

FLÁVIA AMOROSO MATOS E SILVA

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

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Amarante-Mendes

Versão original

São Paulo
2014

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

1.1.1 *Linfócitos T*

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

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

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

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

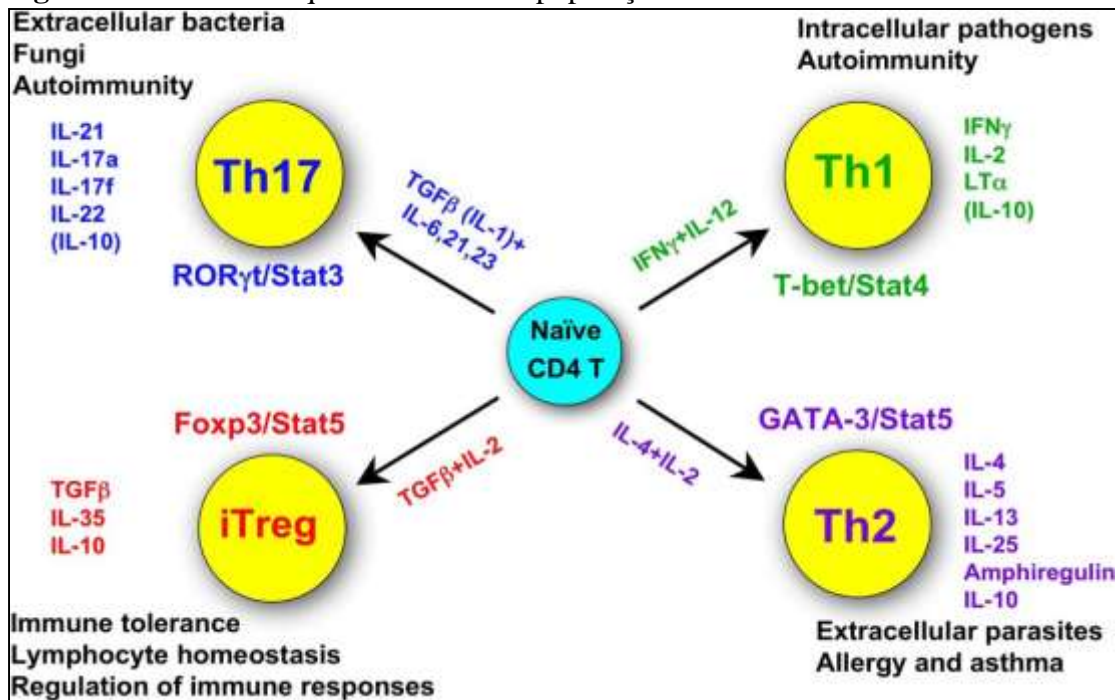
imunológico, em que as células autorreativas ou linfócitos T recorrentemente ativados, sejam eliminados. Os linfócitos T CD4+ após terem sido ativados e diferenciados em subtipos de células efetoras distintas, desempenham um papel importante na mediação da resposta imune através da secreção de citocinas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

1.1.2 Subpopulações de Linfócitos T CD4+

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

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

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



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

As células Th1 secretam principalmente IFN- γ , linfotóxina α (LT α) e IL-2, estão envolvidas na eliminação de patógenos intracelulares e associadas a patogênese de muitas doenças autoimunes, como esclerose múltipla e artrite reumatoide (DEL PRETE, 1992). IFN- γ é essencial na ativação de fagócitos mononucleares, incluindo macrófagos, microglias e leva a potencialização de atividades fagocíticas (MURRAY et al., 1985). LT α está associada com doenças autoimunes e com grande importância na inflamação, e por fim, a citocina IL-2 induz a proliferação das células T e promove a atividade citolítica dos linfócitos T CD8+ (GATTINONI et al., 2005).

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

Outros fatores de transcrição como Runx1 e Runx3 também participam na diferenciação deste processo na promoção da diferenciação das células Th1 (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004; KOHU et al., 2009). Runx3 em cooperação com T-bet se liga ao promotor de IFN- γ silenciando os genes que codificam IL-4, levando a inibição da diferenciação de Th2 através da interação com GATA-3 favorecendo assim, a diferenciação de Th1. Por outro lado, a interação de Runx1 e T-bet inibe o desenvolvimento das células Th17 pela interação com seu principal regulador ROR γ t (LAZAREVIC et al., 2011).

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

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

*os fatores de transcrição principais estão sublinhados

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

As citocinas IL-4 e IL-2 são cruciais na diferenciação destes linfócitos com perfil Th2 e o principal fator de transcrição envolvido é o GATA-3 (GLIMCHER; MURPHY, 2000). No entanto, GATA-3 não é capaz de regular sozinho toda a especificidade gênica de Th2, mas atua em

cooperação com STAT6 (HORIUCHI et al., 2011), e apesar da necessidade das citocinas IL4 e IL-2 no perfil Th2 *in vitro*, existem evidências de que esta diferenciação *in vivo* pode ser independente de IL-4, mas necessariamente dependente de GATA-3, sugerindo assim, a existência de uma via de sinalização por GATA-3 independente de IL-4 (BOEHM et al., 1997). Com isso, vários estudos mostraram que a diferenciação de Th2 envolve outros fatores de transcrição que ativam *downstream* várias citocinas como IL-2, IL-6 e IL-21 (**tabela 1**).

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

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

Por sua vez, os linfócitos Th17 são importantes personagens na resposta a determinados tipos de fungos e também na ativação e recrutamento de neutrófilos, amplificando a inflamação tecidual. Estes subtipos de linfócitos T CD4+ estão fortemente associados a diversas síndromes autoimunes, que anteriormente eram descritas como consequência da desregulação de linfócitos Th1, tais como a artrite reumatoide, doença de Alzheimer e colite. Essa subpopulação de linfócitos se diferencia na presença de IL-6, IL-21, IL-23 e TGF- β juntamente com o fator de transcrição primordial ROR γ t. O processo de diferenciação destas células se dá através de 3 estágios, a fase mediada por TGF- β e IL-6, autoamplificação por IL-21 e estabilização por IL-23. TGF- β é uma citocina crucial na sinalização de Th17, mas também tem papel importante no desenvolvimento

das células iTreg, sendo estas duas linhagens relacionadas antagonicamente (VELDHOEN et al., 2006; VOLPE et al., 2008). TGF- β sozinha em altas concentrações, pode dirigir a diferenciação celular para o perfil de iTreg (células T reguladora induzida) através da ativação de FOXP3 (CHEN et al., 2003a; ZHOU et al., 2008). No entanto, em baixas concentrações e na presença de IL-6, TGF- β induz o desenvolvimento de Th17 por ativação de ROR γ t, produção de IL-21 e *up*-regulação na expressão de IL-23R (BETTELLI et al., 2006; VELDHOEN et al., 2008; ZHOU et al., 2008). Apesar do ROR γ t ser crucial no desenvolvimento destas células, outros fatores de transcrição são necessários para a diferenciação total do perfil Th17 (**tabela 1**), mas, por outro lado uma deficiência neste “regulador *master*” não possibilita estas células completar seu perfil fenotípico e produção de suas citocinas IL-17A e IL-17F (IVANOV et al., 2006; YANG et al., 2008).

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

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

Uma característica interessante no fenômeno de polarização dos linfócitos T é a plasticidade que há entre essas subpopulações. Era comum se pensar que quando uma resposta imunológica desviava-se para um determinado padrão efetor, a célula estaria comprometida com aquele padrão

até sofrer o processo de apoptose. Atualmente, diversos estudos têm demonstrado que os linfócitos T efetores podem mudar seus padrões de resposta se o microambiente também mudar. Tanto Th17 quanto Tregs necessitam de TGF- β para sua geração durante uma resposta imunológica, o que determina a polarização para Th17 é justamente o balanço de citocinas pró-inflamatórias presentes. Níveis mais elevados de IL-6, em conjunto com TGF- β , desviarão para o padrão Th17, porém se, durante a resposta, o microambiente apresentar níveis cada vez menores de IL-6, a célula antes Th17 pode adquirir características mais reguladoras do que efectoras (GHORESCHI et al., 2011).

Estudos recentes têm sugerido que Th17 têm um impacto importante sobre os tumores sólidos. No entanto, a natureza destas células em neoplasias hematológicas ainda é pouco conhecida. Recentemente, foram investigadas a frequência destas células e secreção de citocinas relacionadas em pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA). Primeiro, foi observado que a frequência destas células foi aumentada significativamente nas amostras de sangue periférico de pacientes não tratados em comparação com indivíduos normais, sugerindo que os linfócitos Th17 podem desempenhar um papel na patogênese deste tipo de leucemia. Também, foi observado que a frequência destas células foi reduzida quando os pacientes obtiveram remissão completa após quimioterapia, sugerindo que a frequência de Th17 pode ter valor clínico na avaliação do efeito terapêutico (WU et al., 2009a).

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

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

encontrada em Th1, Th2 e Th17 (BRUNNER et al., 1995; RAMSDELL et al., 1994; ZHANG et al., 2008).

1.1.3 Morte celular dos linfócitos T

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

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

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

A subfamília dos DRs, responsáveis pela ativação da via extrínseca, pertence à família dos receptores de TNF (*tumor necrosis factor*) e compreende, por exemplo, TNF-R1 ou DR-4 (*tumor necrosis factor receptor 1*), TRAIL-R2 ou DR-5 (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing*

receptor) e FAS (CD95/APO-1), o protótipo dos receptores de morte, expresso constitutivamente na maioria dos tecidos celulares e, assim como os demais DRs, é caracterizado pela presença de um a seis domínios ricos em cisteína nas suas porções extracelulares, que medeiam a interação deste com FASL (CD95L/Apo-1L) (ADAM-KLAGES et al., 2005). Esta interação resulta na ativação de uma cascata de sinalização intracelular, a qual tem início com a agregação dessas moléculas na superfície, culminando na morte da célula que expressa o receptor de morte FAS (ITOH; NAGATA, 1993).

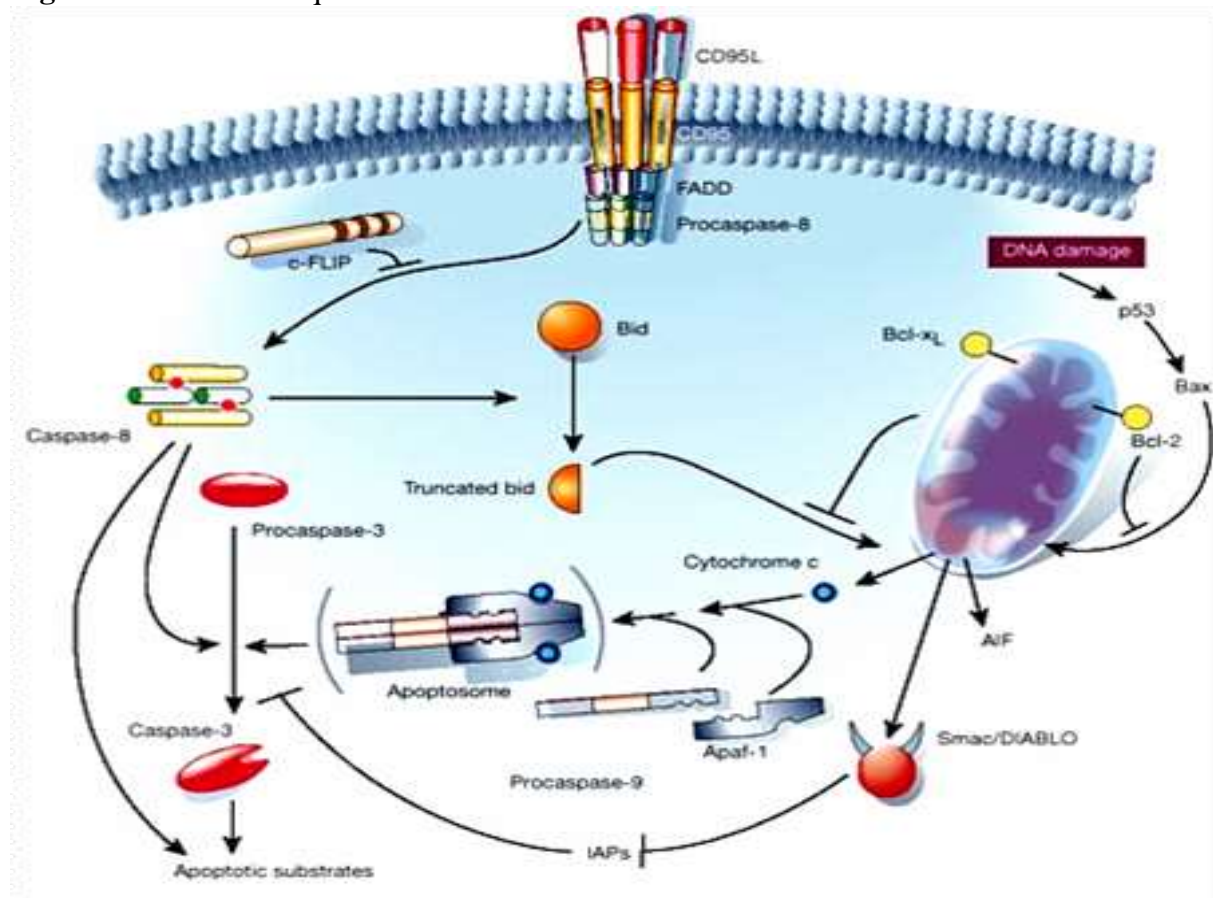
Após a interação entre receptor-ligante, ocorre o recrutamento de proteínas adaptadoras chamadas FADD (*fas-associated death domain protein*). Uma característica importante, comum a todos os DRs, é a presença do domínio DD (*death domain*), através do qual ocorrem diversas interações, inclusive entre FAS e FADD (CHINNAIYAN et al., 1995). Há também o recrutamento da pró-caspase-8 que interage com FADD através de outro domínio, o DED (*death effector domain*) (MUZIO et al., 1998), formando um complexo que é denominado de DISC (*death-inducing signaling complex*), o qual permite a ativação da caspase-8 (KISCHKEL et al., 1995). Já foi descrito que a caspase-10 também é capaz de se associar ao FADD no complexo DISC, sendo a única, além da caspase-8, a possuir o domínio DED (BARNHART et al., 2003).

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

Dados mais recentes mostram que a sinalização via FAS pode estar implicada não somente com o processo de apoptose, como também com o crescimento e a proliferação celular. Essas funções parecem estar relacionadas com níveis basais de FAS/FASL, uma vez que a redução destes leva a uma diminuição da massa tumoral, enquanto o aumento não é capaz de causar nenhuma alteração perceptível. Além disso, foi demonstrado que a concentração de FAS necessária para

induzir apoptose é mil vezes maior do que para induzir sinais não-apoptóticos. A participação de FAS também foi observada no processo de regeneração hepática, mostrando que em uma hepatectomia parcial não há uma completa recuperação do órgão na ausência do receptor, provavelmente sendo essa a ligação existente entre FAS e o desenvolvimento de hepatocarcinogênese (CHEN et al., 2010).

Figura 2 – Desenho esquemático da via extrínseca de morte celular.



Adaptado de (HENGARTNER, 2000).

1.1.4 Linfócitos T e neoplasias hematológicas

A participação de linfócitos T durante o curso de certas neoplasias hematológicas vem sendo descrita como um mecanismo importante e relacionada a interações imunológicas que podem influenciar a fisiopatologia, evolução e prognóstico destas doenças. O entendimento destes mecanismos e os subsequentes defeitos das células T permitirá o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas objetivando a restauração das funções das células T. Vários são os

mecanismos pelos quais as funções dos linfócitos T podem estar comprometidas, como por exemplo, as próprias células leucêmicas da LLC podem interferir diretamente com as funções dos linfócitos T e nas alterações das subpopulações dos linfócitos T.

A LLC é uma doença em que se pode visualizar bem os eventos de interação imunológica, pois como é sabido, o *cross-talk* entre células T e B é um fator importante que controla a expansão, diferenciação, sobrevivência e função efetora de células B normais e também neoplásicas. De fato, muitas alterações no compartimento de linfócitos T em pacientes com LLC já foram previamente descritas e algumas delas estão relacionadas a uma pior evolução da doença, como a evidência recente que sugere que um acúmulo de células T de memória pode estar associado a uma doença de evolução mais agressiva (HOFBAUER et al., 2011; TINHOFER et al., 2009).

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

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

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

Além de IFN- γ , outras citocinas vem se destacando na patogênese da LLC. Por exemplo, podemos destacar a interleucina-10 (IL-10) que é uma citocina produzida pela células T *helper* (Th2) e pode estimular a proliferação e diferenciação dos linfócitos B. Já foi demonstrado que os níveis séricos desta citocina estão aumentados na LLC, correlacionando-se com as características da doença e sobrevivência reduzida (FAYAD et al., 2001). A origem desta IL-10 não está clara, mas existem evidências de que é produzido pelas células B policlonais não leucêmicas, em vez das próprias células leucêmicas. Existem também dados contraditórios sobre o efeito da IL-10 nas células tumorais, sugerindo que esta citocina inibe a proliferação e induz a apoptose nos linfócitos B da LLC (FLUCKIGER et al., 1994) (TANGYE et al., 1998), já outros estudos sugerem que a IL-10 protege contra morte celular por apoptose (KITABAYASHI et al., 1995).

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

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

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

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

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

Alterações nos LT	Descrição
--------------------------	------------------

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

1.2 Neoplasias Hematológicas

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

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

Neoplasia hematológica é o termo utilizado para designar as diferentes formas de câncer que acometem a medula óssea, sangue periférico e tecido linfático. A heterogeneidade destas

neoplasias é uma característica marcante, pois podem acometer as linhagens linfoides T e B, linhagem mieloide em diferentes estágios de maturação e diferenciação, os macrófagos e seus precursores, e os mastócitos, diferindo não apenas no quadro citomorfológico, mas também quanto aos aspectos clínicos, evolução, prognóstico e resposta ao tratamento (SANTOS et al., 2004).

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

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

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

Fonte: Instituto Nacional do Câncer.

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

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é uma neoplasia hematológica derivada de uma população de linfócitos B maduros CD5⁺ localizados na zona do manto dos folículos linfoides. É

a mais comum das doenças linfoproliferativas e trata-se de uma doença em que as taxas de proliferação celular não são acompanhadas por taxas semelhantes de apoptose, resultando em acúmulo das células neoplásicas em linfonodos, medula óssea e sangue periférico (GARICOCHEA, 2005). A leucemia linfoide crônica foi durante muito tempo entendida como uma doença relativamente homogênea causada pelo acúmulo de linfócitos B monoclonais, imunoincompetentes e com graves distúrbios nos mecanismos normais de apoptose.

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

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

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

só *lambda*). Estes achados permitem fazer o diagnóstico diferencial com outros linfomas B leucemizados (MULLER-HERMELINK et al., 2001).

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

1.2.2 ZAP-70 e CD38 – ferramentas prognósticas

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

Estudos realizados por Naylor *et al* (1999) demonstraram que a análise das expressões de CD38 e IgD pode ser utilizada para diferenciar os linfócitos B “virgens”, que estão localizados no manto folicular e as células B de memória, que já passaram pelo centro germinativo. A expressão de CD38 ocorre em várias células do sistema hematopoiético, bem como de outros tecidos não-hematopoiéticos (NAYLOR; CAPRA, 1999). A expressão de CD38 nas células hematopoiéticas é variável e ocorre principalmente nas células progenitoras CD34+, nos precursores mielóides, nos linfócitos T e B ativados, células NK, células plasmáticas, monócitos e células endoteliais. CD38 é uma glicoproteína do tipo II de linhagem não específica e está envolvida na ativação de linfócitos, desempenha também várias funções incluindo adesão ao endotélio celular e tem papel importante no *homing* dos linfócitos, entretanto sua função nas células B não está claramente definida (HAMBLIN, 2002)

A expressão de CD38 é variável. Em 1999, Damle *et al* demonstraram que tanto a porcentagem de células CD38+ quanto a intensidade média de fluorescência da expressão deste antígeno, tinham forte correlação inversa com a porcentagem de mutações do gene V (VH e VL)

das imunoglobulinas. De fato, havia dois grupos com expressão significativamente diferente e que correspondiam ao tipo não mutado (>30% células CD38+). Estes autores verificaram que o perfil de expressão do CD38 permanece constante ao longo da doença, o que não foi confirmado em outros trabalhos (DAMLE et al., 1999). Dados mais recentes de perfil de expressão gênica demonstram, porém, que se trata de duas formas variantes originárias da mesma célula-tronco, e não de duas doenças como se tem questionado (MARGALIT et al., 2005).

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

1.2.4 Estadiamento clínico da LLC

O curso clínico da LLC é bastante variável. Alguns pacientes são assintomáticos e sobrevivem por longos períodos sem a necessidade de terapia, enquanto outros evoluem rapidamente apesar de tratamento agressivo. Baseando-se nas características clínicas, tais como aumento do linfonodo, presença ou ausência de esplenomegalia e/ou hepatomegalia e avaliação hematológica do sangue periférico, vários sistemas de estadiamento clínico foram propostos para identificar a extensão da doença nos pacientes com LLC, avaliar o prognóstico e desta forma programar melhor a estratégia terapêutica (GEISLER et al., 1986). Os dois sistemas mais utilizados na prática clínica são o sistema de estágio clínico de Rai (1975) e o de Binet (1981) (BINET, 1981b; RAI et al., 1975).

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

alto risco (estádios V e VI). A **Tabela 5** sumariza estas características de acordo com o sistema de Rai (RAI; MONTSERRAT, 1987).

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

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

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

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

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

Em 2002, foi relatado na literatura que os pacientes com LLC-B indolente (progressão lenta), apresentaram um predomínio da subpopulação Th1. Em contraste, as células T CD4+ dos pacientes com a doença mais progressiva apresentaram predominantemente a subpopulação Th2 (PODHORECKA et al., 2002). Com os avanços no conhecimentos em relação as novas descoberta dos subtipos de linfócitos T CD4+, vários trabalhos mostraram que, além de Th1 eTh2, os linfócitos com perfil Th17 e regulador estão envolvidos na patofisiologia de tumores sólidos e hematológicos. Porém, pouco se sabe sobre o papel e relação de Th17 e Treg nas fases de progressão da LLC-B. Sendo assim, a nossa hipótese é que estas subpopulações celulares também estão diferencialmente expressas na LLC-B e contribuem para a patofisiologia da doença

2 CONCLUSÃO

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

Resumos dos achados:

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

REFERÊNCIAS*

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

* De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FAYAD, L. et al. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. **Blood**, v. 97, n. 1, p. 256-263, 2001.

FERRARINI, M.; CHIORAZZI, N. Recent advances in the molecular biology and immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. **Semin. Hematol.**, v. 41, n. 3, p. 207-223, 2004.

FLUCKIGER, A. C. et al. Interleukin 10 induces apoptotic cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 1, p. 91-99, 1994.

FRANSEN, L. et al. Recombinant tumor necrosis factor: species specificity for a variety of human and murine transformed cell lines. **Cellular Immunology**, v. 100, n. 1, p. 260-267, 1986.

FREEDMAN, A. S.; NADLER, L. M. The relationship of chronic lymphocytic leukemia to normal activated B cells. **Leuk. Lymphoma**, v. 1, n. 5-6, p. 293-300, 1990.

GALE, R. P. et al. Recent progress in chronic lymphocytic leukemia. International Workshop on chronic Lymphocytic Leukemia. **Leukemia**, v. 8, n. 9, p. 1610-1614, 1994.

GALLEGO, A. et al. Production of intracellular IL-2, TNF-alpha, and IFN-gamma by T cells in B-CLL. **Cytometry B Clin. Cytom.**, v. 56, n. 1, p. 23-29, 2003.

GATTINONI, L. et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 6, p. 1616-1626, 2005.

GEISLER, C. et al. The bone marrow histological pattern has independent prognostic value in early stage chronic lymphocytic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 62, n. 1, p. 47-54, 1986.

GERLINGER, M. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. **N. Engl. J. Med.**, v. 366, n. 10, p. 883-892, 2012.

GHORESCHI, K. et al. T helper 17 cell heterogeneity and pathogenicity in autoimmune disease. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 9, p. 395-401, 2011.

GIANNOPOULOS, K. et al. Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Oncology Reports**, v. 20, n. 3, p. 677-682, 2008.

GLIMCHER, L. H.; MURPHY, K. M. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. **Genes & Development**, v. 14, n. 14, p. 1693-1711, 2000.

GOBESSI, S. et al. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2032-2039, 2007.

GODDARD, R. V. et al. Generation in vitro of B-cell chronic lymphocytic leukaemia-proliferative and specific HLA class-II-restricted cytotoxic T-cell responses using autologous dendritic cells pulsed with tumour cell lysate. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 126, n. 1, p. 16-28, 2001.

HAMBLIN, T. Chronic lymphocytic leukaemia: one disease or two? **Ann. Hematol.**, v. 81, n. 6, p. 299-303, 2002.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HERRMANN, F. et al. Imbalance of T cell subpopulations in patients with chronic lymphocytic leukaemia of the B cell type. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 49, n. 1, p. 157-162, 1982.

HOFBAUER, J. P. et al. Development of CLL in the TCL1 transgenic mouse model is associated with severe skewing of the T-cell compartment homologous to human CLL. **Leukemia**, v. 25, n. 9, p. 1452-1458, 2011.

HORIUCHI, S. et al. Genome-wide analysis reveals unique regulation of transcription of Th2-specific genes by GATA3. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 11, p. 6378-6389, 2011.

HUS, I. et al. Th17/IL-17A might play a protective role in chronic lymphocytic leukemia immunity. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p.e78091, 2013.

IRMLER, M. et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. **Nature**, v. 388, n. 6638, p. 190-195, 1997.

ITOH, N.; NAGATA, S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 15, p. 10932-10937, 1993.

IVANOV, II, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121-1133, 2006.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 5, n. 10, p. 987-995, 2004.

JAIN, P. et al. Th17 and non-Th17 interleukin-17-expressing cells in chronic lymphocytic leukemia: delineation, distribution, and clinical relevance. **Haematologica**, v. 97, n. 4, p. 599-607, 2012.

KAUFMANN, S. H. et al. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. **Cancer Res.**, v. 53, n. 17, p. 3976-3985, 1993.

KAY, N. E. et al. T-cell subpopulations in chronic lymphocytic leukemia: abnormalities in distribution and in in vitro receptor maturation. **Blood**, v. 54, n. 2, p. 540-4, 1979.

KIAII, S. et al. Signaling molecules and cytokine production in T cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: long-term effects of fludarabine and alemtuzumab treatment. **Leukemia & Lymphoma**, v. 47, n. 7, p. 1229-1238, 2006.

KIMBY, E. et al. Differences in blood T and NK cell populations between chronic lymphocytic leukemia of B cell type (B-CLL) and monoclonal B-lymphocytosis of undetermined significance (B-MLUS). **Leukemia**, v. 3, n. 7, p. 501-504, 1989.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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