KELLY CRISTINA GOMES MANFRERE

Caracterização fenotípica e o potencial imunomodulador de agonistas de receptores Toll-like na resposta citotóxica de células Natural Killer na Síndrome de Sézary

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Programa de Dermatologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a Maria Notomi Sato

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Manfrere, Kelly Cristina Gomes

Caracterização fenotípica e o potencial imunomodulador de agonistas de receptores *Toll-like* na reposta citotóxica de células *Natural Killer* na síndrome de Sézary / Kelly Cristina Gomes Manfrere. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Dermatologia.

Orientadora: Maria Notomi Sato.

Descritores: 1.Linfoma 2. Síndrome de Sézary 3.Imunidade inata 4.Células matadoras naturais 5.Citocinas 6.Citometria de fluxo

USP/FM/DBD-485/16

KELLY CRISTINA GOMES MANFRERE

**Caracterização fenotípica e o potencial imunomodulador de
agonistas de receptores Toll-like na resposta citotóxica de células
Natural Killer na Síndrome de Sézary**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
Da Universidade de São Paulo para a obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Programa de Dermatologia

Orientadora: Prof. Dr^a Maria Notomi Sato

São Paulo

2016

Dedicatória

Dedico este trabalho aos pacientes com síndrome de Sézary, que anseiam por cura e melhor qualidade de vida.

Agradecimentos

Ao Meu Deus, pois sem Ele eu não estaria aqui.

À minha orientadora, Professora Dra Maria Notomi Sato, pela orientação, carinho, paciência e por gerar em mim o amor pela ciência.

Ao professor Dr Jose Antonio Sanches pela co-orientação, confiança, paciência e incentivos de que podemos melhorar a vida desses pacientes.

À minha querida amiga e parceira de trabalho Marina Passos Torrealba, pelo apoio, carinho, comprometimento com nosso trabalho.

Ao Dr Denis Ricardo Myashiro pela ajuda, de grande valia, na elaboração da dissertação e desenvolvimento do projeto.

À amiga de coração Nátalli Zanette pelo apoio e explicações ilustradas em rascunhos que me fez entender além dos livros.

Às amigas nascidas no laboratório que ajudaram a manter a calma, a seguir a diante mesmo nas horas de desânimo, que pacientemente dividiam seus conhecimentos práticos, teóricos e pessoais e por todos os momentos de convívio e companheirismo: Nilson Lima, Gabriel Costa, Anna Claudia Branco, Luanda Oliveira, Luana Mendonça, Elaine, Aline Lira, Marília Garcia, Rosana Domingues, Raquel Orfali, Nátalli Zanete, Fábio Seiti, Anna Júlia, Francielli, Raíssa, Vanessa e Yasmin.

A todos os integrantes do LIM 56 que de maneira direta ou indireta contribuíram neste trabalho.

Ao meu esposo e melhor amigo, que me incentiva todos os dias e que me faz sonhar com um futuro melhor junto com nossa filha Sophia, o meu maior tesouro!

Agradeço a cooperação do departamento de Citometria Noemi Mie Ori, Rosângela e Patrícia.

Ao Professor Dr. Alberto José da Silva Duarte por ceder o espaço de trabalho.

A Luana Mendonça pela grande ajuda nos ensaios de quantificações por citometria,

À banca de qualificação Prof. Dr. José Antonio Sanches, Dr Jose Nilson Feitosa e Prof. Dra.

Elaine Guadalupe pelas contribuições e melhorias na dissertação.

À secretaria do Departamento de Dermatologia HC-FMUSP, Rodrigo, Ruth e Marcelo.

À secretaria do laboratório LIM 56, pela ajuda burocrática na realização do trabalho.

Aos pacientes que tão gentilmente aceitaram participar deste trabalho.

À CAPES, FAPESP e FUNADERSP pelo apoio financeiro.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Linfomas: classificação	1
1.2 Contexto imunológico no LCCT	2
1.3 Síndrome de Sézary	5
1.4 Resposta imune citotóxica no LCCT: Células NK	6
1.5 Imunomodulação no LCCT: Agonistas de TLRs	7
2. OBJETIVO	10
2.1 Objetivos específicos	11
3. MÉTODOS	13
3.1 Casuística	13
3.2 Obtenção de células mononucleares (CMNs) do sangue periférico	14
3.3 Avaliação fenotípica de células NK do sangue periférico.	14
3.4 Análise das subpopulações de células NK funcional após estímulos por citometria	15
3.5 Cultura celular	16
3.6 Análise da expressão constitutiva de RNAm por PCR em tempo real	17
3.7 Determinação de ligantes solúveis de NK	18
3.8 Análises estatística	18
4. RESULTADOS	19
4.1 Características dos indivíduos envolvidos no estudo	20
4.2 Perfil fenotípico das células NK no sangue periférico de pacientes com SS	22
4.3 Avaliação de ligantes solúveis de NK na Síndrome de Sézary	27
4.4 Expressão de citocinas IFN- γ , TNF e da molécula CD107a em células NK estimuladas com agonistas de receptores <i>Toll-like</i> (TLR)	28

4.5 Análise da expressão constitutiva de RNAm de TLRs.....	32
4.6 Avaliação sérica de citocinas em pacientes com síndrome de Sézary.....	33
4.7 Análise da expressão e secreção de interferon tipo I em CMN	34
4.8 Avaliação do perfil de produção de citocinas por CMN induzida por agonistas de TLR.....	36
5. DISCUSSÃO	39
5.1 Perfil fenotípico das células NK na síndrome de Sézary	40
5.2 Ativação das células NK por ligantes de TLRs na síndrome de Sézary	42
5.3 Avaliação do perfil de produção de citocinas por CMN induzida por agonista de TLRs	44
5.4 Perfis de citocinas séricas na síndrome de Sézary	46
6. CONCLUSÃO	50
7. ANEXOS	52
8. REFERÊNCIAS.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

LCCT – Linfoma cutâneo de células T
TLR – *Toll like receptor*
SS – Síndrome de Sézary
HL – Linfoma Hodgkin
NHL – Linfoma não-Hodgkin
ISCL – *International Society for Cutaneous Lymphomas*
EORTC – *European Organization for Research and Treatment of Cancer*
MF – Micose fungóide
EUA – Estados Unidos da América
WHO – *World Health Organization*
APCs – Células apresentadoras de antígeno
CLA – antígeno linfocitário cutâneo
CCR4 – *C-C chemokine receptor type 4*
CCR7 – *C-C chemokine receptor type 7*
CCR8 – *C-C chemokine receptor type 8*
CCR10 – *C-C chemokine receptor type 10*
Treg – Célula T reguladora
FMO – *Fluorescence Minus One*
FoxP3 – *forkhead box P3*
IL-1 – interleucina 1
IL-6 – interleucina 6
IL-2 – interleucina 2
IL-15 – interleucina 15
IL-10 – interleucina 10
IL-5 – interleucina 5
IL-4 – interleucina 4
PD-1 – *Programmed cell death 1*
PD-L1 – *Programmed death-ligand 1*
Th1 – *T helper cell type 1*
Th2 – *T helper cell type 2*
IFN γ – Interferon gamma
DC – célula dendrítica
TCR – receptor de célula T
STAT – *Signal transducer and activator of transcription*
JAK – *Janus kinase*
PCR – *Polymerase chain reaction*
MCH – *major histocompatibility complex*
TNF – *Tumor necrosis factor*
NK – Células *Natural Killer*
PRRs – receptores de reconhecimento padrão
PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos
TIRAP – proteína associada ao TIR

MyD88 – *Myeloid differentiation primary response gene 88*

NFkB – fator nuclear kappa B

IRF – fator regulador de IFN

pDC – célula dendrítica plasmocitóide

FMO – *Fluorescence Minus One*

HC/FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

CMN – célula mononuclear

PMA – acetado de forbolmiristato

LDH – *lactato desidrogenase*

MFI – *median fluorescence intensity*

CTRL – controle

PHA – fitohemaglutinina

CBA – *cytometric bead array*

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
µg	Micrograma
µL	Microlitro
≤	Menor ou igual a
<	Menor que
>	Maior que
+	Positivo
-	Negativo
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imunopatogênese da micose fungóide e síndrome de Sézary.....	4
Figura 2. Estratégia de gate para análise das células NK do sangue periférico.....	24
Figura 3. Frequência das populações de células NK, CD56bright e CD56dim no sangue periférico.....	25
Figura 4. Frequência dos receptores de ativação e inibição em células NK CD56brightCD16.....	25
Figura 5. Frequência dos receptores de ativação e inibição em células NK CD56dimCD16-.....	26
Figura 6. Expressão constitutiva de RNAm de NKG2D e ligantes.....	27
Figura 7. Níveis séricos de MICB solúvel de pacientes SS.....	28
Figura 8. Estratégia de análise das células NK estimuladas com agonistas de TLRs.....	30
Figura 9. Percentual de células NK CD56brightCD16- produtoras de CD107a, IFN- γ e TNF estimuladas com agonistas de TLRs.....	31
Figura 10. Percentual de células NK CD56dimCD16+produtoras de CD107a, IFN- γ e TNF estimuladas com agonista de TLRs.....	32
Figura 11. Expressão constitutiva de RNAm deTLRs.....	33
Figura 12. Níveis séricos de citocinas.....	34
Figura 13. Expressão constitutiva de RNAm IFNs e produção de IFN- α induzida por agonistas de TLR.....	36
Figura 14. Perfil de produção de IL-6 e TNF por CMN induzidas por agonistas de TLRs.....	37
Figura 15. Perfil de produção de IFN- γ e IL-10 por CMN induzidas por agonistas de TLRs.....	38

Resumo

Manfrere K C G .Caracterização fenotípica e o potencial imunomodulador de agonistas de receptores Toll-like (TLRs) na resposta citotóxica de células Natural Killer na Síndrome de Sézary [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A Síndrome de Sézary (SS) é um dos tipos mais comuns de linfoma cutâneo de células T (CTCL). Esta síndrome é caracterizada por eritrodermia, linfadenopatia generalizada e presença de células tumorais na pele, linfonodos e sangue periférico. A imunidade do hospedeiro está comprometida nesta síndrome, contudo, estudos relacionados à imunidade inata, particularmente sobre as células Natural Killer (NK) são mais escassos. As células NK exercem um papel essencial na resposta imune antitumoral. A proposta deste estudo é caracterizar o perfil fenotípico associado à ativação e inibição das células NK e a capacidade de secreção de citocinas em resposta aos agonistas de receptores Toll-like (TLR), TLR4, TLR7/TLR8 e TLR9 em pacientes com SS. Foram selecionados 14 pacientes com SS (7 homens, 7 mulheres), com 48-85 anos de idade provenientes do Ambulatório de Linfomas Cutâneos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, e um grupo controle com 22 indivíduos sadios (11 homens, 11 mulheres, idade de 48-75). Os resultados evidenciaram diminuição percentual de células NK CD56^{dim} do sangue periférico dos pacientes SS, bem como baixa expressão de marcadores de ativação, NKG2D e NKG2C. A forma solúvel dos ligantes de NKG2D, MICB e MICA solúvel (sMICA/MICB), foi detectada em níveis séricos elevados para sMICB, e sMICA foi detectado em apenas 2 pacientes. Houve uma correlação negativa entre os níveis de sMICB e o percentual de células NK CD56^{bright}CD16 NKG2D+. O perfil de secreção de citocinas das células NK, mostra, já na condição sem estímulo, um aumento percentual de TNF e CD107a em células NKCD56^{dim} de pacientes com SS. Após o estímulo com os agonistas de TLR7/TLR8 houve um aumento na produção de CD107a e TNF nas células NKCD56^{bright} e de TNF para as células NKCD56^{dim}.

Na produção de citocinas induzidas por agonistas de TLRs nos sobrenadantes de células mononucleares, foi observado que os agonistas TLR2 e TLR4 foram capazes de estimular a produção de IL-6, TNF e IL-10 enquanto o agonista de TLR7/8 mostrou um efeito adjuvante para a secreção de IFN- α , IFN- γ e IL-10. Além disso, foi observado aumento de expressão de RNAm para TLR2 em células mononucleares avaliada por PCR em tempo real, como também para os fatores relacionados à resposta antiviral, como interferon tipo I (IFN- α), receptor de IFN- β e interferon tipo III (IFN- λ) em pacientes com SS. Quanto aos níveis séricos de citocinas, foi detectado aumento de IL-5 (citocina Th2), IL-6 (pró-inflamatória) e

IL-10 (reguladora) nos SS, não diferindo quanto aos níveis de IL-1 β , IL-2, IL-17a, TNF e TGF- β em relação ao grupo controle. Os resultados mostram que há uma diminuição percentual de células NK CD56^{dim}, alteração da expressão dos receptores de ativação e elevação de ligantes solúveis que podem bloquear a ativação das células NK nos pacientes com SS. Além disto, as células NK exibem diminuição da produção de IFN- γ , que contribuem na diminuição da resposta Th1. Há uma baixa responsividade das células NK aos ligantes de TLRs. Contudo, há um efeito adjuvante dos ligantes de TLRs em células mononucleares dos pacientes com SS, sendo que os agonistas de TLR2/4 e TLR7/8 foram capazes de restaurar parcialmente a produção de citocinas. Os resultados evidenciam que nos pacientes com SS, apesar da redução percentual das células NK, essas células são funcionais, mas que podem ser bloqueadas pelos ligantes solúveis de receptores de ativação. O uso de ligantes de TLRs pode ser uma estratégia para potencializar a produção de citocinas na Síndrome de Szary.

Abstract

Manfrere K C G . Phenotypic characterization and the immunomodulatory potential of Toll-like receptor agonists (TLRs) in the cytotoxic response of Natural Killer cells in Sézary syndrome. [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Sézary syndrome (SS) is one of the most common types of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). This syndrome is characterized by erythroderma, generalized lymphadenopathy and presence of tumor cells in the skin, lymph nodes and peripheral blood. Immunity of the host is compromised in syndrome, a study has related an innate immunity, particularly in Natural Killer (NK) cells are more scarce. NK cells play an essential role in the antitumor immune response. The aim of this study is to characterize the phenotypic profile associated with the activation and inhibition of NK cells and cytokine secretion capacity in response to the TLR4, TLR7 / TLR8 and TLR9 receptor agonists in SS patients. METHODS: We selected 14 patients with SS (7 men, 7 women, 48-85 years old) from the Cutaneous Lymphoma Outpatient Clinic of the Medical School of USP, and a control group with 22 healthy individuals (11 men, 11 women, 48-75 years old). The results showed a decrease in CD56dim NK cells in the peripheral blood of SS patients, as well as low expression of activation markers, NKG2D and NKG2C. The soluble form of NKG2D, MICB and soluble MICA (sMICA / MICB) ligands was detected at high levels in serum for sMICB, and sMICA was detected in only 2 patients. There was a negative correlation between sMICB levels and the percentage of NK cells CD56brightCD16 NKG2D+. The cytokine secretion profile of NK cells, in the unstimulated condition, showed an increase of TNF and CD107a in NKCD56dim cells of SS patients. Upon stimulation of TLR7 / TLR8 agonists, CD107a and TNF production was higher in NKCD56bright cells and for TNF in CD56dim cells. The agonists TLR2 and TLR4 in NK cells were able to stimulate the production of IL-6, TNF and IL-10, while TLR7 / 8 agonist showed an adjuvant effect for secretion of IFN- α , IFN- γ e IL-10. In addition, increased expression of TLR2 mRNA was observed in mononuclear cells evaluated by real-time PCR, similarly for factors related to antiviral response, such as interferon type I (IFN- α), IFN-Type III receptor (IFN- λ) in patients with SS. For serum levels of cytokines, IL-5 (cytokine Th2), IL-6 (proinflammatory) and IL-10 (regulatory) were detected higher in SS, not differing in levels of IL-1 β , IL-2, IL-17a, TNF and TGF- β in relation to the control group. The results show that, there is a percentage decreased of CD56dim NK cells, alteration in activation receptor expression and elevation of soluble ligands that block the activation of NK cells in SS patients. In addition, NK cells exhibit decreased IFN- γ production, that contribute to the decrease in Th1 response. There is low responsiveness of NK cells to

TLR ligands. However, there is an adjuvant effect of TLR ligands on mononuclear cells of SS patients, with TLR2 / 4 and TLR7 / 8 agonists is able to partially restore cytokine production. The results show that patients with SS, despite the percentage reduction of NK cells, these cells are functional, but can be blocked by soluble ligands of activation receptors. The use of TLR ligands may be a strategy to potentiate a production of cytokines in Sézary Syndrome.

Introdução

1.INTRODUÇÃO

1.1 Linfomas

Os linfomas são neoplasias com origem em células linfóides que englobam um grupo de enfermidades distintas com uma heterogeneidade de achados clínicos, histológicos, imunofenotípicos e genéticos, representando de 3 a 4% dos casos de cânceres no mundo(1).A classificação dos subtipos de linfoma tem sido extensivamente alterada nas últimas décadas, o que pode continuar acontecendo, concomitantemente ao desenvolvimento de novas técnicas e métodos diagnósticos. (2). A qualidade e acuidade do diagnóstico e da classificação de linfomas continuam um desafio aos profissionais da saúde devido à necessidade de correlacionar informações clínicas e histopatológicas com ensaios elaborados de imunofenotipagem, biologia molecular e de citogenética(3).

Existem dois subgrupos principais de linfoma: os linfomas de Hodgkin (HL) e os linfomas não-Hodgkin (NHL). Os HL acometem principalmente os linfonodos cervicais enquanto os NHL, que representam 85% dos linfomas, são subdivididos em relação ao local de acometimento primário: nodais (linfonodos) e extranodais (outros sítios de acometimento diferentes dos linfonodos). As regiões mais comuns de acometimento primário em NHL extranodais são o trato gastrointestinal e a pele. Quando a pele é o sítio de acometimento primário, ele é classificado como linfoma cutâneo primário, sendo responsável por 25% dos NHL com acometimento extranodal (4).

Em 2007, duas organizações de referência em cânceres, a *International Society for Cutaneous Lymphomas* (ISCL) e a *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) propuseram a classificação consensual e o estadiamento para linfomas cutâneos primários baseados nos aspectos histopatológicos, imuno-histoquímicos, moleculares e clínicos. Antes desta definição, os linfomas cutâneos primários não eram reconhecidos como entidade própria, mas como um acometimento secundário da pele por um linfoma nodal (5).Ao contrário dos NHL nodais, que são em sua maioria derivados de células B, aproximadamente 75% dos linfomas cutâneos primários são derivados de células T, sendo classificados como linfomas cutâneos de células T (LCCT). As principais formas de LCCT são a micose fungóide (MF) e a síndrome de Sézary (SS), que representam juntas 65% de todos os casos de LCCT, com características destoantes das outras formas de LCCT (5).

1.2 Contexto imunológico no LCCT

Linfomas cutâneos de células T são caracterizados pela presença de linfócitos T malignos em lesões de pele cronicamente inflamadas (6), estes linfócitos T são recrutados para a pele após injúria tecidual decorrente de trauma ou infecção. A injúria tecidual resulta na secreção de citocinas por queratinócitos e na ativação da resposta imune inata pelas células residentes, tais como células dendríticas (DCs), macrófagos e mastócitos. Essa resposta pode ser mediada por componentes de patógenos (como a parede bacteriana ou material genético viral) reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores *Toll-like* (TLR). A ativação da via do fator de transcrição gênica NF- κ B, decorrente da sinalização deflagrada pelos TLRs, resulta no recrutamento e migração de células apresentadoras de antígeno (APC) ativadas para os linfonodos drenantes locais. Os linfócitos T virgem, após ativação nos linfonodos drenantes da pele, passam a expressar o antígeno linfocitário cutâneo (CLA), ligante da selectina, molécula de adesão vascular endotelial e receptora de quimiocinas (CCR4, CCR8 e CCR10) necessários para migração para a pele. (7).

Alguns estudos sugerem que em uma parcela dos pacientes com SS, as células T malignas são derivadas das células T reguladoras (Tregs). Esses clones malignos expressam o fator de transcrição Foxp3, podem expressar também a cadeia alfa do receptor de IL-2 e CD25, sendo capazes de suprimir as células T convencionais, como um mecanismo de escape tumoral (8)(9). A forma solúvel do CD25 pode ser encontrada no sangue periférico em casos avançados de LCCT, sendo considerado um fator associado com pior prognóstico. (10). Entretanto, ainda não está elucidado se uma parcela dos pacientes apresenta clones tumorais derivados de Tregs ou se alguns clones malignos assumem um perfil de célula Treg (11).

As células malignas TCD4+, na maioria dos pacientes com MF/SS, apresentam um perfil Th2. A estimulação *in vitro* de células do sangue periférico destes pacientes resulta em uma considerável produção de IL-4, uma citocina característica deste subtipo de linfócito efetor. (12) Os precursores de IL-4 e IL-5 foram encontrados em lesões de pele, inclusive em pacientes em estágios iniciais de MF, porém não foram detectados em biópsia nas porções de pele não lesionadas desses pacientes ou de indivíduos controles saudáveis. (13). O precursor de IL-10 também foi identificado paralelamente com o aumento da densidade do infiltrado de células T malignas conforme as progressões das lesões em indivíduos MF (14). A análise gênica destes pacientes mostrou um aumento nos fatores de transcrição associados ao perfil Th2, como GATA-3 e Jun B, altamente expressos em células mononucleares do sangue

periférico de pacientes com SS, quando comparados a indivíduos normais (15). A produção crônica de citocinas com perfil Th2 aparentemente representa um dos mecanismos pelo qual as células tumorais contornam a resposta imune antitumoral, além do aumento da produção de citocinas do perfil Th2, defeitos na produção de citocinas do eixo Th1 são identificados em pacientes com células tumorais circulantes. A produção das citocinas IL-12 e IFN- α por células do sangue periférico se correlaciona inversamente com o aumento das células tumorais circulantes (16) e o declínio dessas citocinas está relacionado com um menor número de DCs circulantes (17). Além disso, presume-se que as DCs mielóides (mDCs) desses pacientes também são deficientes na produção de citocinas como IL-15 e IL-18, importantes agentes indutores de IFN- γ e da resposta perfil Th1.

Um defeito na expressão do ligante de CD40 (CD40L) em células T malignas em pacientes com SS pode estar relacionado à deficiência na produção de IL-12, IFN- γ e maturação das DCs, o CD40L não é constitutivamente expresso em células T virgens, mas é modulado positivamente após a ativação do receptor de células T (TCR) (18). Células T malignas, em contrapartida, não expressam CD40L mesmo após a ativação via TCR/CD3. A ausência desse ligante na interação com CD40 das APCs durante a resposta imunológica pode levar a uma profunda redução na atividade de DCs e na produção de citocinas. Entretanto, a adição *in vitro* de CD40L recombinante foi capaz de reverter a produção deficiente de IL-12 e IFN- γ (18). Uma compilação de achados imunológicos e da imunopatogênese em pacientes com MF e SS estão ilustrados na **Figura 1**.

Figura 1. Imunopatogênese da micose fungóide e síndrome de Sézary. Kim, E.J., *et al*, 2005.

1.3 Síndrome de Sézary

Albert Sézary, dermatologista francês, descreveu pela primeira vez, em 1938, paciente com células “monstruosas” na pele e no sangue, paralelamente à ocorrência de eritrodermia e de um intenso prurido (19). Assim, a SS foi definida historicamente pela presença de linfadenopatia generalizada, eritrodermia e presença de células neoplásicas (Células de Sézary) na pele, nos linonodos e no sangue periférico (20). Contudo, uma vez que linfócitos normais ativados podem ser morfológicamente similares às células de Sézary, outros critérios, além da contagem absoluta de células de Sézary $>1000\text{mm}^3$, sugeridos pela ISCL, são necessários para o diagnóstico da doença: alterações imunofenotípicas dos marcadores de células T maduras CD2, CD3, CD4 e CD5; deleção de CD7 na população CD4 $\geq 40\%$ ou deleção do CD26 na população CD4 $\geq 30\%$; razão de CD4: CD8 ≥ 10 (resultante da expansão clonal maligna) e demonstração de um clone predominante de células T no sangue periférico e em linfonodos ou biópsias de pele (4). Devido ao grande número de linfócitos neoplásicos em lesões tumorais dos pacientes com LCCT, ensaios moleculares normalmente evidenciam um clone de células T predominante. Avaliações por citometria de fluxo ou por reação em cadeia da polimerase (PCR) das cadeias V β predominantes possibilitam a identificação do clone maligno (21).

Outra molécula de superfície, o ligante de classe I do MHC (*Major Histocompatibility Complex*), CD158k/KIR3DL2, pertencente à família *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIR), tem sido descrito como um marcador para células T malignas (22-23). Em indivíduos normais, ele é expresso em uma parcela de células *natural-killer* (NKs) e uma minoria de linfócitos TCD8 $^{+}$ circulantes (24). Alguns trabalhos relatam uma elevada expressão de CD158k em clones malignos de células T circulantes em indivíduos SS (25) e em linfócitos T de infiltrado tumoral (26). Estudos recentes identificaram a expressão de CD158k em células T circulantes em apenas 40% de um grupo de 107 casos de SS (27). Devido à intensa heterogeneidade das células de Sézary, além da imunofenotipagem, outros ensaios são necessários para a identificação das células malignas. Em raras ocasiões, a SS pode ocorrer após um curso clássico de MF. Segundo a ISCL esses casos devem ser denominados de "SS precedidos por MF". Da mesma maneira, pacientes com MF sem eritrodermia, mas que apresentem critério hematológico devem ser denominados "MF com envolvimento leucêmico" (28).

O óbito normalmente é relacionado à sepse bacteriana (sendo os microrganismos mais frequentemente isolados *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) atribuída à

imunodeficiência (29). A imunodeficiência em questão pode ser decorrente do perfil de citocinas Th2 secretadas pelas células malignas, à diminuição da resposta a antígenos, à diminuição da citotoxicidade mediada por células T (30) ou à perda do repertório de TCR(31). A perda do repertório é observada também em pacientes infectados por HIV, e no LCCT, estima-se que seja devido à imunossupressão das células T malignas sobre as células T não malignas, diminuição de geração de células T virgens pelo timo ou por outras causas ainda não identificadas (32). Além disto, a diminuição do repertório de TCR pode ser correlacionada com o estágio do linfoma em pacientes com LCCT, sendo que o repertório é mais comprometido nos estágios mais avançados, embora também possa ser encontrado nos estágios iniciais (31, 33).

1.4 Resposta imune citotóxica no LCCT: Células NK

As células do sistema imune inato e adaptativo previnem ativamente o desenvolvimento de câncer em um processo chamado vigilância imunológica. As células NK são linfócitos imunes inatos, identificados pela primeira vez em 1970 com base em sua capacidade para matar as células tumorais sem restrição MHC ou sensibilização prévia (34). As células NK são reguladas por um balanço entre os receptores ativadores e inibidores específicos para MHC. Estes receptores de ativação detectam a presença de ligantes na superfície de células em "perigo", e, a partir do reconhecimento desses receptores, as células NK podem distinguir as células que expressam moléculas de classe I do MHC das células que perderam ou modificaram esta expressão em decorrência de infecção viral ou tumorigênese (35).

As células linfoides inatas (ILCs) são subconjuntos distintos de linfócitos que, como as células T e B, surgem a partir de uma célula progenitora linfóide comum e são importantes células efetoras e reguladoras da imunidade inata que atuam no remodelamento e reparo tecidual. As células NK são consideradas protótipos das ILCs, e em conjunto com as ILC1, constituem o grupo 1 das ILCs, que são caracterizadas pela produção de IFN- γ e dependência do fator de transcrição T-bet (36). As células NK são divididas em subtipos distintos que exercem funções efetoras únicas e são identificadas pelas combinações de receptores de superfície. As células NK CD56^{dim} representam cerca de 85 a 90% das células NK circulantes, expressam altos níveis de receptores KIRs e CD16 e possuem potente função citotóxica evidenciada pelos grânulos de perforina citoplasmáticos. Já as células NK CD56^{bright} são mais escassas, correspondendo a cerca de 10% a 15% da população circulante, e estão presentes principalmente nos linfonodos e baço, expressando CD94/NKG2D, sendo

associadas à produção de altos níveis de citocinas como IFN- γ e TNF- α e baixa atividade citotóxica(37-39).

Na superfície das células NKs existem vários receptores de ativação, incluindo CD2, CD16, LFA-1, os KIRs (NKG2C e NK2GD), os receptores de citotoxicidade natural (NCR) NKp30, NKp44 e NKp46, como também de inibição (NKG2A) (40). Este tipo celular pode ser ativado por meio de patógenos ou por citocinas, como IFN tipo I, IL-12, IL-15 e IL-18 - as citocinas produzidas por leucócitos podem exercer efeito na ativação das células NK (41-42). Alguns receptores inibidores expressos por células NK se complexam ao CD94/NKG2A e reconhecem HLA-E, uma molécula não clássica de MHC classe I. O subtipo NKG2A, de sinalização inibidora, e o NKG2C, capaz de estimular a transdução de sinal ativador de citotoxicidade (43). O NKG2D é encontrado, além das células NK, em células T $\gamma\delta$ + (44) e células TCD8+ (45). Experimentos de cultura de células NK com IL-15 ou IL-2 induzem aumento da expressão de NKG2D e a apoptose de células alvos tumorais (46).

As células NK e seus receptores tem um papel importante na imunovigilância de tumores espontâneos, contudo os tumores desenvolveram mecanismos de escape da ação citotóxica das células NK, como o aumento de ligantes solúveis do receptor NKG2D necessários para a sua ativação. O NKG2D é ativado pela ligação com as moléculas A ou B de classe I do MHC (MICA/B) ou pelo reconhecimento das proteínas ligadoras de UL16 em células alvo. Entretanto, já foi descrito que os tumores podem prejudicar o reconhecimento das moléculas MICA e/ou MICB, solubilizando esses ligantes e impedindo a ligação com o receptor NKG2D, o que modula negativamente as células NK (47-48). Portanto, seria importante avaliar o perfil I de células NK, a expressão dos receptores ativação/inibição na vigência do LCCT.

1.5 Imunomodulação no LCCT: agonistas de TLRs

O estágio avançado de SS é de prognóstico sombrio, o que gera interesse no desenvolvimento de novas terapias ou adjuvantes com ação imunomoduladora para potencializar a resposta antitumoral. As estratégias de tratamento para LCCT em fase inicial, incluem tratamentos tópicos com ou sem IFN- α , enquanto na fase avançada frequentemente são tratados com quimioterápicos. Adjuvantes de resposta imune inata, como os agonistas de TLRs, têm sido amplamente abordados em pesquisas para potencializar a resposta antitumoral, utilizados em associação ou não com antígenos do tumor.

Existem cerca de 13 TLRs em mamíferos, sendo 10 presentes em humanos (49). Os TLRs podem ser extra ou intracelulares, sendo expressos por diferentes tipos celulares,

incluindo queratinócitos, neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e células epiteliais de mucosas (50-51). Os receptores TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 estão presentes na membrana plasmática e são essenciais para o reconhecimento de componentes bacterianos (50-51). Já os receptores TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 estão localizados em compartimentos endossomais e reconhecem ácidos nucleicos virais e bacterianos (52-53), estando envolvidos na resposta a viroses por serem potentes indutores de IFN tipo I. O ligante natural de TLR3 é a dupla fita de RNA viral (dsRNA), enquanto TLR7 e 8 reconhecem a fita simples de RNA viral (ssRNA) e TLR 9 o DNA não metilado rico em motivos de citosinas e guanossinas de bactérias e vírus (oligodeoxinucleotídeo CpG). Estes receptores são expressos principalmente nas APCs, sendo o TLR3 nas mDCs, o TLR7 e o TLR 9 nas DCs plasmocitóides (pDCs) e o TLR8 nas mDCs e monócitos (54).

As vias de sinalização de TLRs são reguladas por moléculas adaptadoras intracelulares, tais como MyD88, MAL, TRIF, TRAM e SARM (55). A maioria dos TLRs, com exceção de TLR3, atuam pela via MyD88, iniciando a sinalização de uma série de quinases e outras proteínas que culminam na ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1. Outros adaptadores como os membros da família de fatores de transcrição IRF (fator regulador de IFN), particularmente IRF 1, 3, 5 e 7, são ativados por MyD88 ou TRIF e são cruciais para produção de IFN tipo I (49).

Os agonistas sintéticos de TLR podem estimular de forma direta a atividade citotóxica das células NK na ausência de APCs, possivelmente por aumentar a expressão de receptores NKG2D (56), o que contribui para sua atividade citolítica(57). O reconhecimento por células NK de células tumorais K562, utilizada nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*, pode ser potencializado diretamente por ligantes de TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 e TLR9, sendo a melhor indução em resposta ao ligante de TLR3 (58).

Os agonistas de TLR, seja em uso tópico ou *in vitro*, tem mostrado ampla ação imunomoduladora e potencializam a atividade imune inata de células dos pacientes com LCCT em estágio avançado (30). Nestes pacientes, o estímulo com o agonista de TLR8, Imiquimode 3M-002, induziu o aumento da expressão de CD69 e CD25 em células NK e células T, respectivamente, e o aumento da atividade citolítica de células NK (59). Já o resiquimode, agonista para TLR7 e TLR8, expresso em células pDCs e mDCs, respectivamente, quando utilizado na forma de gel tópico, é 100 vezes mais potente para ativar a imunidade sistêmica comparado ao uso tópico de imiquimode(59).

A combinação de agonistas de TLRs com citocinas, como IFN- γ , mostra um efeito importante no tratamento de pacientes em estágios avançados de LCCT, por potencializar a

resposta imune (60). Além disto, a associação do agonista para TLR 7/8 (3M-007) com IFN- γ ou IL-15 induz a produção de citocinas por DCs, aumenta a atividade citolítica de células NK contra células tumorais e induz células TCD8+ citotóxicas (61).

Os agonistas de TLR9, CpG A e CpG B, *in vitro*, são capazes de induzir a produção de IFN- α e de aumentar a função das células NK e células TCD8+ em pacientes com LCCT avançado (62). O uso de PF-3512676 (CPG7909), outro agonista de TLR9, é capaz de promover a maturação de pDCs e aumentar a eficácia da resposta antitumoral em protocolo clínico de fase I em pacientes com MF e SS, que são refratários a outros agentes terapêuticos sistêmicos (63). Estudos de vacinação *in situ* com agonista CpG-ODN diretamente nas lesões, associados com tratamento de radiação localizada, mostrou ser eficaz para desenvolvimento de resposta antitumoral. Os resultados sugerem que a radiação local pode tornar as células T malignas mais disponíveis para o processamento antigênico pelas APCs e que a estimulação das células pDCs por CPG-ODNs, mesmo em doses subterapêuticas, induz uma resposta antitumoral. Além das evidências histológicas de regressão de lesões, há uma diminuição do número de células T reguladoras Foxp3+ e aumento de pDCs (64).

Um outro estudo evidenciou em biópsias de pele de pacientes com MF o aumento da expressão de TLRs 2, 4 e 9 (65). Nos vasos dérmicos, a presença de TLRs 4, 5 e 6 pode determinar um possível papel na sinalização de linfócitos na pele ou uma regulação positiva de mediadores inflamatórios que atuam durante o ciclo da doença (66).

Esses dados salientam a importância de estimular a resposta inata, seja por imidazoquinolinas ou CpG, em combinação com modificadores biológicos, para potencializar a resposta imune de pacientes com LCCT em estágio avançado (eritrodermia e células T malignas circulantes). Além disto, a utilização dos adjuvantes em fases iniciais da doença pode ser uma estratégia para prevenir a anergia da resposta imunológica no LCCT.

Objetivo

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar, na Síndrome de Sézary, os subtipos de células Natural Killer e o potencial de ligantes de TLR na indução de citocinas.

2.2 Objetivos específicos

Analisar em pacientes com Síndrome de Sézary comparando com indivíduos saudáveis:

- Frequência e expressão de moléculas de ativação (NKG2D/NKG2C) e inibição (NKG2A) e o receptor de citotoxicidade natural (NKp46) nos subtipos de células NK,
- Frequência de células NK secretoras de TNF, IFN- γ e CD107a em resposta aos ligantes de TLR 4, 7/8 e 9 em CMNs,
- Determinação de ligantes solúveis de NKG2D (MICA/B),
- Expressão de mRNA de ligantes de NK, TLRs e citocinas em CMNs,
- O potencial de resposta aos ligantes de TLR2, TLR4, TLR5, TLR7/TLR8 e TLR9 em CMNs na produção de IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10.
- Dosagem sérica de citocinas.

Métodos

3. MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram selecionados 14 pacientes com SS (7 homens, 7 mulheres), com 48-85 anos de idade provenientes do Ambulatório de Linfomas Cutâneos da Divisão Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, e um grupo controle com 22 indivíduos saudáveis (11 homens, 11 mulheres, idade de 48-75) provenientes do Laboratório de Investigação Médica unidade 56 da Faculdade de Medicina da USP, que não apresentaram história de doença dermatológica. Foram excluídas as amostras do grupo controle que utilizavam drogas imunossupressoras e imunomodificadoras, mulheres grávidas e menores de 18 anos de idade.

O critério de seleção utilizado foi o proposto pelas organizações EORTC e ISLC (4-5): presença de células de Sezary $\geq 1000\text{mm}^3$, clone predominante de células T no sangue periférico, clone idêntico ao circulante identificado na pele e razão de CD4: CD8 circulantes ≥ 10 associados com as avaliações clínicas. Exames de imunofenotipagem de CD4+CD7- ($\geq 40\%$) e CD4+CD26- ($\geq 30\%$) também foram considerados. As amostras de sangue periférico foram obtidas previamente ao tratamento dos pacientes.

Os pacientes e os indivíduos controles saudáveis foram submetidos ao termo de consentimento e livre esclarecido para posterior inclusão no estudo. Todos informados do conteúdo da pesquisa, assinando um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo (CAAE, 07965312.0.0000.0068).

3.2 Obtenção de células mononucleares (CMNs) do sangue periférico

Para obtenção de CMNs, amostras de sangue periférico dos indivíduos foram coletadas em tubos heparinizados e diluídas com solução fisiológica, volume a volume. As suspensões das CMNs foram obtidas após centrifugação por 20 minutos a 2200 rpm, através de gradiente de concentração Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, EUA). As células obtidas foram quantificadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada de acordo com o ensaio realizado.

3.3 Avaliação fenotípica de células NK do sangue periférico

Foi coletado aproximadamente 5 mL de sangue periférico por punção venosa em tubos contendo EDTA. Para identificação de células NK, a marcação fenotípica das células foi realizada com a adição dos anticorpos descritos no **Quadro 1**, em 140µL de sangue e posterior incubação por 20 minutos à temperatura ambiente no abrigo de luz. Antes da marcação das células, as hemácias foram lisadas com a solução BD FACSTTM Lysing Solution (BD Biosciences) por 15 minutos à temperatura ambiente.

Após a marcação das células, 300.000 eventos foram adquiridos em citômetro de fluxo Fortessa (LSR Fortessa, BD, Califórnia, USA) com auxílio do software Diva (BD – USA). A análise das células foi realizada através do software Flow Jo (Try Star – USA).

Quadro 1: Pannel de anticorpos para marcação de células NK de sangue periférico

Anticorpo	Fluorocromo	Clone
CD3	BV605	SK7
CD19	V-500	HIB19
CD56	Alexa Fluor 647	3G8
CD16	APC-CY7	RUO
NKG2D	PECY-7	149810
NKG2A	PE	131412
NKG2C	FITC	13459

3.4 Análise das sub-populações de células NK funcionais após estímulos por citometria multiparamétrica

Para avaliar o efeito da ativação via TLRs na citotoxicidade das células NK, foram realizadas culturas de CMN estimuladas com agonistas de TLR4 (lipopolissacáride), TLR7/8 (composto CL097) e TLR9 (oligo de oxinucleotídeos CpG). O perfil funcional das células NK foram avaliadas pela expressão de IFN- γ , TNF e CD107a. Para tal, as CMNs (10^6 células/500 µL) foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado (GIBCO) com 10% de soro AB (Sigma Aldrich, St Louis, USA) em placas de 48 poços (Corning-Costar, Cambridge, MA, USA) na presença de agonistas de TLR4 (2.50 µL/mL), TLR7/8 (5 µL/mL) e TLR9 (8µmol L) (InvivoGen, San Diego, CA, USA) ou como controle positivo utilizou-se forbol 12-miristato, 13-acetato (PMA 50ng/mL, Sigma Aldrich) e Ionomicina (1µg/mL, Sigma Aldrich)

por 6 horas 37°C em estufa a 5% de CO₂. No início da cultura adicionou-se o anticorpo anti-CD107a (5uL - PE-CP 5.5) humano (BD Biosciences, San Jose,CA) e após 2 horas, adicionou-se a brefeldina, (5µL/mL, Sigma Aldrich). Posteriormente, as células foram incubadas com IgG humana para evitar ligação inespecífica, e em seguida, submetidas à marcação extra e intracelular com os anticorpos descritos no **Quadro 2**. Além do marcador de viabilidade LIVE/DEAD (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 20 minutos à 4°C. As células foram lavadas com PBS 1%, fixadas e permeabilizadas em tampão (Fix Perm A e B, Caltag Lab. Inc). A técnica do FMO (*Fluorescence minus one*) foi realizada a fim de definir a intensidade de fluorescência correspondente ao positivo de cada marcador. Posteriormente, as células foram ressuspensas em solução isotônica e a aquisição de 200.000 eventos foi adquirido em citômetro de fluxo Fortessa (LSR Fortessa, BD, Califórnia, USA) com auxílio do software Diva (BD – USA). As análises foram com o programa Flow Jo (Try Star – USA).

Quadro 2: Pannel de anticorpos para marcação de células NK em CMNs

Anticorpo	Fluorocromo	Clone
CD3	BV605	SK7
CD19	V-500	HIB19
CD56	AlexaFluor 647	3G8
CD16	APC-CY7	RUO
CD107a	PE-Cy5	H4A3
IFN γ	V450	B27
TNF	PE-CY7	MAb11

3.5 Cultura celular

As CMNs foram isoladas a partir de sangue venoso heparinizado por centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e diluídas em meio RPMI suplementado com soro humano AB à 10% (Sigma, St Louis, MO, EUA). Culturas de PBMC ($2,0 \times 10^5$ células / poço) foram incubadas em microplacas de 96 poços (Costar, Cambridge, MA, U.S.A.) em meio na presença Agonistas de receptor Toll-like: TLR2 (pam3csk4, 0,5 g/mL); TLR3 poli (I: C) -RIG, 20 ng/mL; TLR4 (LPS, 1,25 µg/mL); TLR5 (flagelina, 0,5 ng/mL); TLR7 (imiquimod, 1,25 g/mL); TLR7 / TLR8 (CL097, 2,5 µg/mL) e TLR9 (CpGA 2206,4 mol/L) durante 48 h à 37 ° C e 5% de CO₂. Todos os ligantes foram obtidos da InvivoGen (San Diego, CA, U.S.A.). Os sobrenadantes livres de células foram colhidos e

armazenados à -80 ° C até as medições de citocinas. Os kits para mensurar as citocinas foram procedentes da BD Biosciences, CA, USA). As amostras foram avaliadas em citometria de fluxo (LSR Fortessa, BD, San Jose, CA, EUA).

Em resumo, os sobrenadantes e os padrões de citocinas foram incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações, foi acrescentado 1mL da solução de lavagem e centrifugado por 10 minutos à 1100 rpm. O sobrenadante foi desprezado e com 300µL da solução de lavagem as amostras foram ressuspendidas para as aquisições em citômetro de fluxo, LSR Fortessa (BD Biosciences). Os resultados foram gerados em formato gráfico tabular utilizando o BD CBA Analysis Software.

3.6 Análise da expressão constitutiva de mRNA por PCR em tempo real:

A expressão de mRNA para TLRs e citocinas foi avaliada por PCR em tempo real, utilizando os iniciadores conforme descrito no quadro 3 .A extração de RNA total de CMNs foi obtida com o auxílio dos kits RNeasy Plus Mini Kit (QiagenValência, CA, EUA). Os níveis de RNA mensurados com auxílio do espectrofotômetro nanodrop (Thermo Scientific, EUA). Para obtenção de cDNA a partir do RNA total foi utilizada a metodologia do kit iScript cDNA synthesis (Bio-Rad). Para a realização da reação de amplificação em tempo real foi utilizado o termociclador 7500 (Applied Biosystem), para cada amostra: 5µL cDNA (30ng/µL), 7µL da solução *SYBR[®]Green* (AppliedBiosystem) e 2µL (10µM) dos *primers* sense e anti-sense. Os iniciadores de TLRs, citocinas e controle interno (GAPDH) foram sintetizados pela Invitrogen.

Quadro 3: Pannel de iniciadores utilizados para q-PCR

NKG2D	F:CTGGTGAAGTCATATCATTGGATGG R:GCTCGAGGCATAGCGTGACAG
MICA	F: CAGCCCCACAGTCTTCGTTA R:GAGGTCCTTTCCGTTCCCTG
ULBP-2	F: ATTCTTCCGTACCTGCTATT R:GCTATCCTTCTCCCACTTCT

HLA-E	F: TCTACCCTGCGGAGATCACA R:TCGCTCCACTCAGCCTTAGA
TLR 2	F: TCAGCCTCTCCAAGGAAGAA R:AATGTTCAAGACTGCCCAGG
TLR 3	F:GTGCCAGAACTTCCCATGT R:TCCAGCTGAACCTGAGTTCC
TLR 4	F: CAGAGTTTCCTGCAATGGATCA R: GCTTATCTGAAGGTGTTGCACA
TLR 7	F: AATGTCACAGCCGTCCCTAC R: GCGCATCAAAAGCATTTACA
TLR 8	F:TGTGATGGTGGTGCTTCAAT R:ATGCCCCAGAGGCTATTTCT
TLR 9	F:GGGAGGAAGCTGCTAAGCTC R:CTGGGAAGGACCAAGACCAC
IFN-α	F : AAATACAGCCCTTGTGCCTGG R : GGTGAGCTGGCATAACGAATCA
IFN-β	F:GGCTGGCCCTGTGATATTTCTGTG R:ACCTGGCTCTCCTCCTCC CTCCT
IFN-λ	F:CGCCTTGGAAGAGTCACTCA R:GAAGCCTCAGGTCCCAATTC
IFN-γ	F:TTTCATGCCTGGTGCTTCCA R:GCTAAGAAGACTCCCCCTCCCTA
TNF-α	F:CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC R: GCTTGAGGGTTTGCTACAACAT
IL-10	F: CAGGGCACCCAGTCTGAG R: CACATGCGCCTTGATGTCT
IL-6	F:CCTGAGAAAGGAGACATGTAA

	R:GGCAAGTCTCCTCATTGAATCC
GAPDH	F: GAA GGT GAA GGT CGG AGT R:GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC

3.7 Determinação de ligantes solúveis de NK

Foi determinado no soro de indivíduos saudáveis e com SS os níveis de MICA, MICB e ULBP (ligantes de NKG2D) pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) utilizando o kit R&D Systems (Wiesbaden, German).

3.8 Análises estatísticas

Os dados foram analisados no software GraphPad Prism (versão 5.0). A correlação estatística entre os grupos foi realizada utilizando o teste não paramétrico *Man-Whitney* e *Wilcoxon* para teste intra-grupos.

Todas as comparações que resultaram em $P \leq 0.05$ foram consideradas significantes. Os dados foram representados com medianas e interquartis.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Características dos indivíduos envolvidos no estudo

Foram selecionados 14 pacientes diagnosticados com Síndrome de Sézary cujos achados clínicos e laboratoriais no momento do diagnóstico estão descritos na **Tabela I**. Como grupo controle foram selecionados 22 indivíduos saudáveis com idade pareada ao grupo com SS.

O sexo dos pacientes com SS tem representação homogênea, sendo sete do sexo feminino e sete do masculino. Todos os pacientes (100% - 14/14) apresentaram eritrodermia e intenso prurido. Apenas 13% (2/14) encontravam-se ectrópios, 76% (10/14) com hiperqueratose palmo-plantar, 71% (10/14) com linfonodomegalia palpável, sendo 38% (5/13) com confirmação por tomografia computadorizada.

A pesquisa de clones predominantes no sangue periférico é um dos critérios para diagnóstico dos pacientes com SS, sendo positiva para 80% dos pacientes. O clone circulante foi identificado em biópsias de pele em 61% dos indivíduos avaliados. Os achados laboratoriais considerados no diagnóstico foram: contagem absoluta de células de Sézary (9/14), proporção de células $CD4/CD8 \geq 10$ (11/14) e $CD4+CD26^- \geq 30\%$ (13/14) e $CD4+CD7^- \geq 40\%$ (7/14). Em 1 paciente (SS19) a pesquisa de clonalidade de células T foi negativa (os probes utilizados em nossos serviços provavelmente não englobaram o clone presente desse paciente, contudo, os demais achados clínicos e laboratoriais concluíram o diagnóstico de síndrome de Sézary).

Outros achados como leucocitose (10/14), linfocitose (10/14) e contagem absoluta de $CD4^+$ (13/14) foram observados na maior parte dos indivíduos, condizente com a expansão de células malignas. A contagem de linfócitos $TCD8^+$ absoluta mostrou-se abaixo dos valores normativos (12/13) dos indivíduos avaliados. Eosinofilia (4/14) e valores elevados da enzima lactato desidrogenase (DHL) (11/14) foram observados no grupo SS, e podem ser correlacionados com a progressão da doença.

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com SS

PCT	Idade	Sexo	Céls. Sézary mm ³	CD4/CD8	Clonalidade Sangue/Pele/ linfo	DHL UI/L	Eosinófilos mm ³	Linfócitos(10³)
1	75	F	Sim	55.3	+/+/+	1.19	140	10
2	55	F	Não	48	+/+Nr	1.23	190	21
3	56	M	Não	28	+Nr/Nr	1.55	300	0.9
4	70	M	Sim	31	+N/Nr	1.36	1100	2,2
7	57	M	Sim	18	+/+Nr	1,74	50	3,4
8	68	M	Sim	22	+Nr/+	1	80	6,8
9	69	F	Não	6	+/+Nr	1	120	3
10	56	M	Sim	23	+/+/+	1,84	0	7,6
11	62	M	Sim	24	+/+/+	2,53	210	8,6
13	48	M	Sim	48	+/+/+	3,39	15750	21
14	55	M	Não	5.14	N/N/N	2,25	6290	4,1
15	60	F	Sim	24	+/+/+	1,7	0	131
16	65	F	Não	22.5	-	1.76	150	3,7
19	58	F	Sim	2	-	1,57	280	3

Valores de referência para: Linfócitos ($\times 10^3$) 0,9-3,4/mm³; Células de Sézary $\geq 1000/\text{mm}^3$; CD4 abs. ($\times 10^3$) 0,5-1,7/mm³; CD26 e CD7 em linfócitos TCD4+; TCD8+ abs. 330-1460/mm³; eosinófilos 50-500/mm³; DHL (Desidrogenase Láctea) para mulheres 240-480/UI/L e para homens 135-225/UI/L; nr= não realizado.

4.2 Perfil fenotípico das células NK no sangue periférico de pacientes com SS

Considerando o papel relevante das células *Natural Killer* (NKs) na imunidade inata em função de seu desempenho citotóxico/secretor, avaliamos os subtipos de células NK, a expressão de receptor inibidor NKG2A e ativadores NKG2C, NKG2D e NKp46 no sangue periférico de pacientes com SS e do grupo de indivíduos controles saudáveis (CTRL).

A **Figura 1** ilustra a estratégia de análise utilizada para avaliar a frequência de diferentes receptores nas subpopulações de células NK. A frequência da população de células NKCD56^{bright} no sangue periférico, mostra similaridade entre os grupos SS e CTRL, porém uma frequência reduzida da população de células NK CD56^{dim}CD16⁻ no grupo SS em relação ao grupo CTRL (**Figura 2**).

A **Figura 3** mostra a expressão de receptores na população CD56^{bright}CD16⁻. Pode-se observar uma diminuição da frequência de células NKCD56^{bright}CD16⁻ que expressam receptores ativadores NKG2D e NKG2C do grupo SS, em relação ao grupo CTRL, porém não foram observadas diferenças na mediana de intensidade de fluorescência (MFI) destes mesmos receptores nas células NK dos pacientes com SS. Este achado mostra que apesar dos receptores de ativação NKG2D e NKG2C estarem em menor número de células nos pacientes com SS, sua intensidade de expressão é equivalente ao grupo controle, podendo indicar um mecanismo compensatório.

Similarmente, a frequência de células CD56^{dim}CD16⁻ que expressam NKG2D e NKG2C esta diminuída nos pacientes com SS quando comparados ao grupo CTRL (**Figura 4**), porém os níveis destes receptores se igualam aos níveis dos controles quando avaliada a intensidade média de fluorescência. Nas populações CD56^{bright} e CD56^{dim} não foi observada alteração na expressão de NKG2A e NKp46.

A expressão do RNAm para o NKG2D, e seus ligantes MICA e ULBP-2, como também o ligante para NKG2A (HLA-E), foram analisados em células mononucleares do sangue periférico (CMN). A expressão de RNAm para NKG2D em CMNs está diminuída no grupo SS em relação ao controle. Assim como o RNAm de HLA-E, ligante principal para o receptor inibidor CD94/NKG2A está diminuído nas CMNs do grupo com SS (**Figura 5**). Os demais transcritos analisados (MICA e ULBP-2) não diferiram entre os grupos (**Figura 5**).

Esses dados, em conjunto, evidenciam nos pacientes SS, uma diminuição na frequência do subtipo CD56^{dim}CD16⁻, redução na frequência dos receptores de ativação e manutenção da expressão do receptor inibidor NKG2A e o receptor de citotoxicidade Natural NKp46 em ambas as populações.

Figura 1. Estratégia de gate para análise das células NK do sangue periférico

As células NK foram analisadas dentro da população CD3⁻ e CD19⁻ para exclusão de células T e células B, respectivamente. Em seguida selecionou-se a população CD56⁺ total, permitindo avaliar as populações de células NK CD56^{bright}CD16⁻ e CD56^{dim}CD16⁺. A estratégia ilustra um indivíduo controle quanto a expressão dos receptores NKG2C/CD94, NKG2A/CD94, NKG2D e NKP46.

Figura 2. Frequência das populações de células NK, CD56^{bright} e CD56^{dim} no sangue periférico

As células NK foram analisadas por citometria de fluxo, em amostras do sangue periférico de indivíduos controles saudáveis (CTRL, n=22) e de pacientes com Síndrome de Sézary (SS, n=11). Os dados estão representados como mediana e interquartis. ** $p \leq 0,01$.

Figura 3. Frequência dos receptores de ativação e inibição em células NK CD56^{bright}CD16⁻

Receptores de células NK foram analisados por citometria de fluxo, em amostras do sangue periférico de indivíduos controles saudáveis (CTRL, n=21) ou de pacientes com Síndrome de Sézary (SS, n=5-11). A) frequência de NKG2D, NKG2C, Nkp46 e NKG2A. B) intensidade mediana de fluorescência (MFI) de NKG2D, NKG2C, e NKP46. Os dados estão representados como mediana e interquartis. ** $p \leq 0,01$

Figura 4. Frequência dos receptores de ativação e inibição em células NK CD56^{dim}CD16⁻

Os receptores de células NK foram analisados por citometria de fluxo, em amostras do sangue periférico de indivíduos controles saudáveis (CTRL, n=21) ou de pacientes com Síndrome de Sézary (SS, n=5-11). A) Frequência de NKG2D, NKG2C, NKp46 e NKG2A e B) intensidade mediana de fluorescência (MFI) de NKG2D, NKG2C, NKp46. Os dados estão representados como mediana e interquartil. ** $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Figura 5. Expressão constitutiva de RNAm de NKG2D e ligantes

Células mononucleares de pacientes Sézary (n=7) e indivíduos saudáveis (CTRL, n=8-11) foram analisadas por PCR em tempo real quanto à expressão de NKG2D, seus ligantes MICA e ULBP-2 e o ligante de NKG2A, HLA-E. A expressão está representada com mediana. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

4.4 Expressão de citocinas IFN- γ , TNF e da molécula CD107a em células NK estimuladas com agonista de receptores *Toll-like* (TLR)

A **Figura 7** ilustra a estratégia de análise para a avaliação de células NKCD56^{bright}CD16⁻ e CD56^{dim}CD16⁺ após estímulo com os ligantes de TLR4 (LPS), TLR7/8 (CL097) e TLR9 (CpGA), além dos estímulos inespecíficos PMA e Ionomicina, em cultura de CMNs. A produção de IFN- γ e TNF, além da molécula de desgranulação CD107a foi analisada em ambas as populações de células NK do grupo controle e de pacientes SS por citometria de fluxo.

Na população NK CD56^{bright}CD16⁻ foi verificado um aumento na frequência de produção de CD107a e do TNF induzidos pela ativação via TLR7/8 no grupo SS em relação ao grupo CTRL (**Figuras 8A e 8C**). Contudo, comparado aos níveis basais, o estímulo com ligantes de TLRs não induziu a produção de citocinas, em ambos os grupos analisados, exceto para a produção de TNF induzido pelo agonista de TLR4 no grupo CTRL. A estimulação com PMA e Ionomicina, que utiliza a via da proteína quinase C (PKC), nas células NK CD56^{bright}CD16⁻ foi capaz de aumentar a produção de IFN- γ comparada à condição basal, mas no grupo SS houve uma redução de IFN- γ em relação ao grupo CTRL (**Figura 8B**). Além disto, a estimulação com PMA e ionomicina aumentou a produção TNF no grupo SS (**Figura 8C**).

Na população CD56^{dim}CD16⁺ foi detectado aumento de expressão de CD107a e produção de TNF no grupo SS em relação ao grupo CTRL na condição sem estímulo, (**Figuras 9A e 9C**, respectivamente). Também foi possível avaliar um aumento de CD107a em resposta à ativação via TLR4 no grupo SS comparando-se ao grupo CTRL, bem como aumento de TNF após a ativação via TLR7/8 no grupo SS **Figuras 9A e 9C**. O estímulo com PMA e inomicina induziu aumento na produção de todas as moléculas analisadas em ambos os grupos, comparado-se à sua condição sem estímulos, contudo, foi observada uma menor produção de IFN- γ , no grupo SS em comparação com o grupo CTRL, similarmente ao observado no subtipo NK CD56^{bright}CD16⁻.

Os resultados evidenciam que as células NK CD56^{dim}CD16⁺ mostram um aumento constitutivo de TNF/CD107a nos pacientes com SS e o composto CL097 é capaz de estimular produção de TNF e CD107a em células NK CD56^{bright}CD16⁻..

Figura 7. Estratégia de análise das células NK estimuladas com agonistas de TLRs

As células NK foram analisadas no gate de linfócitos, selecionadas as células viáveis pelo marcador de viabilidade, seleção da população CD3⁻ para exclusão de células T. Seleção da população CD56⁺ total, e das populações de células NK CD56^{bright}CD16⁻ e CD56^{dim}CD16⁺ para avaliar a produção de IFN-γ, TNF e CD107a.

Figura 8. Percentual de células NK CD56^{bright}CD16⁻ produtoras de CD107a, IFN-γ e TNF estimuladas com agonistas de TLRs

CMNs foram estimuladas por 6 horas com agonista de TLR4 (LPS), TLR7/8 (CL097) e TLR9 (CpGA) e PMA/Ionomomicina. As células foram avaliadas por citometria de fluxo quanto à frequência de: **A)** CD107a, **B)** IFN-γ e **C)** TNF do grupo controle (CTRL, n=21) e grupo de pacientes com Síndrome de Sézary (SS, n=11). Os valores estão representados como mediana e interquartis. * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$ quando comparados entre CTRL e SS; # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ e ### $p \leq 0,001$ comparados com a condição não estimulada.

Figura 9. Percentual de células NK CD56^{dim}CD16⁺ produtoras de CD107a, IFN-γ e TNF estimuladas com agonista de TLRs

CMNs foram estimuladas por 6 horas com agonista de TLR4 (LPS), TLR7/8 (CL097) e TLR9 (CpGA), e de PMA/Ionomomicina. As células foram avaliadas por citometria de fluxo quanto a frequência: **A)** CD107a, **B)** IFN-γ e **C)** TNF, do grupo controle (CTRL 21) e pacientes com Síndrome de Sézary (SS 11). Os valores estão representados como mediana e interquartis. * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$ quando comparados entre CTRL e SS; # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ e ### $p \leq 0,001$ comparados com a condição não estimulada

4.5 Análise da expressão constitutiva de mRNA de TLRs

A partir das diferenças observadas na resposta da produção de citocinas após estímulo dos receptores *toll-like* (TLRs) em subtipos celulares dos grupos SS e controle, viu-se a necessidade de analisar a expressão destes TLR, constitutivamente nos dois grupos. O perfil de expressão de RNAm dos receptores TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 e TLR9, foi avaliado em amostras de CMNs de pacientes Szary e indivduos saudveis por PCR em tempo real. A expresso de RNAm dos TLRs se mostrou similar entre os grupos para todos os TLRs avaliados. (**Figura 10**).

Figura 10. Expresso constitutiva de RNAm de TLRs

SS (SS, n=8-9) (CTRL, n=12-14) foram analisadas por PCR em tempo real. A expresso est representada como mediana.

4.6 Avaliao srica de citocinas em pacientes com sndrome de Szary

Avaliamos os nveis sricos de IL-2, IL-1, IL-6, TNF-, IL-17a, IL-5, IL-10, e TGF- de indivduos com SS e grupo controle por citometria de fluxo, atravs do mtodo de *cytometry bead array* (CBA).

Os nveis de IL-5, IL-6 e IL-10 foram elevados no grupo SS quando comparados ao grupo controle (**Figura 11**) j os nveis de IL-1, IL-2, IL-17a, TNF- e TGF-, foram similares entre os grupos.

Figura 11. Níveis séricos de citocinas

O soro de indivíduos saudáveis (CTRL, n=21) e pacientes com Síndrome de Sézary (SS, n=12) foi determinado quanto à presença de IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, TNF, IL-17a e TGF- β pelo método de *cytometry bead array* por citometria de fluxo. Os valores estão representados com mediana e interquartis. *p $\leq$ 0,05 e ***p $\leq$ 0,001.

4.7 Análise da expressão e secreção de interferon tipo I em CMN

O perfil de expressão constitutiva de RNAm de citocinas foi avaliado em amostras de CMNs de pacientes Sézary e indivíduos saudáveis por PCR em tempo real. A expressão de RNAm de citocinas mostrou aumento de IFN- α , IFN- β e IFN- λ nos pacientes SS em relação com grupo CTRL (**Figura 12A**). A produção de IFN tipo I foi parcialmente restaurada quando estimulada com os agonistas de TLR7/8 e TLR9 no grupo com SS, contudo, em níveis inferiores ao grupo CTRL (**Figura 12B**).

Figura 12. Expressão constitutiva de RNAm IFNs e produção de IFN- α induzida por agonistas de TLR

A) Pacientes com Szary (SS, n=12) e indivduos saudveis (CTRL, n=14) foram analisadas por PCR em tempo real, **B)** CMN de indivduos saudveis (CTRL, n=13) e pacientes com Sndrome de Szary (SS, n=10) foram cultivadas em meio de cultura (no estimuladas) ou com agonistas de TLR (TLR3, 7/8 e 9) por 48 horas. Os sobrenadantes foram avaliados quanto a secreo de IFNs, pelo mtodo de *cytometry bead array* por citometria de fluxo. Os resultados so mostrados como medianas e intervalos interquartis (IQRs). * $P \leq 0.05$ em comparao com o grupo CTRL; # $P \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$ em comparao com a cultura no estimulada.

4.8 Avaliação do perfil de produção de citocinas por CMNs induzidas por agonistas de TLR.

Os níveis de produção de citocinas (IL-6, TNF, IFN- γ , IL-10) por CMNs induzidas por agonistas extra (TLRs 2, 4 e 5) e intracelulares (TRLs 3, 7, 7/8 e 9) de TLRs foram determinados em pacientes SS.

Na **Figura 13**, pode-se observar que os níveis de secreção não estimulada de IL-6 estão diminuídos no grupo SS comparados aos controles. Já com os estímulos de agonistas extracelulares, como TLR2 e TLR4, eles foram capazes de induzir níveis elevados de IL-6, mas em níveis inferiores que o grupo controle, esses agonistas foram capazes de restaurar a secreção de TNF no grupo SS. O estímulo com o agonista de TLR5 não foi capaz de induzir secreção de citocinas, mesmo no grupo controle.

Quanto aos estímulos com agonistas de TLRs intracelulares a secreção de IL-6 e TNF estão diminuídas para TLR3, TLR7 e TLR9, exceto para o ligante de TLR7/8 que foi capaz de induzir a secreção de ambas às citocinas no grupo SS.

A **Figura 14** mostra que há uma reduzida secreção de IFN- γ , induzida por agonistas extra ou intracelulares no grupo com SS, contudo, o agonista de TLR7/8 estimulou a produção de citocina, embora em baixos níveis comparado com o grupo CTRL. Já para IL-10, os agonistas de TLR2 e TLR4 foram capazes de induzir sua secreção, principalmente via TLR4 no grupo com SS (**Figura 14**). Porém, para os estímulos de TLRs intracelulares, somente o ligante de TLR7/8 estimulou a produção de IL-10 dos pacientes com SS.

Os resultados evidenciam que os agonistas de TLR2, TLR4 e TLR7/8 são capazes de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF, citocinas Th1 (IFN- γ) e reguladora (IL-10) de CMNs de pacientes com SS.

Figura 13. Perfil de produção de citocinas por CMN induzidas por agonistas de TLRs

CMN de indivíduos saudáveis (CTRL, n=13) e pacientes com Síndrome de Sézary (SS, n=10) foram cultivadas em meio (não estimuladas) ou com agonistas de TLR extracelulares (TLR2, TLR4 e TLR5) ou TLR intracelulares (TLR3, TLR7, TLR7/TLR8 e TLR9) por 48 horas. Os sobrenadantes foram avaliados quanto a secreção de IL-6 e TNF pelo método de *cytometrybeadarray* por citometria de fluxo. Os resultados são mostrados como medianas e intervalos interquartis (IQRs). * $P \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ em comparação com o grupo HC; # $P \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$ em comparação com a cultura não estimulada.

Figura 14. Perfil de produção de citocinas por CMN induzidas por agonistas de TLRs CMN de indivíduos saudáveis (CTRL, n=13) e pacientes com Síndrome de Sézary (SS, n=10) foram cultivadas em meio (não estimuladas) ou com agonistas de TLR extracelulares (TLR2, TLR4 e TLR5) ou TLR intracelulares (TLR3, TLR7, TLR7/TLR8 e TLR9) por 48 horas. Os sobrenadantes foram avaliados quanto a secreção de IFN- γ e IL-10 pelo método de *cytometrybeadarray* por citometria de fluxo. Os resultados são mostrados como medianas e intervalos interquartis (IQRs). * $P \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ em comparação com o grupo HC; # $P \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$ em comparação com a cultura não estimulada.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A grande maioria dos estudos que se tem sobre a Síndrome de Sézary, avaliam as células tumorais de Sézary, enquanto poucos trabalhos evidenciam a imunidade inata do paciente. A nossa proposta foi analisar os componentes do sistema imune inato, com ênfase nas células Natural Killer (NK), avaliando o fenótipo e a expressão de receptores de ativação/inibição. Além disto, avaliar o potencial de resposta das células NK aos ligantes de receptores Toll-like (TLRs) em células mononucleares de sangue periférico (CMNs) de pacientes com SS e indivíduos controles saudáveis.

5.1 Perfil fenotípico das células NK na síndrome de Sézary

As células NK são essenciais na resposta imune contra células tumorais e na resposta antiviral. Neste contexto, as populações de células NK do sangue periférico: CD3-CD19-CD56+CD16^{bright} e a CD3-CD19-CD56+CD16^{dim}, foram avaliadas quanto à frequência dos receptores de ativação NKG2D, NKG2C, do receptor inibidor NKG2A e também do receptor de citotoxicidade natural Nkp46.

O percentual do subtipo NK CD56^{dim} foi diminuído nos pacientes com SS, contudo, tem sido descrito que as células NK totais são funcionais e capazes de induzir a desgranulação da molécula CD107a (47). A porcentagem de células NK do sangue periférico tem sido relatada por estar diminuída nos pacientes SS, porém, neste estudo, os autores não identificam o subtipo de células NK(67). Além disto, foi observado que os pacientes com SS possuem um decréscimo no número de células dendríticas (DCs) circulantes, o que pode contribuir para a imunidade celular deprimida, como também na diminuição da resposta Th1 (61).

Quanto à expressão dos receptores, nosso trabalho evidenciou que, em ambas as populações de células NK, há diminuição da expressão de NKG2D e NKG2C nos pacientes com SS. Apesar da população de células NK CD56^{bright} não mostrar alteração percentual, houve importante diminuição da expressão dos receptores ativadores. Além disto, 3 pacientes (SS2, SS11 e SS16) tiveram um percentual de NKG2D nas células NK CD56^{bright} abaixo de 10%. Já na população de células NK CD56^{dim}, outros 2 pacientes (SS7 e SS13) mostraram diminuição percentual acentuada deste mesmo receptor.

O NKG2D é o principal receptor de ativação expresso em células NK e TCD8+, populações celulares cruciais durante os eventos de vigilância imunológica do tumor (48). A diminuição dos receptores de ativação em ambas as populações de células NK nos pacientes SS, sugere um possível mecanismo de escape, que pode diminuir o desempenho das células

NK, prejudicando a imunidade do hospedeiro contra às células tumorais e, desta forma, facilitando sua expansão.

Considerando que o receptor NKG2D é capaz de ativar as células efectoras pelo reconhecimento das moléculas relacionadas ao MHC classe I, como o MICB (MHC classe I polypeptide-related sequence B) ou MICA ou pelas proteínas UL16 (ULBP) nas células alvo, (40) é possível que os ligantes solúveis possam alterar a citotoxicidade das células NK, impedindo-as de se ligarem às células alvo. Geralmente, as células tumorais expressam moléculas MICA/MICB e as solubilizam, como um mecanismo de escape tumoral (68), (48).

De fato, foi detectado sericamente, altas concentrações de MICB solúvel (sMICB) nos pacientes SS quando comparados ao grupo controle. Além disto, houve correlação inversa entre os níveis de sMICB com o percentual de células NK CD56brightCD16⁻ NKG2D⁺, indicando que quanto maior a concentração de sMICB menor é o percentual das células NK NKG2D⁺. Os níveis séricos de sMICA foram detectáveis em apenas 3/15 pacientes com SS (SS2, SS7 e SS11), os quais, coincidentemente, foram os mesmos que mostraram níveis mais elevados de sMICB. É possível que os ligantes solúveis de MICA/MICB sejam produzidos pelas células TCD4⁺ tumorais de Sézary, as quais regulam negativamente as células NK. Nós também verificamos que outro receptor de ativação, o NKG2C, também está regulado negativamente nas células NK de pacientes com SS. Pouco é descrito sobre a influência desse receptor em casos de CTCL. O receptor NKG2C tem sido descrito em infecções latentes de citomegalovirus humano (HCMV), onde há expansão das células NK NKG2C⁺ e aumento na citotoxicidade. Este fato pode ser benéfico no início da doença, por não permitir a progressão de malignidades hematológicas, caracterizada por elevada expressão de HLA-E (69). Contudo, há descrição de aumento de células NK NKG2C⁺ na leucemia crônica linfocítica de pacientes soropositivos ao HCMV(70).

Elevada soropositividade ao CMV tem sido descrita na MF e SS, tanto nos estágios precoces da doença, como também em indivíduos saudáveis de acordo com o envelhecimento e em controles imunocomprometidos (71). Contudo, estudando uma coorte de pacientes de idade, sexo e raça similares de controles sadios, foi observado que a soropositividade não está elevada nos pacientes SS (72). De fato, a soroprevalência ao CMV é dependente de fatores geográficos, idade e imunocomprometimento. É possível que a expansão de células NK NKG2C⁺ observado nos nossos pacientes com SS, pode ter sido gerada pelo HCMV, onde grande maioria é soropositiva.

A expressão do receptor NKp46 dos pacientes com SS mostrou-se similar aos controles saudáveis em ambas populações de células NK. Esse receptor está diretamente

envolvido no reconhecimento da célula alvo (73). Em pacientes com SS, tem sido descrito diminuição de NKp46 em uma amostragem de 3/6 pacientes com mediana de 40,2% e de 51% em 21 controles (47), sugerindo que a baixa expressão nas células NKCD3-CD56+, pode prejudicar a resposta do hospedeiro. O receptor NKp46 também é expresso em células malignas TCD4+CD158k /KIR3DL2 em pacientes com SS, porém não é expresso em células TCD8+(74). Em um estudo realizado por microdissecção a laser combinado com qPCR, mostrou aumento de expressão de NKp46 em células TCD4+ residentes na pele de MF e de SS(75).

A expressão do receptor de inibição NKG2A não se alterou nas populações de células NK nos pacientes SS em relação aos indivíduos controles. Nas células NK há um equilíbrio de expressão entre os receptores ativadores os receptores inibidores, os quais são capazes de reconhecer células normais e não induzir resposta citotóxica (76). Em pacientes com leucemia mieloide aguda, há um aumento na expressão de NKG2A e a diminuição de NKp46 em células NKCD56+do sangue periférico, o que evidencia um desequilíbrio de expressão dos receptores, sugerindo ser um mecanismo de evasão da vigilância imunológica (73).

Nos pacientes com SS, foi evidenciado expressão dos receptores em células NK alterados, com menor frequência de células NK NKG2D+. Além disto, os níveis séricos elevados de ligante de NKG2D, MICB, pode representar um mecanismo de escape à ação antitumoral.

5.2 Ativação das células NK por ligantes de TLRs na Síndrome de Sézary

Na avaliação da resposta funcional das células NK nos pacientes SS, foram analisados a expressão do marcador de desgranulação CD107a, e as citocinas TNF e IFN- γ , após ativação com os agonistas das vias TLR4, TLR7/8 e TLR9, ou por estímulo com PMA/Ionomicina. Já na condição sem estímulo, detectamos um aumento da expressão de CD107a e TNF nas células NKCD56^{bright} nos pacientes SS. Embora não tenhamos avaliado a atividade funcional contra as células tumorais, a evidência de aumento da expressão do marcador de desgranulação, sugere que as células NK estão mais ativadas no sangue periférico, sugerido uma tentativa de combater as células tumorais ou infectadas por vírus.

As células NK de pacientes SS são descritas por serem capazes de agir contra as células tumorais K562, com aumento da expressão de CD107a, similarmente ao controle sadio (47). Nós observamos que a estimulação com o agonista de TLR7/8, CL097, é capaz de

aumentar a produção de CD107a e TNF em células NKCD56^{bright} e de TNF nas células CD56^{dim} nos pacientes com SS. Esta ação adjuvante do CL097, pode ser uma via para potencializar a resposta citotóxica das células NK nos pacientes com SS.

Além disto, a estimulação com PMA e ionomicina, que induz a sinalização via PKC, também foi capaz de promover a produção de TNF pelas células NK CD56^{bright} nos pacientes com SS. A capacidade de secreção de TNF por células NK em resposta aos estímulos TLR7/8 e PMA, ainda não foram abordadas na literatura. Contudo, foi relatado que a secreção de TNF em células NK, é capaz de aumentar a expressão da molécula de apoptose Fas nas células tumorais, o que pode proporcionar a interação Fas/FasL, consequentemente eliminando a célula maligna (77). É possível que este potencial de imunidade inata seja uma alternativa em função da diminuição de outros componentes da imunidade adaptativa, como as células T. Na SS há uma resistência aos efeitos pró-apoptóticos de TNF- α em células malignas, devido à redução na expressão do receptor TNFR1, e elevada expressão de gene IERF3 que inibe a produção de espécie reativa de oxigênio, capaz de induzir a apoptose celular(78).

Nossos dados evidenciam diminuição da produção de IFN- γ nas células NKCD56^{bright} e NKCD56^{dim} em resposta ao PMA/Ionomicina nos pacientes com SS em relação ao grupo controle. A diminuição de IFN- γ pelas células NK pode contribuir para a redução da resposta Th1, usualmente encontrada na SS, onde há baixa produção de IL-2 e IFN- γ , e aumento de IL-4 pelas CMNs estimuladas por fitohemaglutinina(13). Esta deficiência é parcialmente gerada pelo aumento da produção de IL-4, IL-5 e IL-10 pelas células T malignas, as quais inibem a produção de citocinas Th1 favorecendo assim a resposta Th2 (79-80).

A ativação da via intracelular STAT4 de células T virgens está diretamente relacionada com a diferenciação do perfil Th1, enquanto que o fator STAT6, é necessário para o fenotipo Th2. Nas fases iniciais da SS, em que a doença se manifesta com manchas escamosas eritematosas e placas, há super expressão de STAT4, comparando com as amostras de pele não malignas, essa expressão de STAT4 é perdida nos estágios clínicos posteriores, onde a doença adquire fenótipo predominantemente Th2 (81-82). A desregulação da expressão STAT4 pode ser significativa para o desenvolvimento e/ou progressão da SS (83).

A análise de citocinas em células NK mostrou uma ativação espontânea nos pacientes SS, ou seja, mesmo na ausência de estímulos, as células NK mostram aumento de TNF e CD107a. Contudo, há baixa responsividade aos estímulos via TLRs. Considerando a baixa resposta induzida pelos ligantes de TLRs avaliados, o nível de expressão de TLR2, TLR3,

TLR4, TLR7, TLR8 e TLR9 foram avaliados em CMNs de pacientes SS e controles. A expressão não diferiu entre os grupos, contudo pode-se perceber um aumento de RNAm de TLR2 nos pacientes SS. É possível que o aumento de expressão de TLR2 possa ser decorrente aos estímulos derivados de bactérias, considerando que em consequência do intenso prurido dos pacientes SS, ocorra ruptura da barreira epitelial, gerando uma porta de entrada às bactérias. O desenvolvimento de lesões cutâneas em MF tem sido descrito estar associado com aumento da expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 em queratinócitos, que pode desempenhar um papel na ativação crônica de linfócitos T na pele. (65)

O potencial de resposta das células NK aos agonistas de TLRs é deficitário, entretanto, o composto CL097 (agonista de TLR7/TLR8) pode atuar como importante adjuvante. Além disto, há um aumento da ativação espontânea das células NK, mesmo que em baixo percentual, nos pacientes com SS.

5.3 Avaliação do perfil de produção de citocinas por CMN induzidas por agonistas de TLRs.

A resposta das células NK aos ligantes de TLRs é deficiente, contudo, avaliamos o potencial de produção de citocinas, em CMNs de pacientes com SS. Avaliamos citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF e IFN- γ), citocinas T reguladoras (IL-10), bem como a produção de IFN do tipo I (IFN- α) antiviral, após estimulação das CMNs com agonistas de TLR extracelular e intracelular.

Os dados mostram uma produção alterada de citocinas após a ativação de TLR em pacientes SS, especialmente para a resposta induzida por agonistas intracelulares (TLR3, TLR7, TLR7/8 e TLR9). Já para os agonistas extracelulares como agonista de TLR2 e TLR4, estes foram capazes de estimular a produção de IL-6, TNF e IL-10 enquanto que o agonista de TLR7/8 mostrou um efeito adjuvante para a secreção de IFN- α , IFN- γ e IL-10.

A secreção de IL-6 e IFN- γ induzidas pelos ligantes de TLR2 e TLR4, ainda permaneceu baixa, o que pode explicar a susceptibilidade dos doentes SS para infecções bacterianas, considerando que estes ligantes de TLRs (TLR2 e TLR4) mimetizam componentes bacterianos. De fato, em pacientes com SS, a sepse por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* pode ser causada por infecções cutâneas crônicas e subsequentes às infecções sistêmicas (84).

A produção de IL-10 foi induzida por ligante e TLR2 e fortemente induzida pela ativação via TLR4 nos pacientes com SS, embora em níveis inferiores aos controles saudáveis. A ativação de TLR2 induz uma degradação do RNAm de IL-10 enquanto que a ativação de TLR4 é capaz de preservar o RNAm de IL-10 devido à ativação da sinalização de TRIF e p38, no sistema de camundongos (85).

Chama a atenção, a resposta deficiente aos agonistas de TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 em CMNs de pacientes com SS. Contudo, houve a ativação com o agonista de TLR7/8, o CL097, um derivado do composto imidazoquinolina (IMQ) R848, foi capaz de recuperar a secreção de IL-6, TNF e IL-10, bem como a produção de IFN tipo I de CMNs de pacientes com SS. Considerando que a ativação via TLR7 não induziu produção de citocinas, o uso do agonista TLR7/TLR8, indica que a ativação via TLR8, foi capaz de restaurar a secreção de citocinas.

A ação adjuvante do agonista TLR9 (CpG A) na produção de IFN- α nos pacientes com SS, foi superior aos níveis detectados com CL097. Esta regulação positiva não foi observada para as demais citocinas, em contraste com a ampla atividade do CL097. Esses efeitos diversos podem ser decorrentes das distintas vias de sinalização desencadeadas por estes agonistas, pois a produção de IFN tipo I por CpG-A é mediada via PIK3 e mTOR (86), enquanto os agonistas TLR7 e TLR8 ativam IRF5 e IRF7(87). Contudo, ambos agonistas sinalizam via NF κ B, é possível que a expressão desses receptores seja diferenciada, uma vez que as DCs mieloides expressam TLR7 e TLR8, e as DCs plasmocitoides expressam TLR7 e TLR9 (88).

Como foi observado um perfil diferente de secreção de citocinas entre os agonistas TLRs extracelulares e intracelulares, avaliamos a expressão de RNAm de TLRs (TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 e TLR9). A expressão dos níveis de RNAm de TLRs em CMNs foram similares entre pacientes CTRL e SS. Considerando que até 90% dos linfócitos de pacientes com SS representam células de Sézary malignas, o que sugere que as células malignas não mostram alteração na expressão de TLRs. Ainda é preciso avaliar células malignas purificadas, com uso de marcadores como CD158k/KIR3DL2, considerado ser um marcador para as células malignas (25).

Este achado mostrou que o comprometimento da ativação de TLRs, não é devido à alteração na expressão de TLRs e pode estar relacionado com a via de sinalização ou até mesmo a um mecanismo epigenético, como a hipermetilação de promotores de genes de

citocinas. Esses mecanismos precisam ainda serem melhor investigados nos pacientes com SS.

Nossos dados mostram que a imunidade dos pacientes SS está alterada, assim como a diminuída produção de citocinas induzida por ligantes de TLRs. Contudo, a diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias e de IFN tipo I (IFN- α) e II (IFN- γ), foi parcialmente revertida por agonistas de TLR2, TLR4 e TLR7/8. Esses dados evidenciam o potencial adjuvante de agonistas de TLRs, sugerindo uma possível associação de agonistas como estratégia para potencializar a resposta imunológica.

5.4 Perfis de citocinas séricas na síndrome de Sézary

Devido ao desequilíbrio entre o perfil Th1 e Th2 na Síndrome de Sézary, averiguamos os níveis séricos de IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, TNF, IL-17a e TGF- β . Entre essas citocinas, foi identificado um aumento dos níveis séricos para IL-5, IL-6 e IL-10 nos pacientes SS comparados aos controles.

Durante a progressão da doença, tem sido observado várias anormalidades imunológicas em relação à imunidade celular em pacientes SS (89), caracterizada pela diminuição de citocinas de Th1 e da regulação negativa de genes, tais como TBX21 (T-bet), NKG7 e Rantes (12).

Os níveis séricos de IL-6 em doentes SS aumentaram 4,85 vezes em comparação com os níveis do grupo controle, é possível que as células tumorais contribuam para a secreção desta citocina. A IL-6, é secretada por monócitos, linfócitos, NK, células endoteliais, células tumorais e está relacionada com a proliferação de queratinócitos e células T (90). Em determinadas condições, como no linfoma de Hodgkin, elevados níveis de IL-6 pode estar associado com mau prognóstico (91), ou menor sobrevida de linfomas não-hodgkin (92).

O desequilíbrio da sinalização de STATs tem sido associado na patogênese de câncer, incluindo na CTCL. A ativação constitutiva de STAT5 e STAT3 é observada nos estágios precoce e tardio da CTCL, respectivamente (93).

A via Jak3/STAT3 promove a expressão de IL-5, IL-17AF e IL-10, regula a produção de fatores angiogênicos e confere resistência ao tratamento com inibidores de histona desacetilase em células T malignas (94-95). É possível que os altos níveis de IL-5 detectados em nossos pacientes com SS seja decorrente da secreção por células TCD4+ malignas, o que pode atrair os eosinófilos para a circulação periférica, considerando que a eosinofilia é um

estado freqüente em pacientes CTCL, geralmente associada com mau prognóstico (28). De fato, na MF, 78% dos pacientes com doença avançada mostram infiltração de eosinófilos, em contraste com 11% dos pacientes MF em estágios iniciais que apresentam manchas e em 48% de pacientes com placas (96).

Os níveis séricos elevados de secreção de IL-10 nos pacientes SS, pode ser em função de regulação do processo inflamatório. Contudo, há a possibilidade da IL-10 também ser secretada por células malignas e como escape para suprimir as células não malignas (11). A IL-10 e TGF- β possuem um papel crucial na evasão da resposta imune das células T malignas e desenvolvimento de imunodeficiência em CTCL (97).

A produção contínua de IL-4, IL-5 e IL-10 por células de Sézary poderia representar um mecanismo de evasão à resposta imune tumoral. Assim, a produção de citocinas Th2 pode promover a progressão da doença, uma vez que as citocinas Th2 podem inibir o efeito antitumoral (30).

A secreção de IFN tipo I e III não foi detectável nos soros, embora tenha sido empregado um método de detecção de alta sensibilidade. Desta forma, foram avaliados o perfil de expressão de RNAm para IFNs em CMNs de pacientes com SS. Apesar da expressão constitutiva de RNAm de IFN- γ , nos pacientes SS, ser similar aos controles saudáveis, a expressão de IFN de tipo I (IFN- α) e de tipo III (IFN- λ) em CMNs, mostram que em alguns pacientes há um aumento constitutivo destes IFNs (pacientes 1, 4 e 9), possivelmente não eram devido à soropositividade para infecções virais.

O papel dos IFN tipo I no controle anti-tumoral mediado por células NK tem sido bem documentado (98). Já o IFN tipo III possui atividade antiviral contra um grande espectro de vírus e pode contribuir para a prevenção da invasão viral pela pele e superfícies de mucosas (99). O IFN- λ é capaz de aumentar a expressão de moléculas de classe I do MHC (100) e tem a capacidade de regular diretamente as funções efectoras de células NK (101). Entretanto, o fato de avaliarmos a expressão dos fatores em CMNs não evidencia qual é o subtipo celular responsável pela expressão desses fatores antivirais.

Os elevados níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, condizem com o status do estágio avançado dos pacientes com SS. Se a elevação sérica de IL-10 seja em função para regular o processo, ou se é derivado de células malignas, ainda é preciso maiores investigações. Avaliamos também os níveis de células T reguladoras no sangue periférico dos

pacientes com SS, para avaliar o potencial regulador na síndrome. Contudo, o fato das células T reguladoras serem de fenótipo TCD4+, dificultou a análise por citometria de fluxo, pois poderia incluir células malignas. As avaliações preliminares mostraram que a frequência de células T reguladoras Foxp3+ dos pacientes com SS são similares com as do grupo controle.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Em pacientes com SS,

- Há redução do percentual do subtipo células NK CD56^{dim} e da expressão de receptores de ativação NKG2D e NKG2C, em associação aos elevados níveis séricos de ligantes de NKG2D, MICA/B solúvel, que em conjunto, sugere ser um mecanismo de escape das células malignas aos efeitos citotóxicos das células NK,
- Há baixa responsividade das células NK aos agonistas de TLRs, contudo o agonista de TLR7/8 foi capaz de potencializar a resposta de TNF nas células NK,
- Há uma deficiente produção de citocinas das células mononucleares após a ativação via TLR. Entretanto, os agonistas TLR2/TLR4 e TLR7/8 mostram efeito adjuvante, capazes de restaurar parcialmente, a secreção de citocinas e interferon tipo I e II,
- Os resultados evidenciam que há um prejuízo da imunidade inata nos pacientes com SS, e que os agonistas de TLRs, podem ser estratégicos para potencializar a resposta imunológica.

Anexos

7. ANEXOS

ANEXO 1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:

ENDEREÇO:.....Nº APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE: DDD ().....

2. RESPONSÁVEL

LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA “Imunomodulação *in vitro* com agonistas de receptores Toll-like em células NK e TCD8+ polifuncionais na Micose Fungóide e Síndrome de Sézary”

PESQUISADOR: Maria Notomi Sato

CARGO/FUNÇÃO: Professor Doutor
REGIONAL Nº 1690

INSCRIÇÃO

CONSELHO

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Dermatologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos e 12 meses.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): O estudo tem como objetivo estudar e entender melhor a sua doença Linfoma de células T cutâneo. Esta doença é um tipo de câncer de pele. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa analisar a defesa pelas células brancas do sangue para o combate ao câncer.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: Serão realizados exames laboratoriais, para estudar as células brancas que participam da defesa do organismo que estão presentes no sangue e na pele. Os exames serão feitos no próprio Hospital das Clínicas sem nenhum custo para o paciente, que pode aproveitar o dia das consultas para realizar a coleta de das amostras de sangue ou biópsia de pele. Os indivíduos saudáveis, chamados de grupo controle (não possuem a doença), serão do Laboratório de Investigação Médica unidade 56 da Faculdade de Medicina da USP, localizado no 3 andar do Instituto de Medicina Tropical Prédio II. Os pacientes continuarão a ser acompanhados nas consultas do ambulatório de dermatologia. Se houver a necessidade de mais algum exame, você poderá ser ainda convocado via telefone ou carta para vir a uma consulta, mesmo antes do seu retorno e terá todos os esclarecimentos e assistência que precisar. Todos os pacientes terão acesso aos resultados de seus exames no momento em que quiserem e com as explicações necessárias para seu entendimento. O paciente pode em qualquer momento não concordar em fazer os exames que serão pedidos.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: será realizada coleta de 30 mL (dez colheres de sopa) de sangue, por punção periférica da veia do antebraço. Para coleta da amostra de pele os pacientes receberão anestesia local, e serão obtidas biópsias de pele da lesão (3mm de diâmetro). As amostras serão enviadas ao laboratório para análise da presença de fatores no soro por ensaio imunoenzimático, cultura celular das células mononucleares por citometria de fluxo e imunoistoquímica das biópsias de pele.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3:

A picada da agulha pode levar a um leve desconforto que passará em poucos minutos. Um dia após pode se sentir em torno da picada uma mancha roxa que desaparece em poucos dias sem maiores problemas; em alguns pacientes será realizada a biópsia na pele sob anestesia local. Durante o procedimento da biópsia, você poderá sentir dor mínima no momento da aplicação da anestesia, parecida com uma picada de formiga. No local da biópsia, pode ocorrer uma pequena cicatriz.

5 – Benefícios para o participante: Não há benefício direto para o participante, pois se trata de estudo que visa analisar as células brancas do sangue periférico em pacientes com a doença.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Você não é obrigado a realizar estes procedimentos específicos se não quiser, o que não implica que sofrerá alguma penalidade. Mesmo que não concorde em participar do estudo, terá todos os benefícios de atendimento e de informações sobre novas descobertas com relação à doença.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Maria Notomi Sato que pode ser encontrado no endereço Instituto de Medicina Tropical, Prédio II, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 500. Telefone(s) 3061-7499/3061-7457. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel.: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20. FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa;

ANEXO 2

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: "IMUNOMODULAÇÃO POR AGONISTA DE RECEPTORES TOLL-LIKE NOS SUBTIPOS DE CÉLULAS NATURAL KILLER NA MICOSE FUNGOIDE E SÍNDROME DE SEZARY"
Pesquisador Responsável: Maria Notomi Sato **Versão:** 2
Pesquisador Executante: Kelly Cristina Gomes Manfrere **CAAE:** 31197714.3.0000.0068
Finalidade Acadêmica: Mestrado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: DERMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 12087

Número do Parecer: 1.052.645

Data da Relatoria: 05/05/2015

Apresentação do Projeto: Trata-se de inclusão de subprojeto intitulado "ANÁLISE DOS MECANISMOS DE ESCAPE TUMORAL NA MICOSE FUNGOIDE E SÍNDROME DE SEZARY", que não implicará em quaisquer questionamentos de ordem ética e desconforto para os participantes da pesquisa. É solicitado também a inclusão do DR. DENIS RICARDO MIYASHIRO.

Objetivo da Pesquisa: O subprojeto apresentado projeto tem por objetivo avaliar os possíveis mecanismos de escape tumoral pelos linfócitos neoplásicos em pacientes com micose fungoide e S. Sezary, enfocando aspectos funcionais na inibição de células natural killer e mecanismos de apoptose na evasão das neoplasias em estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos para os pacientes são mínimos pois envolvem coleta de sangue e tomadas de biópsia de pele sob anestesia local. Não há benefícios diretos para os indivíduos da pesquisa. Entretanto, possivelmente os resultados obtidos possibilitarão um melhor conhecimento da patogênese dos Linfomas cutâneos de células T, como também orientará novas opções de intervenção terapêutica para esse grupo de neoplasias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Projeto de pesquisa bem elaborado e factível com a infraestrutura oferecida pela Instituição e atuação da equipe de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O termo de consentimento livre e esclarecido é o mesmo que para o projeto maior. Os procedimentos a serem realizados com os indivíduos da pesquisa são os mesmos, serão somente introduzidas novas abordagens as técnicas de laboratório nas mesmas amostras de sangue e espécimes de pele a serem coletados.

Recomendações: Nada a acrescentar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Sem pendências ou questionamentos.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

São Paulo, 06 de Maio de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Referências

Referências.

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
2. Sabattini E, Bacci F, Sagranso C, Pileri SA. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica*. 2010 Jun;102(3):83-7.
3. Morton LM, Turner JJ, Cerhan JR, Linet MS, Treseler PA, Clarke CA, et al. Proposed classification of lymphoid neoplasms for epidemiologic research from the Pathology Working Group of the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph). *Blood*. 2007 Jul 15;110(2):695-708.
4. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005 May 15;105(10):3768-85.
5. Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, et al. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood*. 2007 Sep 15;110(6):1713-22.
6. Krejsgaard T, Lindahl LM, Mongan NP, Wasik MA, Litvinov IV, Iversen L, et al. Malignant inflammation in cutaneous T-cell lymphoma-a hostile takeover. *Semin Immunopathol*. 2016 Oct 7.
7. Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med*. 2001 Nov 19;194(10):1541-7.
8. Heid JB, Schmidt A, Oberle N, Goerdt S, Krammer PH, Suri-Payer E, et al. FOXP3+CD25- tumor cells with regulatory function in Sezary syndrome. *J Invest Dermatol*. 2009 Dec;129(12):2875-85.
9. Girardi M, Heald PW, Wilson LD. The pathogenesis of mycosis fungoides. *N Engl J Med*. 2004 May 6;350(19):1978-88.
10. Wasik MA, Vonderheid EC, Bigler RD, Marti R, Lessin SR, Polansky M, et al. Increased serum concentration of the soluble interleukin-2 receptor in cutaneous T-cell lymphoma. Clinical and prognostic implications. *Arch Dermatol*. 1996 Jan;132(1):42-7.
11. Krejsgaard T, Odum N, Geisler C, Wasik MA, Woetmann A. Regulatory T cells and immunodeficiency in mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Leukemia*. 2012 Mar;26(3):424-32.
12. Vowels BR, Cassin M, Vonderheid EC, Rook AH. Aberrant cytokine production by Sezary syndrome patients: cytokine secretion pattern resembles murine Th2 cells. *J Invest Dermatol*. 1992 Jul;99(1):90-4.
13. Vowels BR, Lessin SR, Cassin M, Jaworsky C, Benoit B, Wolfe JT, et al. Th2 cytokine mRNA expression in skin in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*. 1994 Nov;103(5):669-73.
14. Asadullah K, Docke WD, Haeussler A, Sterry W, Volk HD. Progression of mycosis fungoides is associated with increasing cutaneous expression of interleukin-10 mRNA. *J Invest Dermatol*. 1996 Dec;107(6):833-7.
15. Kari L, Loboda A, Nebozhyn M, Rook AH, Vonderheid EC, Nichols C, et al. Classification and prediction of survival in patients with the leukemic phase of cutaneous T cell lymphoma. *J Exp Med*. 2003 Jun 2;197(11):1477-88.
16. Wysocka M, Zaki MH, French LE, Chehimi J, Shapiro M, Everetts SE, et al. Sezary syndrome patients demonstrate a defect in dendritic cell populations: effects of CD40 ligand and treatment with GM-CSF on dendritic cell numbers and the production of cytokines. *Blood*. 2002 Nov 1;100(9):3287-94.
17. De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol*. 1997 May;27(5):1229-35.
18. French LE, Huard B, Wysocka M, Shane R, Contassot E, Arrighi JF, et al. Impaired CD40L signaling is a cause of defective IL-12 and TNF-alpha production in Sezary syndrome: circumvention by hexameric soluble CD40L. *Blood*. United States 2005. p. 219-25.
19. Steffen C. The man behind the eponym dermatology in historical perspective: Albert Sezary and the Sezary syndrome. *Am J Dermatopathol*. 2006 Aug;28(4):357-67.

20. Wieselthier JS, Koh HK. Sezary syndrome: diagnosis, prognosis, and critical review of treatment options. *J Am Acad Dermatol*. 1990 Mar;22(3):381-401.
21. Schwab C, Willers J, Niederer E, Ludwig E, Kundig T, Grob P, et al. The use of anti-T-cell receptor-Vbeta antibodies for the estimation of treatment success and phenotypic characterization of clonal T-cell populations in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Haematol*. 2002 Sep;118(4):1019-26.
22. Pende D, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Falco M, di Donato C, et al. The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med*. 1996 Aug 1;184(2):505-18.
23. Moins-Teisserenc H, Daubord M, Clave E, Douay C, Felix J, Marie-Cardine A, et al. CD158k is a reliable marker for diagnosis of Sezary syndrome and reveals an unprecedented heterogeneity of circulating malignant cells. *J Invest Dermatol*. 2015 Jan;135(1):247-57.
24. Moretta A, Parolini S, Castriconi R, Bottino C, Vitale M, Sivori S, et al. Function and specificity of human natural killer cell receptors. *Eur J Immunogenet*. 1997 Dec;24(6):455-68.
25. Poszepczynska-Guigne E, Schiavon V, D'Incan M, Echchakir H, Musette P, Ortonne N, et al. CD158k/KIR3DL2 is a new phenotypic marker of Sezary cells: relevance for the diagnosis and follow-up of Sezary syndrome. *J Invest Dermatol*. 2004 Mar;122(3):820-3.
26. Wechsler J, Bagot M, Nikolova M, Parolini S, Martin-Garcia N, Boumsell L, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor expression delineates in situ Sezary syndrome lymphocytes. *J Pathol*. 2003 Jan;199(1):77-83.
27. Novelli M, Fava P, Sarda C, Ponti R, Osella-Abate S, Savoia P, et al. Blood flow cytometry in Sezary syndrome: new insights on prognostic relevance and immunophenotypic changes during follow-up. *Am J Clin Pathol*. 2015 Jan;143(1):57-69.
28. Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2016 Jan;91(1):151-65.
29. Diamandidou E, Colome M, Fayad L, Duvic M, Kurzrock R. Prognostic factor analysis in mycosis fungoides/Sezary syndrome. *J Am Acad Dermatol*. 1999 Jun;40(6 Pt 1):914-24.
30. Kim EJ, Hess S, Richardson SK, Newton S, Showe LC, Benoit BM, et al. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest*. 2005 Apr;115(4):798-812.
31. Yawalkar N, Ferenczi K, Jones DA, Yamanaka K, Suh KY, Sadat S, et al. Profound loss of T-cell receptor repertoire complexity in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2003 Dec 1;102(12):4059-66.
32. Shin J, Monti S, Aires DJ, Duvic M, Golub T, Jones DA, et al. Lesional gene expression profiling in cutaneous T-cell lymphoma reveals natural clusters associated with disease outcome. *Blood*. 2007 Oct 15;110(8):3015-27.
33. Ruggiero E, Nicolay JP, Fronza R, Arens A, Paruzynski A, Nowrouzi A, et al. High-resolution analysis of the human T-cell receptor repertoire. *Nat Commun*. 2015;6:8081.
34. Montaldo E, Del Zotto G, Della Chiesa M, Mingari MC, Moretta A, De Maria A, et al. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A*. 2013 Aug;83(8):702-13.
35. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:189-220.
36. Spits H, Bernink JH, Lanier L. NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense. *Nat Immunol*. 2016 Jun 21;17(7):758-64.
37. Culley FJ, Johnson M, Evans M. Natural Killer cell signal integration balances synapse symmetry and migração". 2009.
38. Pontes Lde B, Antunes YP, Bugano DD, Karnakis T, Giglio AD, Kaliks RA. Prevalence of renal insufficiency in elderly cancer patients in a tertiary cancer center. *Einstein (Sao Paulo)*. Brazil2014. p. 300-3.
39. Carrega P, Bonaccorsi I, Di Carlo E, Morandi B, Paul P, Rizzello V, et al. CD56(bright)perforin(low) noncytotoxic human NK cells are abundant in both healthy and neoplastic solid tissues and recirculate to secondary lymphoid organs via afferent lymph. *J Immunol*. 2014 Apr 15;192(8):3805-15.

40. Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A. Different checkpoints in human NK-cell activation. *Trends Immunol.* 2004 Dec;25(12):670-6.
41. Zimmer J, Ioannidis V, Held W. H-2D ligand expression by Ly49A+ natural killer (NK) cells precludes ligand uptake from environmental cells: implications for NK cell function. *J Exp Med.* 2001 Nov 19;194(10):1531-9.
42. Sjostrom A, Eriksson M, Cerboni C, Johansson MH, Sentman CL, Karre K, et al. Acquisition of external major histocompatibility complex class I molecules by natural killer cells expressing inhibitory Ly49 receptors. *J Exp Med.* 2001 Nov 19;194(10):1519-30.
43. Lee YS, Choe GY, Hong SI, Lee MJ, Kim TH, Jang JJ. Changes in natural killer cell activity and prostaglandin E2 levels during the progression of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in Fischer 344 rats. *Oncol Rep.* 1998 Nov-Dec;5(6):1441-5.
44. Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity.* 2002 Jul;17(1):19-29.
45. Ehrlich LI, Ogasawara K, Hamerman JA, Takaki R, Zingoni A, Allison JP, et al. Engagement of NKG2D by cognate ligand or antibody alone is insufficient to mediate costimulation of human and mouse CD8+ T cells. *J Immunol.* 2005 Feb 15;174(4):1922-31.
46. Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene.* 2008 Oct 6;27(45):5944-58.
47. Dulphy N, Berrou J, Campillo JA, Bagot M, Bensussan A, Toubert A. NKG2D ligands expression and NKG2D-mediated NK activity in Sezary patients. *J Invest Dermatol.* 2009 Feb;129(2):359-64.
48. Coudert JD, W. "The role of the NKG2D receptor for tumor immunity". *Semin Câncer Biol;* 2006.
49. Petry V, Gaspari AA. Toll-like receptors and dermatology. *International journal of dermatology.* 2009 Jun;48(6):558-70.
50. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, et al. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol.* 2005 Mar 1;174(5):2942-50.
51. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell.* 2007 Sep 21;130(6):1071-82.
52. Bell JK, Botos I, Hall PR, Askins J, Shiloach J, Segal DM, et al. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 2;102(31):10976-80.
53. Haas T, Metzger J, Schmitz F, Heit A, Muller T, Latz E, et al. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity.* 2008 Mar;28(3):315-23.
54. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of immunology.* 2002 May 1;168(9):4531-7.
55. O'Neill LA. TAMpering with toll-like receptor signaling. *Cell.* 2007 Dec 14;131(6):1039-41.
56. Ogasawara K, Lanier LL. NKG2D in NK and T cell-mediated immunity. *Journal of clinical immunology.* 2005 Nov;25(6):534-40.
57. Kozłowski L, Wojtukiewicz MZ. [The role of proteolytic enzymes in skin neoplasm progression and development of metastasis]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczonej.* 1999;53(6):841-54.
58. Lauzon NM, Mian F, MacKenzie R, Ashkar AA. The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cellular immunology.* 2006 Jun;241(2):102-12.
59. Wysocka M, Newton S, Benoit BM, Introcaso C, Hancock AS, Chehimi J, et al. Synthetic imidazoquinolines potently and broadly activate the cellular immune response of patients with cutaneous T-cell lymphoma: synergy with interferon-gamma enhances production of interleukin-12. *Clinical lymphoma & myeloma.* 2007 Sep;7(8):524-34.

60. Napolitani G, Rinaldi A, Berton F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nature immunology*. 2005 Aug;6(8):769-76.
61. Wysocka M, Dawany N, Benoit B, Kossenkova AV, Troxel AB, Gelfand JM, et al. Synergistic enhancement of cellular immune responses by the novel Toll receptor 7/8 agonist 3M-007 and interferon-gamma: implications for therapy of cutaneous T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2011 Oct;52(10):1970-9.
62. Wysocka M, Benoit BM, Newton S, Azzoni L, Montaner LJ, Rook AH. Enhancement of the host immune responses in cutaneous T-cell lymphoma by CpG oligodeoxynucleotides and IL-15. *Blood*. 2004 Dec 15;104(13):4142-9.
63. Kim YH, Girardi M, Duvic M, Kuzel T, Link BK, Pinter-Brown L, et al. Phase I trial of a Toll-like receptor 9 agonist, PF-3512676 (CPG 7909), in patients with treatment-refractory, cutaneous T-cell lymphoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2010 Dec;63(6):975-83.
64. Kim YH, Gratzinger D, Harrison C, Brody JD, Czerwinski DK, Ai WZ, et al. In situ vaccination against mycosis fungoides by intratumoral injection of a TLR9 agonist combined with radiation: a phase 1/2 study. *Blood*. 2012 Jan 12;119(2):355-63.
65. Jarrousse V, Quereux G, Marques-Briand S, Knol AC, Khammari A, Dreno B. Toll-like receptors 2, 4 and 9 expression in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sezary syndrome). *Eur J Dermatol*. 2006 Nov-Dec;16(6):636-41.
66. Kado JA, Shango M, Mehregan C, Mehregan DR. Mapping Toll-Like Receptor Activity in Different Stages of Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Am J Dermatopathol*. 2012 Mar 6.
67. Bagot M, Bensussan A. [Epidermotropic T cell lymphomas as models for tumor progression]. *Med Sci (Paris)*. 2006 Feb;22(2):192-6.
68. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. England2002. p. 734-8.
69. Simpson RJ, Bigley AB, Spielmann G, LaVoy EC, Kunz H, Bollard CM. Human cytomegalovirus infection and the immune response to exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2016;22:8-27.
70. Bjorklund AT, Clancy T, Goodridge JP, Beziat V, Schaffer M, Hovig E, et al. Naive Donor NK Cell Repertoires Associated with Less Leukemia Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Immunol*. United States: Inc.; 2016. p. 1400-11.
71. Herne KL, Talpur R, Breuer-McHam J, Champlin R, Duvic M. Cytomegalovirus seropositivity is significantly associated with mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Blood*. 2003 Mar 15;101(6):2132-6.
72. Ballanger F, Bressollette C, Volteau C, Planche L, Dreno B. Cytomegalovirus: its potential role in the development of cutaneous T-cell lymphoma. *Exp Dermatol*. Denmark2009. p. 574-6.
73. Sandoval-Borrego D, Moreno-Lafont MC, Vazquez-Sanchez EA, Gutierrez-Hoya A, Lopez-Santiago R, Montiel-Cervantes LA, et al. Overexpression of CD158 and NKG2A Inhibitory Receptors and Underexpression of NKG2D and Nkp46 Activating Receptors on NK Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Arch Med Res*. United States: Published by Elsevier Inc.; 2016. p. 55-64.
74. Bensussan A, Remtoula N, Sivori S, Bagot M, Moretta A, Marie-Cardine A. Expression and function of the natural cytotoxicity receptor Nkp46 on circulating malignant CD4+ T lymphocytes of Sezary syndrome patients. *J Invest Dermatol*. 2011 Apr;131(4):969-76.
75. Schneider P, Plassa LF, Ratajczak P, Leboeuf C, Verneuil L, Battistella M, et al. Nkp46-specific expression on skin-resident CD4(+) lymphocytes in mycosis fungoides and Sezary syndrome. *J Invest Dermatol*. United States2014. p. 574-8.
76. Cheent K, Khakoo SI. Natural killer cells: integrating diversity with function. *Immunology*. 2009 Apr;126(4):449-57.
77. Smyth MJ, Swann J, Cretney E, Zerafa N, Yokoyama WM, Hayakawa Y. NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J Exp Med*. 2005 Sep 5;202(5):583-8.
78. Akilov OE, Wu MX, Ustyugova IV, Falo LD, Jr., Geskin LJ. Resistance of Sezary cells to TNF-alpha-induced apoptosis is mediated in part by a loss of TNFR1 and a high level of the IER3 expression. *Exp Dermatol*. 2012 Apr;21(4):287-92.

79. Raphael BA, Shin DB, Suchin KR, Morrissey KA, Vittorio CC, Kim EJ, et al. High clinical response rate of Sezary syndrome to immunomodulatory therapies: prognostic markers of response. *Arch Dermatol. United States* 2011. p. 1410-5.
80. Sugaya M. Chemokines and cutaneous lymphoma. *J Dermatol Sci.* 2010 Aug;59(2):81-5.
81. Litvinov IV, Cordeiro B, Fredholm S, Odum N, Zargham H, Huang Y, et al. Analysis of STAT4 expression in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) patients and patient-derived cell lines. *Cell Cycle.* 2014;13(18):2975-82.
82. Johnson VE, Vonderheid EC, Hess AD, Eischen CM, McGirt LY. Genetic markers associated with progression in early mycosis fungoides. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014 Nov;28(11):1431-5.
83. Showe LC, Fox FE, Williams D, Au K, Niu Z, Rook AH. Depressed IL-12-mediated signal transduction in T cells from patients with Sezary syndrome is associated with the absence of IL-12 receptor beta 2 mRNA and highly reduced levels of STAT4. *J Immunol.* 1999 Oct 1;163(7):4073-9.
84. Lorincz AL. Cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides). *Lancet.* 1996 Mar 30;347(9005):871-6.
85. Teixeira-Coelho M, Guedes J, Ferreirinha P, Howes A, Pedrosa J, Rodrigues F, et al. Differential post-transcriptional regulation of IL-10 by TLR2 and TLR4-activated macrophages. *Eur J Immunol.* 2014 Mar;44(3):856-66.
86. Costa-Mattioli M, Sonenberg N. RAPPING production of type I interferon in pDCs through mTOR. *Nat Immunol.* 2008 Oct;9(10):1097-9.
87. Schoenemeyer A, Barnes BJ, Mancl ME, Latz E, Goutagny N, Pitha PM, et al. The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *J Biol Chem.* 2005 Apr 29;280(17):17005-12.
88. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway.
89. Rook AH, Vowels BR, Jaworsky C, Singh A, Lessin SR. The immunopathogenesis of cutaneous T-cell lymphoma. Abnormal cytokine production by Sezary T cells. *Arch Dermatol.* 1993 Apr;129(4):486-9.
90. Hassel JC, Meier R, Joller-Jemelka H, Burg G, Dummer R. Serological immunomarkers in cutaneous T cell lymphoma. *Dermatology.* 2004;209(4):296-300.
91. Reynolds GM, Billingham LJ, Gray LJ, Flavell JR, Najafipour S, Crocker J, et al. Interleukin 6 expression by Hodgkin/Reed-Sternberg cells is associated with the presence of 'B' symptoms and failure to achieve complete remission in patients with advanced Hodgkin's disease. *Br J Haematol. England* 2002. p. 195-201.
92. Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H, Yoshino T, Tamaru J, Nakamura S, et al. Simultaneous elevation of the serum concentrations of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 as independent predictors of prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol.* 2002 Feb;68(2):91-100.
93. Netchiporouk E, Litvinov IV, Moreau L, Gilbert M, Sasseville D, Duvic M. Deregulation in STAT signaling is important for cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) pathogenesis and cancer progression. *Cell Cycle.* 2014;13(21):3331-5.
94. Krejsgaard T, Ralfkiaer U, Clasen-Linde E, Eriksen KW, Kopp KL, Bonefeld CM, et al. Malignant cutaneous T-cell lymphoma cells express IL-17 utilizing the Jak3/Stat3 signaling pathway. *J Invest Dermatol.* 2011 Jun;131(6):1331-8.
95. Qin JZ, Dummer R, Burg G, Dobbeling U. Constitutive and interleukin-7/interleukin-15 stimulated DNA binding of Myc, Jun, and novel Myc-like proteins in cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood.* 1999 Jan 1;93(1):260-7.
96. Fredholm S, Gjerdrum LM, Willerslev-Olsen A, Petersen DL, Nielsen IO, Kauczok CS, et al. STAT3 activation and infiltration of eosinophil granulocytes in mycosis fungoides. *Anticancer Res. Greece: 2014 International Institute of Anticancer Research (Dr. John G. Delinassios);* 2014. p. 5277-86.

97. Krejsgaard T, Gjerdrum LM, Ralfkiaer E, Lauenborg B, Eriksen KW, Mathiesen AM, et al. Malignant Tregs express low molecular splice forms of FOXP3 in Sezary syndrome. *Leukemia*. 2008 Dec;22(12):2230-9.
98. Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*. 2001 Jan 1;97(1):192-7.
99. Sommereyns C, Paul S, Staeheli P, Michiels T. IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog*. 2008 Mar;4(3):e1000017.
100. Abushahba W, Balan M, Castaneda I, Yuan Y, Reuhl K, Raveche E, et al. Antitumor activity of type I and type III interferons in BNL hepatoma model. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Jul;59(7):1059-71.
101. Souza-Fonseca-Guimaraes F, Young A, Smyth MJ. IFN type III: in vivo NK cell response. *Oncotarget*. 2015 Aug 21;6(24):19960-1.