, p. 439-445, 1993.

PLANDER, M. et al. Chronic lymphocytic leukemia cells induce anti-apoptotic effects of bone marrow stroma. **Annals of Hematology**, v. 90, n. 12, p. 1381-1390, 2011.

PODHORECKA, M. et al. Intracellular IFN-gamma expression by CD3+/CD8+ cell subset in B-CLL patients correlates with stage of the disease. **Eur. J. Haematol.**, v. 73, n. 1, p. 29-35, 2004.

_____. T type 1/type 2 subsets balance in B-cell chronic lymphocytic leukemia--the three-color flow cytometry analysis. **Leukemia Research**, v. 26, n. 7, p. 657-660, 2002.

PRABHALA, R. H. et al. Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma. **Blood**, v. 115, n. 26, p. 5385-5392. 2010.

QIN, Z.; BLANKENSTEIN, T. CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. **Immunity**, v. 12, n. 6, p. 677-686, 2000.

RAI, K. R.; MONTSERRAT, E. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. **Semin Hematol.**, v. 24, n. 4, p. 252-256, 1987.

RAI, K. R. et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 46, n. 2, p. 219-234, 1975.

RAMSDELL, F. et al. Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. **Int. Immunol.**, v. 6, n. 10, p. 1545-1553, 1994.

REFAELI, Y. et al. Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 196, n. 7, p. 999-1005, 2002.

REITTIE, J. E. et al. Interleukin-6 inhibits apoptosis and tumour necrosis factor induced proliferation of B-chronic lymphocytic leukaemia. **Leuk. Lymphoma**, v. 22, n. 1-2, p. 83-90, follow 186, color plate VI, 1996.

REYES, E., et al. Altered pattern of cytokine production by peripheral blood CD2+ cells from B chronic lymphocytic leukemia patients. **American journal of hematology**, v. 57, n. 2, p. 93-100, 1998.

RICHES, J. C. et al. T-cell function in chronic lymphocytic leukaemia. **Semin. Cancer. Biol.**, v. 20, n. 6, p. 431-438, 2010.

ROBEY, E.; ALLISON, J. P. T-cell activation: integration of signals from the antigen receptor and costimulatory molecules. **Immunol Today**, v. 16, n. 7, p. 306-310, 1995.

ROMANO, C. et al. Induction of CD95 upregulation does not render chronic lymphocytic leukemia B-cells susceptible to CD95-mediated apoptosis. **Immunol. Lett.**, v. 97, n. 1, p. 131-139, 2005.

ROSENWALD, A. et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. **J. Exp. Med.**, v. 194, n. 11, p. 1639-1647, 2001.

RUSSELL, J. H. et al. Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 88, n. 6, p. 2151-2155, 1991.

SANTOS, F. L. et al. [Hematological features and expression profile of myeloid antigens of acute promyelocytic leukemia patients: analysis of prognostic factors for development of the retinoic acid syndrome]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 50, n. 3, p. 286-292, 2004.

SOKOL, C. L. et al. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. **Nature Immunology**, v. 10, n. 7, p. 713-720, 2009.

STAUDT, V. et al. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. **Immunity**, v. 33, n. 2, p. 192-202, 2010.

STEINKE, J. W.; BORISH, L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. **Respiratory Research**, v. 2, n. 2, p. 66-70, 2001.

STEINMAN, R. M. et al. Tolerogenic dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 685-711, 2003.

TANGYE, S. G. et al. Interleukin-10 inhibits the in vitro proliferation of human activated leukemic CD5+ B-cells. **Leukemia & Lymphoma**, v. 31, n. 1-2, p. 121-30, 1998.

THIEU, V. T. et al. Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. **Immunity**, v. 29, n. 5, p. 679-690, 2008.

TINHOFFER, I. et al. Difference in the relative distribution of CD4+ T-cell subsets in B-CLL with mutated and unmutated immunoglobulin (Ig) VH genes: implication for the course of disease. **J Immunother**, v. 32, n. 3, p. 302-309, 2009.

TORRES, A. J. et al. Establishing the reference range for T lymphocytes subpopulations in adults and children from Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 55, n. 5, p. 323-328, 2013.

TOTTERMAN, T. H. et al. T-cell activation and subset patterns are altered in B-CLL and correlate with the stage of the disease. **Blood**, v. 74, n. 2, p. 786-792, 1989.

TRINCHIERI, G. et al. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. **Immunity**, v. 19, n. 5, p. 641-644, 2003.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. Nature reviews. **Immunology**, v. 7, n. 3, p. 179-90, 2007.

VELDHOEN, M. et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v. 24, n. 2, p. 179-189, 2006.

_____. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. **Nature Immunology**, v. 9, n. 12, p. 1341-1346, 2008.

VOLPE, E. et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. **Nature Immunology**, v. 9, n. 6, p. 650-657, 2008.

WANG, J. et al. Skewing the balance of regulatory T-cells and T-helper 17 cells in breast cancer patients. **The Journal of International Medical Research**, v. 39, n. 3, p. 691-701, 2011.

WILKE, C. M. et al. Th17 cells in cancer: help or hindrance? **Carcinogenesis**, v. 32, n. 5, p. 643-649, 2011.

WOO, E. Y. et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. **Cancer Res.**, v. 61, n. 12, p. 4766-4772, 2001.

WU, C. et al. Increased frequencies of T helper type 17 cells in the peripheral blood of patients with acute myeloid leukaemia. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 158, n. 2, p. 199-204, 2009a.

_____. Increased frequencies of T helper type 17 cells in the peripheral blood of patients with acute myeloid leukaemia. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 158, n. 2, p. 199-204, 2009b.

YAGI, H. et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. **International Immunology**, v. 16, n. 11, p. 1643-1656, 2004.

YANG, J. et al. Antigen activation and impaired Fas-induced death-inducing signaling complex formation in T-large-granular lymphocyte leukemia. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1610-1616, 2008.

YOSHIMURA, A.; MUTO, G. TGF-beta function in immune suppression. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 350, p. 127-147, 2011.

YU, J. W.; SHI, Y. FLIP and the death effector domain family. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6216-6227, 2008.

ZHANG, Y. et al. Th17 cells undergo Fas-mediated activation-induced cell death independent of IFN-gamma. **J. Immunol.**, v. 181, n. 1, p. 190-196, 2008.

ZHANG, Z. et al. Interleukin-17 enhances the production of interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha by bone marrow T lymphocytes from patients with lower risk myelodysplastic syndromes. **Eur. J. Haematol.**, v. 90, n. 5, p. 375-384, 2013.

ZHENG, M. H. et al. [CD4+CD25+Treg cell and its function in liver diseases: a review]. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi**, v. 15, n. 3, p. 238-240, 2007.

ZHOU, L. et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. **Nature**, v. 453, n. 7192, p. 236-240, 2008.

ZHOU, P. et al. The role of T-helper 17 (Th17) cells in patients with medulloblastoma. **The Journal of international medical research**, v. 38, n. 2, p. 611-619, 2010.

ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1557-1569, 2008.

ZOU, J. X. et al. Altered naive and memory CD4+ T-cell homeostasis and immunosenescence characterize younger patients with myelodysplastic syndrome. **Leukemia**, v. 23, n. 7, p. 1288-1296, 2009.

ZOU, W. et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. **Nat. Med.**, v. 7, n. 12, p. 1339-1346, 2001.

ZOU, W.; RESTIFO, N. P. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. **Nature Reviews. Immunology**, v. 10, n. 4, p. 248-256, 2010.

APÊNDICE - Involvement of memory T-cells in the pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia

REV BRAS HEMATOL HEMOTER 2014;36(1):XXX-XXX

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia
Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy

www.rbhh.org

Review article

Involvement of memory T-cells in the pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia

Rodolfo Patussi Correia^{a,b,*}, Flávia Amoroso Matos e Silva^a, Nydia Strachman Bacal^{b,c},
Paulo Vidal Campregher^b, Nelson Hamerschlag^b, Gustavo P. Amarante-Mendes^{a,d}

^a Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

^b Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), São Paulo, SP, Brazil

^c Centro de Hematologia de São Paulo (CHSP), São Paulo, SP, Brazil

^d Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 August 2013

Accepted 16 October 2013

Keywords:

Leukemia lymphocytic chronic

B-cell

T-lymphocytes

Immunologic memory

ABSTRACT

The role of T-cells in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia has recently gained much attention due to the importance of the constant interaction between neoplastic B-cells with microenvironment substratum and T-cells. It is believed that these interactions modulate the clinical course of the disease, mainly through the regulation of the expansion, differentiation, and survival of chronic lymphocytic leukemia B-cells. Importantly, this crosstalk may also change the number, function, and memory phenotype of normal T-cells, therefore altering the amplitude and/or efficiency of adaptive immunity in chronic lymphocytic leukemia patients. The present study presents an overview on important aspects of this immunological crosstalk, particularly on the abnormalities of chronic lymphocytic leukemia B-cells and the alterations in normal T-cells, with focus on the CD4⁺ memory T-cell compartment that could offer survival signals to chronic lymphocytic leukemia B-cell clone(s) and contribute to the establishment and progression of the disease. The authors believe that understanding the biological consequences of the interaction between normal T- and neoplastic B-cells in chronic lymphocytic leukemia may allow for improvements in the prognostic information and therapeutic approaches for this disease.

© 2014 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular.

All rights reserved.

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common mature B-cell neoplasm in Western countries. It is charac-

terized by the appearance of monoclonal CD5⁺CD19⁺ mature B-cells in the peripheral blood, lymphoid system, and bone marrow.¹ The prevalence of the disease is higher in men compared to women and the estimated incidence is two to six cases per 100,000 people annually. At the time of diagnosis,

*Corresponding author at: Universidade de São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes, 1730, Cidade Universitária 05508-000 São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: rodolfoptc@gmail.com (R.P. Correia).

1550-8484/\$ - see front matter © 2014 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

approximately 31% of the patients are younger than 64 years and the median age is 72 years.^{1,2}

The clinical course of CLL is heterogeneous, and survival can vary from months to decades. Although most patients have an asymptomatic disease, there is a group of patients with aggressive CLL characterized by autoimmune hemolytic anemia, recurrent infections, immunodeficiency, and transformation to aggressive lymphoma, with an average life expectancy of less than three years.^{1,3}

Several factors play an important role in the etiology of CLL, such as genetic predisposition related to the familiar history, environmental factors, and antigens/auto-antigens promoting division of precursor cells and clonal evolution.^{3,4} Moreover, the study of CLL genome by sequencing approaches revealed novel mutated genes, such as MYD88, NOTCH1, SF3B1, and XPO1, among others. Importantly, some of these genes may be considered as prognosis factors.⁵⁻⁶

Another important aspect that modulates the outcome of the disease in CLL patients is the interaction between neoplastic B-cells with microenvironment substratum and T-cells. These interactions occur in organized structures termed pseudofollicular proliferative centers (PC), which are clusters of small lymphocytes dispersed in lymph nodes and bone marrow. Interestingly, PC are not visualized in any other B-cell neoplasm, and this structure is considered a hallmark of CLL.⁷ Data in the literature suggest that the crosstalk between CLL B-cells, extracellular components of the microenvironment, and T-cells has an important impact on the physiopathology and evolution of the disease, mainly through regulation of CLL B-cell expansion, differentiation, and survival. Conversely, this crosstalk may also induce qualitative and quantitative changes in normal T-cells that could impact the fitness of the immune system of CLL patients.⁷⁻¹⁰

Tables 1 and 2 summarize some characteristics of neoplastic B-cells and normal T-cells, respectively, that may impact in CLL physiopathology.

Table 1 - CLL B-cells characteristics.

Characteristics	Implications
Reduction in CD8 ⁺ /CD44 expression	CLL B-cells are poor as antigen-presenting cells ²¹
CD200 expression	Inhibition of T-helper-1 and induction of regulatory T-cells (Treg) ^{22,23}
Expression of FASL with downregulation of FAS	Protection of CLL B-cells from FAS-mediated cell death, promotion of T-cell apoptosis ⁸
Increase of soluble FAS	Related to the progressive CLL ²⁴
Secretion of soluble interleukin-2 receptor and interleukin-10	Inhibition of T-helper-1 differentiation ^{15,16}
Interleukin-6 secretion	Protection of CLL B-cells from spontaneous apoptosis; secretion of interleukin-4 by T-cells and consequent positive impact on CLL B-cell survival ^{17,25}

CLL, Chronic lymphocytic leukemia.

Table 2 - T-cells qualitative and quantitative changes induced by CLL B-cells.

Changes in T-cell	Comments
Increase in CD4 and CD8 T-cell absolute number	Due to leukocytosis ^{2,18,20}
Inversion of the CD4/CD8 ratio in peripheral blood	CD4 T-cells are more sensitive to FAS mediated cell death ^{18,21}
Elevated expression of FASL	Increased rates of T-cell apoptosis induced by FASL on CLL B-cells ²²
Deficiency acquired in CD40L expression	CLL cells induce downregulation of CD40L on the T-cell surface ²³
Abnormal profile of cytokines and/or cytokine receptors expression ¹⁰	
Expansion of regulatory T-cells (Tregs)	Induced by CD200 expression in CLL B-cells ^{22,23}
Reduction in T-cell receptor repertoire	T-cell clonal expansion ²²
Interleukin-4 secretion	Induced by interleukin-6 secretion of CLL B-cells ^{17,28,29}
Cytoskeleton changes	Defective immune synapse ²²
Alterations in genes involved in CD8 T-cell cytotoxicity	Inefficient CD8 T-cell cytotoxicity ^{26,27}
Defective lymphocyte function-associated antigen 1-directed T-cell motility	CLL B-cells alter the Rho GTPase signaling ^{28,29}

CLL, chronic lymphocytic leukemia.

In addition to these changes in the T-cell compartment, recent data suggest an accumulation of memory T-cells in CLL patients that is associated with a more aggressive course of the disease.^{19,21,30,31} Therefore, this study aimed discuss the possible involvement of memory T-cells in the physiopathology and clinical course of CLL.

Memory T-cells

T-cells play a crucial role in the immune system; they are critical for combating and controlling tumors and intracellular and extracellular pathogens, acting as cytotoxic cells (cytotoxic T-lymphocytes [CTL]) or assisting other immune cells (T-helper [Th] lymphocytes). Importantly, Th lymphocytes differentiate into subsets capable of producing different cytokine patterns and, therefore, exerting diverse helper functions.³

The course of immune response can be briefly summarized by initial antigen-specific stimulation of naive T-cells that results in activation, vigorous proliferation, and differentiation to specific effector T-cell subpopulations, which are capable of fighting pathogens and tumor cells.³

After pathogen clearance, the majority of effector T-cells die due to lack of stimulation with participation of the pro-apoptotic protein B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death (BIM).³² In the case of chronic activation of T-cells, these may undergo activation-induced cell death (AICD),

a cell death regulatory mechanism mediated by the FAS/ FASL interaction.²³⁻²⁶ Together, this homeostatic mechanism attempts to restore the initial 'baseline' immune system and is defined as the contraction phase of immune response.

However, a small fraction of antigen-specific T-cells are resistant to cell death and become long-lived memory T-cells. These cells comprise a heterogeneous group that are more sensitive to low antigen concentrations and that survive in the body to give faster and more effective antigen-specific responses, providing immediate protection in peripheral tissues and the ability to confer secondary responses in lymph nodes.²⁴

Criteria such as immediate effector function, phenotypic diversity, proliferative index, migratory capability, and anatomical location are used to define memory T-cells in human models and characterize them in central memory (TCM) and effector memory (TEM) profiles (Table 3). This classification was proposed in 1999 by Sallusto et al. and is now widely accepted in the international scientific literature.^{15,26}

Table 3 - Central and effector memory T-cell characteristics

	Central memory T-cells	Effector memory T-cells
Anatomical location	Lymph nodes	Liver, lung, and gut
Effector function	Low	High/Immediate
Proliferative index	High	Low
Migratory capability	Secondary lymphoid organs (CD45 ^{RA} CCR7 ^{hi})	Non-lymphoid tissues (CD45 ^{RO} CCR7 ^{lo})
Cytokine pattern	IL-2	CD4, IFN- γ , IL-4, and IL-17CCL chemokine and granulocyte
CD8: perforin and granzymes		
Co-stimulatory molecules	High expression of CD40L	

CLL, chronic lymphocytic leukemia

CLL and memory T-cells

As previously mentioned, constant interaction with the microenvironment substratum and T-cells is essential for CLL B-cells in order to avoid apoptosis and acquire favorable growing conditions. As a result of this crosstalk, some changes in T-cells are well documented, but a recent observation that CLL is able to interfere in naive and memory T-cell status deserves more discussion.^{18,21,26,31}

It has been demonstrated that CLL patients have a significant skewing only in the CD4 T-cell compartment towards TCM and TEM cells.²⁷ Interestingly, this altered T-cell profile was associated with a more aggressive course of the disease, as shown by the positive association with unmutated human immunoglobulin heavy chain variable genes (IgV_H), advanced regent admission index clinical stage, and shorter treatment-free survival. Conversely, there was no correlation between the increase in CD4 memory T-cells and CD38 expression or genomic aberrations in CLL patients.¹³

Another study demonstrated that a CLL mice model had decreased naive T-cells with concomitant increase in antigen-experienced memory T-cells, mainly the subtypes that have the ability to migrate to lymph nodes.³⁰ As the background of the mice model used was the TCL1, which represents an aggressive CLL, it is possible that the increased numbers of memory T-cells are related to the aggressiveness of CLL, both in humans and mice.

An interesting question is how the different types of memory T-cells could influence CLL physiopathology. It has been postulated that chronic antigenic stimulation through the B-cell receptor (BCR) is required for the neoplastic clone to survive and grow.³² In this context, CD4 TCM cells have the capability to migrate to the lymph nodes due to their expression of CXCR5 (a chemokine CXCL13-receptor produced by B-cells in lymph node follicles), and could interact with CLL B-cells, providing co-stimulatory signals, such as CD40L and cytokines.³³ This crosstalk could contribute to a stronger BCR signaling, greater survival, expansion, and evolution of CLL.

In addition, according to the literature on memory T-cell generation, a low but sufficient activation of naive T-cells is crucial to the differentiation of TCM cells.³² Associating this evidence with the fact that CLL B-cells are poor as antigen presenting cells,¹¹ the interaction between CLL B-cells and naive T-cells could result in a weak stimulation leading to the generation and/or accumulation of CD4 TCM cells.

Regarding TEM cells, cytokine production of interleukin-4 (IL-4) and interferon-gamma (IFN- γ) could also participate in CLL progression, mainly through the up-regulation of BCL-2 and protection of CLL cells from apoptosis.^{30,31} It was demonstrated that, in *in vitro* co-culture assays, the apoptosis rate of CLL B-cells in the presence of CD4 TEM cells was lower than in other conditions, such as in the presence of either naive CD4 T-cells or peripheral blood mononuclear cells. Moreover, the protection conferred by CD4 TEM cells seems to depend on IL-4.³³

Considered together, the existence of an intrinsic feedback mechanism involved in the physiopathology of the CLL is supported, in which CLL B-cells could induce the generation and/or accumulation of CD4 memory T-cells, which, in turn, would help them achieve better survival and expansion (Figure 1). Indeed, it was demonstrated that CD4 memory T-cell generation is impaired in mice that are deficient in B-cells.^{37,38}

Fig. 1 - Immunological crosstalk between chronic lymphocytic leukemia B-cells and CD4 T-cells.

At the lymph node site, neoplastic B-cells interact with naïve and activated CD4 T-cells, resulting in generation/accumulation of CD4 memory T-cells in peripheral blood. Through the lymph node homing receptors, chemokine receptors and co-stimulatory CD4 central memory T-cells could offer survival signals to chronic lymphocytic leukemia B-cells at lymph node site. In addition, cytokines produced by CD4 effector memory T-cells, such as interleukin-4 and interferon-gamma, could also participate of this survival process.

Unpublished data from this group supports the aforementioned information. Briefly, the authors analyzed the peripheral blood T-cells of 21 CLL patients, and evaluated whether the distribution of naïve and memory T-cells was related to the ZAP-70 expression, a well-established prognosis factor in CLL.⁴³ Interestingly, this analysis demonstrated that ZAP-70 positive patients with neoplastic B-cells presented increased frequency and absolute numbers of CD4 TCM cells compared to the ZAP-70 negative patients and 17 age-matched healthy individuals (Correia RP, unpublished data). Although other clinical and laboratory prognostic markers were not analyzed at this point, the results are in accordance with the literature that shows alterations in the memory CD4 T-cell subpopulations. Importantly, it is suggested that this alteration is restricted to the T-helper compartment, since no significant differences were observed among memory CD8 T-cells.

To the authors' knowledge, there is no study that evidences associations between genetic factors and T-cell skewing towards memory status. Because the authors believe that this information is critical for a better evaluation of the prognostic value of analyzing the memory T-cell compartment, as well as for the understanding of the involvement of CD4 memory T-cells in the pathophysiology of CLL, studies with this focus are underway in this laboratory.

Conclusions

Abnormalities in T-cell subsets may be associated with the progression of CLL. Particularly, the increased CD4 memory T-cells could help CLL B-cells to achieve better fitness, i.e., more survival and proliferation signals. Therefore, understanding and unraveling this mechanism could improve the prognostic information and therapeutic approaches in CLL.

Conflicts of interest

The author declares no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Swerdlow SH, Jaffe ES. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.
2. Seer Stat Factsheets. Chronic lymphocytic leukemia. National Cancer Institute 2009. Available from: <http://www.seer.cancer.gov/statfacts/html/cllh.html>
3. Stilgenbauer S, Zenz T. Understanding and managing ultra high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:481-8.
4. Riches JC, Ramsay AG, Gröbner JG. Chronic lymphocytic leukemia: an update on biology and treatment. *Curr Oncol Rep*. 2011;13(5):379-85.
5. Fabbi G, Rasi S, Rossi D, Trifunov V, Khachanian H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*. 2011;208(7):1189-401.
6. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GB, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101-5. Comment in: *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(8):447. *Cancer Cell*. 2011;20(3):5-7.
7. Caligaris-Cappio F, Ghia P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J Clin Oncol*. 2008;26(27):4497-503.
8. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders; 2012.
9. Riches JC, Ramsay AG, Gröbner JG. T-cell function in chronic lymphocytic leukaemia. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(6):431-8.
10. Serwint S, Goddard RV, Kaminski ER, Prentice AG. Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma*. 2003;44(3):383-9.
11. Dazzi F, D'Andrea E, Biasi G, De Silvestro G, Guidano G, Schena M, et al. Failure of B-cells of chronic lymphocytic leukemia in presenting soluble and alloantigens. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995;75(1):26-32.
12. Gocczynski RM, Lee L, Strzalski L. Augmented induction of CD4+CD25+ Treg using monoclonal antibodies to CD2800. *Transplantation*. 2006;79(4):488-91.
13. Wong KK, Khatri I, Shaha S, Spaner DE, Gocczynski RM. The role of CD200 in immunity in B-cell lymphoma. *J Leukoc Biol*. 2010;88(2):361-72.
14. Osorio LM, Aguilar-Santelices M, De Santiago A, Hachya T, Mallett H, Jendal M. Increased serum levels of soluble Fas in progressive B-CLL. *Eur J Haematol*. 2001;66(5):342-5.
15. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Boncoraro MG, te Velde A, Figdor C, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*. 1991;174(1):915-24.
16. Lindqvist CA, Christiansson LH, Simonsson B, Enblad G, Olsson-Stromberg U, Laskog AS. T regulatory cells control T-cell proliferation partly by the release of soluble CD25 in patients with B-cell malignancies. *Immunology*. 2010;131(1):371-6.
17. Kautz JE, Yong KL, Panayiotidis P, Hollbrand AV. Interleukin-5 inhibits apoptosis and tumour necrosis factor induced proliferation of B-chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma*. 1996;22(1-2):83-90, follow. 180, color plate VI.
18. Buggins AG, Fadden PE, Richards J, Thomas NS, Muir GJ, Beverbox S. Tumor-derived IL-6 may contribute to the immunological defect in CLL. *Leukemia*. 2008;22(5):1084-7.

19. Tinhofer I, Weiss L, Gassner F, Rubenzer G, Hoffer G, Grell R. Difference in the relative distribution of CD4+ T-cell subsets in B-CLL with mutated and unmutated immunoglobulin (Ig) VH genes: implication for the course of disease. *J Immunother*. 2006;32(3):302-9.
20. Tinhofer I, Mieschke I, Kos M, Henz T, Egle A, Vidunger A, et al. Differential sensitivity of CD4+ and CD8+ T lymphocytes to the killing efficacy of Fas (Apo-1/CD95) ligand+ tumor cells in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1998;93(11):4273-81.
21. Pourghasaei B, Bruton R, Parry H, Billingham L, Fegan C, Murray J, et al. The number of cytomegalovirus-specific CD4+ T cells is markedly expanded in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and determines the total CD4+ T-cell repertoire. *Blood*. 2010;116(26):2868-74. Comment in: *Blood*. 2010;116(26):2869-70.
22. Cantwell M, Hsu Y, Pappas J, Kipps TJ. Acquired CD45-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*. 1997;3(9):988-9.
23. Rojivany MB, Jodhi-Tehrani M, Osterborg A, Kimby E, Wiggall H, Mellstedt H. Oligoclonal TCRBV gene usage in B-cell chronic lymphocytic leukemia: major perturbations are preferentially seen within the CD4 T-cell subset. *Blood*. 1999;94(3):1063-9.
24. Kay ME, Han L, Bone N, Williams G. Interleukin 4 content in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) B cells and blood CD8+ T cells from B-CLL patients: impact on clonal B-cell apoptosis. *Br J Haematol*. 2001;112(3):760-7.
25. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgun G, Le Dieu B, Blum W, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest*. 2008;118(7):2427-37.
26. Gorgun G, Holterriedt TA, Zahrieh D, Neuberg D, Gribben JG. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *J Clin Invest*. 2005;115(7):1787-825.
27. Zeiss T. Exhausting T cells in CLL. *Blood*. 2013;121(5):1485-6.
28. Ramsay AG, Evans R, Elmi S, Svensson L, Hogg N, Gribben JG. Chronic lymphocytic leukemia cells induce defective LFA-1-directed T-cell motility by altering Rho GTPase signaling that is reversible with farnesin analogs. *Blood*. 2013;121(14):2704-14.
29. Ysebaert L. T-cells in CLL: lost in migration. *Blood*. 2013;121(24):2180-2.
30. Hochhaus P, Heyder C, Denk U, Kocher T, Hoffer G, Trautwein D, et al. Development of CLL in the TCL1 transgenic mouse model is associated with severe skewing of the T-cell compartment homologous to human CLL. *Leukemia*. 2011;25(5):1452-8.
31. Walton JA, Lydyard PM, Nathwani A, Emery V, Akhtar A, Glennie MJ, et al. Patients with B cell chronic lymphocytic leukaemia have an expanded population of CD4 perforin-expressing T cells enriched for human cytomegalovirus specificity and an effector-memory phenotype. *Br J Haematol*. 2010;148(2):274-84.
32. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Boudillet P, Strasser A, Kappler J, et al. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity*. 2002;16(5):759-67.
33. Green DR. Fas Bim bonni. *Immunity*. 2008;28(2):141-3. Comment in: *Immunity*. 2008;28(2):197-205. *Immunity*. 2008;28(2):218-30. *Immunity*. 2008;28(2):206-17.
34. Jameson SC, Mansueti D. Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. *Immunity*. 2009;31(6):859-71.
35. Sallusto F, Lenig D, Friesen B, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708-12. Comment in: *Nature*. 1999;401(6754):659-60.
36. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63.
37. Pepper M, Jenkins ME. Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nat Immunol*. 2011;12(5):467-71.
38. Sherman EK, Caligiuri-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*. 2004;103(12):4389-95.
39. Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(3):326-32.
40. Dancescu M, Rubio-Trujillo M, Biron G, Bron D, Dellespasse G, Saefi M. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemia B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J Exp Med*. 1992;175(5):1319-26.
41. Buschle M, Campese D, Carding SR, Richard C, Hoffbrand AV, Brenner MK. Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 1993;177(1):213-8.
42. Whitmire JK, Asano MS, Koeh SM, Sarkar S, Hannum LG, Shlomchik MJ, et al. Requirement of B cells for generating CD4+ T cell memory. *J Immunol*. 2009;182(4):1868-76.
43. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo R, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(28):1764-75. Comment in: *N Engl J Med*. 2003;348(5):506-7. Author reply 505-7. *N Engl J Med*. 2003;348(18):1797-9.