MARINA PASSOS TORREALBA

**Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos TCD8+
circulantes 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

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Sanches Junior

São Paulo

2016

MARINA PASSOS TORREALBA

**Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos TCD8+ circulantes 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

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Sanches Junior

São Paulo

2016

Dedicatória

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

Agradecimentos

Ao Professor Doutor José Antônio Sanches Junior, pela orientação, por ter me aceito como aluna e todas as instruções fornecidas.

À Professora Doutora Maria Notomi Sato, pela co-orientação, pela confiança depositada em mim e pela sua paciência e incentivos maternais neste período de orientação.

Ao meu pai, Carlos Torrealba, pelo exemplo de solidez moral e caráter, pela paciência e por todo amor e carinho durante todos esses anos. Pelo estímulo às minhas perguntas e curiosidades da infância, você cultivou a semente da ciência em mim.

Aos queridos meus irmãos, Marcelo e Maurício, meus “maninhos” e Leandro pelo apoio afetivo, emocional e amor sem precedentes.

À minha dupla de trabalho e amiga querida, Kelly Manfrere, pelo apoio, carinho, comprometimento e senso de companheirismo e equipe.

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

A colega de trabalho e amiga querida, Nátalli Zanette, pelo apoio em todos os ensaios científicos e da vida.

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, Elaine, Anna Claudia Branco, Cyro Brito, Luanda Oliveira, Luana Mendonça, Aline Lira, Marília Garcia, Rosana Domingues, Gabriel Costa, 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 Felipe Foresto, querido companheiro na vida, por todo cuidado, amor e carinho que me deram suporte nesse período.

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, elaboração e formatação da dissertação.

À banca de qualificação Prof. Dr. Niels, Dra. Juliana Pereira 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.

“A ciência é a aproximação progressiva do homem com o mundo real”

Max Planck

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Linfomas: epidemiologia e classificação	1
1.2 Contexto imunológico no LCCT	4
1.3 Síndrome de Sézary	9
1.4 Receptores Toll-like e câncer (TLR)	13
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. MÉTODOS	20
3.1 Casuística	21
3.2 Obtenção de células mononucleares (CMNs) do sangue periférico	21
3.3 Avaliação fenotípica de células TCD8 ⁺ e TCD4 ⁺ do sangue periférico.	22
3.4 Produção de citocinas por células T após estímulo com ligante de TLR	22
3.5 Avaliação da expressão de BCL2 em células T	23
3.6 Avaliação da fosforilação de STAT5 em células T	24
3.7 Ensaio de proliferação de células T	25
3.8 Quantificação de IL-7 sérico	26
3.9 Análise estatística	26
4. RESULTADOS	27
4.1 Características dos indivíduos envolvidos no estudo	28
4.2 Perfil fenotípico das células TCD8 ⁺ no sangue periférico	30

4.3 Perfil fenotípico das células TCD4+ no sangue periférico	36
4.4 Perfil de resposta de células TCD4+ e TCD8+ após estímulo com agonista de receptor Toll-like	37
4.5 Perfil fenotípico de células TCD8+ em pacientes com SS após tratamento	41
4.6 Eixo IL-7/IL-7R: fosforilação de STAT5 em células T	42
4.7 Eixo IL-7/IL-7R: expressão de BCL2 em células T	44
4.8 Eixo IL-7/IL-7R: resposta proliferativa de células T	47
4.9 Eixo IL-7/IL-7R: Determinação sérica de IL-7	50
5. DISCUSSÃO	51
5.1 Características laboratoriais dos pacientes com SS	52
5.2 Perfil de células TCD8+ na síndrome de Sézary	53
5.3 Perfil de células TCD4+ na síndrome de Sézary	56
5.4 Eixo IL-7/IL-7R na síndrome de Sézary	58
6. CONCLUSÃO	62
7. ANEXOS	63
8. REFERÊNCIAS	70

LISTA DE ABREVIATURAS

LCCT – Linfoma cutâneo de células T
CD – *cluster of differentiation*
TLR – *Toll like receptor*
IL-7 – interleucina 7
IL-7R – receptor da interleucina 7
SS – Síndrome de Sézary
IARC – *international agency for research on cancer*
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*
CCR8 – *C-C chemokine receptor type 8*
CCR10 – *C-C chemokine receptor type 10*
CXCR3 – *C-X chemokine receptor type 3*
CXCR4 – *C-X chemokine receptor type 4*
CXCR11 – *C-X chemokine receptor type 11*
CXCR12 – *C-X chemokine receptor type 12*
CCR7 – *C-C chemokine receptor type 7*
TCM – células T de memória central
TRM – célula T residente de memória
Treg – Célula T reguladora
FMO – *Fluorescence Minus One*
FoxP3 – *forkhead box P3*
IL-2 – interleucina 2
IL-15 – interleucina 15
IL-10 – interleucina 10
Th2 – *T helper cell type 2*
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*
IL-12 – interleucina 12
IL-18 – interleucina 18
IFN γ – Interferon gamma
DC – célula dendrítica

TCR – receptor de célula T
BCL-2 – B-cell lymphoma 2
STAT5 – *Signal transducer and activator of transcription 5*
JAK – *Janus kinase*
PCR – *Polymerase chain reaction*
MCH – *major histocompatibility complex*
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
TNF – *Tumor necrosis factor*
LAMP – *Lysosomal-associated membrane protein*
NK – Células *Natural Killer*
LCMV – vírus da coriomeningite linfocítica
KLRG1 – receptor da lectina G1
HCB – *chronic hepatitis B virus*
EBV – Vírus Epstein-Barr
CMV – Citomegalovírus
PRRs – receptores de reconhecimento padrão
TIR – receptor de interleucina 1
PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos
TIRAP – proteína associada ao TIR
MyD88 – *Myeloid differentiation primary response gene 88*
NFkB – fator nuclear kappa B
IL-1 – interleucina 1
IL-6 – interleucina 6
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
CFSE – *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*
LDH – *lactato desidrogenase*
TC – tomografia computadorizada
MFI – *median fluorescence intensity*
CTRL – controle
PHA – fitohemaglutinina
CBA – *cytometric bead array*
TREC – T cell receptor excision circles
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. Frequência global estimada de câncer em (A) mulheres e (B) homens.....	2
Figura 2. Incidência estimada de linfomas NHL e HL combinadas.....	3
Figura 3. Imunopatogênese da micose fungóide e síndrome de Sézary.	8
Figura 4. Representação esquemática dos subtipos de TLR e vias de sinalização em humanos.....	15
Figura 5. Estratégia de análise para caracterização de linfócitos e sua diferenciação em indivíduo saudável e paciente com s. Sézary.....	32
Figura 6. Estratégia de análise de marcadores de ativação/inibição em linfócitos TCD8.....	33
Figura 7. Avaliação fenotípica dos linfócitos TCD8..	34
Figura 8. Expressão de marcadores de ativação/exaustão nas fases de diferenciação dos linfócitos TCD8	35
Figura 9. Avaliação fenotípica dos linfócitos TCD4+ no sangue periférico.	37
Figura 10. Estratégia de análise de linfócitos TCD8+ e TCD4 em células mononucleares.	39
Figura 11. Produção de citocinas e expressão de marcadores de ativação/exaustão em células TCD8+ após estímulo com agonista de TLR 7/8.	40
Figura 12. Produção de citocinas e expressão de marcadores de ativação/exaustão em células TCD4 após estímulo com agonista de TLR 7/8.	41
Figura 13. Expressão de marcadores de ativação/inibição em TCD8+ antes e após tratamento de pacientes com SS.....	42
Figura 14. Análise da fosforilação de STAT5 após estímulo com IL7/IL-5 em linfócitos TCD8.....	43
Figura 15. Análise da fosforilação de STAT5 após estímulo com IL7/IL-5 em linfócitos TCD4.....	44
Figura 16. Expressão de BCL2 após estímulo com IL-7 ou IL-15 em linfócitos TCD8.	45
Figura 17. Expressão de BCL2 após estímulo com IL-7 ou IL-15 em linfócitos TCD4.	46
Figura 18. Expressão de BCL2 após estímulo com IL-7 ou IL-15 em linfócitos TCD4+CD158k+ e TCD4+CD158k- de indivíduos com S. Sézary	47
Figura 19. Resposta linfoproliferativa de células TCD8+ por CFSE.....	48
Figura 20. Resposta linfoproliferativa de células TCD4 por CFSE.....	49
Figura 21. Determinação sérica de IL-7.....	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Anticorpos do painel de ativação/exaustão e diferenciação de células T de sangue periférico	22
Quadro 2 - Anticorpos do painel de células T secretoras de citocinas	23
Quadro 3 - Anticorpos do painel para a avaliação da expressão de BCL-2 em células T	24
Quadro 4 - Anticorpos do painel de fosforilação de STAT5	25
Quadro 5 - Anticorpos do painel de linfoproliferação em células T	25

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Características clínicas dos pacientes no diagnóstico29

Tabela II. Características laboratoriais dos pacientes no diagnóstico29

Resumo

TORREALBA MP. Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos TCD8+ circulantes na síndrome de Sézary [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: A Síndrome de Sézary (SS) é um linfoma cutâneo de células T (LCCT), caracterizado por eritrodermia, linfadenopatia generalizada e presença de células tumorais na pele, linfonodos e sangue periférico. Os linfócitos TCD8+ têm papel fundamental na resposta imune antitumoral, entretanto, há escassos estudos evidenciando seu perfil fenotípico e funcional. Considerando que a resposta imunológica do paciente com SS está suprimida, estratégias para potencializar a imunidade inata e adaptativa com agonistas de receptores Toll-like (TLRs) têm sido exploradas. **OBJETIVO:** Caracterizar o perfil de marcadores de ativação/inibição das células TCD8+, seus estágios de diferenciação, capacidade de resposta a IL-7/IL-15 e ao agonista de TLR7/TLR8 de pacientes com SS. **METODOLOGIA:** Foram selecionados 15 pacientes com SS (7 homens e 8 mulheres) com 48-85 anos do Ambulatório de Linfomas Cutâneos, do HC-FMUSP, e um grupo de controle com 24 indivíduos saudáveis. A análise de marcadores de ativação/inibição e diferenciação celular em células TCD4/TCD8+ do sangue periférico foi realizada por citometria de fluxo. A expressão de marcadores extracelulares e citocinas intracelulares em células mononucleadas do sangue periférico (CMN) após estimulação com o agonista de TLR7/TLR8 foi analisada por citometria de fluxo. Além disso, o efeito de IL-7 e IL-15 em células T foi avaliado pela fosforilação de STAT5, na capacidade de proliferação mitogênica e expressão de BCL-2 em CMNs, como também pelos níveis séricos de IL-7 por citometria de fluxo. **RESULTADOS:** Os pacientes com SS mostram perfil fenotípico de ativação crônica nos linfócitos TCD8+ periféricos, decorrente do elevado percentual de células TCD8+ CD38+, redução percentual de TCD8+ CD127+ (IL-7R) e da população *naive*. Além disso, ocorreu aumento de expressão de PD-1 na população *naive* de células TCD8+. O marcador de ativação, CD26, até então apenas relacionado com linfócitos TCD4, foi detectado em reduzida percentagem de linfócitos TCD8. A resposta para IL-7/IL-15 parece estar funcionalmente presente tanto nos linfócitos TCD4 quanto nos linfócitos TCD8. Contudo, foi encontrado um perfil diferenciado e heterogêneo de fosforilação de STAT5 assim como de expressão de BCL-2 nos linfócitos TCD8+ de pacientes com SS. O nível sérico de IL-7 reduzido dos pacientes com SS foi inversamente correlacionado com o número absoluto de linfócitos TCD4+. **CONCLUSÃO:** Os linfócitos TCD8+ dos pacientes com SS encontram-se reduzidos em números absolutos, e possuem um perfil alterado de diferenciação celular e expressão de marcadores extracelulares.

A redução percentual da população de TCD8+ *naive* associada com a presença de moléculas de ativação crônica mostra um perfil de imunosenescência. As células TCD8+ exibem baixa capacidade de resposta aos ligantes de TLR intracelulares, provavelmente devido ao perfil de ativação crônica. Além disso, há resposta parcial dos linfócitos TCD8+ às citocinas ligantes do receptor γc . Nossos resultados evidenciam alterações em linfócitos TCD8+ que debilitam a resposta imune antitumoral e que pode contribuir com a patogênese da síndrome de Sézary.

Descritores: Síndrome de Sézary, Imunidade Adaptativa, Linfócitos T CD8-positivos, Interleucina-7, Antígenos CD38, Citometria de fluxo.

Abstract

TORREALBA MP. Phenotypic and functional characterization of circulating CD8⁺ T lymphocytes in Sezary syndrome [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

INTRODUCTION: Sézary syndrome (SS) is a cutaneous T cell lymphoma (CTCL), characterized by erythroderma, generalized lymphadenopathy and the presence of tumor cells in the skin, lymph nodes and peripheral blood. The TCD8⁺ lymphocytes play a key role in anti-tumor immune response, whereas, there are few studies showing its phenotypic and functional profile in SS. Considering that the immune response of SS patient is suppressed, strategies to enhancing the innate and adaptive immunity by Toll-like receptors (TLRs) agonists have been explored. **OBJECTIVE:** To characterize the profile of activation/inhibition markers of CD8⁺ T cells, their stages of differentiation, ability of response to IL-7/IL-15 and TLR7/TLR8 agonist of patients with SS. **METHODOLOGY:** Fifteen SS patients were enrolled (7 men and 8 woman) with 48-85 years from the Clinic of Cutaneous Lymphomas, HC-FMUSP, and a control group of 24 healthy individuals. Analysis of activation/inhibition markers and cellular differentiation in CD4/CD8 T cells from peripheral blood were assessed by flow cytometry. The expression of extracellular markers and intracellular cytokines in mononuclear cells in the peripheral blood (CMN) were evaluated by flow cytometry. Moreover, the effect of IL-7 and IL-15 stimulation in T cells was assessed by the STAT5 phosphorylation, proliferative mitogenic capacity, BCL-2 expression in CMNs as well as serum IL-7 levels by flow cytometry. **RESULTS:** Patients with SS show a phenotypic CD8 T peripheral lymphocytes profile of chronic activation, due to the high percentage of CD8⁺CD38⁺ T cells, reduced percentage of CD8⁺CD127⁺ (IL-7R) and naïve population. Furthermore, it was observed an increased PD-1 expression in the naïve CD8⁺ T cells. The activation marker CD26, previously only associated with CD4 T lymphocyte, was detected at decreased percentage in CD8 T lymphocytes. The TLR7/TLR8 agonist did not affect the IFN- γ and TNF secretion of CD8 T lymphocytes of SS patients, in contrast to the control group. The response to IL-7/IL-15 appears to be functional in both CD4 and CD8 T lymphocytes. However, it was founded a differentiated and heterogeneous profile of STAT5 phosphorylation and Bcl-2 expression in the CD8 T lymphocytes in SS patients. The reduced IL-7 serum of patients with SS was inversely correlated with the absolute number of CD4 T lymphocytes. **CONCLUSION:** CD8 T lymphocytes of patients with SS are reduced in absolute numbers, and show an altered cellular differentiation profile and extracellular markers expression. The reduced percentage of CD8 naïve population associated with chronic

activation of molecules reveals an immunosenescence profile. The CD8 T cells exhibit low ability to ligands of intracellular TLR receptors, probably due to chronic activation profile. In addition, there are partial response of CD8 T lymphocytes to the cytokine receptor γ_c . Our results show disturbance in CD8 T lymphocytes that may impair the anti-tumor response contributing to the pathogenesis of Sézary syndrome.

Descriptors: Sézary syndrome, Adaptive Immunity, CD8-Positive T-Lymphocytes, Interleukin-7, Antigens CD38, Flow cytometry.

Introdução

1.INTRODUÇÃO

1.1 Linfomas: epidemiologia e classificação

A mortalidade e incidência de vários tipos de cânceres vêm se alterando consideravelmente nas últimas décadas. Na década de 90, houve um pico de mortalidade seguido por um declínio decorrente dos cânceres relacionados ao fumo, especialmente câncer de pulmão (1). Entretanto, três dos mais frequentes diagnósticos de neoplasias apresentaram mortalidade crescente em grande parte do mundo até o final dos anos 90: hepatocarcinoma, mieloma múltiplo e linfomas não-Hodgkin (2).

Os linfomas são neoplasias com origem em células linfóides. Caracteriza um grupo de enfermidades distintas com uma heterogeneidade de achados clínicos, histológicos, imunofenotípicos e genéticos, que representam juntos de 3 a 4% dos casos de cânceres no mundo (3).

A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) estimou, em 2008, 12 milhões dos novos casos de câncer, 6.64 milhões em homens e 6.04 milhões em mulheres. Desses novos casos, 7.5% e 6.4% respectivamente, são classificados como neoplasias hematológicas. Estima-se que, em ambos os sexos, aproximadamente metade desses diagnósticos sejam de linfomas (4). Os dados estão representados na **Figura 1**.

A classificação dos subtipos linfomas tem sido extensivamente alterada nas últimas décadas, e deve continuar sendo na medida em que novas técnicas e métodos de diagnósticos são desenvolvidos (5). 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(6).

Existem dois subgrupos principais de linfoma: os linfomas de Hodgkin (HL) e os linfomas não-Hodgkin (NHL). Ambos tipos de linfoma estão geograficamente distribuídos por todos os continentes, **figura 2**. Os maiores índices estão presentes em regiões economicamente mais desenvolvidas.

Globocan, 2008.

Figura 1. Frequência global estimada de câncer em (A) mulheres e (B) homens.

Globocan, 2008.

Figura 2. Incidência estimada de linfomas NHL e HL combinadas.

As taxas padronizadas de mortalidade por linfomas não-Hodgkin atingiram, nas últimas décadas, os valores mais altos na União Europeia e nos Estados Unidos. Estimativas globais recentes sugerem 226.000 mortes por NHL, 71% destas em países desenvolvidos e 29% em países em desenvolvimento (7). Porém, em anos mais recentes, tem sido observada uma tendência de estabilização ou diminuição nas taxas de incidência de NHL, nos países do norte europeu, Estados Unidos, Canadá, Austrália e Nova Zelândia (8). Entretanto, estimativas para o Brasil, apontam um aumento da mortalidade por NHL de 1996 para 2004 (9), indicando um comportamento divergente da incidência e mortalidade em comparação aos dos países desenvolvidos. Atualmente é a 11ª neoplasia mais frequente no Brasil, sendo a segunda causa de morte por neoplasia hematológica, em ambos os sexos, segundo o SUS (9). Globalmente é o 8º câncer em incidência e 11º em mortalidade (7).

Os linfomas de Hodgkin acometem principalmente os linfonodos cervicais em indivíduos adultos. Os linfomas não-Hodgkin, 85% dos linfomas, são subdivididos em relação ao local de acometimento primário: nodais (linfonodo) 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, o linfoma é classificado como cutâneo primário, e representa 25% dos NHL com acometimento extranodal (10).

Em 2007 a *International Society for Cutaneous Lymphomas* (ISCL) e a *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC), propuseram a classificação consensual e estadiamento para linfomas cutâneos primários baseados nos aspectos histopatológicos, imuno-histoquímicos, moleculares e clínicos. Anteriormente a 2007, linfomas cutâneos primários não eram reconhecidos como entidade própria e sim como acometimento secundário da pele por linfoma nodal (11).

Ao contrário dos linfomas nodais do tipo não-Hodgkin, 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 micose fungóide (MF) e síndrome de Sézary (SS) e representam juntos 65% de todos os casos de LCCT, com características destoantes das outras formas de LCCT (11).

Os casos de LCCT registrados nos EUA entre 1973 a 2002 evidenciaram uma incidência de 6.4 pessoas por milhão, sendo que 72% eram de MF e 2.5% de SS (12). A maior incidência foi observada em homens afrodescendentes. Raramente acomete crianças e jovens, a incidência aumenta com a idade, com a mediana de idade ao diagnóstico de 50 anos. Há um aumento de quatro vezes para adultos com mais de 70 anos (13). A classificação segundo a WHO-EORTC permite estratificar os diferentes tipos de linfoma de acordo com o prognóstico. Os casos de MF têm sobrevida média de 5 anos variando de acordo com o estadiamento. Os pacientes com SS têm expectativa de sobrevida média de 2 a 5 anos (13).

1.2 Contexto imunológico no LCCT

Não é sabida ainda a origem do comportamento das células malignas na MF, como também na SS. Em um comportamento fisiológico, os 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 nas células residentes, células dendríticas, macrófagos e mastócitos. Essa resposta pode ser mediada por componentes de patógenos (parede bacteriana, material genético viral) reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão, como os receptores *toll like* (TLR). A ativação da via NFκ-B resulta no recrutamento e migração de células apresentadoras (APC) ativadas para os

linfonodos drenantes locais. Os linfócitos T *naive*, após ativação nos linfonodos drenantes da pele, passam a expressar o antígeno linfocitário cutâneo (CLA), ligante da selectina, molécula de adesão vascular endotelial e receptores de quimiocinas (CCR4, CCR8 e CCR10) necessárias para migração para a pele (14).

Outros receptores de quimiocinas, como CXCR3 e CXCR4, são encontrados em células T em infiltrado de lesões de pacientes MF (15). Esses receptores são fortemente relacionados com o desenvolvimento e progressão de vários tipos de cânceres, sendo que seu efeito tumorigênico deve-se principalmente a ação dos seus ligantes, CXCL11 (ITAC) e CXCL12 (SDF-1) (16). A expressão desses receptores parece estar correlacionada com lesões nos estágios iniciais da MF, por conta de não ser encontrada em estágios avançados. Nestes é comum a expressão de CCR7, com perfil de receptores de quimiocinas apresentando menor potencial de tropismo epidérmico nas biópsias de lesões (15, 17).

A expansão clonal das células ativadas é precedida pela diferenciação em subtipos de células efectoras e de memória. Células de memória central (TCM) detêm a habilidade de acessar o sangue periférico e linfonodos, devido à expressão de CCR7 e selectina-L. Células efectoras de memória (TEM) migram entre sítios extranodais, como a pele, enquanto uma pequena parcela forma uma população residente no tecido, denominadas de células residentes de memória (TRM). As TRM são capazes de responder rapidamente a ativação antígeno dependente, constituem 80% dos linfócitos T residentes na pele saudável (18) e apresentam um perfil de expressão genética específico (19).

Os linfócitos T clonais em indivíduos com MF são comumente derivados de TRM, evidência relacionada à tendência de permanecerem restritos à pele (20). As células T malignas das variantes leucêmicas, SS e MF com envolvimento leucêmico, expressam CCR7 e selectina-L, indicativo de linfócitos TCM (21). A hipótese de células tumorais de origens diferentes para SS (TCM) e para MF (TRM) são condizentes com o curso clínico distinto dos dois tipos de LCCT, onde TCM podem ser encontradas nos linfonodos, sangue periférico e pele, enquanto TRM permanecem apenas na pele (21).

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 e são capazes de suprimir as células T convencionais (22). Podem expressar também a cadeia alfa do receptor de IL-2, CD25, característico de célula Treg (23). A forma solúvel do CD25 pode ser encontrada no sangue periférico em casos avançados de

LCCT, sendo considerado um fator de pior prognóstico (24). Entretanto, ainda não está determinado se uma parcela dos pacientes apresenta clones tumorais derivados de Tregs ou se alguns clones malignos assumem um perfil de célula Treg (25).

As células malignas TCD4⁺ na maioria dos pacientes com MF/SS apresentam um perfil Th2. Estimulação *in vitro* de células do sangue periférico resulta em uma considerável produção de IL-4 (26). 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 de pele não lesionadas desses pacientes ou de indivíduos controles saudáveis (27). 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 (28). Análise por PCR array identificou fatores de transcrição com perfil Th2, como GATA-3 e Jun B, altamente expressos em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com SS (29). A produção crônica de citocinas com perfil Th2 aparentemente representa um dos mecanismos pelo qual as células tumorais contornam a resposta imune anti-tumoral.

Células não malignas, incluindo monócitos, têm importante contribuição com a patogênese em linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin (30). As células T malignas na pele são frequentemente encontradas associadas com células dendríticas e macrófagos, recrutados para o ambiente tumoral provavelmente por quimiocinas (31). Essas células derivadas de monócitos promovem a tumorigênese direta pela produção de fatores que promovem o crescimento da célula tumoral e sobrevivência, e de maneira indireta por suprimir a imunidade antitumoral. Os monócitos circulantes autólogos de pacientes LCCT são capazes de promover, *in vitro*, o crescimento das células tumorais (32). A IL-10, altamente expressa em pacientes SS (33), é capaz de impedir a maturação das células dendríticas e de induzir um estado de incompetência imunológica, permitindo o escape tumoral. Além disso, células dendríticas associadas ao tumor expressam PD-L1, ligante de PD-1 e CD80, que inibe a proliferação de células T citotóxicas específicas ao tumor e promove a indução de células Treg (34).

O uso de agentes imunossupressores, como ciclosporina, levou indivíduos com forma avançada de LCCT a uma rápida progressão da doença (35), o que sugere que a resposta imunológica do hospedeiro embora aparentemente deficiente possa efetuar um papel importante na contenção da progressão da doença.

Além da aumentada produção de citocinas perfil Th2, defeitos na produção de citocinas perfil Th1 foram identificados em pacientes com células tumorais circulantes. A produção das citocinas IL-12 e IFN- α por células do sangue periférico se correlacionam inversamente com o aumento das células tumorais circulantes (36). E, o declínio dessas citocinas está relacionado com o menor número circulante de células dendríticas mielóides e plasmocitóides (37). Presume-se que haja um déficit de citocinas produzidas por células dendríticas mielóides, 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 em células T malignas, em pacientes SS, pode estar relacionado com o déficit na produção de IL-12, IFN γ e maturação das DC (38). O ligante de CD40 não é expresso em células T *naive*, e sim modulado positivamente após ativação via TCR. Células T malignas não expressam CD40L após ativação via TCR/CD3. A ausência desse ligante na interação com CD40 em APC durante a resposta imunológica pode levar a uma profunda redução na atividade de DC e produção de citocinas. Entretanto, a adição *in vitro* de CD40L recombinante foi capaz de reverter a produção deficiente de IL-12 e IFN γ (38). Uma compilação de achados imunológicos e, da imunopatogênese em pacientes com MF e SS é ilustrado na **Figura 3**.

Alguma citocinas promovem a homeostase e manutenção das células T, como a IL-7. IL-7 é produzida principalmente por células com origem não hematopoieticas, como queratinócitos, fibroblastos estromais da medula óssea, tecidos linfóides, células epiteliais do timo, e intestino (39). A produção de IL-7 por células estromais é relativamente constante e independente de estímulos externos, a regulação do eixo IL-7/IL-7R é principalmente via expressão do receptor (39).

A sinalização da IL-7 com seu receptor IL-7R (CD127) promove em células T periféricas, a proliferação e a sobrevivência celular por proporcionar um balanço favorável da família de proteínas anti-apópticas BCL-2 (40). A IL-7 é detectada em altas concentrações séricas em pacientes LCCT (41), e expressão do transcrito nas biópsias de pele (42). Cultura de pele de indivíduos LCCT tem o crescimento das células malignas interrompido após a adição de anticorpo neutralizante de IL-7 (41). Além disto, a exposição de células de Sézary com IL-7 desencadeia aumento na expressão dos receptores IL-7R (CD127) e IL-2 e efeitos sinérgicos à IL-2 na proliferação dessas células (42). IL-7 e também IL-15 regulam a expressão de c-myc e BCL-2 em linhagens de LCCT promovendo a sobrevivência e proliferação celular(43). A expressão de BCL-2 também é encontrada nas lesões de LCCT,

sendo que altos níveis da família de proteínas está relacionada com resistência das células tumorais à radioterapia (44).

Kim, E.J., *et al*, 2005.

Figura 3. Imunopatogênese da micose fungóide e síndrome de Sézary.

A proteína sinalizadora STAT5 é um fator transcrição, que exibe um papel importante de perfil inflamatório. Em linfócitos TCD8+, mas não TCD4, o STAT5 é essencial na homeostase de células efectoras (45). Em modelo experimental *knockout* de STAT5 ocorre a redução da população total de linfócitos TCD8+ (46). STAT5 é fosforilado pelo complexo Janus kinases (JAK1/JAK3) de maneira dependente de sinalização de citocinas

sensibilizadoras do receptor gama comum, como IL-7, IL-15, IL-2 e IL-21 (47). Subunidades de STAT5p promovem transcrição de diversas proteínas, entre elas BCL2.

Fotoférese extracorpórea foi capaz de diminuir a fosforilação de STAT5 após estímulo com IL-15 em linfócitos totais (48). Estudos recentes identificaram altos níveis de IL-15 circulantes em pacientes com LCCT, relacionado com o avanço da doença. Um agente transcripcional repressor de IL-15, Zeb1, encontra-se hipermetilado, promovendo o aumento da transcrição de IL-15. Em modelo experimental, a hiperexpressão de IL-15 induz um quadro espontâneo de LCCT similar com a forma humana (49). Estudos recentes indicam que STAT5 induz a expressão de miR-21 e miR-155, micro RNA pós transcricionais altamente expresso na pele e no sangue periférico de pacientes e que conferem propriedades anti-apoptóticas em células malignas no LCCT, (50, 51).

A resistência à apoptose das LCCT é dificilmente atribuída apenas aos fatores de resistência intrínsecos. A necessária adição de citocinas ou sinais co-estimuladores de células T nas culturas de células malignas (41, 42) sugerem que fatores extrínsecos presentes no ambiente tumoral contribuam para o crescimento e sobrevivência das células T malignas.

1.3 Síndrome de Sézary

Os primeiros relatos da Síndrome de Sézary são de artigos datados de 1938 a 1949, nos quais o dermatologista francês, Albert Sézary, descreve pacientes com células “monstruosas” na pele e no sangue, paralelamente a eritrodermia e prurido intenso (52).

Sendo assim, síndrome de Sézary foi definida historicamente pela tríade de eritrodermia, linfadenopatia generalizada e presença de células neoplásicas (Células de Sézary) na pele, nos linfonodos e no sangue periférico (53). A contagem de células de Sézary por microscopia nem sempre é altamente sensível ou reproduzível por diferentes laboratórios (54). Além disso, linfócitos normais ativados podem se apresentar morfológicamente similares às células de Sézary. Sendo assim, outros critérios, além da contagem absoluta de células de Sézary $>1000\text{mm}^3$, sugeridos pela *International Society for Cutaneous Lymphomas* (ISCL), são necessários para o diagnóstico: alterações imunofenotípicas de marcadores de células T maduras, CD2, CD3, CD4, CD5, deleção do 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 em biopsias de pele (10). Devido ao grande número de linfócitos neoplásicos em lesões tumorais dos pacientes com LCCT, ensaios moleculares normalmente

evidenciarão um clone de células T predominante. Avaliações das cadeias V β predominantes por citometria de fluxo ou por PCR possibilitam a identificação do clone maligno (55).

Dentre as alterações de marcadores mais comuns, é a perda de CD7, encontrada em aproximadamente dois terços dos casos, juntamente com a perda de CD26, maioria dos casos, que representam ferramentas na identificação das células de Sézary (56). Entretanto, a expressão alterada desses marcadores de células T, embora frequente, não é específica para as células T malignas, sendo descrito em indivíduos saudáveis como também em outros tipos neoplásicos de células T (57) e dermatoses benignas (58).

Em raras ocasiões, SS pode ocorrer após 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" (59).

Outro marcador, ligante de MHC de classe I, CD158k/KIR3DL2, pertencente à família à *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIR), tem sido descrito como um marcador para células T malignas (60). Em indivíduos normais é expresso em uma parcela de células NK e uma minoria de linfócitos TCD8+ circulantes (61). Trabalhos relatam a expressão de CD158k estar elevada em clones malignos de células T circulantes em indivíduos SS (62), e em linfócitos T de infiltrado tumoral (63). Entretanto, estudos recentes identificaram a expressão de CD158k em células T circulantes em apenas 40% de um grupo de 107 casos de SS (64). Devido à intensa heterogeneidade das células de Sézary, além da imunofenotipagem, outros ensaios são necessários para a identificação da célula maligna.

O óbito normalmente é relacionado à sepse bacteriana (microorganismos mais frequentemente isolados: *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) atribuída à imunodeficiência (65). A imunodeficiência em questão pode ser decorrente do perfil de citocinas Th2 secretadas pelas células malignas, diminuição da resposta à antígenos, diminuição da citotoxicidade mediada por células T (66) ou a perda do repertório de receptores de células T (TCR) (67). A perda do repertório de TCR é observada também em pacientes infectados por HIV, e no LCCT, estima-se que seja devido a imunossupressão pelas células T malignas em células T não malignas, diminuição de geração de células T *naive* pelo timo ou por outras causas ainda não identificadas (33). A diminuição do repertório TCR é correlacionada com o estágio do linfoma em pacientes com LCCT. O repertório é mais comprometido nos estágios mais avançados, embora possa ser encontrado também em estágios iniciais (67, 68).

1.3.1 Imunidade anti-tumoral: células TCD8+ na síndrome de Sézary

O curso natural da resposta TCD8+ inclui ativação de células *naive*, expansão clonal de células efectoras, redução das células efectoras e geração de células de memória, sendo memória central e/ou memória efectora (69). A homeostase é restaurada principalmente por indução de apoptose após a expansão massiva de células efectoras, via moléculas pró-apoptóticas, como a molécula Bim (70).

A função primordial das células TCD8+ é sua ação citotóxica contra células infectadas por vírus ou patógenos intracelulares via moléculas de classe I do MHC. O contato dos linfócitos TCD8+ citotóxicos com as células alvo induz apoptose por dois mecanismos: num primeiro evento ocorre a liberação de grânulos de perforina que permitem a entrada de grânulos co-secretados de granzimas ou granzima na célula alvo induzindo a apoptose. O segundo evento envolve a ligação entre o Fas ligante dos linfócitos TCD8+ com o receptor Fas no queratinócito que culmina em uma cascata de sinalização intracelular apoptótica (71). As células TCD8+ secretam citocinas como TNF e IFN- γ e quimiocinas que atraem células inflamatórias para os sítios de infecção (72).

Nas células T citotóxicas, os grânulos líticos dos lisossomos que contêm perforina e granzima são revestidos por uma dupla camada lipídica constituída de glicoproteínas lisossomais (LAMPs), incluindo CD107a (LAMP-1), CD107b (LAMP-2) e CD63 (LAMP-3). A expressão de CD107a e b na superfície de células mononucleares do sangue periférico é marcador de degranulação, ou seja, de função efectora celular, também pode aumentar a adesão vascular dos linfócitos (73). As duas populações efectoras contêm perforina, secretam IFN- γ e TNF- α e conferem funções citotóxicas contra as células alvo (74). As células TCD8+ citotóxicas são essenciais na resposta antitumoral na SS, uma deleção ou um estado anérgico das células TCD8+ específicas ao linfoma poderia resultar na progressão da doença (75).

A presença de linfócitos TCD8+ no infiltrado tumoral é considerada um fator de prognóstico favorável nos pacientes com MF (76). Existe uma relação positiva de linfócitos TCD8+ circulantes, ≥ 600 cells/uL, a um maior tempo de sobrevida de pacientes com LCCT (77). Essa relação se torna mais proeminente de acordo com o avanço da doença.

A progressão da doença em pacientes com LCCT está associada a uma redução nos números de células NK circulantes e sua funcionalidade. O percentual de células citotóxicas, NK e TCD8, expressando marcadores de ativação, CD69, é reduzido em pacientes com LCCT em estágios iniciais e avançados (78).

Além da ação citotóxica, a geração de células de memória imunológica é essencial para conferir proteção imediata nos tecidos periféricos inflamados e nos órgãos linfoides secundários. As células T CD8⁺ podem ser classificadas em quatro populações distintas baseadas em seus fenótipos: uma população de memória central (CD45RA⁻CCR7⁺), duas de memória efetora (CD45RA⁻CCR7⁻, CD45RA⁺CCR7⁻), e uma população *naive* (CD45RA⁺CCR7⁺). Mecanismos que controlam quais células efetoras entram em apoptose e quais sobreviverão para tornarem-se células de memória ainda não estão bem esclarecidos. Dentro da heterogeneidade dos linfócitos TCD8⁺ efetores, algumas propriedades podem apontar precursores de células de memória. As células T efetoras de memória migram para os tecidos periféricos não linfóides, tem potencial citolítico e promiscuidade no potencial migratório; enquanto que as células T de memória central dirigem-se para as áreas de células T nos órgãos linfóides secundários, tem baixo potencial citolítico e apresentam limitado potencial migratório (79).

Em alguns modelos bem estabelecidos de infecção, como vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV), um pequeno grupo de células TCD8⁺ efetoras foi indicado como precursor de células de memória, baseado nas expressões de receptor da subunidade alfa de IL-7 (CD127), CD27, BCL-2, e redução da expressão do receptor de lectina G1 (KLRG1) (80). Apesar de esses marcadores serem entendidos como potenciais precursores da formação de células de memória, esses fenômenos não são critérios exclusivos, uma vez que a morte celular também é observada em células com alta expressão de CD127 (81). Em infecções agudas, células TCD8⁺ de memória são mantidas de maneira independente de apresentação antígeno por ação das IL-7 e IL-15 que promovem sobrevivência celular e uma proliferação basal (82). Os efeitos de sobrevivência IL-7 são, em parte, devidos a capacidade de aumentar a expressão da família de proteínas anti-apoptóticas BCL-2 via fosforilação de STAT5 (46). A ativação dos linfócitos TCD8⁺ resulta em uma regulação negativa da expressão de CD127, acompanhada pela redução de BCL-2, o que pode estar envolvido com a fase de contração, indução de apoptose em células efetoras (83).

Exaustão celular nos linfócitos TCD8⁺ é caracterizada por uma fase temporária em que os linfócitos não apresentam mediadores líticos como granzima B, perforina ou apresentam alguma função adicional comprometida (84). Em contexto de infecção viral crônica, como HIV, HCB, EBV e CMV, a redução do receptor CD127 em linfócitos TCD8⁺ tem sido correlacionado com exaustão celular, decorrente da exposição antigênica persistente (85). Pacientes com HIV apresentam uma correlação inversa entre a expressão de CD127 em

linfócitos TCD8⁺ totais com o índice de apoptose desses mesmos linfócitos. A redução da expressão de CD127 está relacionada também com a alta viremia e depleção de linfócitos TCD4⁺ nesses pacientes, sendo considerado indicador de mau prognóstico (86, 87). Em pacientes com HCV, linfócitos TCD8⁺ vírus-específicos considerados exaustos, com alterações na capacidade proliferativa, diferenciação celular e reconhecimento antigênico, com marcadores sugestivos de exaustão celular como, PD-1, KLRG1 e CD160, apresentavam exclusivamente expressão baixa ou mediana do receptor CD127 (88). Em modelo experimental de infecção (LCMV), estimulação persistente do TCR resulta na redução irreversível da expressão de CD127 em linfócitos TCD8⁺ e deleção desses linfócitos específicos. No caso da estimulação por um curto período de tempo, os linfócitos TCD8⁺ voltaram a expressar CD127 e sua sobrevivência foi estendida por mais tempo (85).

Em biópsias de lesão em pele de pacientes com SS, a maioria dos linfócitos T CD8 são *naïve* ou células de memória, e não células T efectoras (89). O receptor de quimiocina CXCR3 é relacionado ao *homing* de células T efectoras ao sítio de inflamação e encontra-se diminuído em linfócitos T de pacientes com LCCT (90). Esse predomínio de células T imaturas pode ser explicado pela redução de CXCR3, principalmente em células TCD8⁺ efectoras de pacientes com LCCT (75). Além disto, há uma correlação inversa entre os níveis de expressão de CXCR3 em células TCD8⁺ e a porcentagem de células tumorais CD4⁺ CD7⁻ no sangue periférico (75). De fato, a evolução da doença está associada ao aparecimento de células tumorais circulantes paralelamente com a redução da contagem de células TCD8⁺ CXCR3⁺ no sangue periférico.

O fenótipo de células T CD8⁺ CD28⁻ exibe função reguladora, e são encontrados em porcentagem elevada no sangue periférico de pacientes com LCCT, correlacionando-se positivamente com idade, estágio clínico e níveis do infiltrado da pele (91).

O recrutamento de células T CD8⁺ é provavelmente gerado pela exposição aos antígenos tumorais específicos, particularmente quando o infiltrado tumoral aumenta na pele. A resposta antitumoral pelas células TCD8⁺ pode ser modulada com determinados adjuvantes, como ligantes de receptores Toll-like (TLR).

1.4 Receptores Toll-like e câncer (TLR)

O estágio avançado de MF/SS tem prognóstico reservado, o que gera interesse no desenvolvimento de novas terapias adjuvantes com ação imunomoduladora para potencializar

a resposta antitumoral. Adjuvantes de resposta imune inata como os agonistas de TLRs, têm sido amplamente abordados em pesquisas para potencializar a resposta tumoral, utilizados em associação ou não com antígenos do tumor.

Os receptores TLRs são receptores de reconhecimento padrão (PRRs), pertencentes à superfamília de receptores interleucina-1-TLR (TIR), capazes de reconhecer estruturas conservadas presentes nos diversos microorganismos (PAMPs, Padrões Moleculares Associados a Patógenos). O reconhecimento dos PAMPs inicia as vias de sinalização que resultam na produção de citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias e indução da resposta adaptativa (92). São classificados de acordo com o tipo de PAMPs que reconhecem.

Os TLRs são altamente conservados através da evolução e podem ser encontrados em espécies distantes como plantas, peixes e mamíferos (93). Atualmente, existem 13 subtipos distintos de TLRs identificados em mamíferos, sendo que 10 desses são codificados por humanos. Cada subtipo de TLR exibe um padrão de expressão peculiar e responde a sinais específicos. Ainda podem ser divididos em duas maiores categorias, de acordo com a localização celular: (1) TLRs endossomais ou intracelulares (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9); e (2) TLRs associados à membrana plasmática ou extracelulares (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) (94).

O domínio citoplasmático dos TLRs, após o reconhecimento dos TLRs aos seus ligantes, desencadeia o recrutamento de moléculas adaptadoras, como fator de diferenciação mielóide (MyD88), proteína associada-TIR (TIRAP), receptor toll ativador de interferon (TRIF) e o fator nuclear (NF)-kappa B. Essas plataformas moleculares regulam a transcrição de genes de ativação, como indutores de interferon tipo I e II, e de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), IL-1, IL-6 e IL-12 (95). O padrão de citocinas induzidas é determinado pelo tipo celular ativado via TLR. A maioria dos TLRs, com exceção do TLR3, sinaliza via MyD88. Outros adaptadores como os membros da família de fatores de transcrição IRF (fator regulador de IFN), particularmente o IRF 1, 3, 5 e 7 são ativados pela MyD88 ou TRIF e são cruciais para produção de IFN tipo I (96). Os receptores do tipo TLR respondem também a sinais endógenos de células estressadas ou de morte celular, o que sugere um papel na auto-vigilância e resposta imune anti-câncer (95). Os subtipos de TLRs e suas vias de sinalização estão representados na **Figura 4**.

Joosten and *et al.*, 2016 (101).

Figura 4. Representação esquemática dos subtipos de TLR e vias de sinalização em humanos.

Os receptores tipo toll são encontrados em diversos tipos celulares como células dendríticas, monócitos, neutrófilos, linfócitos, células epiteliais, natural killers (NK), sendo que cada tipo celular expressa uma combinação de diferentes tipos de TLR. Células dendríticas mielóides expressam TLR1-6 e TLR8. TLR7 e TLR9 são encontrados principalmente em dendríticas plasmocitóides e linfócitos B (97). Monócitos expressam todos os TLR com exceção do TLR3. Neutrófilos expressam TLR1, TLR2 e TLR4-10, enquanto células NK expressam TLR1 (98, 99). Linfócitos T podem expressar TLR2, 8 e 10 (95). Apesar dos TLRs serem expressos principalmente em células hematopoiéticas, também são encontrados em queratinócitos, células epiteliais da pele, do trato intestinal, urogenital e respiratório (100).

Agonistas para TLR3, 4, 7, 8 e 9 são agentes promissores na imunoterapia para o câncer, e estão na lista de agentes imunoterápicos com altos potenciais para tratamento no

câncer do Instituto Nacional do Câncer (102). IFN do tipo I, é a principal citocina induzida após ativação de TLR3, 7, 8 e 9. Fortemente associada com a imunidade anti-viral, é essencial para a imunidade adaptativa por facilitar a apresentação antigênica, promover a proliferação de células T de memória, inibir a apoptose em células T e induzir ativação de células dendríticas e células NK (103). Além da resposta dependente de IFN I, as citocinas IL-6 e IL-12, induzidas também pela ativação de TLRs, inibem a efetividade das células T reguladoras e polarizam a resposta para o perfil Th1, promovendo efeitos antitumorais. Ativação de TLR7 e TLR8 com imidazoquinolinas desencadeia efeitos anti-tumorais, por inibir angiogênese, potencializar a citotoxicidade de células NK e promover a apoptose direta de células tumorais (104, 105).

Os ligantes de TLR podem promover ativação de células TCD8⁺, induzindo o fenótipo de memória/efetor e aumento da expressão de CD69 (106). Contudo, os agonistas de TLR3 e TLR7 resultam na ativação de todos os fenótipos de maturação pelas células T CD8⁺.

Os agonistas de TLR sejam em uso tópico ou *in vitro* tem mostrado ampla ação imunomoduladora e têm sido explorados para potencializar a atividade imune inata de células dos pacientes com LCCT em estágio avançado (66). Nos pacientes de LCCT, o estímulo com agonista para TLR8, Imiquimode 3M-002, induz aumento da expressão de CD69 e CD25 em células NK e células T, respectivamente, e aumento da atividade citolítica de células NK. A combinação de agonistas para TLRs com citocinas, como IFN mostra um importante efeito no tratamento de pacientes em estágios avançados de LCCT, por potencializar a resposta imune. Além disto, a associação do agonista para TLR 7/8 (3M-007) com IFN- α ou IL-15 induz a produção de citocinas por DCs, aumenta a atividade citolítica de células NK contra células tumorais assim como induz células TCD8⁺ citotóxicas em pacientes com LCCT(107).

Similarmente, os agonistas de TLR9, CpG A e CpG B, são capazes de induzir a produção *in vitro* de IFN- α , e de aumentar a função das células NK e células TCD8⁺ em pacientes com LCCT avançado (107). O uso de PF-3512676 (CPG7909), um agonista de TLR9, é capaz de promover a maturação de células pDC e eficácia anti-tumoral em protocolo clínico de fase I em pacientes com MF e SS, que são refratários a outros agentes terapêuticos sistêmicos. Estudos de vacinação *in situ* com agonista para CpG-ODN diretamente nas lesões, associado com tratamento de radiação localizada, mostrou-se eficaz para desenvolver resposta anti-tumoral (108).

Os resultados sugerem que a radiação local pode tornar as células T malignas mais susceptíveis para o processamento antigênico pelas APC e que a estimulação das células pDCs por CpG-ODNs, mesmo em doses subterapêuticas, induz resposta anti-tumoral. Além

das evidências histológicas de regressão de lesões há uma diminuição do número de células T reguladoras Foxp3+ e aumento de pDCs.

Nas biópsias de pele de pacientes com MF há aumento da expressão de TLRs 2, 4 e 9 enquanto no infiltrado tumoral de TLRs 5, 6 e 7 (109). 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 (109). A aplicação tópica nas lesões de agonista de TLR, como o Imiquimod ligante de TLR7 induz uma resposta imune local capaz de regredir as lesões (110). 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 (111).

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. Grande parte dos trabalhos científicos foca na caracterização e na funcionalidade das células malignas. Abordagens com o foco nos linfócitos TCD8+ podem contribuir para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas na síndrome de Sézary.

Objetivo

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a expressão de moléculas de ativação e exaustão celular em células TCD8+, verificar o potencial de ligantes de TLR na indução de citocinas e na expressão de moléculas de ativação em células TCD8+. Conferir resposta do eixo IL-7/IL-7R nos linfócitos T.

2.2 Objetivos específicos

Analisar no sangue periférico de pacientes com SS e controles saudáveis,

- A frequência e expressão de marcadores de ativação/exaustão em células TCD8+ e TCD4+ nos diferentes estágios de diferenciação;
- O potencial de resposta de células T ao ligante de TLR7/TLR8 em células mononucleares na produção de IFN- γ e TNF e na expressão de marcadores de ativação/exaustão;
- A resposta do eixo IL-7/IL-7R pela análise de fosforilação de STAT5, expressão de BCL-2 em células T, potencial proliferativo e nível sérico de IL-7.

Métodos

3. MÉTODOS

3.1 Casuística

Os pacientes com Síndrome de Sézary (SS) (n=15), com idade de 48 a 85 anos, composto por sete homens e oito mulheres, foram procedentes do Ambulatório de Linfomas Cutâneos da Divisão Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. O critério de seleção utilizado foi o proposto pelas organizações EORTC e ISLC (10, 11): 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 a 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, contudo para três indivíduos com SS, as amostras foram coletadas durante o tratamento: caso SS2 - PUVA, clorambucil e deflazacort; caso SS5 - clorambucil, prednisona e betametasona; caso SS19 - prednisona, interferon, UVBnb e betametasona.

O grupo controle foi composto por indivíduos sadios (n=24), sendo 12 homens e 12 mulheres, com idade entre 35-75. Todos os indivíduos foram informados do conteúdo da pesquisa, e submetidos ao 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 tubo heparinizado estéril e diluídas com solução fisiológica, volume a volume, em tubo plástico. 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 TCD8+ e TCD4+ do sangue periférico.

Foram coletados cinco mL de sangue periférico em tubo contendo EDTA. A marcação extracelular das células foi realizada com a adição dos anticorpos descritos no **Quadro 1**, em 140µL de sangue e posterior incubação por 20 minutos a temperatura ambiente ao abrigo de luz. As hemácias foram lisadas com a solução BD FACSTTM LysingSolution (BD Biosciences) por 15 minutos a temperatura ambiente.

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

Quadro 1 - Anticorpos do painel de ativação/exaustão e diferenciação de células T de sangue periférico

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Empresa
CD3	BV605	SK7	BD Biosciences
CD4	PE-CF594	RPA-T4	BD Biosciences
CD8	V500	RPA-T8	BD Biosciences
CCR7	AlexaFluor 647	3D12	BD Biosciences
CD45RA	APC-H7	HI100	BD Biosciences
CD26	FITC	M-A261	BD Biosciences
CD7	Violet 421	M-T701	BD Biosciences
CD38	AlexaFluor 700	HIT2	BD Biosciences
PD-1	PE	MIH4	BD Biosciences
CD127	PE-Cy7	HIL-7R-M21	BD Biosciences
PDL-1	PE-Cy7	MIH1	BD Biosciences

3.4 Produção de citocinas por células T após estímulo com ligante de TLR

Para avaliar o efeito da ativação de células por ligantes de receptores Toll-like (TLR) na produção de citocinas e na expressão de marcadores de ativação/exaustão em células T, as CMNs foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen, CA, EUA) suplementado

com 10% de soro AB humano (Sigma Aldrich, CA, USA) e distribuídas em placa de 48 poços (Corning-Costar, NY, EUA), na concentração de 2×10^6 células/mL a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após 18 horas, as CMNs foram incubadas com anticorpo anti-CD107a (PeCy5) e estimuladas com agonista de TLR7/8 (CL097, 5.0 µg/mL) (Invivogen, CA, EUA) ou acetado de forbolmiristato (PMA, 50ng/mL) e ionomicina (1µg/mL) por 20 horas. Após seis horas de incubação, acrescentou-se a brefeldina A (10µg/mL, SigmaAldrich). Posteriormente, as células foram lavadas e incubadas com marcador de viabilidade Texas Red (Invitrogen) por 20 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS, fixadas e permeabilizadas em tampão CytofixCytoperm (BD), a marcação extra e intracelular foi procedida com anticorpos descritos no **Quadro 2**. A técnica do FMO (*Fluorescence minus one*) foi realizada com o objetivo de definir a intensidade de fluorescência correspondente ao positivo cada marcador. Após a marcação das células 300.000 eventos foram adquiridos em aparelho de citometria de fluxo Fortessa (LSRFortessa, BD, Califórnia, USA) com auxílio do software Diva (BD – USA). A análises das células foi realizada através do software FlowJo (Try Star – USA).

Quadro 2 - Anticorpos do painel de células T secretoras de citocinas

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Empresa
CD3	BV605	SK7	BD Biosciences
CD4	V500	RPA-T4	BD Biosciences
CD8	AlexaFluor 700	RPA-T8	BD Biosciences
CD26	FITC	M-A261	BD Biosciences
CD69	APC-Cy7	FN50	BD Biosciences
CD107a	PE-Cy5	H4A3	BD Biosciences
IFN γ	V450	B27	BD Biosciences
TNF	PE-Cy7	MAb11	BD Biosciences
PD-1	PE	MIH4	BD Biosciences

3.5 Avaliação da expressão de BCL2 em células T

Para avaliar a expressão da família da proteína anti-apoptótica BCL2, as CMNs foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com 10% de soro AB humano

(Sigma Aldrich) e distribuídas em placa de 48 poços (Corning-Costar), na concentração de 2×10^6 células/mL 37°C em estufa com 5% de CO_2 . Após 18 horas as células foram estimuladas com recombinante humano de IL-7 (10ng/mL) ou IL-15 (10ng/mL) (Peprotech, NJ, USA) e incubadas por mais 48 horas. Posteriormente, as células foram coletadas, lavadas e incubadas com marcador de viabilidade Texas Red (Invitrogen) por 20 minutos em temperatura ambiente. Seguiu-se com o protocolo de marcação para citometria de fluxo e aquisição apresentado no item anterior. O painel de anticorpos utilizados encontra-se no **Quadro 3**.

Quadro 3 - Anticorpos do painel para a avaliação da expressão de BCL-2 em células T

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Empresa
CD3	BV605	SK7	BD Biosciences
CD4	V500	RPA-T4	BD Biosciences
CD8	AlexaFluor 700	RPA-T8	BD Biosciences
CD127	PE-Cy7	HIL-7R-M21	BD Biosciences
CCR7	AlexaFluor 647	3D12	BD Biosciences
CD45RA	APC-H7	HI100	BD Biosciences
CD158k	PE	180704	R&D Systems
BCL2	FITC	100	BioLegend

3.6 Avaliação da fosforilação de STAT5 em células T

Para avaliar o potencial de resposta ao estímulo de IL-7 e IL-15, foi analisada a fosforilação de STAT5 em células T pela técnica Phosflow, em CMNs de indivíduos saudáveis e com SS. 1×10^6 de CMNs foram distribuídas em tubo de citometria, em 500 μL de meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com 10% de soro AB humano (Sigma Aldrich) a 37°C em estufa com 5% de CO_2 . Após 18 horas, as células foram estimuladas com recombinante humano de IL-7 (1ng/mL) ou IL-15 (1ng/mL) (Peprotech) e incubadas por 15' a 37°C . Seguiu-se com o protocolo de marcação extracelular e intracelular para citometria sob as instruções do fabricante. Após a marcação das células 300.000 eventos foram adquiridos em aparelho de citometria de fluxo Fortessa (LSRFortessa) com auxílio do software Diva (BD). A análise das células foi realizada através do software FlowJo (Try Star).

Quadro 4 - Anticorpos do painel de fosforilação de STAT5

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Empresa
CD3	BV605	SK7	BD Biosciences
CD4	APC	RPA-T4	BD Biosciences
CD8	V500	RPA-T8	BD Biosciences
CD127	PE-Cy7	HIL-7R-M21	BD Biosciences
CCR7	AlexaFluor 647	3D12	BD Biosciences
CD45RA	APC-H7	HI100	BD Biosciences
CD158k	PE	180704	R&D Systems
STAT5	PE-CF594	pY694	BD Biosciences
CD132	FITC	TuGh4	BD Biosciences

3.7 Ensaio de proliferação de células T

CMNs de indivíduos saudáveis e com SS, foram marcadas com CFSE (CellTrace™ CFSE CellProliferation Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As células marcadas com CFSE (4μM) foram cultivadas (1x10⁶ células/500μL) em meio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com 20% de soro AB humano (Sigma Aldrich), na presença de IL-7 (20ng/mL), fitohemaglutinina (PHA) (5μg/mL) ou com IL-7 previamente e após 2h de estímulo com a PHA, durante 5 dias em placa de 48 poços (Corning-Costar) incubado a 37°C em estufa com 5% de CO₂. A concentração de PHA foi uma sub-dose capaz de induzir pelo menos dois ciclos de divisão celular. Posteriormente ao período de cultura, as células foram coletadas, lavadas e incubadas com marcador de viabilidade Texas Red (Invitrogen) por 20 minutos em temperatura ambiente. Seguiu-se com o protocolo de marcação extracelular para citometria de fluxo. A divisão celular foi avaliada por citometria de fluxo no citômetro Fortessa. O painel de anticorpos utilizados encontra-se no **Quadro 5**.

Quadro 5 - Anticorpos do painel de linfoproliferação em células T

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Empresa
CD3	BV605	SK7	BD Biosciences
CD4	V500	RPA-T4	BD Biosciences

CD8	AlexaFluor 700	RPA-T8	BD Biosciences
CD127	PE-Cy7	HIL-7R-M21	BD Biosciences
CD158k	PE	180704	R&D Systems

3.8 Quantificação de IL-7 sérico

Os valores de IL-7 foram avaliados em amostras de soro utilizando o kit *human IL-7 CBA Flex Set* (BD Biosciences) por citometria de fluxo. O limite de detecção foi de 0,5 pg/mL.

3.9 Análise estatística

Os dados foram analisados no software *GraphPadPrism* (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.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Características dos indivíduos envolvidos no estudo

Foram selecionados 15 pacientes diagnosticados com Síndrome de Sézary cujos achados clínicos e laboratoriais no momento do diagnóstico estão descritos na **Tabela I** e **Tabela II** respectivamente. Como grupo controle foram selecionados 24 indivíduos saudáveis com idade pareada ao grupo com SS.

O sexo dos pacientes com SS tem representação homogênea, sendo oito do sexo feminino e sete do masculino. Todos pacientes apresentavam eritrodermia (15/15, 100%) e intenso prurido (15/15, 100%). Apenas 13% (2/15) encontravam-se com ectrópios, 76% (10/13) 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 (12/15, 80%), razão de $CD4/CD8 \geq 10$ (12/14, 85%) e $CD4+CD26^- \geq 30\%$ (14/15, 93%) e $CD4+CD7^- \geq 40\%$ (7/11, 63%). Em dois pacientes, SS5 e SS19, a pesquisa de clonalidade de células T foi negativa (os probes utilizados em nossos serviços provavelmente não englobaram o clone presente nesses pacientes, contudo, os demais achados clínicos e laboratoriais concluíram o diagnóstico de síndrome de Sézary).

Outros achados como leucocitose (10/15, 66%), linfocitose (10/15, 66%) e contagem absoluta de $CD4^+$ (14/15, 93%) 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 (13/13, 100%) dos indivíduos avaliados. Eosinofilia (5/15, 33%) e valores elevados da enzima lactato desidrogenase (DHL) (12/15, 80%) foram observados no grupo SS, e podem ser correlacionados com a progressão da doença.

Tabela I. Características clínicas dos pacientes no diagnóstico

Paciente	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	13	15	16	17	19
Sexo	F	F	M	M	F	M	M	F	M	M	M	F	F	F	F
Idade (anos)	75	55	56	70	62	57	68	69	56	62	48	60	65	70	58
Eritrodermia	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Prurido	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ectrópio	--	--	--	--	--	--	x	--	--	--	--	--	x	--	--
Hiperqueratose	--	x	x	--	x	x	x	nr	nr	x	x	--	x	x	x
Linfonodomegalia palpável	x	x	--	x	--	--	x	nr	x	x	x	x	x	x	--
Linfonodomegalia palpável(TC)	--	--	x	x	--	--	--	nr	--	x	x	x	--	nr	--
Clonalidade T	x	x	x	x	--	x	x	x	x	x	x	x	x	x	--
Clonalidade T na pele	x	x	nr	--	--	x	nr	x	x	x	x	x	--	x	--

Hiperqueratose palmo-plantar, TC = tomografia computadorizada; Clone de células T predominante no sangue periférico, Clone de células T idêntico no sangue periférico e na pele, nr = não realizado.

Tabela II. Características laboratoriais dos pacientes no diagnóstico

SS	Leuc.	Linf. (10 ³)	λ. Sézary	CD4 (10 ³) abs.	CD26- (%)	CD7- (%)	CD8 abs.	CD4/CD8	Eosin.	DHL/ ref.
1	x	10	x	9	75	nr	204	47	650	1,19
2	x	21	x	20	98	97	--	48	260	1,23
3	--	0,9	--	0,8	36	3	29	28	300	1,55
4	--	2,2	x	2	90	nr	66	31	1100	1,36
5	--	2	x	1,7	52	nr	182	9	750	1,36
7	x	3,4	--	3,1	74	82	174	18	50	1,74
8	x	6,8	x	6,2	86	81	295	22	150	1
9	--	3	--	2,3	81	23	--	6	270	1
10	x	7,6	x	6,6	79	nr	153	43	340	1,84
11	x	8,6	x	8,1	52	41	--	24	0	2,53
13	x	21	x	20	22	2	--	48	10270	3,39
15	x	131	x	104	99	99	0	nr	1410	1,7
16	--	3,7	x	3,2	89	88	148	22	160	1,76
17	x	7,3	x	6,7	59	62	147	45	0	1,82
19	x	3	x	2	61	2	247	10	280	1,57

Valores de referência para: Leucócitos $\geq 10 \times 10^9/L$; 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; nr= não realizado.

4.2 Perfil fenotípico das células TCD8+ no sangue periférico

A imunidade celular está deprimida nos pacientes com SS, contudo avaliações de marcadores de ativação ou exaustão celular de células TCD8+ são escassas. Inicialmente, foi avaliado o perfil fenotípico das células TCD8+ quanto aos estágios de diferenciação, expressão de moléculas de ativação (CD26, CD38), *naive* (CD127) e de exaustão celular (PD-1/PDL-1) no sangue periférico dos pacientes com SS, e comparados com indivíduos saudáveis por citometria de fluxo. A **Figura 5** ilustra a estratégia de análise utilizada para avaliar as etapas de diferenciação do linfócito TCD8+ definidas pela expressão de CCR7 e CD45RA como: *naive* (CCR7+CD45RA+), memória central (CCR7+CD45RA-), efetor (CCR7-CD45RA-) e efetor RA (CCR7-CD45RA+). A **Figura 6** exibe estratégia de análise utilizada para avaliação de marcadores de ativação/inibição.

Os pacientes com SS mostraram um percentual diminuído de células TCD8+ em relação aos indivíduos controles (**Figura 7A**) com mediana de 3.7% em comparação a 31.15% dos indivíduos controles. Além disto, o valor absoluto dos linfócitos TCD8+ em 100% dos pacientes com SS esteve abaixo do valor de normalidade.

Em relação à diferenciação celular, o grupo SS mostrou menor frequência (mediana 5.1%) da população TCD8+ *naive* em relação ao grupo controle (26.9%), não diferindo quanto aos demais estágios de diferenciação (**Figura 7B**).

O percentual de células TCD8+ com presença do marcador de ativação CD26 foi reduzido no grupo SS (mediana de 11.54%) em relação ao grupo CTRL (26.5%) **Figura 7C**.

Por outro lado, o percentual de células TCD8+ que expressam o marcador de ativação crônica, CD38, esteve elevado no grupo SS comparado ao grupo CTRL (**Figura 7C**). Esse aumento também foi observado quando avaliado o MFI, *median fluorescence intensity* (**Figura 7D**). Ao estratificar a expressão de CD38 de acordo com o grau de diferenciação celular, observou-se o aumento na frequência das populações mais diferenciadas: efetora e efetora RA no grupo SS (**Figura 8A**), porém sem interferir no MFI (dado não mostrado).

Em contraste com a expressão de CD38+ nas células TCD8+ mais diferenciadas, o percentual de células TCD8+CD127+ foi reduzido nas populações efetora e efetora RA (**Figura 8A e B**).

Quanto à expressão da molécula inibidora PD-1 (CD279), os grupos mostraram-se similares (**Figura 8C**). Ao estratificarem relação aos estágios de diferenciação, o percentual de células TCD8+PD-1+ foi elevado na população *naive* nos pacientes com SS em comparação ao grupo CTRL (**Figura 8C**), enquanto não houve diferença no seu ligante PDL-1 entre os grupos (dado não mostrado).

Os dados evidenciam que na SS, as células TCD8+ do sangue periférico expressam marcador de exaustão (PD-1) já no início de diferenciação, *naive*, enquanto que nos estágios mais diferenciados expressam o marcador de ativação crônica, CD38.

Figura 5. Estratégia de análise para caracterização de linfócitos e sua diferenciação em indivíduo saudável e paciente com s. Sézary. Amostra de sangue periférico foi avaliada por citometria de fluxo. a) Indivíduo saudável; b) Paciente com SS (SS4).

A)

B)

Figura 6. Estratégia de análise de marcadores de ativação/inibição em linfócitos TCD8+. Amostra de sangue periférico de indivíduo saudável e com SS foi analisada por citometria de fluxo. a) Indivíduo saudável; b) Paciente com SS (SS4).

Figura 7. Avaliação fenotípica dos linfócitos TCD8+. Os linfócitos TCD8+ foram analisados por citometria de fluxo em amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis (n=14-19) e de pacientes com S. Sézary (n=4-15) quanto: a) percentual em linfócitos CD3+; b) populações naïve, memória, efetor e efetor RA; c) expressão de CD38, PD-1, CD127, PD-L1 e CD26; f) MFI da expressão de CD38, CD127 e CD26. Os dados estão representados com mediana e interquartis. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Figura 8. Expressão de marcadores de ativação/exaustão nas fases de diferenciação dos linfócitos TCD8+. Amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis (n=17) e de pacientes com s. Sézary (n=12) foram avaliadas por citometria de fluxo quanto: a) expressão de CD38; b) expressão de CD127; c) expressão de PD-1. Os dados estão representados com mediana e interquartil. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$.

4.3 Perfil fenotípico das células TCD4+ no sangue periférico

O sangue periférico de indivíduos com SS mostrou uma importante expansão de células malignas (**Tabela I**). Desta forma, o percentual de TCD4+ foi elevado no grupo com SS em comparação com ao grupo CTRL (**Figura 9A**). Similarmente, a média dos valores absolutos de células TCD4+ no grupo SS (**Tabela II**) esteve acima dos valores de referência de indivíduos adultos normais. Contudo, em relação à diferenciação celular, os grupos não diferiram entre si (**Figura 8B**). Apesar da avaliação da expressão dos marcadores CD26 e CD7, as análises em células TCD4+ não distinguiram células malignas das não-malignas, toda via sugerem a presença de células malignas circulantes.

A **Figura 9C** exibe redução no percentual de células CD4+CD26+ e de CD7+, um dos critérios considerados para o diagnóstico de SS. Observamos uma redução nas populações TCD4+CD127+ e TCD4+CD38+ em comparação ao grupo controle (**Figura 9D**).

A molécula inibidora PD-1 e seu ligante PDL-1 também foi avaliada em linfócitos T CD4+ do grupo SS. O percentual de TCD4+PD-1+ foi maior no grupo SS quando comparado com grupo CTRL, porém os grupos não diferiram em relação à expressão de PDL-1 (**Figura 9D**). Vale ressaltar que a avaliação de PD-L1 do grupo SS foi possível em apenas 4 indivíduos do grupo.

Os achados mostram que as células TCD4+, neoplásicas ou não, no sangue periférico de indivíduos do grupo com SS apresentaram aumento na expressão do marcador de exaustão, PD-1, e diminuição no marcador de ativação crônica, CD38.

Figura 9. Avaliação fenotípica dos linfócitos TCD4+ no sangue periférico. As células TCD4+, de sangue periférico de indivíduos saudáveis (n=14-19) e de pacientes com SS (n=3-15), foram analisadas por citometria de fluxo quanto: a) percentual em TCD3+; b) populações naive, memória, efector e efector RA; c) expressão de CD26 e CD7 e d) expressão CD38, PD-1, CD127 e PD-L1. Os dados estão representados com mediana e interquartil. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

4.4 Perfil de resposta de células TCD4+ e TCD8+ após estímulo com agonista de receptor Toll-like

Considerando a imunossupressão nos pacientes com SS, avaliamos se a ativação de componentes da imunidade inata pode estimular a resposta de células T. Neste sentido, agonistas sintéticos de TLR são amplamente utilizados como adjuvantes de resposta vacinal com o intuito de potencializar a produção de citocinas/quimiocinas. Desta forma, células

mononucleares de indivíduos controle e com SS foram cultivadas por 20hrs com agonista de TLR 7/8, CL097 ou com forbol acetato de miristato (PMA) como controle positivo. A produção de citocinas, como IFN γ e TNF, molécula de desgranulação CD107a, marcador de ativação precoce CD69 e a molécula inibidora PD-1, foram avaliadas em células TCD8 $^{+}$ e TCD4 $^{+}$ por citometria de fluxo. A **Figura 10** ilustra a estratégia de análise para caracterização de linfócitos TCD4 $^{+}$ e TCD8 $^{+}$ em células mononucleares.

A **Figura11A** ilustra que no grupo SS, na condição sem estímulo, houve um maior percentual de linfócitos TCD8 $^{+}$ IFN γ^{+} em relação ao grupo CTRL. É importante ressaltar queo grupo SS não se mostrou permissível a modulação da produção de IFN γ pelos agonistas, PMA e CL097, em contraste do grupo controle. Da mesma maneira com a molécula de desgranulação, CD107a, somente o grupo controle mostrou aumento de resposta após adição do estímulo (**Figura 11B**). A expressão de PD-1, molécula com potencial inibidor em células T, exibe percentuais similares entre os grupos.

As células TCD4 $^{+}$ secretoras de IFN γ e TNF manifestaram um perfil similar de produção de citocinas, IFN γ e TNF, entre os grupos (**Figura 12A**). Entretanto, o grupo com SS não expressou resposta aos estímulos, PMA e CL097, na produção de IFN γ ou de CD107a (**Figura 12B**). Apesar da produção de citocinas não ser modulada pelos agonistas, houve aumento da expressão de CD69, em níveis similares entre os grupos para PMA, e não via agonista de TLR7/8, CL097, como observado no grupo controle, tanto para as células TCD4 $^{+}$ quanto para TCD8 $^{+}$.

Os dados evidenciam alteração na via de ativação TLR7/8 seja por linfócitos ou células apresentadoras, que por sua vez, não foram capazes de promover a ativação dos linfócitos T.

Figura 10. Estratégia de análise de linfócitos TCD8+ e TCD4+ em células mononucleares. CMNs de indivíduo saudável cultivadas com agonista de TLR 7/8 (CL097) ou com PMA + Ionomicina por 20 horas, e analisadas por citometria de fluxo quanto à expressão de marcadores de desgranulação, ativação, exaustão e produção de citocinas.

Figura 11. Produção de citocinas e expressão de marcadores de ativação/exaustão em células TCD8+ após estímulo com agonista de TLR 7/8. Amostras de CMNs de indivíduos saudáveis (n=22) e de pacientes com SS (n=8) foram cultivadas com agonista de TLR 7/8 (CL097) ou PMA +Ionomicina por 20 horas, e analisadas por citometria de fluxo quanto: a) produção de IFN γ e de TNF; b) expressão de CD107a, CD69 e PD-1; c) MFI de CD107a, CD69 e PD-1. Os valores estão representados como mediana e interquartis. *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, quando comparado entre grupos e #p $\leq$ 0,05, ##p $\leq$ 0,01, ###p $\leq$ 0,001 e #####p $\leq$ 0,0001 quando comparado com o condição não estimulada (basal).

Figura 12. Produção de citocinas e expressão de marcadores de ativação/exaustão em células TCD4+ após estímulo com agonista de TLR 7/8. As amostras de CMNs de indivíduos saudáveis (n=22) e de pacientes com SS (n=8) foram cultivadas com agonista de TLR 7/8 (CL097) ou PMA + Ionomicina por 20 horas, e analisadas por citometria de fluxo quanto a: a) produção de IFN γ e TNF; b) expressão de CD107a, CD69 e PD-1; c) MFI de CD107a, CD69 e de PD-1. Os valores estão representados como mediana e interquartis. * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$, quando comparado entre grupos e # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,001$ ou #### $p \leq 0,0001$ quando comparado com a condição não estimulada (basal).

4.5 Perfil fenotípico de células TCD8+ em pacientes com SS após tratamento

Investigamos se a terapia medicamentosa poderia ter alterado o perfil fenotípico dos linfócitos TCD8+. Em quatro pacientes com SS o perfil fenotípico foi reavaliado durante a terapia. Considerando que os pacientes iniciam a terapêutica imediatamente após diagnóstico,

o tempo sob terapêutica foi heterogêneo entre os pacientes: SS2 foram 23 meses, SS5 11 meses, SS16 5 meses e o paciente SS19 após 3 meses.

Em todos os pacientes avaliados foi possível detectar aumento na população TCD8+ CD26+ (**Figura 13**). Os indivíduos SS5 e SS19 apresentaram um perfil semelhante, com aumento das populações TCD8+CD38+, CD26+, PD-1+ e CD127-, sugestivo de ativação. O indivíduo SS2 se destacou do grupo pela redução do percentual TCD8+PD-1+.

Figura 13. Expressão de marcadores de ativação/inibição em TCD8+ antes e após tratamento de pacientes com SS. Amostras de sangue periférico de pacientes com SS (n=3-4) foram avaliadas por citometria de fluxo antes e após tratamento.

4.6 Eixo IL-7/IL-7R: fosforilação de STAT5 em células T

Com a constatação da redução de CD127, subunidade α do receptor de IL-7, em células TCD4+ e TCD8+ dos pacientes com SS continuamos a investigação para avaliar se o eixo IL-7/IL-7R poderia estar comprometido. A subunidade gama de IL-7R é comum a IL-15 e outras citocinas, e compartilham similaridades na cascata de sinalização intracelular, como a fosforilação de STAT5. Por essa razão a citocina IL-15 foi utilizada como controle positivo.

A fosforilação de STAT5 de células T após estímulo com IL-7 ou IL-15 foi avaliada em CMNs de indivíduos com SS (n=3) e indivíduos saudáveis (n=4) por citometria de fluxo (**Figura 14**). Optamos pela exibição de casos individualizados devido à pequena amostragem de pacientes. É possível observar um aparente retardo no deslocamento do pico da intensidade de fluorescência dos três pacientes avaliados (**Figura 14A**). O paciente SS2 exibiu menor deslocamento em relação à condição sem estímulo, enquanto o paciente SS19 revelou índices de STAT5p até maiores do que os controles. Nota-se também que o pico na condição sem

estímulo do paciente SS2 encontra-se ligeiramente deslocado, sugerindo um aumento na STAT5p constitutivo (MFI de 1472, sendo que o MFI do grupo controle foi de 810).

Os dados evidenciam que a fosforilação de STAT5 em células TCD8+ é variável entre os pacientes com SS e mostram que pode ocorrer alteração na sinalização já na condição basal, como após estímulo da via IL7-IL-R.

Figura 14. Análise da fosforilação de STAT5 após estímulo com IL7/IL-15 em linfócitos TCD8. CMNs de indivíduos saudáveis (n=4) e de pacientes com SS (n=3) foram cultivadas com IL-7 ou IL-15 por 15', e analisadas por citometria de fluxo quanto à fosforilação de STAT5. a) Representação em histograma de STAT5p em TCD8+ de um indivíduo saudável e dos três pacientes; b) MFI de STAT5p em TCD8+. Linha pontilhada preta mostra a condição com IL-7, linha pontilhada azul mostra a condição com IL-15 e preenchido de cinza a condição sem estímulo. Cada barra representa um indivíduo.

O perfil de STAT5p nos linfócitos TCD4+ se mostrou similar entre os grupos (**Figura 15**). Observou-se também a formação de dois picos de fluorescência (**Figura 15A**), o que evidencia a ausência de deslocamento parcial da população de linfócitos TCD4+ nos pacientes com SS. É fato que nos linfócitos TCD4+ do grupo com SS encontramos células neoplásicas e não neoplásicas, o que poderia justificar a disparidade na fosforilação de STAT5p.

Figura 15. Análise da fosforilação de STAT5 após estímulo com IL7/IL-15 em linfócitos TCD4. CMNs de indivíduos saudáveis ($n=4$) e de pacientes com SS ($n=3$) foram cultivadas com IL-7 ou IL-15 por 15', e analisadas por citometria de fluxo quanto à fosforilação de STAT5. a) Representação em histograma de STAT5p em TCD4+ de um indivíduo saudável e dos três pacientes; b) MFI de STAT5p em TCD4+. Linha pontilhada preta mostra a condição com IL-7, linha pontilhada azul mostra a condição com IL-15 e preenchido de cinza a condição sem estímulo. Cada barra representa um indivíduo.

4.7 Eixo IL-7/IL-7R: expressão de BCL2 em células T

A IL-7 é um potente fator de sobrevivência para linfócitos durante o desenvolvimento e na homeostase periférica. Os efeitos de sobrevivência IL-7 são, em parte, devidos a capacidade de aumentar a expressão da família de proteínas anti-apoptóticas BCL-2 via fosforilação de STAT5 (46). Desta maneira, avaliamos a expressão de BCL2 em linfócitos TCD8+ e TCD4+ em resposta a IL-7 e IL-15. Observou-se um perfil peculiar de expressão parcial de BCL-2 dos linfócitos TCD8+ dos pacientes com SS (**Figura 16A**), em relação ao grupo controle, no qual se percebeu a não uniformidade na expressão de BCL-2. Revelado também no percentual de células TCD8+BCL2+ (**Figura 16B**).

O perfil de expressão de BCL2 pelos linfócitos TCD8+ do grupo SS se manteve o mesmo após os estímulos. Evidência de que parte dos linfócitos TCD8+ não é responsivo. O indivíduo SS2 se destacou por apresentar o menor percentual de expressão de BCL2 (em

todas as condições) em comparação ao grupo controle e aos demais pacientes com SS. Além disso, o Δ MFI do paciente SS2, ou seja, a diferença entre a condição com estímulo IL-7 e a condição sem, foi 120, enquanto a média dos indivíduos controles foi de 1758. Pode-se observar no histograma (**Figura 16A**) a ausência de deslocamento após o estímulo IL-7 no caso SS2. Os casos SS5 e SS19, no entanto, apesar do menor percentual de TCD8+ BCL-2+ constitutivo equivalem-se ao grupo controle após os estímulos, tanto no percentual de TCD8+BCL2+ quanto para o MFI de BCL-2 em linfócitos TCD8+.

Figura 16. Expressão de BCL2 após estímulo com IL-7 ou IL-15 em linfócitos TCD8. CMNs de indivíduos saudáveis (n=4) e de pacientes com SS (n=3) foram cultivadas com IL-7 ou IL-15 por 48 horas, e analisadas por citometria de fluxo quanto à expressão de BCL2. a) Representação em histograma da expressão de BCL2 em TCD8+ de um indivíduo saudável e dos três pacientes; b) Expressão de BCL2 em TCD8+. Cada barra representa um indivíduo.

Em linfócitos TCD4+ a expressão constitutiva de BCL2 foi similar entre os grupos no percentual de células (**Figura 17B**). Apenas o paciente SS19, mostrou-se heterogêneo na expressão de BCL2 de linfócitos TCD4+ (**Figura 17A**). Novamente, o grupo SS se mostrou bastante heterogêneo, sendo que o caso SS5 exibiu um elevado MFI de expressão de BCL2

constitutivo, 3182, em relação à média do grupo controle, 2069, não diferindo nos valores de Δ MFI. Paralelamente, contatou-se baixo Δ MFI após IL-7 do caso SS2, 323, comparado a mediana dos controles de 1617.

Figura 17. Expressão de BCL2 após estímulo com IL-7 ou IL-15 em linfócitos TCD4. CMNs de indivíduos saudáveis (n=4) e de pacientes com SS (n=3) foram cultivadas com IL-7 ou IL-15 por 48 horas, e analisadas por citometria de fluxo quanto a expressão de BCL2. a) Representação em histograma da expressão de BCL2 em TCD4 de um indivíduo saudável e dos três pacientes; b) Expressão de BCL2 em TCD4+.

A presença do marcador sugestivo de malignidade, KIR2DL2/CD158k, em células TCD4 foi considerada para avaliação da expressão de BCL2 (**Figura 18A**). O indivíduo SS2 registrou o maior percentual de CD158k+ em linfócitos TCD4, 2,66%, em relação a 0,16% no indivíduo SS19 e 0,79% do indivíduo SS5.

No grupo SS observamos um perfil de expressão de BCL2 diferente entre os linfócitos TCD4+CD158k- e TCD4+CD158k+, sendo que a população dita maligna, CD158k+, exibiu menor potencial de expressão de BCL2, tanto no percentual quanto no MFI em comparação as células TCD4+CD158k- (**Figura 18B**). Além disso, os valores de MFI do caso SS2 revelaram alta similaridade entre as populações TCD4+CD158k+ e TCD4+CD158k-, sugerindo a

presença de células malignas na população sem o marcador de malignidade. Contudo, este paciente exibe um perfil atípico dos demais avaliados.

A)

B)

Figura 18. Expressão de BCL2 após estímulo com IL-7 ou IL-15 em linfócitos TCD4+CD158k+ e TCD4+CD158k- de indivíduos com S. Sézary. CMNs de indivíduos com SS (n=3) foram cultivadas com IL-7 ou IL-15 por 48 horas, e analisadas por citometria de fluxo quanto à expressão de BCL2. a) Marcador de malignidade, CD158k+, em TCD4+; b) Expressão de BCL2 em células TCD4+CD158k- (barra preenchida) e TCD4+CD158k+ (barra hachurada). Cada barra representa um indivíduo.

4.8 Eixo IL-7/IL-7R: resposta proliferativa de células T

É reconhecido o papel da IL-7 na indução de sobrevivência e proliferação mitotônica de linfócitos T, sendo assim, avaliamos o efeito de IL-7 na capacidade proliferativa dos linfócitos de pacientes com SS. As CMNs de indivíduos com SS e controles saudáveis marcadas com CFSE foram incubados por cinco dias com IL-7, na presença do mitógeno fitohemaglutinina (PHA) ou previamente incubados com IL-7 por duas horas e depois com

PHA por cinco dias. A incubação apenas com IL-7 não é capaz de induzir ciclos de proliferação detectáveis por CFSE, sendo assim utilizamos uma baixa concentração de PHA para que possibilitasse avaliar os efeitos da IL-7, como previamente descrito (112, 113).

Os linfócitos TCD8⁺ dos três indivíduos do grupo SS, na condição IL-7 + PHA, mostraram um percentual maior de células que sofreram divisões que a mediana dos controles, 39% (**Figura 19A e Figura 19B**). Esse potencial proliferativo aumentado dos pacientes não parece ser dependente somente de IL-7, considerando que na condição apenas com PHA obtivemos os seguintes valores: mediana dos controles, 11%, e mediana do grupo SS, 33%.

Figura 19. Resposta linfoproliferativa de células TCD8⁺ por CFSE. CMNs de indivíduos saudáveis (n=4) e de pacientes com SS (n=3) foram marcadas com CFSE e cultivadas com IL-7, PHA, ou IL-7 previamente e depois com PHA, por 120 horas, e analisadas por citometria de fluxo quanto à capacidade de proliferação. a) Representação em dot spot dos TCD8⁺ que proliferaram de um indivíduo saudável e dos três pacientes; b) TCD8⁺ que proliferaram. Dot spot vermelho indica a situação sem estímulo, e dot spot azul a condição IL-7+PHA. Cada barra representa um indivíduo.

O potencial proliferativo dos linfócitos TCD4⁺ do grupo SS não se mostrou homogêneo entre os pacientes como observado com os linfócitos TCD8⁺. O caso SS5 se destacou do grupo SS por mostrar alta capacidade proliferativa, de 47% para PHA e 89% para IL-7 e PHA, sendo a mediana do grupo controle 14% com PHA, 43% para IL-7 e PHA (**Figura 20A e 20B**). Paralelamente, o caso SS2 mostrou-se o menor potencial com 5% para PHA e 13% para IL-7 e PHA.

Como os linfócitos TCD4⁺ incluem as células malignas esperava-se um maior potencial proliferativo em comparação ao grupo controle, o que foi observado apenas no caso SS5, salientando a heterogeneidade de resposta entre os pacientes com SS. Além disto, o caso SS2 exibiu menor potencial proliferativo e maior percentual de células TCD4⁺CD158k⁺, sugestiva de células de Sézary (**Figura 18A**).

Figura 20. Resposta linfoproliferativa de células TCD4 por CFSE. CMNs de indivíduos saudáveis (n=4) e de pacientes com SS (n=3) foram marcadas com CFSE e cultivadas com IL-7, PHA, ou IL-7 previamente e depois com PHA, por 120 horas, e analisadas por citometria de fluxo quanto a capacidade de proliferação. a) Representação em dot spot TCD4⁺ que proliferaram de um indivíduo saudável e dos três pacientes; b) TCD4⁺ que proliferaram. Dot spot vermelho indica a situação sem estímulo, e dot spot azul a condição IL-7+PHA. Cada barra representa um indivíduo.

4.9 Eixo IL-7/IL-7R: Determinação sérica de IL-7

A avaliação do eixo IL-7/IL-7R foi realizada pela expressão do receptor CD127, fosforilação de STAT5, expressão de BCL2, capacidade proliferativa e também os níveis séricos de IL-7 de pacientes SS e controles. Os três casos com SS foram avaliados pré e pós terapia.

Detectamos menor quantidade de IL-7 circulante no grupo com SS em comparação ao grupo controle (**Figura 21**). Em três pacientes foram avaliados os níveis anteriores e posteriores ao tratamento: SS2 - 1.13 e 0.2pg/mL, SS5 - 2.18 e 0.3pg/mL e SS19 - 88 e 118pg/mL respectivamente. Pode-se observar que dois casos permaneceram com níveis de IL-7 diminuídos em relação aos níveis dos controles. No grupo com SS 5/16 (31,25%) dos indivíduos exibiram valores de IL-7 abaixo do limite de detecção, e 2/28 (7,14%) do grupo de indivíduos saudáveis.

Figura 21. Determinação sérica de IL-7. Os níveis de IL-7 em soro de indivíduos saudáveis (n=28) e de pacientes com SS (n=16) previamente ao tratamento foram avaliados pelo método *cytometric bead array* por citometria de fluxo. A linha horizontal representa o limite de detecção do ensaio. Os valores estão representados com mediana e interquartis. **p<0,01.

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1 Características laboratoriais dos pacientes com SS

Um dos critérios segundo a EORTC para o diagnóstico de SS é a contagem de células Sézary acima de 1000mm^3 no sangue periférico. Embora, em três (3/15) pacientes a pesquisa morfológica em esfregaço foi negativa, estes possuíam quadro clínico compatível com SS e achados laboratoriais condizentes, como imunofenotipagem, razão CD4/CD8 e clonalidade de células T. A quantificação das células malignas por lâmina de esfregaço sanguíneo ainda é utilizada, porém outros fatores devem ser considerados para o diagnóstico, uma vez que o resultado pode apresentar variações interoperador (66). É possível, ainda, que as alterações fenotípicas, que caracterizam as células neoplásicas, precedam às alterações morfológicas.

Alterações de alguns parâmetros laboratoriais, como elevação de desidrogenase láctica (DHL) e eosinofilia são frequentes em pacientes LCCT, podem estar associados com pior prognóstico (59, 65). A eosinofilia é considerada um marcador relacionado com a progressão da doença (114), e em associação com o elevado nível de IgE, revela o um perfil de secreção predominante de citocinas Th2, como IL-5, encontrado nos pacientes (115-118). Do total de 15 pacientes SS, foi observado eosinofilia em 33%, sendo um paciente (nº 13) com valor 20 vezes acima do limite normalidade de eosinófilos.

Quanto à distribuição dos linfócitos T no sangue periférico, foi observada grande alteração na proporção de células CD4/CD8 em todos os pacientes, perfil característico de SS, decorrente da massiva expansão clonal de células malignas. A redução porcentual de linfócitos TCD8+ observada nos pacientes pode ser explicada pela expansão das células TCD4+ malignas, confirmado em 93% do grupo com SS. Em LCCT, na tentativa de avaliar o prognóstico de sobrevida dos pacientes SS com células TCD8+, observaram a relação positiva de linfócitos TCD8+ circulantes $\geq 600\text{cél}/\mu\text{L}$ com maior tempo de sobrevida dos pacientes (77). A mediana dos valores absolutos de células TCD8+ do grupo com SS neste estudo foi de $153\text{ células}/\text{mm}^3$. É possível que a redução dos valores absolutos dos linfócitos TCD8+ , seja decorrente de alteração de fatores considerados essenciais na homeostase e sobrevivência, como a IL-7. De fato, evidenciamos valores séricos de IL-7 nos pacientes com SS abaixo do grupo de controles. Contudo ainda se faz necessário a dosagem de CD127 ligante solúvel, um competidor de IL-7, para assim compreendermos seus baixos níveis séricos.

5.2 Perfil de células TCD8+ na síndrome de Sézary

Nossos resultados mostram alteração na expressão de marcadores nos linfócitos TCD8, CD38 e CD127, sugestivo de ativação crônica, achados ainda não documentados. A estratégia de estimular a resposta adaptativa estimulando a imunidade inata via agonistas de TLRs não foi capaz de impulsionar produção de citocinas com perfil Th1 por células TCD8+, considerando este quadro de exaustão/ativação crônica por células TCD8+. Por outro lado, o uso de agonistas de TLRs é capaz de modular a produção de citocinas/quimiocinas em células mononucleares de pacientes com SS (dados não mostrados).

As células TCD8+ na SS exibem valores absolutos reduzidos e menor representação percentual da população de células *naive*. O número de células *naive* na periferia é determinado pelo balanço entre redução do número de células (morte ou diferenciação) e renovação celular através da divisão celular ou emigração de tecidos linfóides (82). Apesar da diminuição percentual de células TCD8+ *naive* as células mais diferenciadas, efetora e efetora RA, encontram-se percentualmente preservados em comparação ao grupo controle. A emigração de tecidos linfóides e homeostase periférica das células T *naive* é regulada principalmente por IL-7, dentre outros fatores (119). Como o grupo com SS exibiu índices séricos de IL-7 abaixo do grupo controle, é possível que as células emigrantes do timo, assim como a homeostase das células TCD8+ *naive*, estejam prejudicadas. De fato, os índices séricos de IL-7 mostraram correlação positiva ($r_{\text{spearman}} = 0.59$; $p < 0.05$) com o percentual de linfócito TCD8+ circulante, mas não com o valor absoluto ou com o percentual da população *naive* circulante nos pacientes com SS.

As células T não-malignas nos pacientes com LCCT são usualmente encontrados com números reduzidos. A linfopenia de células T é observada nos pacientes com valores absolutos de células T elevados decorrente da expansão de células malignas, mas também nos que possuem valores normais de linfócitos T ou em estágios iniciais da doença (120). Yawalkar e colaboradores identificaram perda da complexidade do repertório do receptor de células T, avaliando a cadeia variável beta (BV) e da região altamente variável CDR3 em linfócitos TCD4+, mas também em TCD8+, em pacientes em todos os estágios de LCCT (67). A causa dessa linfopenia relativa não é conhecida, mas sugere uma desregulação sistêmica da geração ou homeostase de células T.

O biomarcador TREC, *T-cell receptor excision circles*, reflete as células recém imigradas do timo circulantes no sangue periférico (121). Yamanaka e colaboradores

evidenciaram redução de TREC em células T circulantes malignas e não malignas de 108 pacientes com LCCT (121). A redução de TREC nesses pacientes correlaciona-se de maneira positiva com a perda da complexidade do TCR. Existem dois parâmetros biológicos que afetam a concentração do TREC periférico: longevidade das células T e diluição do biomarcador devido à expansão clonal, vez que o biomarcador não é replicado durante a mitose celular (122). Desta maneira, os níveis de TREC podem ser reflexos também da expansão clonal das células T. Entretanto, essa hipótese não exclui a possibilidade de os níveis baixos de TREC serem decorrentes de *output* tímico deficiente.

CD38 (ADP-ribosylcyclase) é um complexo molecular multifuncional, predominante expresso em células de linhagens linfo-monocíticas em diferentes estágios de diferenciação (123). Participa da ativação e migração de células imunocompetentes, sendo que a interação da molécula CD38 e seu ligante induz inibição da adesão ao endotélio de leucócitos via selectina (124). Além disto, a sinalização via CD38 em células T purificadas induz alta produção de IL-6, IFN γ e baixos níveis de IL-4 e IL-2 (125).

O aumento da expressão de CD38 foi um achado homogêneo no grupo com SS, tanto em linfócitos TCD8+ totais quanto nas populações efectoras. Até o momento, não há relatos na literatura sobre a expressão de CD38 em linfócitos TCD8+ de indivíduos com SS. Em infecções crônicas virais, como na infecção por HIV, há aumento da expressão de CD38 nas células TCD8+, evidência associada com rápida progressão da doença, processo de imunoativação e independente da carga viral plasmática (126). Além do mais, estes linfócitos TCD8+CD38+ específicos ao HIV, são mais suscetíveis a morte celular mediada por Fas/FasL, e apresentam alta expressão de CD95 (Fas) (127). É possível que o maior percentual de TCD8+ CD38+ nos pacientes com SS seja resultante de imunoativação persistente, entretanto maiores investigações são necessárias para avaliar o impacto dessa população na progressão da doença.

Além disto, o perfil de ativação crônica dos linfócitos TCD8+ nos pacientes com SS foi enfatizado pela redução da população *naïve* e também de TCD8+CD127+, característico do processo de imunoativação (83). A redução da população TCD8+CD127+ é descrita em diversas doenças, como na infecção por HIV e no câncer (128). O achado pode ser decorrente também de regulação negativa por citocinas de células Th2, comum em pacientes com SS, visto que IL-4 *in vitro* reduz a expressão de CD127 em linfócitos TCD8+ purificados (129). Na imunodeficiência comum variável, analisado pelo nosso grupo de pesquisa, foi observado

aumento de expressão CD38 na população de células TCD8+ TEMRA e diminuição de CD127, revelando um fenótipo de imunosenescência das células TCD8+ (130).

Em modelo experimental de infecção por LCMV, estimulação persistente do TCR resulta na redução irreversível da expressão de CD127 em linfócitos TCD8+ e posterior deleção desses linfócitos específicos. No caso da estimulação por um curto período de tempo, os linfócitos TCD8+ voltam a expressar CD127 e sua sobrevivência é estendida por mais tempo (85). Como no modelo experimental de LCMV, a redução na expressão de CD127 observada nos pacientes pode ser decorrente da estimulação antigênica prolongada.

Intensa sinalização via TCR em células TCD8+ promove a regulação negativa da expressão de CD127 (IL-7R) (82), conforme observado nas populações mais diferenciadas do grupo com SS. Esse achado, em conjunto com maior percentual de TCD8+CD38+, marcador de ativação crônica, também nas populações efectoras, sugerem perfil de ativação das células TCD8+.

A interação PD-1/PD-L1 resulta em inibição de funções imunes em linfócitos T, essa é uma das razões pela expressão de PD-1 ser relacionada com exaustão celular. A expressão de PD-1 nos linfócitos TCD8+ é comum em dermatoses eritrodérmicas benignas (131), porém existe escassa evidência em indivíduos com LCCT. Observamos que os linfócitos TCD8+ *naive* do grupo SS mostraram-se com uma expressão proeminente do marcador, entretanto de maneira heterogênea sendo que cinco (5/12) pacientes tiveram valores acima de 50%.

Na avaliação fenotípica dos linfócitos TCD8+ identificamos uma diminuição da população CD8+CD26+ no grupo SS. CD26 é uma molécula co-estimuladora, e a ativação via CD26 em linfócitos TCD8+ CD26^{high} propicia um perfil citotóxico, com produção elevada de IFN γ , TNF, FasL, e Granzima B (132). Entretanto, investigações em LCCT limitam-se a avaliar CD26 em linfócitos TCD4+, categorizando-o como marcador de célula maligna. É possível que a redução dessa via de ativação, CD26, nos linfócitos TCD8+, possa prejudicar a resposta antitumoral.

Em pacientes com LCCT os genes relacionados com o perfil Th1 e citotoxicidade estão menos expressos (133), enquanto há maior expressão de genes relacionados com resposta Th2. Devido à predominância de resposta Th2 no SS, procuramos avaliar se a utilização *in vitro* de adjuvantes de imunidade inata, como os ligantes de TLRs, seria capaz de imunomodular a produção de citocinas e quimiocinas. Os agonistas de TLR sejam em uso

tópico ou *in vitro* tem mostrado ampla ação imunomoduladora e têm sido explorados para potencializar a imunidade inata de pacientes com LCCT em estágio avançado (66).

As células TCD8⁺ do grupo com SS, não modularam positivamente a produção de IFN γ e CD107a após estímulo com PMA e Ionomicina, ao contrário do grupo de indivíduos controles. O marcador de desgranulação CD107a é um indicador de citotoxicidade em linfócitos TCD8⁺, e IFN γ , de perfil Th1. Porém, a produção da citocina fator de necrose tumoral, TNF, expressão do receptor de ativação precoce, CD69, e marcador de exaustão PD-1 pelas células TCD8⁺ foi similar entre os grupos nas condições avaliadas.

Nossos resultados evidenciam alterações fenotípicas nas células TCD8⁺ do grupo com SS sugestivas de ativação crônica e diferenciação celular, porém com perfil similar de produção de citocinas com o grupo controle.

5.3 Perfil de células TCD4⁺ na síndrome de Sézary

As avaliações realizadas com os linfócitos TCD4⁺, no grupo SS, incluem tanto as células malignas como as não malignas, considerando que não há um marcador específico para todas as células tumorais. Contudo, existem marcadores sugestivos de malignidade no LCCT, como o CD158k/KIR3DL2 (134). Entretanto, grande parte dos linfócitos TCD4⁺ dos pacientes com SS esteja comprometida, visto o aumento percentual das populações CD4⁺CD26⁻ e CD4⁺CD7⁻.

Similarmente, aos linfócitos TCD8⁺, a população TCD4⁺CD127⁺ encontra-se reduzida nos pacientes com SS. É possível que fatores extrínsecos, como interleucinas, possam regular negativamente a expressão do receptor nos linfócitos T, como descrito em outras enfermidades (129). Entretanto, existe o relato de aumento de até 300% de CD127 em queratinócitos e nos linfócitos do infiltrado tumoral em biópsias de indivíduos com SS e MF (133). Além do receptor, o RNAm de IL-7 é encontrado no tecido tumoral de indivíduos com SS e, também, na própria célula tumoral (135). Cultivos de biópsias de pele de pacientes LCCT produziram alta secreção de IL-7 com concomitante proliferação de células T CLA⁺ e CCR4⁺, fenótipo característico de *homing* para pele. O bloqueio *in vitro* de IL-7 desencadeia diminuição na proliferação celular (41).

Evidenciamos menor expressão da população TCD4⁺CD38⁺ no grupo com SS. Nossos dados corroboram o mesmo achado em um estudo recente onde 101/107 pacientes com SS exibiram o mesmo perfil. O mesmo estudo observa correlação positiva entre

TCD4+CD38- e TCD4+CD26- (64). Os autores sugerem que o CD38 pode ser parâmetro para definir uma população de células T atípica em indivíduos com SS. De fato, avaliando em nossos pacientes com SS, houve correlação negativa entre o percentual de células TCD4+CD38+ e parâmetros de progressão da doença como o número absoluto de linfócitos TCD4+ circulantes ($r_{\text{spearman}} = -0.58$; $p < 0.05$) e correlação positiva com o percentual de TCD4+CD7- ($r_{\text{spearman}} = 0.6$; $p < 0.05$).

Entretanto, além de possível marcador é necessário investigar os possíveis prejuízos imunológicos nos pacientes com SS decorrentes dessa alteração, visto que CD38 está envolvida em adesão celular, transdução de sinais, regulação intracelular de cálcio, e sua ausência está associada com redução de funções imunes (136). CD38, como ectoenzima pode associar-se com outras enzimas, como a molécula CD26 (137), comumente citada no LCCT. A sinalização da interação CD38 e CD26 em SS ainda não são bem estabelecidas. A forma solúvel de CD38 também pode ser detectada em soro e fluídos biológicos (138), as quais estão alteradas em algumas enfermidades e neoplasias (139, 140). No fluído seminal tem papel tolerogênico para células dendríticas e células TCD4+ com perfil regulador (Foxp3) (141). É possível que a redução da população TCD4+CD38+ nos pacientes com SS seja decorrente de clivagem do receptor CD38 em forma solúvel, embora ainda não existam relatos de CD38s em LCCT.

Nas condições sem estímulo, os linfócitos TCD4+ mostraram níveis similares de produção de IFN γ , TNF, CD107a, CD69 e PD-1 entre os grupos. Entretanto, no grupo com SS, o estímulo de PMA e Ionomicina evidenciou disfunção de IFN γ e CD107a paralelamente a uma modulação positiva de PD-1 pelos linfócitos TCD4+. As células TCD4+ na SS exibiram baixa responsividade à ativação via TLR 7/8, similarmente aos linfócitos TCD8+. O estímulo via TLR pode ser indireto via APCs ou de maneira direta, apesar da baixa expressão de TLRs nos linfócitos.

A expressão de PD-1 em células malignas de indivíduos com SS é sugerida como marcador de célula maligna. O bloqueio *in vitro* da interação PD-1 com seu ligante, em células mononucleares periféricas de indivíduos SS, é uma estratégia terapêutica utilizada por promover aumento da secreção de IFN γ (142). Existem dois ligantes de PD-1, PD-L1 expresso em muitos tipos celulares, como células T, células dendríticas e células tumorais, e PD-L2 cuja expressão é restrita a APCs (143). Além da molécula inibidora PD-1, avaliamos o seu ligante PD-L1. O grupo com SS mostrou níveis de expressão similares ao grupo controle,

tanto de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, contudo a análise foi feita em apenas quatro dos 15 pacientes. Além disto, a estratégia de análise foi realizada em linfócitos TCD4⁺ totais, incluindo as potenciais células malignas. A expressão do ligante inibidor tem sido descrita em linfócitos T malignos circulantes como também em monócitos e células dendríticas (34). Contudo, outro estudo mostrou expressão de PD-L1 apenas nos monócitos dos pacientes SS e não em linfócitos T(142). A interação PD-L1 com seus ligantes pode ser autócrina ou parácrina e, em pacientes LCCT, confere resistência à lise mediada por CTL, inibe ativação e proliferação de CTL além de suportar o crescimento de células malignas (32).

5.4 Eixo IL-7/IL-7R na síndrome de Sézary

Evidenciamos alterações na expressão do receptor de IL-7, CD127, em células T e nos níveis circulantes de IL-7 nos pacientes com SS. O potencial de fosforilação de STAT5 e expressão de BCL-2 podem estar comprometidos de maneira parcial nos linfócitos TCD8⁺ dos pacientes, considerando que os três pacientes avaliados exibiram dois padrões diferentes de fosforilação (dois picos) enquanto o mesmo não foi observado no grupo controle. A responsividade ao IL-7 é regulada principalmente pela expressão da subunidade α do receptor (CD127), uma vez que a subunidade gama é comum a outras citocinas além de IL-7 (144). Diante do perfil alterado de expressão do IL-7R (CD127) seguiu-se com a investigação do eixo IL-7/IL-7R nas células T dos pacientes com SS.

O perfil de fosforilação de STAT5 pelos linfócitos TCD8⁺ após estímulo com IL-7 ou IL-15 não foi homogêneo entre os pacientes com SS. Entretanto, a comparação entre os grupos exibiu um perfil semelhante. Evidenciamos um aumento de STAT5p constitutivo no paciente SS2, em células TCD8⁺ como também em linfócitos TCD4⁺, em relação aos outros pacientes e ao grupo com indivíduos saudáveis. Estudos anteriores indicam que STAT5 exibe estado anormal de ativação em células tumorais em pacientes com LCCT (145), outros evidenciam que STAT5 é truncado e funciona como um repressor transcricional em células malignas em pacientes com SS (146). Outro grupo reporta que STAT5 está envolvido na sobrevivência de células malignas através da indução de Bcl-2 (43). Além disto, as janus kinases JAK3/JAK1, indutoras de STAT5p, estão constitutivamente ativadas em células malignas na pele de pacientes com SS (147, 148). Apesar de várias evidências de alterações em STAT5 em pacientes com LCCT, são todas em células tumorais, não havendo relatos da relação de STAT5 com linfócitos TCD8⁺ em pacientes com LCCT. Ressaltamos que apesar de o MFI total de STAT5p entre os grupos estarem semelhantes é evidente que uma parcela

dos linfócitos TCD8⁺ dos pacientes com SS exibe um perfil de fosforilação tardio ou até inexistente.

Similarmente ao distinto perfil de STAT5p, com duplo pico de expressão em linfócitos TCD8⁺ dos pacientes, identificamos o mesmo padrão na expressão de Bcl-2, nos linfócitos TCD8⁺. Contudo, não há diferença na fosforilação de STAT5 e expressão de BCL2 entre os grupos em células TCD8⁺, exceto no caso SS2 que mostrou um déficit dessas funções. De fato, tem sido descrito perda genômica do gene codificador de Bcl-2 em pelo menos 40% dos pacientes com SS e MF (149). Ainda evidenciam a menor expressão da proteína e do mensageiro *in situ* em biopsias dos pacientes (149). Em contraste, nós não evidenciamos alteração da expressão de Bcl-2 em linfócitos TCD4⁺ totais nos três pacientes com SS analisados. Contudo, avaliando a expressão de Bcl-2 nas populações TCD4⁺CD158k⁺ e TCD4⁺CD158k⁻, observamos que a população sugestiva de malignidade exibe menor intensidade de Bcl-2. Este dado ainda não descrito na literatura sugere ser um interessante marcador nos pacientes com SS.

Entretanto, apesar das alterações funcionais observadas, o potencial proliferativo dos linfócitos TCD8⁺ dos pacientes encontra-se preservado equiparando-se, ou sobrepondo-se inclusive, ao grupo controle.

O paciente SS2 exibe um perfil atípico quanto a STAT5p e expressão de Bcl-2 nos linfócitos TCD8⁺. Em comparação aos pacientes SS5 e SS19 revelou índices laboratoriais alterados, como valores absolutos seis vezes superior de linfócitos ao da normalidade, onze vezes superior de células TCD4/mm³, 98% de CD26⁻ em células TCD4⁺ e 97% para CD7⁻.

A disponibilidade de IL-7 sérico exibiu forte correlação inversa com o número de células TCD4⁺. Elevação de IL-7 tem sido descrito em enfermidades com linfopenia de células TCD4⁺, como infecção por HIV, altas doses de quimioterapia e doenças autoimunes (144). Após recuperação dos níveis de TCD4⁺ usualmente, esses pacientes mostram restauração gradativa de IL-7 circulante, pelo consumo pelas células *naive* geradas. Os níveis séricos de IL-7 parecem ser regulados principalmente pelo montante de linfócitos TCD4⁺ circulantes. De fato, os índices séricos de IL-7 dos pacientes com SS exibem correlação inversa com o percentual de células TCD4⁺ ($r_{\text{spearman}} = -0.5$; $p < 0.05$) e valores absolutos de TCD4⁺ ($r_{\text{spearman}} = -0.55$; $p < 0.05$). Contudo, esse dado foi dependente do valor sérico de IL-7 do caso SS19, 10 vezes mais do que o grupo controle. Há um único relato referente a IL-7 no plasma de pacientes com LCCT, com descrição de valores circulantes elevados nos quatro

estágios das principais formas de LCCT (41). Entretanto, a metodologia aplicada por nós foi por CBA e o estudo avaliou por ELISA. A intensa redução dos níveis séricos de IL-7 dos pacientes com SS pode ser decorrente da expansão de células TCD4+ malignas.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Em pacientes com SS,

- O agonista de TLR7/8, composto CL097, não foi capaz de promover aumento da produção de IFN γ e TNF ou de ativar os linfócitos TCD4+ e TCD8+, seja de maneira direta ou indireta. É possível que este perfil não responsivo tenha decorrido do aumento das células cronicamente ativadas TCD8+ CD38+ ou *naives* com potencial de exaustão, TCD8+ PD-1+;
- Houve um comprometimento parcial da sinalização de STAT5 e expressão de BCL-2 nos linfócitos TCD8+ , mas não nos linfócitos TCD4+. A população TCD4+CD158k+ (presumidamente neoplásica) exibiu expressão de BCL-2 reduzida em comparação a população não maligna. Além disto, a diminuição sérica de IL-7 pode ter decorrido da expansão massiva de células T malignas;
- Os resultados evidenciaram importante acometimento das células TCD8+, pelo decréscimo do número absoluto, perfil de ativação/exaustão celular e além da redução de fatores séricos relevantes na homeostase celular como a IL-7.

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 IN VITRO COM AGONISTAS DE RECEPTORES TOLL-LIKE EM CÉLULAS NK E TCD8+ POLIFUNCIONAIS NA MICOSE FUNGÓIDE E SÍNDROME DE SÉZARY

Pesquisador Responsável: Maria Notomi Sato

Versão: 4

Pesquisador Executante: Marina Passos Torrealba

CAAE: 07965312.0.0000.0068

Co-autores: Profa. Dra Maria Notomi Sato, Prof. Dr. José Antonio Sanches Junior, Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: DERMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9871

Número do Parecer: 611.166

Data da Relatoria: 09/04/2014

Apresentação do Projeto: Avaliar sorologicamente pacientes com linfomas cutâneos

Objetivo da Pesquisa: Avaliar subtipos de células NK e TCD8+ e seu potencial imunomodulador

Avaliação dos Riscos e Benefícios: risco somente de coleta de sangue

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Projeto já foi aprovado. Atualmente apresenta Emenda em que informa a mudança do aluno executante de Gabrielle Mitsumoi para Marina Torrealba; Readequa o tempo de pesquisa de 48 meses para 24 meses e, informa a mudança do projeto que era para Doutorado, passando agora para Mestrado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: sem comentários

Recomendações: Ciente

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Ciente

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 14 de Abril de 2014

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 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Referências

8. REFERÊNCIAS

1. Wingo PA, Cardinez CJ, Landis SH, Greenlee RT, Ries LA, Anderson RN, et al. Long-term trends in cancer mortality in the United States, 1930-1998. *Cancer*. 2003;97(12 Suppl):3133-275.
2. McKean-Cowdin R, Feigelson HS, Ross RK, Pike MC, Henderson BE. Declining cancer rates in the 1990s. *J Clin Oncol*. 2000;18(11):2258-68.
3. 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;127(12):2893-917.
4. Roman E, Smith AG. Epidemiology of lymphomas. *Histopathology*. 2011;58(1):4-14.
5. Sabattini E, Bacci F, Sagranso C, Pileri SA. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica*. 2010;102(3):83-7.
6. 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;110(2):695-708.
7. Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol*. 2015;1(4):505-27.
8. Bosetti C, Levi F, Ferlay J, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Incidence and mortality from non-Hodgkin lymphoma in Europe: the end of an epidemic? *Int J Cancer*. 2008;123(8):1917-23.
9. Luz LL, Mattos IE. [Trends in mortality rates from non-Hodgkin lymphoma in Southeast Brazil, 1980-2007]. *Cad Saude Publica*. 2011;27(7):1340-8.
10. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005;105(10):3768-85.
11. 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;110(6):1713-22.
12. Criscione VD, Weinstock MA. Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973-2002. *Arch Dermatol*. 2007;143(7):854-9.
13. Agar NS, Wedgeworth E, Crichton S, Mitchell TJ, Cox M, Ferreira S, et al. Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sezary syndrome: validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal. *J Clin Oncol*. 2010;28(31):4730-9.
14. 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;194(10):1541-7.
15. Lu D, Duvic M, Medeiros LJ, Luthra R, Dorfman DM, Jones D. The T-cell chemokine receptor CXCR3 is expressed highly in low-grade mycosis fungoides. *Am J Clin Pathol*. 2001;115(3):413-21.
16. Singh AK, Arya RK, Trivedi AK, Sanyal S, Baral R, Dormond O, et al. Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(1):41-9.
17. Kallinich T, Muche JM, Qin S, Sterry W, Audring H, Kroczeck RA. Chemokine receptor expression on neoplastic and reactive T cells in the skin at different stages of mycosis fungoides. *J Invest Dermatol*. 2003;121(5):1045-52.
18. Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K, Dowgiert RK, et al. The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J Immunol*. 2006;176(7):4431-9.
19. Mackay LK, Rahimpour A, Ma JZ, Collins N, Stock AT, Hafon ML, et al. The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol*. 2013;14(12):1294-301.
20. Clark RA, Watanabe R, Teague JE, Schlapbach C, Tawa MC, Adams N, et al. Skin effector memory T cells do not recirculate and provide immune protection in alemtuzumab-treated CTCL patients. *Sci Transl Med*. 2012;4(117):117ra7.

21. Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, Kupper TS. Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood*. 2010;116(5):767-71.
22. 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;129(12):2875-85.
23. Girardi M, Heald PW, Wilson LD. The pathogenesis of mycosis fungoides. *N Engl J Med*. 2004;350(19):1978-88.
24. 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;132(1):42-7.
25. Krejsgaard T, Odum N, Geisler C, Wasik MA, Woetmann A. Regulatory T cells and immunodeficiency in mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Leukemia*. 2012;26(3):424-32.
26. 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;99(1):90-4.
27. 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;103(5):669-73.
28. 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;107(6):833-7.
29. 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;197(11):1477-88.
30. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2010;362(10):875-85.
31. Schlapbach C, Ochsenbein A, Kaelin U, Hassan AS, Hunger RE, Yawalkar N. High numbers of DC-SIGN+ dendritic cells in lesional skin of cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol*. 2010;62(6):995-1004.
32. Wilcox RA, Wada DA, Ziesmer SC, ElSawa SF, Comfere NI, Dietz AB, et al. Monocytes promote tumor cell survival in T-cell lymphoproliferative disorders and are impaired in their ability to differentiate into mature dendritic cells. *Blood*. 2009;114(14):2936-44.
33. 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;110(8):3015-27.
34. Wilcox RA, Feldman AL, Wada DA, Yang ZZ, Comfere NI, Dong H, et al. B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders. *Blood*. 2009;114(10):2149-58.
35. Zackheim HS, Koo J, LeBoit PE, McCalmont TH, Bowman PH, Kashani-Sabet M, et al. Psoriasiform mycosis fungoides with fatal outcome after treatment with cyclosporine. *J Am Acad Dermatol*. 47. United States 2002. p. 155-7.
36. 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;100(9):3287-94.
37. 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;27(5):1229-35.
38. 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*. 105. United States 2005. p. 219-25.
39. Gao J, Zhao L, Wan YY, Zhu B. Mechanism of Action of IL-7 and Its Potential Applications and Limitations in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci*. 2015;16(5):10267-80.
40. Khaled AR, Durum SK. Lymphocide: cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(11):817-30.

41. Yamanaka K, Clark R, Rich B, Dowgiert R, Hirahara K, Hurwitz D, et al. Skin-derived interleukin-7 contributes to the proliferation of lymphocytes in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2006;107(6):2440-5.
42. Foss FM, Koc Y, Stetler-Stevenson MA, Nguyen DT, O'Brien MC, Turner R, et al. Costimulation of cutaneous T-cell lymphoma cells by interleukin-7 and interleukin-2: potential autocrine or paracrine effectors in the Sezary syndrome. *J Clin Oncol*. 1994;12(2):326-35.
43. Qin JZ, Zhang CL, Kamarashev J, Dummer R, Burg G, Dobbeling U. Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myc genes in cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood*. 2001;98(9):2778-83.
44. Dummer R, Michie SA, Kell D, Gould JW, Haeffner AC, Smoller BR, et al. Expression of bcl-2 protein and Ki-67 nuclear proliferation antigen in benign and malignant cutaneous T-cell infiltrates. *J Cutan Pathol*. 1995;22(1):11-7.
45. Tripathi P, Kurtulus S, Wojciechowski S, Sholl A, Hoebe K, Morris SC, et al. STAT5 is critical to maintain effector CD8+ T cell responses. *J Immunol*. 2010;185(4):2116-24.
46. Kelly J, Spolski R, Imada K, Bollenbacher J, Lee S, Leonard WJ. A role for Stat5 in CD8+ T cell homeostasis. *J Immunol*. 2003;170(1):210-7.
47. 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.
48. Bladon J, Taylor P. Extracorporeal photopheresis differentially regulates the expression of phosphorylated STAT-1 and STAT-5 in treated monocytes and T cells, respectively. *J Cutan Med Surg*. 2004;8(3):148-56.
49. Mishra A, La Perle K, Kwiatkowski S, Sullivan LA, Sams GH, Johns J, et al. Mechanism, consequences and therapeutic targeting of abnormal IL-15 signaling in cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Discov*. 2016.
50. Lindahl LM, Fredholm S, Joseph C, Nielsen BS, Jonson L, Willerslev-Olsen A, et al. STAT5 induces miR-21 expression in cutaneous T cell lymphoma. *Oncotarget*. 2016.
51. Kopp KL, Ralfkiaer U, Gjerdrum LM, Helvad R, Pedersen IH, Litman T, et al. STAT5-mediated expression of oncogenic miR-155 in cutaneous T-cell lymphoma. *Cell Cycle*. 2013;12(12):1939-47.
52. Steffen C. The man behind the eponym dermatology in historical perspective: Albert Sezary and the Sezary syndrome. *Am J Dermatopathol*. 2006;28(4):357-67.
53. Wieselthier JS, Koh HK. Sezary syndrome: diagnosis, prognosis, and critical review of treatment options. *J Am Acad Dermatol*. 1990;22(3):381-401.
54. Vonderheid EC, Bernengo MG. The Sezary syndrome: hematologic criteria. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2003;17(6):1367-89, viii.
55. 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;118(4):1019-26.
56. Sokolowska-Wojdylo M, Wenzel J, Gaffal E, Steitz J, Roszkiewicz J, Bieber T, et al. Absence of CD26 expression on skin-homing CLA+ CD4+ T lymphocytes in peripheral blood is a highly sensitive marker for early diagnosis and therapeutic monitoring of patients with Sezary syndrome. *Clin Exp Dermatol*. 2005;30(6):702-6.
57. Jamal S, Picker LJ, Aquino DB, McKenna RW, Dawson DB, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of peripheral T-cell neoplasms. A multiparameter flow cytometric approach. *Am J Clin Pathol*. 2001;116(4):512-26.
58. Bagot M, Bensussan A. [Epidermotropic T cell lymphomas as models for tumor progression]. *Med Sci (Paris)*. 2006;22(2):192-6.
59. Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2016;91(1):151-65.
60. 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;184(2):505-18.

61. 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;24(6):455-68.
62. 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;122(3):820-3.
63. 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;199(1):77-83.
64. 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;143(1):57-69.
65. Diamandidou E, Colome M, Fayad L, Duvic M, Kurzrock R. Prognostic factor analysis in mycosis fungoides/Sezary syndrome. *J Am Acad Dermatol*. 1999;40(6 Pt 1):914-24.
66. 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;115(4):798-812.
67. 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;102(12):4059-66.
68. 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.
69. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708-12.
70. D'Cruz LM, Rubinstein MP, Goldrath AW. Surviving the crash: transitioning from effector to memory CD8+ T cell. *Semin Immunol*. 2009;21(2):92-8.
71. Singh RA, Rodgers JR, Barry MA. The role of T cell antagonism and original antigenic sin in genetic immunization. *J Immunol*. 2002;169(12):6779-86.
72. Badovinac VP, Harty JT. Intracellular staining for TNF and IFN-gamma detects different frequencies of antigen-specific CD8(+) T cells. *J Immunol Methods*. 2000;238(1-2):107-17.
73. Kannan K, Stewart RM, Bounds W, Carlsson SR, Fukuda M, Betzing KW, et al. Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium. *Cell Immunol*. 1996;171(1):10-9.
74. Tussey L, Speller S, Gallimore A, Vessey R. Functionally distinct CD8+ memory T cell subsets in persistent EBV infection are differentiated by migratory receptor expression. *Eur J Immunol*. 2000;30(7):1823-9.
75. Winter D, Moser J, Kriehuber E, Wiesner C, Knobler R, Trautinger F, et al. Down-modulation of CXCR3 surface expression and function in CD8+ T cells from cutaneous T cell lymphoma patients. *J Immunol*. 2007;179(6):4272-82.
76. Hoppe RT, Medeiros LJ, Warnke RA, Wood GS. CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes influence the long-term survival of patients with mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol*. 1995;32(3):448-53.
77. Abeni D, Frontani M, Sampogna F, Sera F, Bolli S, Corona R, et al. Circulating CD8+ lymphocytes, white blood cells, and survival in patients with mycosis fungoides. *Br J Dermatol*. 2005;153(2):324-30.
78. 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;104(13):4142-9.
79. Schluns KS, Lefrancois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):269-79.

80. Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol.* 2003;4(12):1191-8.
81. Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, et al. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity.* 2007;27(2):281-95.
82. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity.* 2008;29(6):848-62.
83. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrancois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol.* 2000;1(5):426-32.
84. Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A, et al. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med.* 2000;192(1):63-75.
85. Lang KS, Recher M, Navarini AA, Harris NL, Lohning M, Junt T, et al. Inverse correlation between IL-7 receptor expression and CD8 T cell exhaustion during persistent antigen stimulation. *Eur J Immunol.* 2005;35(3):738-45.
86. Paiardini M, Cervasi B, Albrecht H, Muthukumar A, Dunham R, Gordon S, et al. Loss of CD127 expression defines an expansion of effector CD8+ T cells in HIV-infected individuals. *J Immunol.* 2005;174(5):2900-9.
87. Crawley AM, Katz T, Parato K, Angel JB. IL-2 receptor gamma chain cytokines differentially regulate human CD8+CD127+ and CD8+CD127- T cell division and susceptibility to apoptosis. *Int Immunol.* 2009;21(1):29-42.
88. Bengsch B, Seigel B, Ruhl M, Timm J, Kuntz M, Blum HE, et al. Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8+ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *PLoS Pathog.* 2010;6(6):e1000947.
89. Vermeer MH, van Doorn R, Dukers D, Bekkenk MW, Meijer CJ, Willemze R. CD8+ T cells in cutaneous T-cell lymphoma: expression of cytotoxic proteins, Fas Ligand, and killing inhibitory receptors and their relationship with clinical behavior. *J Clin Oncol.* 2001;19(23):4322-9.
90. Christensen JE, de Lemos C, Moos T, Christensen JP, Thomsen AR. CXCL10 is the key ligand for CXCR3 on CD8+ effector T cells involved in immune surveillance of the lymphocytic choriomeningitis virus-infected central nervous system. *J Immunol.* 2006;176(7):4235-43.
91. Urbaniak-Kujda D, Kapelko-Slowik K, Wolowiec D, Dybko J, Halon A, Jazwiec B, et al. Increased percentage of CD8+CD28- suppressor lymphocytes in peripheral blood and skin infiltrates correlates with advanced disease in patients with cutaneous T-cell lymphomas. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2009;63:355-9.
92. Khoo JJ, Forster S, Mansell A. Toll-like receptors as interferon-regulated genes and their role in disease. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31(1):13-25.
93. Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, et al. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(27):9577-82.
94. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(8):546-58.
95. Adams S. Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy.* 2009;1(6):949-64.
96. Petry V, Gaspari AA. Toll-like receptors and dermatology. *Int J Dermatol.* 2009;48(6):558-70.
97. Ito T, Amakawa R, Kaisho T, Hemmi H, Tajima K, Uehira K, et al. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med.* 2002;195(11):1507-12.
98. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, et al. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol.* 2000;164(11):5998-6004.
99. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 2003;102(7):2660-9.
100. Vora P, Youdim A, Thomas LS, Fukata M, Tesfay SY, Lukasek K, et al. Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 2004;173(9):5398-405.

101. Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Dinarello CA, O'Neill L, Netea MG. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(6):344-57.
102. Cheever MA. Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. *Immunol Rev*. 2008;222:357-68.
103. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004;5(10):987-95.
104. Schon M, Bong AB, Drewniok C, Herz J, Geilen CC, Reifemberger J, et al. Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(15):1138-49.
105. Majewski S, Marczak M, Mlynarczyk B, Benninghoff B, Jablonska S. Imiquimod is a strong inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis. *Int J Dermatol*. 2005;44(1):14-9.
106. Funderburg N, Luciano AA, Jiang W, Rodriguez B, Sieg SF, Lederman MM. Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis. *PLoS One*. 2008;3(4):e1915.
107. 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;52(10):1970-9.
108. 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;119(2):355-63.
109. 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;34(7):691-8.
110. Suchin KR, Junkins-Hopkins JM, Rook AH. Treatment of stage IA cutaneous T-Cell lymphoma with topical application of the immune response modifier imiquimod. *Arch Dermatol*. 2002;138(9):1137-9.
111. 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. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2007;7(8):524-34.
112. Armitage RJ, Namen AE, Sassenfeld HM, Grabstein KH. Regulation of human T cell proliferation by IL-7. *J Immunol*. 1990;144(3):938-41.
113. Welch PA, Namen AE, Goodwin RG, Armitage R, Cooper MD. Human IL-7: a novel T cell growth factor. *J Immunol*. 1989;143(11):3562-7.
114. Tancrede-Bohin E, Ionescu MA, de La Salmoniere P, Dupuy A, Rivet J, Rybojad M, et al. Prognostic value of blood eosinophilia in primary cutaneous T-cell lymphomas. *Arch Dermatol*. 2004;140(9):1057-61.
115. Brugnani D, Airo P, Tosoni C, Taglietti M, Lodi-Rizzini F, Calzavara-Pinton P, et al. CD3-CD4+ cells with a Th2-like pattern of cytokine production in the peripheral blood of a patient with cutaneous T cell lymphoma. *Leukemia*. 1997;11(11):1983-5.
116. Ogata M, Ogata Y, Kohno K, Uno N, Ohno E, Ohtsuka E, et al. Eosinophilia associated with adult T-cell leukemia: role of interleukin 5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Am J Hematol*. 1998;59(3):242-5.
117. Suchin KR, Cassin M, Gottlieb SL, Sood S, Cucchiara AJ, Vonderheid EC, et al. Increased interleukin 5 production in eosinophilic Sezary syndrome: regulation by interferon alfa and interleukin 12. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44(1):28-32.
118. Nielsen M, Nissen MH, Gerwien J, Zocca MB, Rasmussen HM, Nakajima K, et al. Spontaneous interleukin-5 production in cutaneous T-cell lymphoma lines is mediated by constitutively activated Stat3. *Blood*. 2002;99(3):973-7.
119. Sprent J, Surh CD. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat Immunol*. 2011;12(6):478-84.

120. Scarisbrick JJ, Child FJ, Evans AV, Fraser-Andrews EA, Spittle M, Russell-Jones R. Secondary malignant neoplasms in 71 patients with Sezary syndrome. *Arch Dermatol.* 1999;135(11):1381-5.
121. Yamanaka K, Yawalkar N, Jones DA, Hurwitz D, Ferenczi K, Eapen S, et al. Decreased T-cell receptor excision circles in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11(16):5748-55.
122. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature.* 1998;396(6712):690-5.
123. Alessio M, Roggero S, Funaro A, De Monte LB, Peruzzi L, Geuna M, et al. CD38 molecule: structural and biochemical analysis on human T lymphocytes, thymocytes, and plasma cells. *J Immunol.* 1990;145(3):878-84.
124. Dianzani U, Funaro A, DiFranco D, Garbarino G, Bragardo M, Redoglia V, et al. Interaction between endothelium and CD4+CD45RA+ lymphocytes. Role of the human CD38 molecule. *J Immunol.* 1994;153(3):952-9.
125. Ausiello CM, la Sala A, Ramoni C, Urbani F, Funaro A, Malavasi F. Secretion of IFN-gamma, IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-10 cytokines after activation of human purified T lymphocytes upon CD38 ligation. *Cell Immunol.* 1996;173(2):192-7.
126. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Kaplan AH, Detels R, Giorgi JV. CD8+ T-lymphocyte activation in HIV-1 disease reflects an aspect of pathogenesis distinct from viral burden and immunodeficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1998;18(4):332-40.
127. Chun TW, Justement JS, Sanford C, Hallahan CW, Planta MA, Loutfy M, et al. Relationship between the frequency of HIV-specific CD8+ T cells and the level of CD38+CD8+ T cells in untreated HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(8):2464-9.
128. Vudattu NK, Magalhaes I, Schmidt M, Seyfert-Margolis V, Maeurer MJ. Reduced numbers of IL-7 receptor (CD127) expressing immune cells and IL-7-signaling defects in peripheral blood from patients with breast cancer. *Int J Cancer.* 2007;121(7):1512-9.
129. Crawley AM, Vranjkovic A, Young C, Angel JB. Interleukin-4 downregulates CD127 expression and activity on human thymocytes and mature CD8+ T cells. *Eur J Immunol.* 2010;40(5):1396-407.
130. de Lollo C, de Moraes Vasconcelos D, da Silva Oliveira LM, de Oliveira Titz T, Carneiro-Sampaio M, Jacob CM, et al. Impaired CD8(+) T cell responses upon Toll-like receptor activation in common variable immunodeficiency. *J Transl Med.* 2016;14(1):138.
131. Çetinözman F, Jansen PM, Willemze R. Expression of programmed death-1 in skin biopsies of benign inflammatory vs. lymphomatous erythroderma. *Br J Dermatol.* 2014;171(3):499-504.
132. Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Morimoto C. CD26-mediated co-stimulation in human CD8(+) T cells provokes effector function via pro-inflammatory cytokine production. *Immunology.* 2013;138(2):165-72.
133. Hahtola S, Tuomela S, Elo L, Hakkinen T, Karenko L, Nedoszytko B, et al. Th1 response and cytotoxicity genes are down-regulated in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(16):4812-21.
134. 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;135(1):247-57.
135. Bagot M, Charue D, Boulland ML, Gaulard P, Revuz J, Schmitt C, et al. Interleukin-7 receptor expression in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol.* 1996;135(4):572-5.
136. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev.* 2008;88(3):841-86.
137. Savarino A, Bottarel F, Malavasi F, Dianzani U. Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions? *Aids.* 2000;14(9):1079-89.
138. Funaro A, Horenstein AL, Calosso L, Morra M, Tarocco RP, Franco L, et al. Identification and characterization of an active soluble form of human CD38 in normal and pathological fluids. *Int Immunol.* 1996;8(11):1643-50.

139. Novikov VV, Mamaeva ME, Aliasova AV, Hazov MV, Kasatova ES, Shumilova SV, et al. [THE SERUM LEVEL OF TOTAL AND OLIGOMERIC FRACTIONS OF SOLUBLE MOLECULES CD38 UNDER MALIGNANT TUMORS OF CERVIX AND UTERINE BODY]. *Klin Lab Diagn.* 2015;60(5):32-6.
140. Lebedev MJ, Egorova NI, Sholkina MN, Vilkov SA, Baryshnikov AJ, Novikov VV. Serum levels of different forms of soluble CD38 antigen in burned patients. *Burns.* 2004;30(6):552-6.
141. Kim BJ, Choi YM, Rah SY, Park DR, Park SA, Chung YJ, et al. Seminal CD38 is a pivotal regulator for fetomaternal tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(5):1559-64.
142. Samimi S, Benoit B, Evans K, Wherry EJ, Showe L, Wysocka M, et al. Increased programmed death-1 expression on CD4+ T cells in cutaneous T-cell lymphoma: implications for immune suppression. *Arch Dermatol.* 2010;146(12):1382-8.
143. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:515-48.
144. Fry TJ, Mackall CL. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol.* 2005;174(11):6571-6.
145. 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;93(1):260-7.
146. Mitchell TJ, Whittaker SJ, John S. Dysregulated expression of COOH-terminally truncated Stat5 and loss of IL2-inducible Stat5-dependent gene expression in Sezary Syndrome. *Cancer Res.* 2003;63(24):9048-54.
147. Krejsgaard T, Vetter-Kauczok CS, Woetmann A, Lovato P, Labuda T, Eriksen KW, et al. Jak3- and JNK-dependent vascular endothelial growth factor expression in cutaneous T-cell lymphoma. *Leukemia.* 2006;20(10):1759-66.
148. Zhang Q, Nowak I, Vonderheid EC, Rook AH, Kadin ME, Nowell PC, et al. Activation of Jak/STAT proteins involved in signal transduction pathway mediated by receptor for interleukin 2 in malignant T lymphocytes derived from cutaneous anaplastic large T-cell lymphoma and Sezary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(17):9148-53.
149. Mao X, Orchard G, Lillington DM, Child FJ, Vonderheid EC, Nowell PC, et al. BCL2 and JUNB abnormalities in primary cutaneous lymphomas. *Br J Dermatol.* 2004;151(3):546-56.