

**Kelly Cristina Gomes Manfrere**

**Avaliação dos receptores de inflamassoma na Síndrome de Sézary**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

São Paulo

2022

**Kelly Cristina Gomes Manfrere**

**Avaliação dos receptores de inflamassoma na Síndrome de Sézary**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientadora: Prof. Dra. Maria Notomi Sato

Coorientador: Prof. Dr. José Antonio Sanches

São Paulo

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Manfrere, Kelly Cristina Gomes  
Avaliação dos receptores de inflamassoma na  
Síndrome de Sézary / Kelly Cristina Gomes Manfrere. -  
São Paulo, 2022.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Dermatologia.  
Orientadora: Maria Notomi Sato .  
Coorientador: José Antonio Sanches.

Descritores: 1.Síndrome de Sézary 2.Linfonodos  
3.Inflamação 4.IL-18 5.Eritrodermia 6.Sequenciamento  
de RNA 7.Caspase-1 USP/FM/DBD-422/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus filhos, Sophia Manfrere e Pedro Manfrere e ao meu esposo André Manfrere

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

Louis Pasteur

## **Agradecimentos**

Ao Meu Deus, maior orientador da minha vida e aos meus pais Nedir Rosa Gomes e José Cicero Gomes (in memoriam). Saudades mora em mim desde quando vocês partiram.

À minha orientadora, Professora Dra Maria Notomi Sato, que foi muito mais que uma excelente orientadora, foi uma amiga que segurou a minha mão no momento mais difícil da minha caminhada.

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

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

Ao Dr Denis Ricardo Myashiro pela paciência, por nos socorrer em momentos difíceis e na elaboração da dissertação e desenvolvimento do projeto.

Às amigadas nascidas no laboratório que ajudaram a manter a calma, e que pacientemente dividiam seus conhecimentos comigo e por todos os momentos de convívio e companheirismo

As minhas amigas Natáli e Anna Cláudia, que me escolheram em um dia comum para ser TT3, e foi onde tudo começou, obrigada por tudo!

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

Ao meu esposo e melhor amigo, que me incentiva todos os dias e que me faz sonhar com um futuro melhor junto com nossos filhos: Sophia e Pedro.

Agradeço a cooperação do departamento de Citometria Noemi Mie Ori.

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

À secretaria do Departamento de Dermatologia HC-FMUSP: 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.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1.INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Linfomas .....	13
1.2 Sézary.....	13
1.3 Dados demográfico do LCCT.....	14
1.4 Aspectos clínicos e histológico.....	14
1.5 Critérios diagnóstico e estadiamento.....	15
1.6 Aspectos fisiopatológicos do LCCT.....	17
1.7 Aspectos da imunidade inata e adaptativa na síndrome de Sézary.....	20
1.8 Inflamassoma.....	21
1.9 O inflamassoma no linfoma.....	26
2 Objetivos.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 Métodos.....	28
3.1 Casuística.....	28
3.2 Extração de RNA, sequenciamento e análises transcriptômicas.....	29
3.3 Obtenção de células mononucleares (CMNs) do sangue periférico.....	29
3.4 Cultura celular de linhagens.....	29
3.5 Expressão gênica por reação em cadeia de polimerase em tempo real.....	30
3.6 Cultura celular e ensaio de atividade de caspase-1.....	31
3.7 Determinação de IL-18 e IL-1BP.....	31
3.8 Imunohistoquímica.....	31
3.9 Imunofluorescência.....	32
3.10 Análise estatística.....	32
4 Resultados.....	33
4.1 Característica dos pacientes envolvidos no estudo.....	33
4.2 Expressão de componentes do inflamassoma em linfonodos e na pele de SS.....	34
4.3 Dupla marcação de CD68/IL-18 e CD4/IL-18 em linfonodos e pele de SS.....	37
4.4. Aumento da Expressão de IL-1 $\beta$ epidérmica e IL-18 dérmica em pele de SS....	38
4.5 Níveis sérico de IL-18 e IL-18BP na síndrome de Sézary.....	41

4.6 Perfil do inflamassoma em CMNs e atividade de caspase-1 em TCD4+.....	42
4.7 Células TCD4+CD7- de pacientes SS possuem elevada atividade de caspase-1...	44
4.8 Análise transcriptômica de LN em SS e EI.....	45
5 Discussão.....	48
6. Conclusões.....	52
7. Referências .....	53
8. Anexo.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

HL – Linfoma Hodgkin

NHL – Linfoma Não-Hodgkin

LCCB – Linfoma Cutâneo de Células B

LCCT – Linfoma Cutâneo de Células T

MF – Micose Fungóide

SS – Síndrome de Sézary

WHO – *World Health Organization*

EORTC – *European Organization for Research and Treatment of Cancer*

TNMB - Tumor, Nodulos, Metástase e Sangue

CCR4 – *C-C Chemokine Receptor Type 4*

CLA – Antígeno Linfocitário Cutâneo

CCR7 – *C-C Chemokine Receptor Type 7*

TEM – Células T de Memória Residentes na Pele

CD27 - Marcador Característico das Células T de Memória Central

TCM - Células T de Memória Central

TRM – Células T de Memória Residente

TMM – Células T de Memória Migratória

LN – Linfonodo

Th1 - *T helper cell type 1*

Th2 – *T helper cell type 2*

IFN $\gamma$  – Interferon Gama

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IL-13 – Interleucina 13

IL-2 – Interleucina 2

STAT – *Signal Transducer and Activator of Transcription*

FoxP3 – *Forkhead Box P3*

PD-1 – *Programmed Cell Death 1*

PD-L1 – *Programmed Death-Ligand 1*

SOCS-3 – Supressor da Sinalização de Citocinas 3

VEGF – Fator de Crescimento Vascular Endotelial

TLR – *Toll Like Receptor*

IFN – Interferon

TNF – *Tumor Necrosis Factor*

NK – Células *Natural Killer*

CXCL9-C-X-C Motif Chemokine Ligand 9

CXCL10- C-X-C Motif Chemokine Ligand 10

PRRs – Receptores de Reconhecimento Padrão

PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

DAMPs – Padrões Moleculares Associados a Danos

ASC - Proteína *Speck-like* Associada à Apoptose com Domínio de Recrutamento de Caspase

NOD - *Nodlike Receptor, NLR*

LPS – *Lipopolissacáride*  
NFkB – Fator Nuclear Kappa B  
IRF – Fator Regulador de IFN  
HMGB1 - *High-Mobility Group Protein B1*  
ATP – Adenosina Trifosfato  
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio  
dsDNA - DNA de fita dupla citosólica  
AIM-2 – *Absent In Melanoma 2*  
TNF- $\alpha$  -Fator de necrose tumoral  
C-MYC – Genes Reguladores e Proto-Oncogenes que Codificam Fatores de Transcrição  
BCL-2 - Linfoma de Células B 2  
TP-53 – Proteína de Tumor-53  
SA – *Staphylococcus Aureus*  
ISCL – *International Society for Cutaneous Lymphomas*  
APCs – Células Apresentadoras de Antígeno  
CCR8 - *C-C chemokine receptor type 8*  
CCR10 - *C-C chemokine receptor type 10*  
Treg – Célula T Reguladora  
DC – Célula Dendrítica  
TCR – Receptor de Célula T  
JAK – *Janus Kinase*  
PCR – *Polymerase Chain Reaction*  
MCH – *Major Histocompatibility Complex*  
MyD88 – *Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*  
HC/FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
CMN – Célula Mononuclear  
CTRL – Controle  
ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Regulação negativa da expressão de IL-1 $\beta$ e positiva de IL-18 em linfonodos em estágio avançado de SS.....	35
<b>Figura 2.</b> Expressão de NLRP1, NLRP3 e AIM2 em linfonodos de pacientes com SS.....	36
<b>Figura 3.</b> Dupla-marcação de CD68/IL-18 e CD4/IL-18 em linfonodos de SS.....	37
<b>Figura 4.</b> Dupla marcação de CD68/IL-18 em pele de paciente SS.....	38
<b>Figura 5.</b> Aumento de expressão de IL-1 $\beta$ epidérmica e IL-18 dérmica em SS .....	39
<b>Figura 6.</b> Expressão de NLRP1, NLRP3 e AIM2 na pele de pacientes com SS.....	30
<b>Figura 7.</b> Níveis circulantes da proteína de ligação de IL-18 (BP) e IL-18 em SS.....	41
<b>Figura 8.</b> Perfil de expressão de transcritos do inflamassoma em CMN de SS e de linhagens celulares de LCCT.....	43
<b>Figura 9.</b> Expressão elevada da atividade de Caspase -1 em SS.....	44
<b>Figura 10.</b> Rede dos genes das vias de sinalização de IL-1 $\beta$ .....	46
<b>Figura 11.</b> Análises transcriptômicas de linfonodos de SS e EI.....	47

Manfrere KCG Avaliação dos receptores de inflamassoma na Síndrome de Sézary [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

## Resumo

Os linfomas cutâneos primários de células T (LCCT) são um grupo heterogêneo de linfomas não Hodgkin que se manifestam inicialmente na pele. A síndrome de Sézary (SS) é uma rara variante de prognóstico agressivo, caracterizada pela tríade de eritrodermia, linfadenopatia e envolvimento leucêmico. A célula maligna, denominada células de Sézary, é o linfócito TCD4+, presente na circulação periférica, com núcleos cerebriforme. A contribuição da inflamação, via inflamassomas, sobretudo no sítio nodal, ainda não é conhecido nos pacientes com SS. O inflamassoma é um complexo multiproteico presente no citosol, considerado um receptor de padrões moleculares, que após estímulos culmina na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e IL-18) e piroptose. A nossa proposta foi avaliar a relação entre a inflamação crônica por componentes do inflamassoma NLRP1, NLRP3, NLRP4, AIM-2 e citocinas (IL-1 $\beta$ /IL-18) em amostras de linfonodos, pele e sangue periférico de SS. Para tal, selecionamos 26 pacientes com SS (13 homens, 13 mulheres) entre 22-84 anos de idade provenientes do Ambulatório de Linfomas Cutâneos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, e um grupo controle (CTRL) com 28 indivíduos sadios (14 homens, 14 mulheres) idade entre 30-85 anos. Para as análises de pele e linfonodos, foram usados como grupo controle, pacientes com eritrodermia idiopática (EI). Em linfonodos, as análises de expressão proteica por imunohistoquímica indicam redução na expressão de IL-1 $\beta$  e aumento na expressão de IL-18 nos estágios N2/N3 em relação ao grupo EI, a presença de IL-18 foi principalmente em macrófagos (CD68+). Além disso, o aumento do transcrito de IL-18 foi confirmado em CMN circulantes e a nível proteico, no soro. A redução na expressão do transcrito de IL-1 $\beta$  e de vias de genes relacionadas a IL-1B, foi confirmada também por análise de transcriptoma nos estágios mais graves em comparação com casos de linfonodos de EI. Curiosamente, a IL-1 $\beta$  epidérmica estava aumentada enquanto a IL-18 estava diminuída na pele de pacientes com SS, na camada dérmica a expressão de IL-18 foi elevada em relação ao grupo IE. Os resultados evidenciam que na síndrome de Sezary a regulação positiva de IL-18 por macrófagos pode contribuir com a angiogênese e favorecer o crescimento de células tumorais, e a inibição da IL-1 $\beta$  poderia ser um escape tumoral evitando piroptose. Estes dados podem sugerir novos alvos terapêuticos para LCCT. **Palavras-chave:** Síndrome de Sézary, linfonodos, inflamassoma, IL-1 $\beta$ , IL-18, eritrodermia cutânea, sequenciamento de RNA e sistêmica.

## Abstract

Primary cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) are a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas that initially manifest in the skin. Sézary syndrome (SS) is a rare variant with an aggressive prognosis, characterized by the triad of erythroderma, lymphadenopathy and leukemic involvement. The malignant cell, called Sézary cells, is the TCD4<sup>+</sup> lymphocyte, in the peripheral blood, with cerebriform nuclei. The contribution of inflammation, through inflammasomes, especially at the nodal site, is not yet known in patients with SS. The inflammasome is a multiprotein complex present in the cytosol, it is considered a receptor of molecular patterns which after stimulation culminates in the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and IL-18) and pyroptosis. Our proposal was to evaluate the relationship between chronic inflammation by inflammasome components NLRP1, NLRP3, NLRP4, AIM-2 and cytokines (IL-1 $\beta$ /IL-18) in lymph node, skin and peripheral blood samples from SS. We selected 26 patients with SS (13 men, 13 women) aged 22-84 years from the Cutaneous Lymphoma Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, and a control group (CTRL) with 28 healthy individuals (14 men, 14 women) aged between 30-85 years. For skin and lymph node analyses, patients with idiopathic erythroderma (IE) were used as a control group. In lymph nodes, protein expression analysis by immunohistochemistry indicates a reduction in the expression of IL-1 $\beta$  and an increase in the expression of IL-18 in the N2/N3 stages compared to the IE group, the presence of IL-18 was mainly in macrophages (CD68<sup>+</sup>). Furthermore, the increase in IL-18 transcript level was confirmed in circulating mononuclear cells and at the protein level in serum. The reduction in the expression of the IL-1 $\beta$  transcript and of IL-1 $\beta$ -related gene pathways was also confirmed by transcriptome analysis in the most severe stages compared to cases of IE lymph nodes. Interestingly, epidermal IL-1 $\beta$  was increased while IL-18 was decreased in the skin of patients with SS, in the dermal layer the expression of IL-18 was increased in relation to the IE group. The results show that in Sézary syndrome, the upregulation of IL-18 by macrophages can contribute to angiogenesis and favor the growth of tumor cells, and the inhibition of IL-1 $\beta$  could be a tumor escape preventing pyroptosis. These data may suggest new therapeutic targets for LCCT.

**Keywords:** Sézary syndrome, lymph nodes, inflammasome, IL-1 $\beta$ , IL-18, cutaneous erythroderma, RNA and systemic sequencing

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Linfomas

Os linfomas fazem parte de um grupo de neoplasias do sistema linforreticular e são divididos em dois tipos: linfoma de Hodgkin e linfoma não-Hodgkin. O linfoma de Hodgkin acomete principalmente os linfonodos cervicais, mediastinais, axilares e supraclaviculares e corresponde a 15% dos linfomas (1), já os linfomas não-Hodgkin podem ser nodais quando acometem primariamente os linfonodos ou extranodais. Considerando os linfomas não-Hodgkin extranodais, o trato gastrointestinal é o órgão mais acometido e a pele o segundo órgão mais envolvido, compreendendo aproximadamente 19% desses linfomas (2) (3). Existe uma diversidade de neoplasias de células T e B que pode envolver a pele primariamente ou secundariamente, como os linfomas cutâneos de células B (LCCB), que têm sua origem em linfócitos B, e os linfomas cutâneos de células T (LCCT) que têm sua origem em linfócitos T, assim como a micose fungoide (MF) e a síndrome de Sézary (SS) (4).

O termo LCCT foi proposto para agrupar micose fungoide, síndrome de Sézary e outros linfomas T primários de origem cutânea (5). No passado, os linfomas cutâneos não eram reconhecidos como entidade própria, e sim como acometimento secundário da pele por linfoma nodal. Em 2005, a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization - WHO) e a Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer (European Organization for Research and Treatment of Cancer - EORTC), propuseram uma classificação que conferiu mais uniformidade ao diagnóstico e tratamento dos processos linfoproliferativos cutâneos primários (6). Em 2019 houve uma atualização realizada pela WHO-EORTC (4), que é atualmente a classificação utilizada.

### 1.2 Síndrome de Sézary

A SS pertence à família dos linfomas não-Hodgkin, classificada como uma forma leucêmica de linfoma cutâneo primário. A primeira descrição da SS foi publicada em 1938, quando Sèzary e Bouvrain relataram a presença de grandes células mononucleares atípicas no sangue de um paciente acometido de eritrodermia e sinais histológicos de MF (7). A SS é tradicionalmente definida pela tríade de eritrodermia, linfadenopatia e envolvimento leucêmico por células T CD4 circulantes, e é considerada uma variante rara e agressiva (4). As

células neoplásicas circulantes, denominadas de Sézary, caracterizam-se pela presença de um núcleo cerebriforme, posteriormente descobriram que esse aspecto é devido a divisão nuclear de um grande linfócito que não sofreu divisão citoplasmática (8).

### **1.3 Dados demográficos do LCCT**

Um estudo pioneiro do Hospital das Clínicas de São Paulo, ambulatório de linfomas cutâneos da Divisão de Clínica Dermatológica, relatou a maior casuística brasileira e latino-americana de pacientes com MF e SS, onde foram revistos casos de 1989 a 2018. Neste estudo demonstrou um predomínio de pacientes homens (372/727) 51% em relação as mulheres (355/727) 48,8% (9) de acordo com estudos norte americano e europeu (10), (11)

A incidência anual de SS é de 0,1 caso por milhão de pessoas (2, 12) os pacientes são diagnosticados com idade média de 60.9 anos e a sobrevida global em 5 anos é de 78,1% para homens e 87,3 para mulheres. Os pacientes negros mostram menor sobrevida média de 72,3 % comparado com pacientes brancos 84,6% (9), os fatores que podem influenciar esta menor sobrevida de pacientes negros com SS são os fatores demográficos e socioeconômico (10).

O aumento da carga tumoral na circulação periférica e nódulos linfáticos de pacientes com SS piora o prognóstico, com sobrevida mediana entre 2 e 4 anos dependendo da definição usada, grande parte dos pacientes vem a óbito devido a infecções oportunistas e imunossupressão (6, 12).

### **1.4 Aspectos clínico e histológico**

Os LCCT são raros e nos estágios iniciais podem ser confundidos com outras doenças, não há um único exame que possa diagnosticar, sendo baseado em achados clínicos, histopatológicos e moleculares. A SS é caracterizada por eritrodermia (eritema e descamação em mais de 80% da superfície corporal). Também podem ser observados alopecia difusa não cicatricial, queratodermia palmo-plantar, oncodistrofias, além de linfonodomegalias. O prurido é o sintoma mais frequente, e a perda de peso é também relatada pelos pacientes (13).

Os achados histológicos mais característicos incluem a presença de linfócitos com núcleos hipercromáticos e convolutos, de tamanho semelhante ao dos queratinócitos, rodeados por halo claro, isolados ou alinhados formando configuração linear na camada basal da

epiderme, com agrupamento de pelo menos 4 linfócitos ao redor de uma célula de Langerhans na epiderme (microabscessos de Pautrier) (14). Na SS, o epidermotropismo é menos evidente uma vez que a maior parte dos linfócitos TCD4+ migraram para a circulação periférica (15). Em até um terço das biópsias de pacientes com SS, o quadro histológico pode ser inespecífico, com infiltrados linfocitários perivasculares superficiais esparsos (13).

A imunohistoquímica evidencia um infiltrado formado por células T CD4+ malignas, com poucas células T CD8+, perda de expressão de CD7, e presença de rearranjo monoclonal dos genes codificantes de receptores de células T (13).

Devido à dificuldade de confirmação diagnóstica do linfoma cutâneo, eventualmente faz-se necessária a realização de repetição de biópsias ao longo da evolução da doença.

### 1.5 Critérios diagnósticos e estadiamento

Para o diagnóstico da SS, é necessária a presença de população monoclonal de células T na pele e no sangue (mesmo clone) e contagem absoluta de células de Sézary  $\geq 1000$  células/mm<sup>3</sup> ou alterações imunofenotípicas, observadas na citometria de fluxo (relação CD4/CD8  $\geq 10$ , perda de CD7 em  $\geq 40\%$  dos linfócitos T CD4+, perda de CD26 em  $\geq 30\%$  dos linfócitos T CD4+) (16).

De acordo com a classificação de linfomas cutâneos da WHO-EORTC, os linfomas podem ser separados de acordo com o comportamento clínico (4). Desta forma todos os pacientes são estadiados (**Tabela 1**), adotando o critério TNMB (tumor, linfonodos, metástase e sangue) para MF e SS, considerando o T como lesões cutâneas, o N como nódulo linfático e o M como lesão viscerais e o B como sangue periférico (16, 17).

Foi visto em estudos que a curva de sobrevida piora progressivamente em função da extensão do acometimento cutâneo, presença de tumores e eritrodermia, acometimento linfonodal, visceral e do sangue periférico (16), (18).

**Tabela 1. Estadiamento TNMB para MF e SS**

<b>T</b>	<b>Pele</b>
<b>T1</b>	Placas limitadas, pápulas ou patches < 10% da superfície cutânea
<b>T1a</b>	apenas patches
<b>T1b</b>	patches e placas
<b>T2</b>	placas generalizadas, pápulas ou patches ≥ 10% da superfície cutânea
<b>T2a</b>	apenas patches
<b>T2b</b>	patches e placas
<b>T3</b>	um ou mais tumores (≥ 1 cm de diâmetro)
<b>T4</b>	eritrodermia (eritema cobrindo ≥ 80% da superfície cutânea)
<b>N</b>	<b>Linfonodo</b>
<b>N0</b>	ausência de linfonodos clinicamente alterados, biópsia não é necessária
<b>N1</b>	linfonodo clinicamente anormal; histologia do linfonodo com linfadenite dermatopática
<b>N1a</b>	clone negativo*
<b>N1b</b>	clone positivo*
<b>N2</b>	linfonodo clinicamente anormal; histologia do linfonodo com comprometimento parcial por células neoplásicas, estrutura arquitetural do linfonodo preservada
<b>N2a</b>	clone negativo*
<b>N2b</b>	clone positivo*
<b>N3</b>	linfonodo clinicamente anormal; histologia do linfonodo com comprometimento total por células neoplásicas, estrutura arquitetural do linfonodo alterada
<b>Nx</b>	linfonodo clinicamente anormal; sem confirmação histológica
<b>M</b>	<b>Visceras</b>
<b>M0</b>	ausência de envolvimento visceral
<b>M1</b>	envolvimento visceral com confirmação histológica**
<b>B</b>	<b>Sangue periférico</b>
<b>B0</b>	ausência de envolvimento significativo do sangue: ≤ 5% dos linfócitos periféricos são atípicos (células de Sézary) <b>B0a Clone negativo. B0b Clone Positivo</b>
<b>B1</b>	baixa carga tumoral no sangue: > 5% dos linfócitos periféricos são atípicos (células de Sézary), mas não preenche os critérios para B2
<b>B2</b>	População monoclonal de linfócitos T no sangue (clone positivo)* e ≥ 1.000 células de Sézary/μL e/ou CD4/CD8 ≥ 10 e/ou CD4+CD7- ≥ 40% e/ou CD4+CD26- ≥ 30%

\* Pesquisa por PCR, Southern blot ou NGS do gene do receptor de células T \*\* exceto esplenomegalia (não precisa de confirmação histológica)

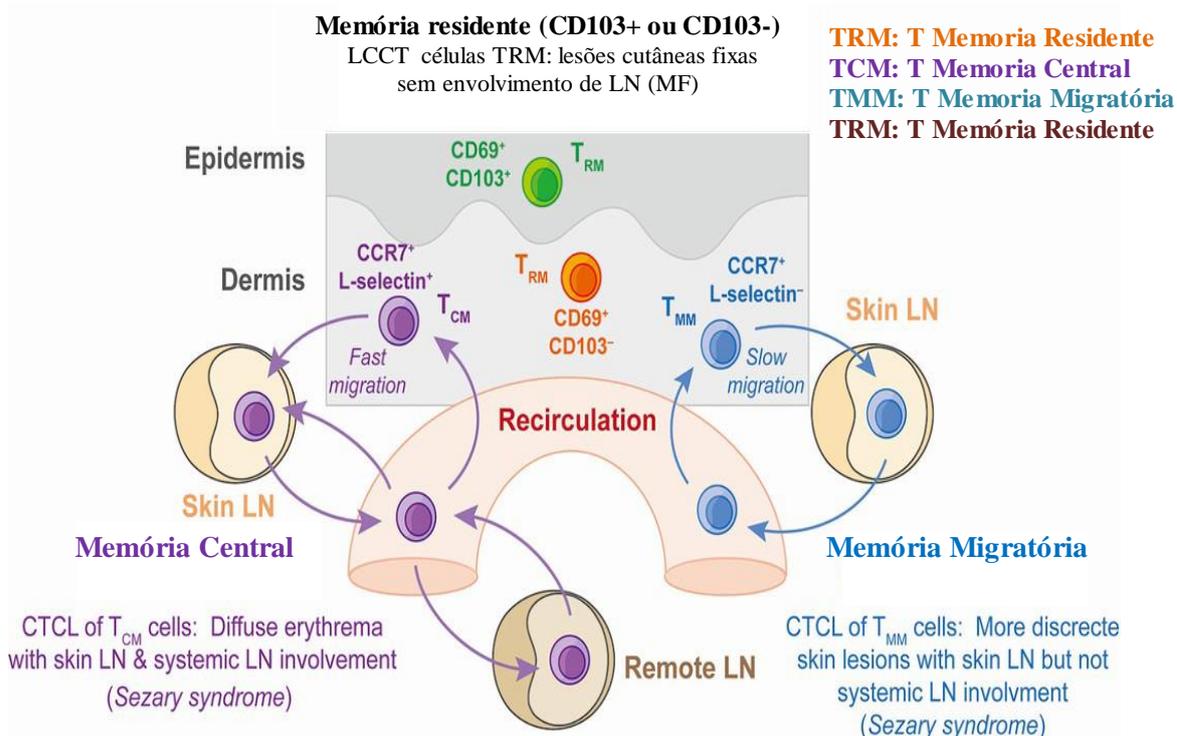
ISCL/EORTC revision to the classification of mycosis fungoides and Sézary syndrome, Olsen et al., 2007.

## 1.6 Aspectos fisiopatológicos do LCCT

A fisiopatologia do LCCT é parcialmente compreendida. A hipótese mais plausível é a de que ocorre ativação inadequada de células T por células apresentadoras de antígenos, o que levaria a um acúmulo gradual de mutações, resultando na proliferação maligna. Porém, o antígeno desencadeador a doença é desconhecida e poderia variar entre os pacientes (19).

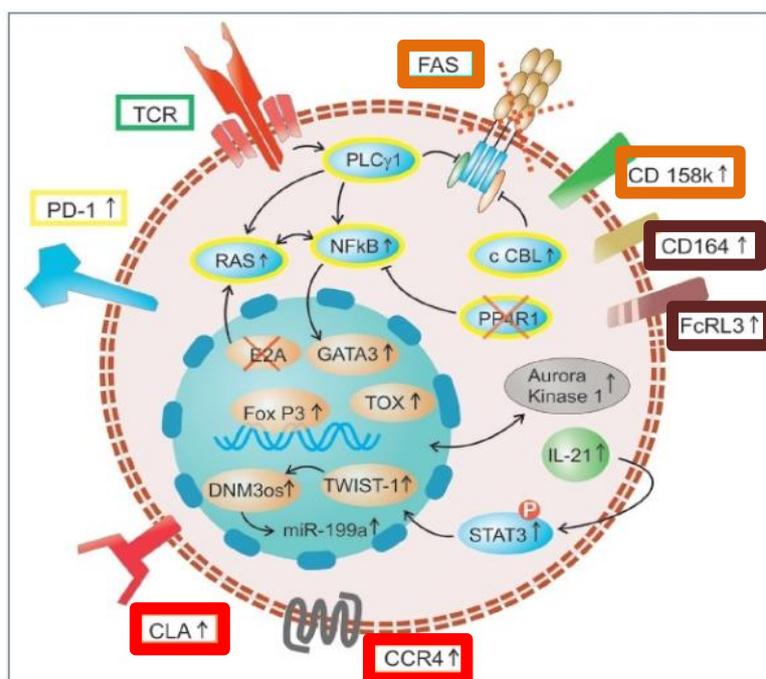
A superfície cutânea é um órgão imunológico dinâmico, constantemente em alerta para proteger ao ataque a patógenos bacterianos, fúngicos, virais e micobacterianos. A pele de um adulto contém aproximadamente 20 bilhões de células T, quase o dobro do número presente na circulação (20). As células T presentes na pele podem nos proteger contra diversos antígenos e reações autoimunes, mas também participam das respostas inflamatórias e tumorais (20).

As células T malignas expressam moléculas de migração para a pele. Na MF, as células expressam fortemente o receptor de quimiocina CCR4 e antígeno associado a linfócitos cutâneos (CLA), que conferem tropismo à pele, e são negativas para CCR7 e L-selectina, receptores que conferem tropismo aos linfonodos, elas são reconhecidas como células T de memória efetora (TEM) (21). As células de Sézary expressam CCR7 e L-selectina, que conferem tropismo para os linfonodos, e CD27 (marcador característico das células T de memória central), são reconhecidas como células T de memória central (TCM). Esses achados sugerem que MF e SS se originam de diferentes subtipos de linfócitos T de memória (22, 23) **Figura 1.**



**Figura 1.** Quatro subtipos de células T de memória com padrões distintos de recirculação, funções efetoras e potencial proliferativo presentes na pele humana em condições normais. Sua transformação maligna pode dar origem a várias formas de LCCT. A MF, com lesões cutâneas fixas e sem envolvimento de LN, é causada por células transformadas que se assemelham a células TRM CD69+CD103+ (verde) ou CD69+CD103- (laranja) não recirculantes. Em contraste, as células T transformadas que recirculam pelo corpo, embora com padrões específicos de subtipos, causam formas leucêmicas de LCCT. As células CCR7+L-selectina+ TCM (roxo) migram rapidamente pela pele, através dos LN drenante, sangue e LNs distais, podendo dar origem à SS com eritema difuso e envolvimento generalizado do LN. As células CCR7+L-selectin- TMM (azul) recirculam com cinética mais lenta e não podem entrar nos LNs distais do sangue devido à falta de expressão de L-selectina. Assim, sua transformação maligna pode resultar em SS com lesões cutâneas mais discretas com NL da pele, mas não envolvimento sistêmico do LN. **Adaptado de Katharina Hochheiser, Annals of Trans Med 20, 2015 (24).**

A SS é um LCCT agressivo, e as células neoplásicas interagem com o microambiente tumoral. Com a progressão da doença, ocorre a mudança de resposta Th1 para Th2, os níveis de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 aumentam e facilitam o crescimento de clones tumorais e o escape imunológico. Além disso, ocorre a diminuição de IFN- $\gamma$  e IL-2 nos pacientes, o que reduz a imunidade celular (25). Mutações somáticas, variações no número de cópias e alterações epigenéticas em células de Sézary podem conduzir a ativação de pró-oncogenes e a inibição de vias supressoras tumorais (26). O balanço entre o grau de ativação de STAT3 (sinal transdutor e ativador de transcrição 3) e STAT5 parece ser crucial na determinação da diferenciação de células Th17 ou T reguladora (27). A ativação de STAT5, e as citocinas IL-2 e IL-15, induzem a expressão de FoxP3 e o desenvolvimento de células T reguladoras (28). A fosforilação constitutiva de STAT3 desempenha um papel importante na expressão aberrante de IL-2R alpha, somente nas células de Sézary, contribuindo com a proliferação e sobrevivência dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> (29). A via de sinalização STAT3 também induz a expressão de IL-17, IL-10, PD-L1 e SOCS-3 (supressor da sinalização de citocinas 3) favorecendo um fenótipo Th17 e de evasão imune contra o tumor (30). A IL-17 promove uma regulação positiva na produção do VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) relacionado à inflamação e angiogênese tumoral (31).



**Figura 2.** Vias de Sinalização alterada e moléculas desreguladas em células de SS, um caminho para novos estudos. Adaptado de Nicolay et al, 2016 (32)

### 1.7 Aspectos da imunidade inata e adaptativa na Síndrome de Sezary

A SS exibe um estado de exaustão da defesa antitumoral, esse microambiente favorece a angiogênese, assim como a sobrevivência e proliferação de células malignas, sendo considerada uma doença de perfil Th2, as citocinas Th2 produzidas pelas células de Sézary suprimem a resposta Th1 e prejudicam a imunidade celular. As células T reativas estão presentes, mas são disfuncionais devido ao desequilíbrio (25), (33).

Considerando que a maioria dos estudos são realizados para entendimento da célula de Sezary, a imunopatogênese da doença necessita ser explorada para compreensão dos mecanismos, seja de contexto de imunidade inata e/ou adaptativa.

Em estudos prévios do grupo de pesquisa, foi visto disfunção na imunidade inata e adaptativa em pacientes SS, sem tratamento prévio. No perfil de produção de citocinas induzida pela ativação via receptores Toll-like (TLRs), observamos em células mononucleares dos pacientes uma diminuição das citocinas a todos os agonistas analisados (TLR2-TLR9). Contudo a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por agonistas de TLR2 e TLR4 está preservada. Chamou atenção a diminuição da produção de IFN tipo II (IFN- $\gamma$ ) e de IFN tipo I (IFN- $\beta$ ) e tipo III (IFN- $\lambda$ ), que pode ser restaurada com o agonista quimerico TLR7-TLR8 (CL097) (34).

Abrangendo a imunidade inata, avaliamos as células Natural Killer (NK) nos pacientes com a síndrome de Sezary, onde foi detectado uma diminuição percentual do subtipo citotóxico NK CD56<sup>dim</sup>, enquanto que o subtipo NK CD56<sup>bright</sup> não se alterou na frequência, mas em ambos subtipos mostraram diminuição da expressão de moléculas de ativação NKG2C e NKG2D (35). Este estudo salientou a importância do agonista duplo TLR7/TLR8 na restauração da produção de IL-12 e IFN tipo I, evidenciando potencial imunomodulador do agonista de imunidade inata. Os achados mostraram que as células NK em SS podem ser potencializadas com o agonista TLR7/TLR8, sugerindo ser um potente adjuvante da resposta anti-tumoral (35).

Sabendo do comprometimento de células NK e linfócitos TCD8 em pacientes SS e da sua importância para o combate as células malignas, fomos avaliar os linfócitos TCD8 que faz parte da imunidade adaptativa. Os achados mostraram um perfil de ativação crônica de células T CD8+, como um perfil citotóxico atenuado, e a responsividade prejudicada de IL-7 foi observado, sugerindo status de ativação crônica, de células T CD8+ em pacientes com SS (36). Este perfil exausto dos linfócitos T CD8+, salienta a alternativa para ativação da imunidade inata, reforçando a resposta de IFNs.

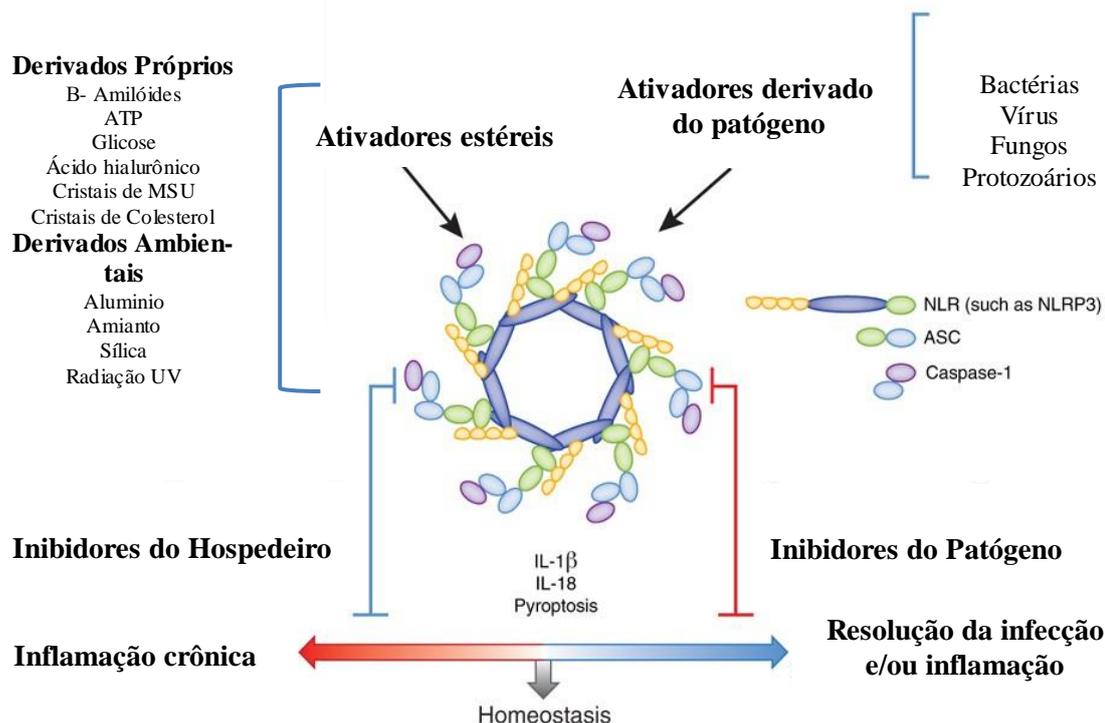
Além disto, foi observado uma redução na produção de quimiocinas relacionadas ao interferon, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10, nos pacientes por possível falta de resposta ao interferon, que pode ser contornado com agonistas de TLR (37). Além disto, foi evidenciado de que os monocitos são responsivos ao IFN- $\gamma$ , evidenciado que as células da imunidade inata são relevantes no processo de imunoterapia por IFN dos pacientes. Enfatizando que a ativação da imunidade inata pode ser uma via importante para compensar a exaustão das células TCD8+ na síndrome de Sézary (37).

Como prosseguimento do estudo da imunidade na SS, há um questionamento de que o microambiente inflamatório é um componente essencial para o desenvolvimento de tumores, e que o escape tumoral é um atributo das células malignas que são capazes de suprimir os mecanismos de vigilância imunológica. Assim, a carcinogênese e a progressão do tumor são estimuladas ou interrompidas por processos inflamatórios e imunológicos, respectivamente (38). Neste sentido, a investigação tem tomado rumo a mecanística da resposta inflamatória mediada por inflamassomas.

### **1.8 Inflamassoma**

Os inflamassomas tem um duplo papel podendo influenciar na formação e progressão de alguns tipos de câncer e contribuindo com a homeostase tecidual e resposta imune (39).

No conceito de imunidade inata, o inflamassoma é um complexo multiprotéico citoplasmático, capaz de ativar a cascata inflamatória em resposta a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). A sinalização leva a ativação da caspase -1, enzima responsável pela produção de citocinas pró-inflamatória IL-1 $\beta$  e IL-18. As células do sistema imune que expressam o complexo inflamassoma são: monócitos, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans e linfócitos T, queratinócitos e mucosas, células endoteliais, assim como tecidos: placenta, cérebro e testículos (40). Os constituintes fundamentais do inflamassoma são: um receptor intracelular de reconhecimento de padrões moleculares (PRR), uma proteína ligada a ASC (proteína *speck-like* associada à apoptose com domínio de recrutamento de caspase) e uma protease (caspase-I) (41).



**Figura 3.** Durante a infecção ou lesão, os inflamassomas são ativados direta ou indiretamente por uma ampla gama de padrões moleculares associados ao perigo. O evento inicial leva à ativação da caspase-1, liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 e, às vezes, piroptose. A liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 resulta no recrutamento de populações de células efetoras da resposta imune e reparo tecidual. Em circunstâncias normais, a ativação dos inflamassomas culmina na resolução da infecção ou inflamação e contribui para os processos homeostáticos (ou seja, ecologia microbiana intestinal e regeneração de células epiteliais após lesão). No entanto, a perpetuação da ativação do inflamassoma pode levar a doenças inflamatórias crônicas. Os inibidores derivados de patógenos bloqueiam a ativação do inflamassoma e, portanto, a resolução da infecção, enquanto os inibidores do inflamassoma derivados do hospedeiro previnem a perpetuação da inflamação crônica. UV, ultravioleta. **Adaptado de Jorge Henao-Mejia, Nature, 2012 (42)**

O inflamassoma possui diversos PRR entre eles as proteínas da família dos receptores tipo NOD (*Nodlike receptor*, NLR): NLRP1, NLRP3, NLRC4/NAIP, NLRP6, NLRP7 e NLRP12 e a família de sensores HIN, constituída por receptores de DNA citoplasmático AIM2 e IFI16. NLRP1, NLRP3, NLRC4/NAIP e AIM2 são os receptores mais reconhecidos responsáveis por ativar a via canônica do inflamassoma, ou seja, a via dependente de caspase-1(43).

Os inflamassomas podem ser ativados por via não canônica e canônica. O inflamassoma não canônico é ativado pelo LPS intracelular liberado pelas bactérias Gram negativas,

resultando na formação de um complexo molecular que consiste em pró-caspase-11 inativa e LPS (44).

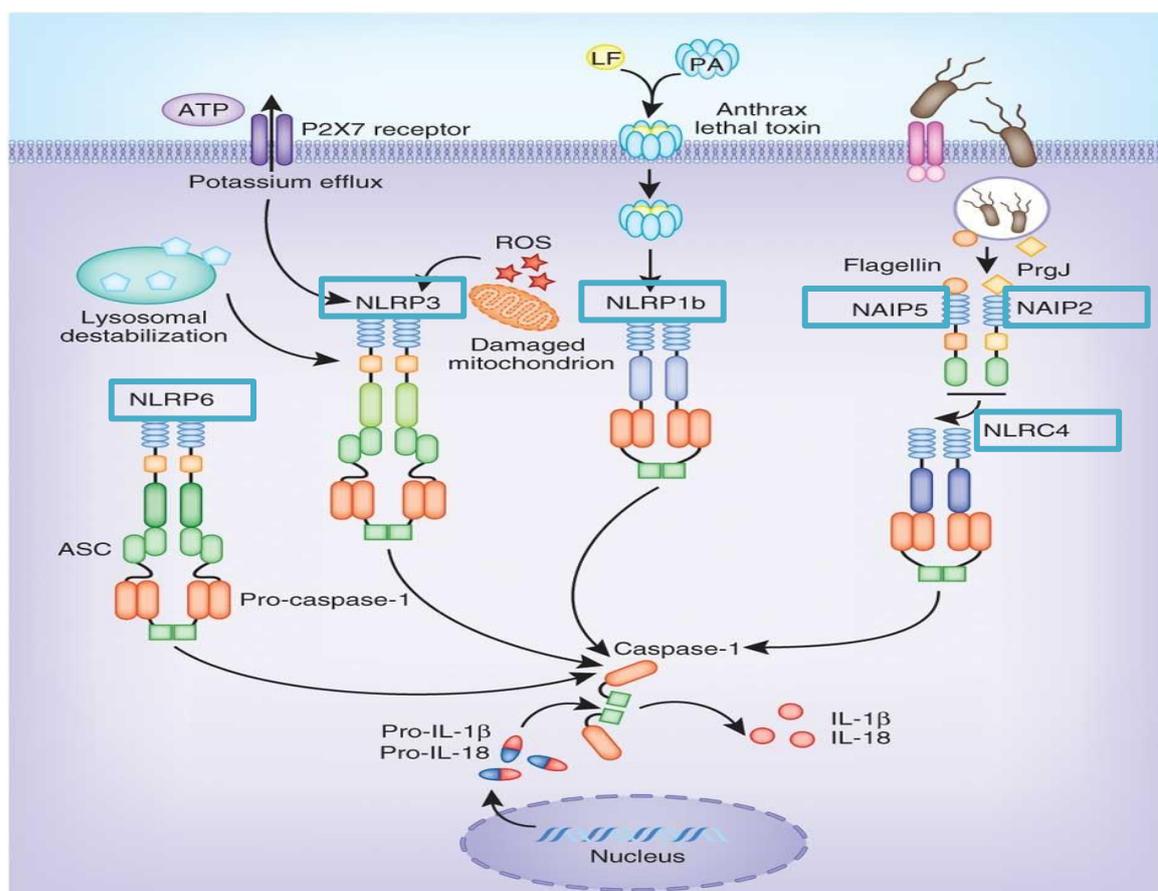
Para que a ativação do inflamassoma aconteça é necessário dois sinais: o primeiro sinal geralmente ocorre após a ativação de um receptor de membrana do tipo Toll (TLR), ligado a membrana e as lectinas de tipo C (CTL), vigilantes do meio extracelular e os compartimentos endossômicos, em busca de algum PAMPs e/ou DAMPs, ao encontrarem, muitos PRRs desencadeiam cascatas de sinalização (primeiro sinal) que promove a transcrição de genes pelo fator nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) ou fatores reguladores de interferon (IRFs), o que leva a ativação de genes necessários para a formação das proteínas do inflamassoma pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 (43).

O segundo sinal ocorre quando os receptores do tipo NOD (NLRs) reconhecem os PAMPs/DAMPs no citoplasma. Sua oligomerização ocorre quando qualquer destes receptores são estimulados, o que leva ao recrutamento da proteína adaptadora ASC e da pró-caspase-1, que ativa a caspase-1 a molécula efetora do complexo. A ativação da caspase-1 cliva as pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 em suas formas ativas (45).

O NLRP-1 é o sensor de inflamassoma mais proeminente expresso na pele humana, dentre os demais tecidos, e pode desempenhar um importante papel na resposta imune específica. Além disso, mutações de ganho de função do inflamassoma NLRP1 podem resultar no desenvolvimento de desordens cutâneas e doenças autoinflamatórias, como no caso da psoríase ou vitiligo (46).

O inflamassoma NLRP3 é um dos mais estudados com o mecanismo molecular caracterizado para maturação e formação de IL-1 $\beta$  e IL-18 (45). Os sinais de ativação do inflamassoma NLRP3 podem ser decorrentes de mecanismos de alteração da homeostasia celular como efluxo de  $\text{K}^+$ , liberação de catepsina G lisossomal, produção de espécies reativas do oxigênio (ROS), efluxo de cálcio, estresse mitocondrial e do retículo endoplasmático. Incluem também PAMPs como compostos bacterianos (lipopolissacáride, LPS), virais, fúngicos e protozoários, e DAMPs como raio ultravioleta, ATP, HMGB1 (*High-mobility group protein B1*), cristais de ácido úrico e fibrilas  $\beta$ -amiloide, alumínio e sílica (44).

O NLRP3 é expresso em baixos níveis em células mieloides e pode ser transcricionalmente induzido por agonistas de TLR4, como o LPS, e por citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , de maneira dependente do NF- $\kappa\text{B}$ . A ativação de NLRP3 também está envolvida no reparo de feridas regulando positivamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias (47).



**Figura 3.** O NLRP3 é ativado por três eventos celulares comuns induzidos por diferentes estímulos: efluxo de potássio; a geração de ROS; e desestabilização fagolisossomal e a liberação de mediadores endógenos no citosol. NLRP1b é ativado pela toxina letal do antraz. No camundongo, o NLRC4 é ativado por proteínas NAIP ligadas a ligantes específicos. O NAIP5 e o NAIP6 ligam-se à flagelina bacteriana, enquanto o NAIP2 liga-se ao componente bacteriano T3SS PrgJ. Esses complexos NAIP-ligando posteriormente se ligam e ativam NLRC4. LF, fator letal; PA, antígeno protetor. **Adaptado de Vijay Rathinam, Nature Immunology, 2012 (48).**

O inflamassoma AIM2, membro da família HIN-200, é composto pelo receptor AIM2, ASC e caspase-1 e pode ser ativado por DNA de fita dupla citosólica (dsDNA) derivado de vírus, bactérias ou de células do hospedeiro, e induz a maturação de IL-1 $\beta$  dependente de caspase-1(44).

A IL-1 $\beta$  é uma citocina importante, participa de todos os eventos envolvidos na ativação e na regulação da inflamação, estimula a secreção de outras citocinas inflamatórias como IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ . Como também de fatores responsáveis pelo crescimento e diferenciação

de células imunes, promove neutrofilia, secreção de VEGF, geração ROS e aumenta a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais vasculares, ativando assim as células dendríticas e os linfócitos (49).

A expressão elevada da citocina pró-inflamatória IL-18 é detectada em distúrbios inflamatórios de pele como na dermatite atópica (50). Em pacientes com LCCT os níveis plasmáticos de IL-18 estão elevados, independente do estágio, e nas lesões de pele há aumento da expressão de transcritos e proteína para IL-18 e caspase-1 (51). A IL-18 possui um papel importante na patogênese de linfomas, uma vez que ele pode regular positivamente a expressão de c-myc e bcl-2 e negativamente a expressão de TP-53 e bax, promovendo assim a proliferação celular do linfoma e da inibição do apoptose celular, além de que pode influenciar na geração de resposta Th2. (52).

A atividade da caspase-1 dependente de inflamassoma, também pode resultar em uma forma altamente inflamatória de morte celular, conhecida como piroptose em células mielóides. A piroptose ocorre com mais frequência após a infecção por patógenos intracelulares e é dependente da caspase-1. Ocorre independente das caspases pró-apoptóticas e pode ser desencadeada por rupturas da membrana plasmática, influxo de água, inchaço celular, lise osmótica e liberação de conteúdo celular pró-inflamatório (53).

## 1.9 O inflamassoma no linfoma

As células T CD4 malignas no LCCT, induzem alterações na arquitetura da pele e prejudica a barreira cutânea (30) juntamente com o intenso prurido e descamação, contribuindo com o comprometimento das defesas imunológicas, conseqüentemente aumenta o risco de contrair infecções bacterianas na pele, em particular, a infecção por *Staphylococcus aureus* (SA) que contribui com a morbidade e mortalidade, e conseqüente óbito por sepse (54).

O papel do inflamassoma no LCCT ainda é algo pouco explorado e necessita de mais estudos, no entanto sabe-se que em pacientes SS a inflamação causada pelas citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-13), possuem um papel prótumoral (55, 56), e que a IL-4 é capaz de inibir a montagem do inflamassoma NLRP3, movendo-se para o núcleo das células TCD4+, ativando subsequentemente a secreção de IL-4 e perpetuando o perfil Th2 (57)

A expressão de NLRP3 e caspase-1 é reduzida em doenças dermatológicas, como na dermatite atópica, onde os pacientes são colonizados por *Staphylococcus aureus*, é possível que seja decorrente da ação da IL-4, IL-5 e IL-13 que regulam negativamente NLRP3 e ASC, (58). Considerando que na SS é frequente a colonização na pele por SA e que o tratamento com antibióticos pode melhorar a apresentação clínica, levando a uma redução de citocinas pró inflamatórias e inibindo a sinalização e proliferação aberrantes das células T malignas (54).

A ativação do complexo inflamassoma NLRP3 pode favorecer o desenvolvimento de linfoma não Hodgkin, por aumentar a expressão de IL-18 no tecido linfoide, associado a mucosa em pacientes com leucemia aguda de células T, e também o aumento da expressão de IL-18 que pode atuar como um fator proliferativo de células tumorais (59, 58)

Sabe-se que as lesões cutâneas de SS e MF expressam níveis mais elevados de TLR2, TLR4 e TLR9 em comparação com a pele de indivíduos saudáveis (60) o que pode gerar o primeiro sinal para a ativação do inflamassoma (43). A regulação positiva do inflamassoma AIM-2 após ruptura da barreira cutânea atua como primeira linha de defesa a patógenos invasores, porém em caso de comprometimento crônico sua ativação contínua pode contribuir para um círculo vicioso de inflamação em doenças inflamatórias crônicas da pele como a psoríase (61).

Dessa forma, faz-se necessário melhor compreender a função do inflamassoma na patogênese da SS, para contribuir ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar na síndrome de Sézary, a expressão de componentes da via do inflamassoma (NLRP1, NLRP3, NLRP4, AIM-2) e citocinas (IL-18 e IL-1 $\beta$ ) na pele, linfonodos reativos e em células mononucleares do sangue periférico.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Analisar o perfil de expressão de mRNA dos componentes do inflamassoma (NLRP1, NLRP3, NLRP4 e AIM-2) e citocinas (IL-18 e IL-1 $\beta$ ) em células mononucleares de SS e controles saudáveis,
- Avaliar a expressão proteica de marcadores de inflamassoma na pele de pacientes Sézary comparando com pacientes com eritrodermia idiopática e controle saudáveis,
- Avaliar também em linfonodos de pacientes Sézary comparados com eritrodermia Idiopática a expressão proteica de marcadores de inflamassoma,
- Dosagem sérica de IL-18 e IL-18 BP,
- Avaliar a atividade de Caspase-1 em linfócitos TCD4+ de SS e controles saudáveis,
- Avaliar o perfil de expressão dos transcritos em linfonodos de pacientes Sézary e eritrodermia idiopática.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 Casuística

Foram selecionados 26 pacientes com SS (13 homens, 13 mulheres), com média de idade de 61 (29-84) anos de idade provenientes do Ambulatório de Linfomas Cutâneos da Divisão Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, e um grupo controle com 28 indivíduos saudáveis, 14 homens e 14 mulheres com média de idade 54 anos de idade (30-85) proveniente do Laboratório de Investigação Médica unidade 56 da Faculdade de Medicina da USP, que não apresentam história de doença dermatológica.

Foram coletadas de pacientes com SS, sangue periférico (n = 23 M12/F11;) e biópsias de pele para serem emblocados em parafina (n = 9; 4M/5F). Amostras de linfonodos (n = 8; 4M/4F; estágio N1 = 4, estágio N2/N3 = 4) foram obtidas a partir de biópsia excisional de linfonodos após avaliação do envolvimento neoplásico por exame clínico ou exames de imagem. Os critérios estabelecidos para suspeita de envolvimento neoplásico de linfonodos foram  $\geq 1,5$  cm de maior diâmetro, endurecidos, aglomerados ou aderidos a planos profundos.

Foram coletadas de pacientes com Eritrodermia idiopática, linfonodos eritrodérmicos sem a presença de células malignas até o momento da biópsia (n = 8; 4M/4F; idade mediana de 65 anos, variando de 32-77 anos) e pele (N=10-12). Este grupo foi utilizado como grupo controle.

As amostras de sangue periférico foram obtidas previamente ao tratamento dos pacientes, todos os pacientes com SS apresentavam eritrodermia. Os diagnósticos de SS foram estabelecidos de acordo com os critérios clínicos e histológicos, revisados propostos pela Sociedade Internacional de Linfomas Cutâneos (ISCL) e pela força-tarefa de linfoma cutâneo da Organização Europeia de Pesquisa e Tratamento do Câncer (EORTC).

Para o grupo controle de indivíduos saudáveis, foram selecionados 28 doadores (CTRL) (14 homens, 14 mulheres) com média de idade de 54 (26-75).

Os critérios de exclusão do estudo foram doenças dermatológicas, autoimunidades, tratamento com drogas imunossupressoras ou imunomodificadoras, gravidez e idade inferior a 18 anos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Uso Institucional da Universidade de São Paulo (CAAE, 65115317.7.0000.0068), e o consentimento informado foi obtido de todos os sujeitos. Todos os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram realizados de acordo com o Comitê de Ética da Universidade de São Paulo e o consentimento informado

foi obtido de todos os sujeitos. Este estudo foi realizado de acordo com as diretrizes e regulamentos desta instituição e os princípios éticos da Declaração de Helsinque.

### **3.2. Extração de RNA, sequenciamento e análises transcriptômicas**

A extração do RNA total foi realizada com o Mini Kit RNeasy Plus (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade da amostra foi verificada pela Tape Station (Agilent). A expressão gênica foi analisada por sequenciamento de RNA utilizando a plataforma Illumina TruSeq Stranded. Esta etapa foi realizada no setor multi-usuário da Rede Premium- FMUSP.

Após a remoção dos adaptadores de sequência, as leituras foram submetidas à garantia de qualidade com o programa FASTQC (62). As sequências resultantes foram mapeadas contra o genoma humano de referência (assembly GRCh38.p13 release 103) com o programa SUBREAD (63), após contagem com FEATURECOUNTS (64). A avaliação da qualidade, normalização, análise estatística e identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs) foram realizados utilizando o pacote R/Bioconductor DESEQ2 (65). Os valores-p foram submetidos ao ajuste da taxa de falsa descoberta com o método de Benjamini-Hochberg. Os genes foram considerados diferencialmente expressos se o valor de  $p \leq 0,05$  e a variação absoluta de vezes  $\geq 1,5$ . A análise de sobre-representação foi realizada com o programa ENRICH (66) e a rede gênica foi construída com o Cytoscape (67). As análises bioinformáticas foram realizadas com a colaboração de Dr Frederico Moraes Ferreira, do Laboratório de investigação medica LIM-50 da Faculdade de Medicina de São Paulo e o Prof. Helder Nakaya do Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo.

### **3.3. Obtenção de células mononucleares (CMNs) do sangue periférico**

Para obtenção de CMNs, amostras de sangue periférico dos indivíduos foram coletadas em tubo com heparina estéril e diluídas com solução fisiológica, volume a volume. As suspensões das CMNs foram obtidas após centrifugação por 20 minutos a 2200 rpm, através de gradiente de concentração Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, EUA). As células obtidas foram quantificadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada de acordo com o ensaio realizado para análise de expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real e cultura celular.

### 3.4. Cultura celular de linhagens

As linhagens HUT-78, SeAx, SZ4 e PB2B, derivadas de pacientes com LCCT foram gentilmente doadas por Professor Niels Ødum (Copenhaga, Dinamarca). As células Hut78 e PB2B foram cultivadas em meio RPMI (Invitrogen) com 20% e 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), respectivamente. As células SZ4 foram cultivadas em meio RPMI contendo 10% de FBS e as células SeAx foram cultivadas em meio RPMI contendo 10% de soro humano AB (SAB) (Sigma, St Louis, MO, EUA), 5 ng/mL de IL-2 e IL-4 humana recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todas as células foram cultivadas em 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de incubadora humidificada a 37°C. As células foram utilizadas para realizar PCR em tempo real.

### 3.5. Expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real

O RNA total foi analisado no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) e a reação de transcrição reversa realizada com o kit iScript™ (Bio-Rad). Para a reação em cadeia da polimerase em tempo real, o DNA complementar foi incubado com SYBR Green (Applied Biosystem) e os primers para todos os genes alvo. Todas as sequências de primers para NLRP1, NLRP3, NLRP4, IL-18, IL-1 $\beta$  e CARD8 foram sintetizadas pela Invitrogen e as sequências estão listadas no **quadro 1**. A amplificação do DNA foi realizada em um sistema de PCR 7500 em tempo real (Applied Biosystems) e a análise dos dados foi realizada usando o software 7500 versão 2.0.6 (Applied Biosystems) de acordo com o método de limiar de  $\Delta\Delta$ -ciclo (68).

**Quadro 1: Sequências dos primers usados para transcriptase reversa quantitativa em PCR em tempo real**

Gene	FW primer	REV primer
NLRP1	5'AAGACCAGCTG TTCTCGGAGTT3'	5'AGGCATGAGATCTCCTGGTTTC3'
NLRP3	5'TGGAGTGTCCGAGAAGAG3'	5'TGCTGTCATTGTCCTGGTGT3'
NLRP4	(5'GAACTACGGCTGGACTCTTTT3'	5'AGCAAAGACATGTGGCGGAA3'
AIM-2	5'CACCAAAAGTCTCCTCATGTT3'	5'AAACCCTTCTCTGATAGATTCCTG3'
IL-18	5'GACGCATGCCCTCAATCC3'	5'CTAGAGCGCAATGGTGAATC3'
IL-1 $\beta$	5'TCCCCAGCCCTTTTGTGA3'	5'TTAGAACCAAATGTGGCCGTG3'
CARD8	5'CAGTGTCCAAGCAACAAGCC3'	5'TACTGGATCCACTGTCCCGT3'
GAPDH	5'GAAGGTGAAGGTCGGAGT3'	5'GAAGATGGTGTGGGATTTTC 3'

### 3.6. Cultura celular e ensaio de atividade de caspase-1

Células mononucleares de sangue periférico foram isoladas de sangue venoso heparinizado por centrifugação em gradiente Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e diluídas em meio RPMI com 10% de soro humano AB (Sigma). As culturas de ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas em microplacas de 48 poços (Costar, Cambridge, MA, EUA) em meio na presença de agonistas de TLR4 (lipopolissacarídeo, LPS, 1  $\mu\text{g/mL}$ ) por 3 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, nos últimos 15 min foi adicionado ATP (1nM). Os reagentes foram obtidos da InvivoGen (San Diego, CA, E.U.A.).

As células foram submetidas à atividade de caspase-1 usando FAM-FLICA (GREEN FLUORESCENCE) Caspase-1 Assay Kit (Immunochemistry Technologies, Bloomington, Minnesota, EUA) por citometria de fluxo. Anticorpos para CD3-BV605 (SK7), CD4 V-450 (SK3), CD7-PERCEP-CY 5-5 (M-T701), foram usados da BD Biosciences. Foram adquiridos 200.000 eventos no citômetro de fluxo Fortessa (LSR Fortessa, BD, Califórnia, EUA) com o software Diva (BD – EUA). Os dados foram analisados com auxílio do software Fortessa versão etc.

### 3.7. Determinação de IL-18 e IL-18BP

Os níveis séricos de IL-18 e IL18BP foram avaliados pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de acordo com as instruções do fabricante kit ELISA (R&D System), com limite de detecção de 26pg/mL e 1.700pg/mL, respectivamente.

### 3.8. Imunohistoquímica

Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, reidratados em etanol e bloqueados com peróxido de hidrogênio a 3%. As secções de tecido foram então incubadas com os anticorpos primários anticorpo de coelho anti-NLRP1 policlonal (Ab 3683); camundongos monoclonais anti-NLRP3 (214185), anticorpo policlonal de coelho anti-AIM2 (93015), anticorpo policlonal de coelho anti-IL-18 (Ab71495), anticorpo policlonal de coelho anti-IL-1 $\beta$  (Ab2105), procedentes da Abcam, Cambridge, Massachusetts.

O sistema Reveal Biotin-Free Polyvalent HRP (SPB-999, Spring Bioscience Corp, Pleasanton, Califórnia) foi selecionado como sistema de amplificação, e DAB (3,3' diaminobenzidina, D5637, Sigma) foi usado para revelação. Os controles negativos da reação foram obtidos omitindo o anticorpo primário, substituindo-o por PBS pH 7,4. Após a montagem

das lâminas com resina Permount (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA). As lâminas foram digitalizadas usando um scanner de lâminas Aperio ScanScope (Aperio Technologies, Vista, Califórnia), e as imagens foram analisadas com Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, Maryland).

### 3.9. Imunofluorescência

A imunofluorescência para expressão de CD4/IL-18 e CD68/IL18 foi realizada em amostras de 4  $\mu$ m embebidas em parafina. As amostras foram desparafinizadas e fixadas com paraformaldeído a 4% (Sigma) em solução salina tamponada com fosfato por 10 minutos em temperatura ambiente. A permeabilização foi realizada utilizando 1% de Triton X-100 (Sigma) em PBS, enquanto 5% de soro fetal bovino (Sigma) foi utilizado para bloqueio. As amostras foram incubadas durante a noite com o anti-CD68 monoclonal primário (KP-1, 168M-96, Cell Marque, CA, EUA), anti-IL-18 (ab71495 Abcam) e camundongos anti-CD4 (Elabscience, E-AB -22098). Os anticorpos secundários burro anti-camundongo Alexa 488 (verde, A11008, Thermo Fisher Scientific) e cabra anti-coelho Alexa 633 (vermelho, A31570, Thermo Fisher Scientific) foram aplicados para dupla coloração de CD4/IL-18 e CD68/IL18. A coloração DAPI (dicloridrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol, Thermo Fisher Scientific) foi usada para identificação nuclear. Para controles, o anticorpo primário foi omitido antes da adição do anticorpo secundário. As imagens foram adquiridas utilizando os filtros apropriados de um microscópio de imunofluorescência invertido Axiovert 200 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

### 3.10. Análise estatística

Todas as representações estatísticas e gráficas foram executadas no software GraphPad Prism (versão 7.0). A correlação estatística entre os grupos foi realizada utilizando o teste não paramétrico *Man-Whitney* e para comparações entre três grupos Anova.

Todas as comparações que resultaram em  $P \leq 0.05$  foram consideradas significantes. Os dados foram representados por média e desvio padrão, # $p \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características dos pacientes envolvidos no estudo

Foram selecionados 26 pacientes diagnosticados com SS, cujos achados clínicos e laboratoriais no momento do diagnóstico estão descritos na **Tabela 1**. Como grupo controle, CTRL foram selecionados 28 indivíduos saudáveis com idade pareada ao grupo SS. O sexo dos pacientes SS e CTRL tem representação homogênea.

**Tabela 1. Características dos grupos de estudo**

Pacientes SS	Sexo	Idade	Linfócito	CD4+/ mm <sup>3</sup>	CD4+/CD26- (%)	CD4+/CD7- (%)	CD8+	CD4/CD8	Biopsia pele	Biopsia linfo
SS1	F	36	3620	2908	1192 (41)	930 (32)	263	11	S	N
SS2	M	62	6870	6270	3762 (60)	2696 (43)	452	11	N	N
SS3	M	22	5687	4866	2335 (48)	1557 (37)	422	9	N	N
SS4	F	69	4730	4209	2946 (70)	2147 (51)	94	44	N	N
SS5	M	62	2100	1008	332 (33)	63 (3)	504	4	N	N
SS6	F	81	2280	1940	1105 (57)	427 (22)	161	12	N	N
SS7	M	53	1430	600	540 (9)	222 (37)	328	2	S	S
SS8	F	76	1160	916	540 (59)	183 (20)	81	11	S	N
SS9	M	57	3490	3176	2350 (74)	2604 (82)	174	18	N	N
SS10	M	62	8670	8150	4238 (52)	3341 (41)	347	23	N	N
SS11	F	60	131010	25767	120736 (96)	120736 (96)	5240	24	S	S
SS12	M	48	21430	20572	4526 (22)	4114 (2)	428	50	N	N
SS13	M	68	6830	6251	5376 (86)	5063 (81)	295	21	S	N
SS14	F	58	3090	2472	1508 (61)	490 (2)	247	10	S	S
SS15	F	29	4262	3580	1825 (51)	429 (12)	362	10	N	N
SS16	F	61	2030	2030	1705 (84)	1218 (60)	182	11	N	N
SS17	M	56	7640	6647	5251 (79)	2791 (42)	153	43	S	S
SS18	F	70	7370	6706	5968 (89)	4158 (62)	147	45	S	N
SS19	F	69	3260	2543	2060 (81)	585 (23)	242	10	S	S
SS20	M	55	2240	1705	290 (17)	937 (55)	313	6	S	S
SS21	F	65	3700	3293	2700 (82)	231 (7)	148	22	S	S
SS22	M	84	2610	2531	2453 (94)	760 (30)	224	11	S	S
SS23	M	70	2200	2068	1861 (90)	827 (40)	66	31	S	N
SS24	F	43	5690	4840	4210 (87)	2904 (60)	178	27	N	N
SS25	M	60	2250	1786	1327 (59)	1417 (63)	98	18	N	N
SS26	F	40	3780	3080	215 (7)	92 (3)	296	10	N	N
<b>SS:26</b>	<b>13 F/13 M</b>	<b>61 (22-84)</b>								
<b>CTRL:28</b>	<b>14 F/14 M</b>	<b>54 (30-85)</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>
<b>EI:19</b>	<b>6 F/M 13</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>	<b>NR</b>

F= feminina, M= masculino; NR= não realizado;

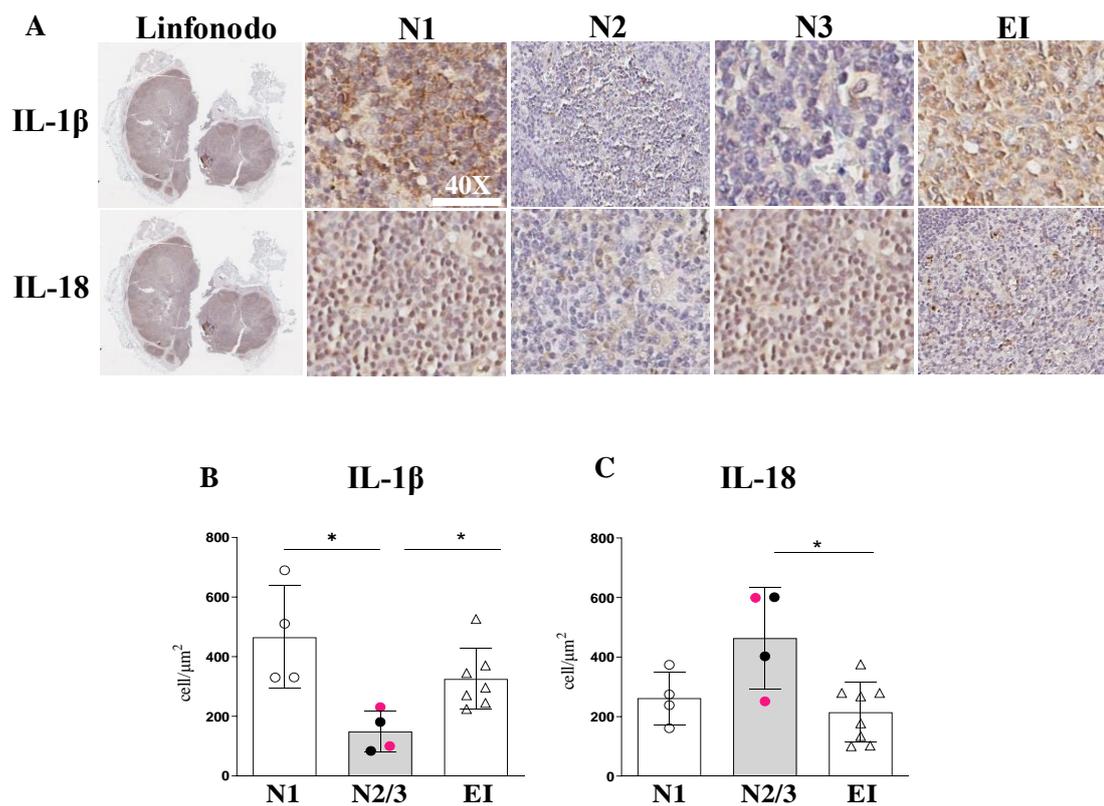
Valores de referência: linfócitos (1000-3200/mm<sup>3</sup>); CD4+ (900-3400/mm<sup>3</sup>); CD4+CD26 (razão>40%); CD4+CD7- (razão >30%.); CD8+ (300-1000/mm<sup>3</sup>); CD4/CD8 (razão >10%). N: Não. S:Sim

#### **4.2 Expressão de componentes do inflamassoma em linfonodos e na pele eritrodérmica de pacientes com SS**

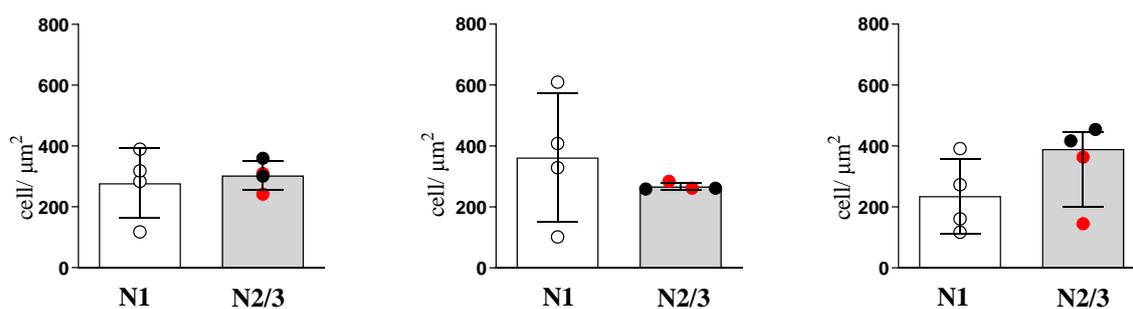
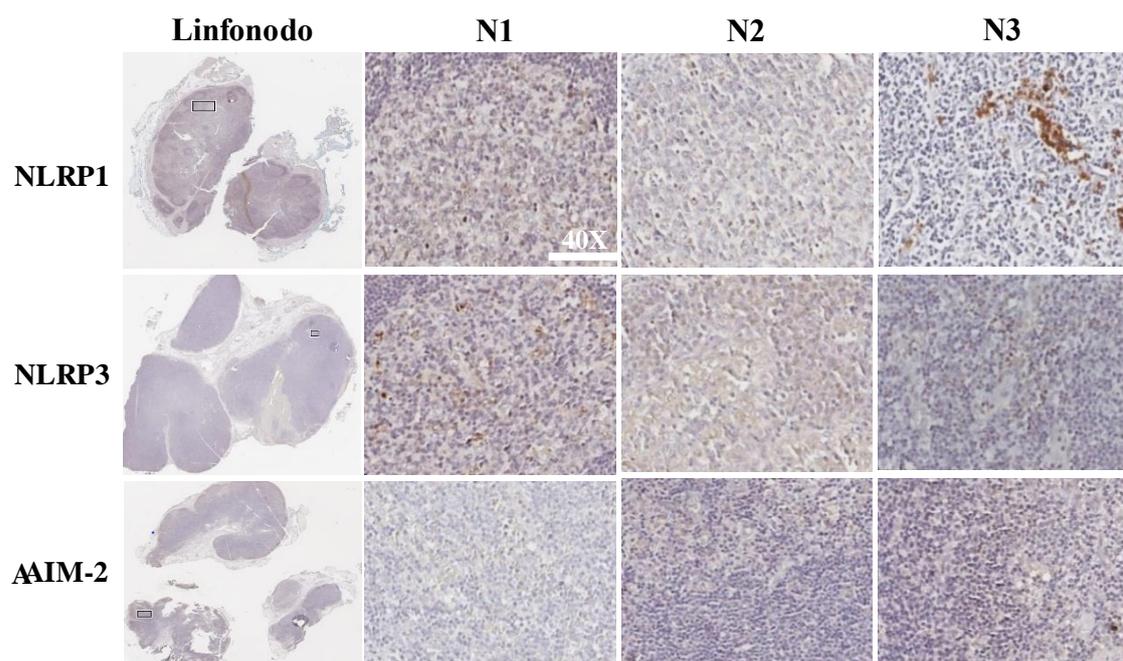
Para verificar se a expressão dos componentes do inflamassoma pode estar alterada na síndrome de Sezary, avaliamos a expressão de NLRP1, NLRP3, AIM2 e IL-1 $\beta$ /IL18 por imunohistoquímica, em linfonodos de pacientes em estágio inicial (N1) e com presença de células neoplásicas (N2/N3). A sigla “N” descreve a extensão do linfoma nos gânglios linfáticos. O estadiamento e classificação da SS foi de acordo com as recomendações do ISCL/EORTC (16), (69), (6). Até o momento, não há evidências de estudos realizados sobre o perfil inflamatório em LN em pacientes com Sezary. Considerando que todos os pacientes com SS possuem pele eritrodérmica, também incluímos casos de pacientes com eritrodermia idiopática (EI) como grupo controle, com ausência de células malignas no momento da coleta.

Na **Figura 1** pode-se observar que a expressão de IL-1 $\beta$  está diminuída nos LN em estágio N2/N3 comparados ao estágio N1 e aos LN EI (**Figura 1B**). Em contraste, houve aumento da expressão de IL-18 no grupo N2/N3 do grupo SS em comparação com o grupo EI (**Figura 1C**).

No entanto, não foram detectadas alterações significativas de expressão de NLRP1, NLRP3 e AIM2 nos linfonodos N1 e nos estágios mais avançados N2/N3 (**Figura 2**).



**Figura 1.** Regulação negativa da expressão de IL-1 $\beta$  e positiva de IL-18 em linfonodos em estágio avançado de SS. A expressão de IL-1 $\beta$  e IL-18 foi avaliada nas biópsias de linfonodos de pacientes com SS nos estágios N1 (n=4, círculo aberto), N2 (n=2, círculo rosa) N3 (n=2, fechado círculo) e pacientes com eritrodermia idiopática (EI, n=7, triângulo aberto) por imuno-histoquímica. (A) As imagens possuem ampliação original  $\times 40$ . (B) expressão de IL-1 $\beta$  e (C) expressão de IL-18. Os dados estão ilustrados por média e desvio padrão, \* $p \leq 0,05$ .

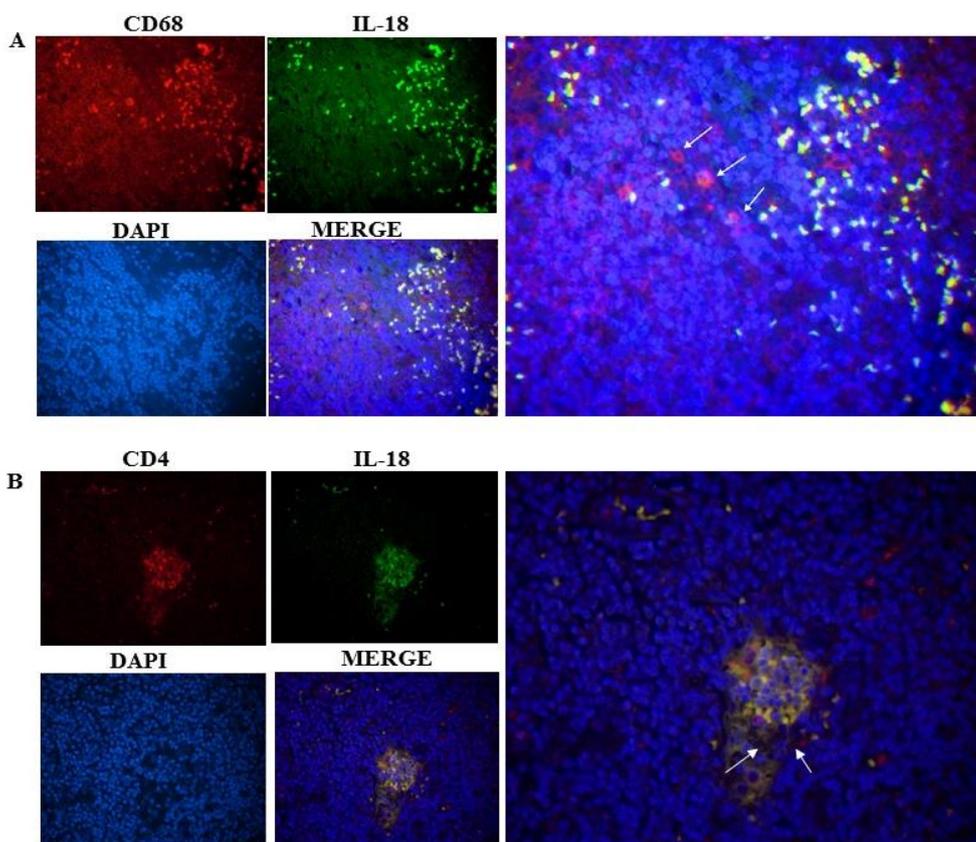


**Figura 2.** Expressão de NLRP1, NLRP3 e AIM2 em linfonodos de pacientes com SS. A expressão de NLRP1, NLRP3 e AIM2 foi avaliada nas biópsias de linfonodos de pacientes com SS nos estágios N1 (n=4, círculo aberto), N2 (n=2, círculo rosa) N3 (n=2, círculo fechado) por imunohistoquímica. Os dados são expressos por média e desvio padrão.

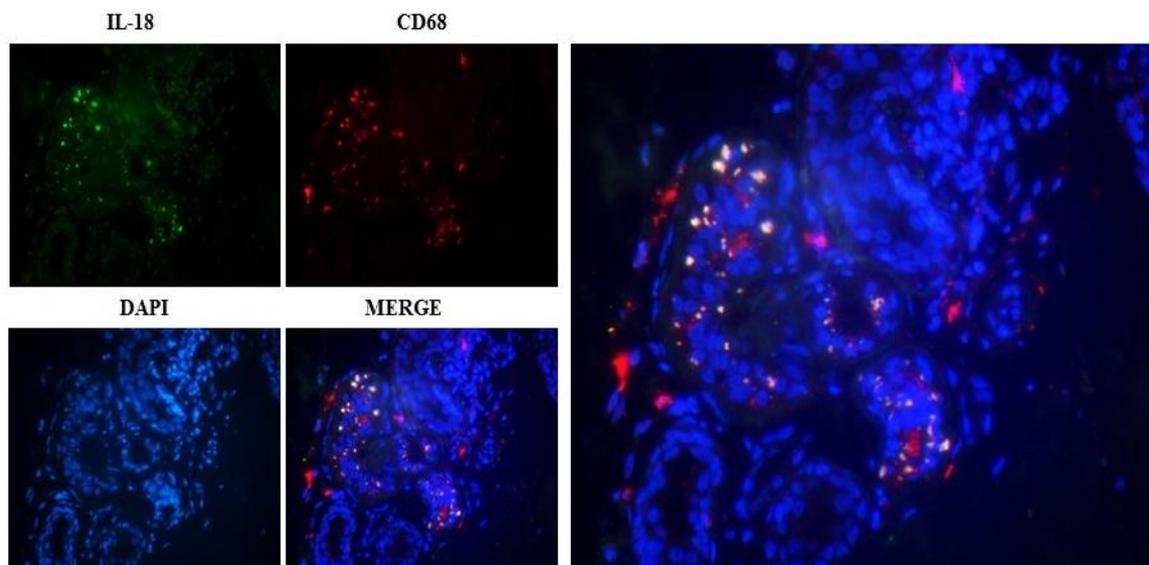
### 4.3 Dupla-marcação de CD68/IL-18 e CD4/IL-18 em linfonodos e pele de SS

A IL-18 é membro da família de citocinas IL-1 e medeia a inflamação via a sinalização dos inflamassomas (70, 71). Em contraste com a IL-1 $\beta$ , pode-se observar aumento da expressão de IL-18 em LN de estágio tumoral (N2/3) (**Figura 1C**). No entanto, não foi possível determinar a fonte de células secretoras de IL-18. Desta forma, para identificar o perfil da célula secretora de IL-18, foi realizado duplas marcações de CD68 ou CD4 com IL-18 por imunofluorescência. Nas análises preliminares já foi observado que a coloração de IL-18 em linfonodos em controle saudável a presença de macrófagos que secretam IL-18 no centro germinativo do folículo linfóide (dados não demonstrados). A **Figura 3A** mostra que em SS a maioria das células positivas para IL-18 são macrófagos (CD68+) e não células T CD4+ (**Figura 3B**).

O mesmo padrão foi encontrado na pele do mesmo paciente SS, em que várias células CD68+ co-localizam com IL-18 (**Figura 4**).



**Figura 3.** Dupla-marcação de CD68/IL-18 e CD4/IL-18 em linfonodos de SS. (A) Painéis de imunofluorescência mostrando CD68 expressando IL-18 e (B) células CD4+ expressando IL-18. As figuras são representativas de amostra de linfonodo de estágio N3. DAPI (azul) foi utilizado para a visualização do núcleo celular. Ampliação original  $\times 20$ .

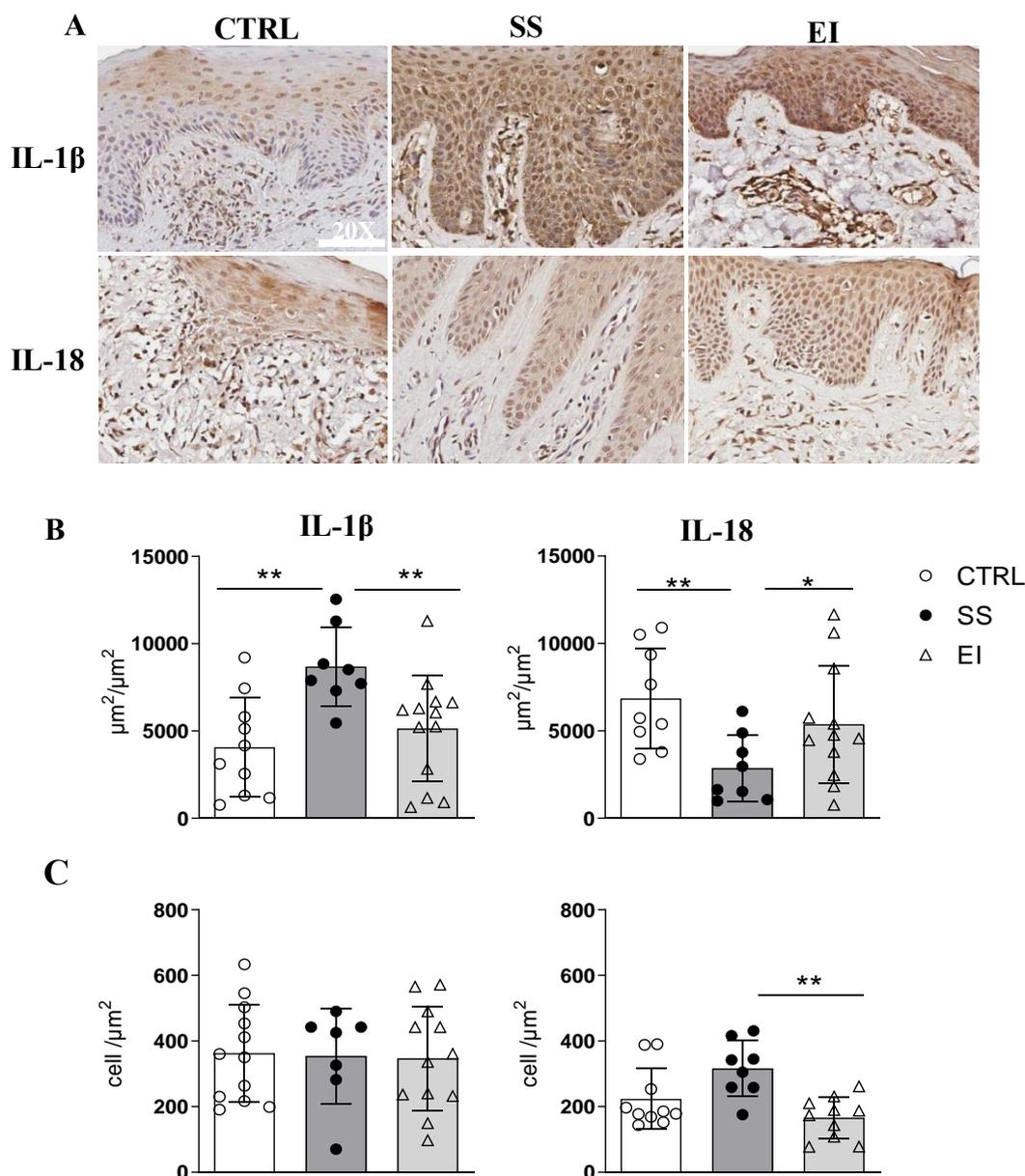


**Figura 4.** Dupla marcação de CD68/IL-18 em pele de paciente SS. Painéis de imunofluorescência mostrando CD68 expressando IL-18. DAPI (azul) foi utilizado para a visualização do núcleo celular. Ampliação original  $\times 20$

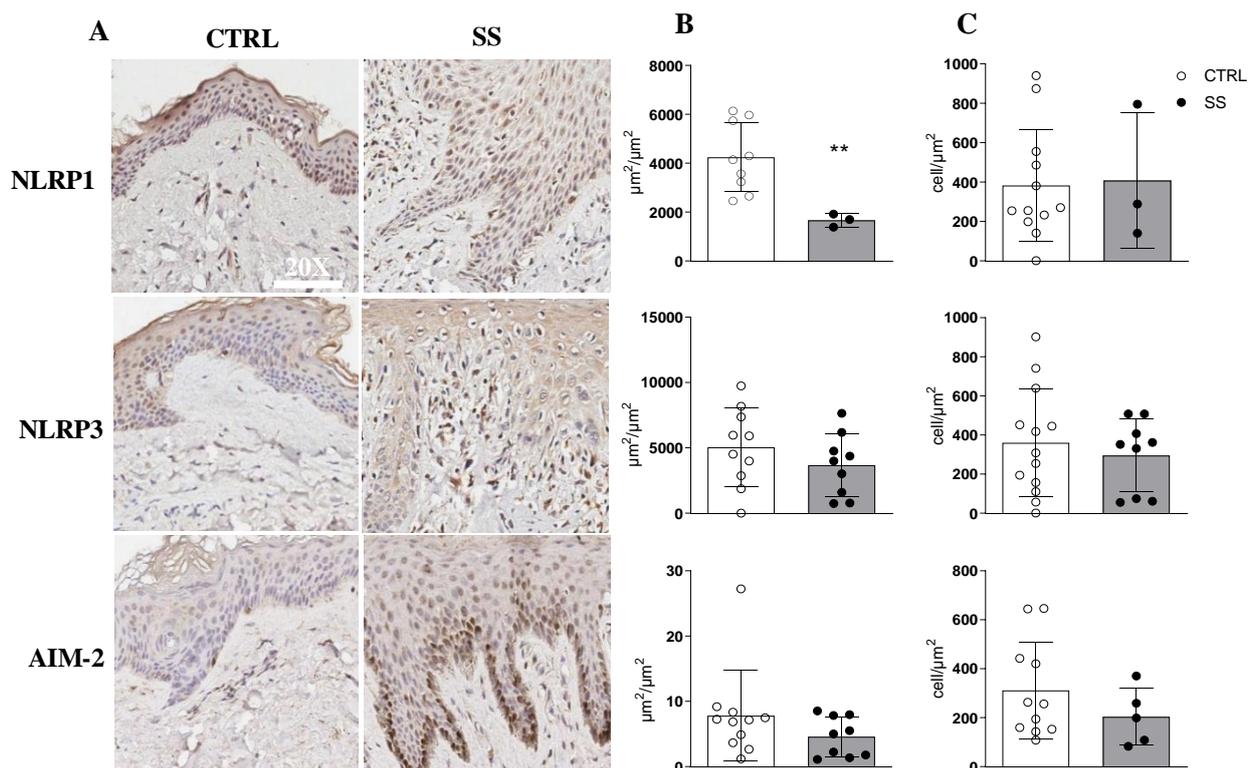
#### 4.4 Aumento de expressão de IL-1 $\beta$ epidérmica e IL-18 dérmica em pele de SS.

Na sequência foi avaliado a expressão de componentes da via de inflamassoma nas camadas epidérmica e dérmica da pele eritrodermica de pacientes com SS. Como controles foram utilizadas amostras de biopsias de pele de pacientes EI e controles saudáveis. A **Figura 5B**, mostra aumento de expressão de IL-1 $\beta$  no grupo SS em comparação com os grupos CTRL e EI, enquanto a IL-18 epidérmica foi diminuída no SS em comparação com os dois grupos controles (**Figura 5B**). Chama atenção que tanto em LN como na pele houve expressão de IL-1 $\beta$  e IL-18 mostram expressão oposta. Já na camada dérmica foi observada uma expressão aumentada de IL-18 em indivíduos SS em comparação ao grupo EI (**Figura 5C**). O perfil de expressão de IL-1 $\beta$  e IL-18 foram similares entre os grupos CTRL e EI. Além disso, observou-se diminuição da expressão de NLRP1 na pele SS em comparação com o grupo CTRL, enquanto a expressão de NLRP3 e AIM-2 foram similares entre os grupos (**Figura 6**).

Os achados mostraram que na SS de acordo com o acometimento linfonodal há inibição da expressão de IL-1 $\beta$ , com regulação positiva da expressão de IL-18 principalmente pelos macrófagos no LN. Na pele, a expressão epidérmica do grupo SS é diferente do grupo EI, mostrando que as alterações podem não ser devido a condição eritrodermica.



**Figura 5.** Aumento de expressão de IL-1 $\beta$  epidérmica e IL-18 dérmica em pele de SS eritrodérmica. A expressão de IL-1 $\beta$  e IL-18 (5A) foi avaliada em biópsias de pele de pacientes com SS (n=7-8, círculo fechado), indivíduos saudáveis (n=9-12, círculo aberto) e eritrodermia idiopática (EI, n=9-12, triângulo aberto) por imuno-histoquímica. As análises foram realizadas separadamente na epiderme (5B) e na derme (5C). Os valores são expressos por média e desvio padrão, \*p<0,05, \*\*p<0,01.

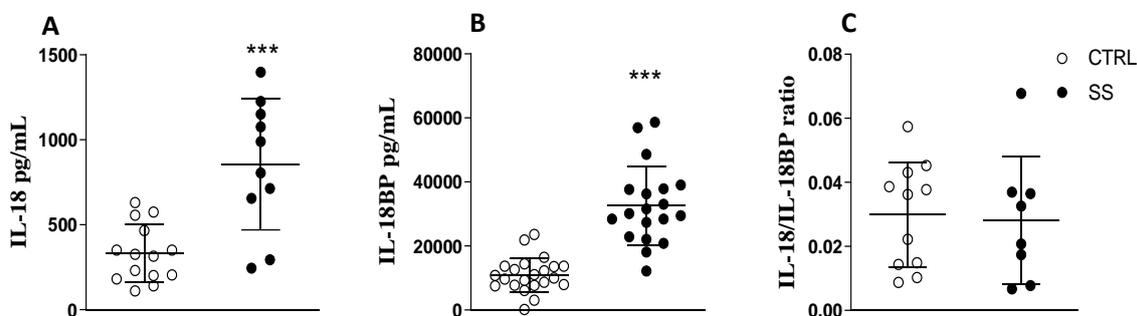


**Figura 6.** Expressão de NLRP1, NLRP3 e AIM2 na pele de pacientes com SS. A expressão de NLRP1, NLRP3 e AIM2 foi avaliada em biópsias de pele de pacientes com SS (A) (n=3-9, círculo fechado), indivíduos saudáveis (n=9-13, círculo aberto) por imuno-histoquímica. As análises foram realizadas na epiderme (B) e na derme (C). Os valores são expressos por média e desvio padrão, \*\* $p \leq 0,01$

#### 4. 5 Níveis séricos de IL-18 e IL-18 BP na síndrome de Sezary

Nesta etapa avaliamos os níveis séricos da proteína IL-18 e IL18 BP (do inglês *binding protein*, BP). A proteína de ligação de IL-18 (IL-18BP) é um inibidor da atividade de IL-18, pois se liga à forma madura desta citocina e bloqueia sua interação com IL-18R (72).

Verificamos que o eixo IL-18/IL-18 BP no soro foi regulado positivamente em pacientes com SS em comparação com indivíduos saudáveis (**Figura 7**). Além disso, a relação IL-18/IL18 BP foi semelhante entre os grupos, e os valores foram inferiores a 0,1, em função da altas quantidade de IL-18BP. Quanto aos níveis séricos de IL-1 $\beta$  observamos previamente que estavam em níveis similares ao grupo CTRL (34).



**Figura 7** Níveis circulantes elevados de proteína de ligação de IL-18 (BP) e IL-18 em pacientes com SS. A determinação sérica de (A) IL-18 (SS, N=18 e CTRL, N=22) e (B) IL-18 BP (SS, N=8 e CTRL N=13) foi avaliada por ELISA. (C) Razão IL18/IL18BP. Os valores são expressos por média e desvio padrão. \*\*\* $p \leq 0,001$ .

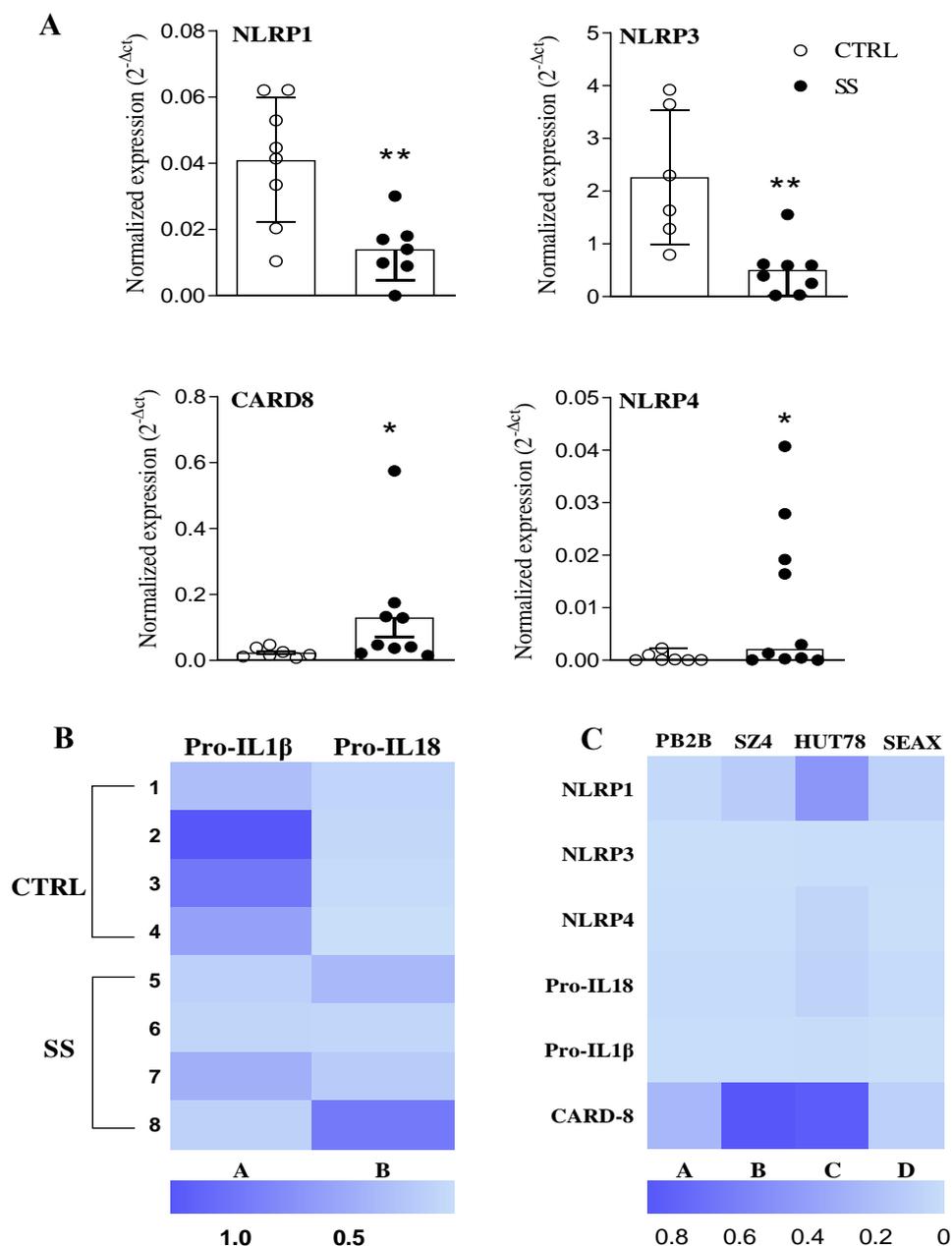
#### 4.6 Perfil do inflamassoma em PBMC e atividade de Caspase-1 em células T CD4+

O perfil de expressão de transcritos de inflamassomas foram avaliados em CMN nos grupos SS e CTRL por RT-qPCR. Conforme a Tabela demográfica 1, a maioria dos pacientes SS mostram aumento numérico de células T CD4 (18/21), o que gera um aumento da razão CD4/CD8  $\geq 10$  (16/21), indicando presença enriquecida de células tumorais no sangue periférico.

Curiosamente, corroborando os achados em LN acometidos, na camada dérmica da pele e no soro de paciente SS, também foi observado aumento dos transcritos de IL-18, acompanhado pela diminuição de IL-1 $\beta$  em PBMC (**Figura 8B**). Além disto, foi observado uma diminuição da expressão de NLRP1, NLRP3 e aumento dos transcritos de CARD8 e NLRP4 em CMN de pacientes com SS em comparação com amostras de CTRL (**Figura 8**)

Considerando a dificuldade de purificar as células de Sezary, devido a heterogeneidade de marcadores de superfície, resolvemos analisar linhagens de células LCCT em estágio avançado, (Hut-78, SZ4, SeAx) e linfoma avançado de pele linfoproliferativo CD30+ (PB2B) para a análise dos transcritos. (73, 74), (75, 76). Observa-se que as células Hut-78 mostram aumento de expressão de NLRP1 e CARD8, e baixa expressão de NLRP4 e IL-18 (**Figura 8C**). As outras linhagens celulares expressam principalmente CARD8.

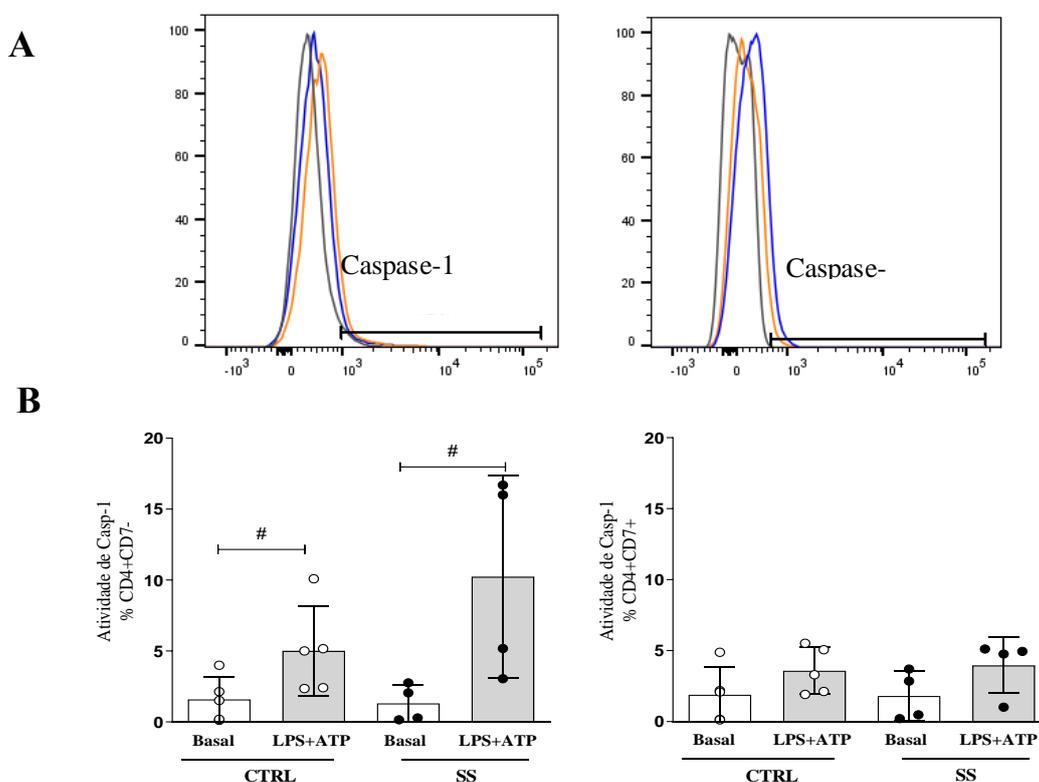
A expressão das PBMCs e das linhagens foi de maneira constitutiva, ou seja, sem estímulo, mostrando uma evidente expressão de CARD8. Esta proteína possui um domínio que recruta caspase (CARD) e está envolvido nas vias ativação de caspase e NF $\kappa$ B, e encontra-se elevado em câncer (77).



**Figura 8.** Perfil de expressão de transcritos do inflamassoma em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com SS e de linhagens celulares de LCCT. A) a expressão de NLRP1, NLRP3, NLRP4, CARD8 e B) pro-IL-18, pro-IL1 $\beta$  foi analisada em PBMC de pacientes com SS (n=4-10, círculo fechado) e controles saudáveis (n=4-8, círculo aberto) por q-PCR. C) As linhagens Hut-78, SZ4, PB2B e SeAx, também foram avaliadas quanto ao perfil de inflamassomas. B) o mapa de calor mostra a expressão dos componentes do inflamassoma analisados em linhagens celulares de LCCT. Os dados são apresentados por média e desvio padrão, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ .

#### 4.7 Células T CD4+ CD7- de pacientes SS possuem elevada atividade de Caspase -1.

A ativação da caspase-1 está envolvida na clivagem de pré-IL-1 $\beta$  e pré-IL-18, tornando-os maduros e também na apoptose. Analisamos células T CD4+ que expressam CD7, considerando que a perda de CD7 no SS é >40%, considerado útil para o diagnóstico da doença. A **Figura 9B** mostra que a atividade da Caspase 1 é observada nas células T CD4+CD7- após ativação de LPS e ATP, em ambos os grupos, em níveis mais elevados em pacientes com SS, sobretudo em dois deles (2/4). Isso significa que alguns pacientes com SS mostram aumento de atividade da caspase 1, ou seja, provavelmente por células de Sezary e que podem ser conduzidas à piroptose. Mais investigações são necessárias para verificar se as células de Sezary podem apresentar ativação funcional da Caspase-1.



**Figura 9.** Células T CD4+ CD7- de pacientes SS possuem elevada atividade de Caspase -1. (A) histograma para atividade de Caspase-1 (FLICA) células T CD4+ CD7- e CD4+ CD7+ em células mononucleares estimuladas por LPS (1  $\mu$ g/mL) mais ATP (1Nm) (linha azul) ou não estimuladas (UNS, linha laranja) e sem coloração (linha preta) de SS (B) (n=4, círculo fechado) e CTRL (n=5, círculo aberto) foi avaliada por citometria de fluxo. Os dados são mostrados por média e desvio padrão, # $p \leq 0,05$ .

#### 4.8 Análise transcriptômica de LN

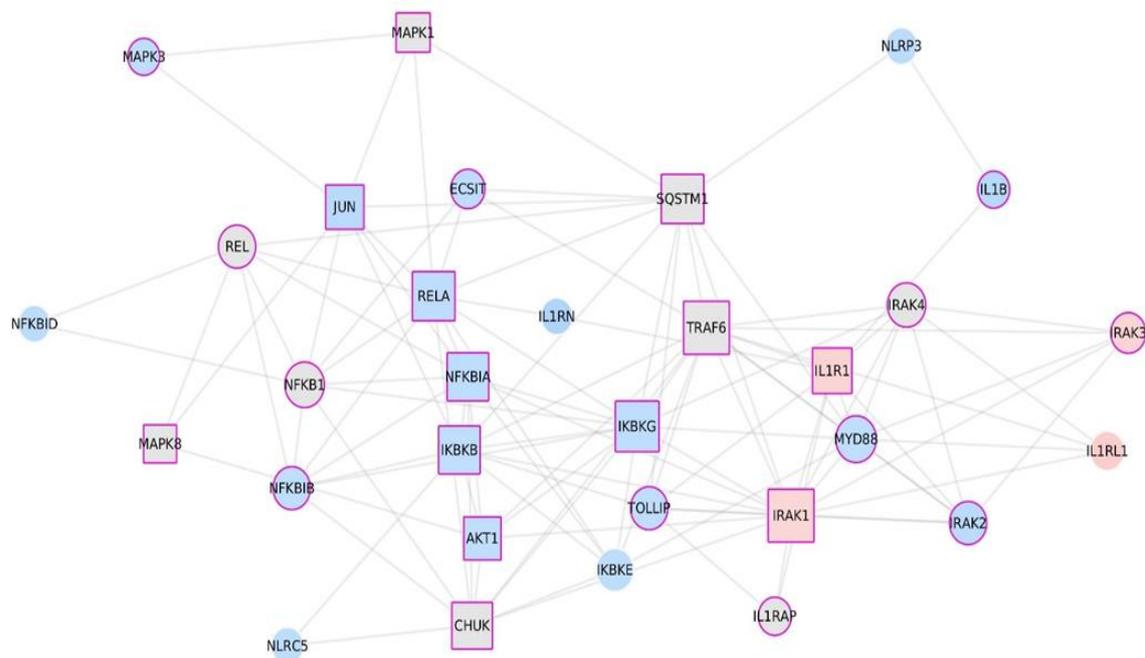
Em conjunto com os dados obtidos, foi possível observar em vários sistemas a existência de uma regulação negativa de componentes dos inflamassomas, como NLRP3 e outros, o que pode refletir na diminuição da produção de IL-1 $\beta$ . Nos LNs, a inibição da expressão de mRNA de IL-1 $\beta$  foi observada nos estágios mais proeminentes de células tumorais.

Para melhor avaliarmos a questão dos genes envolvidos na produção de IL-1 $\beta$ , iniciamos a análise de transcriptômica de LN nos estágios N1 (sem acometimento tumoral), N2 e N3. As análises apesar de preliminares, já apontam inibição de IL-1 $\beta$  como também de NLRP3 (**Figura 10**). Nesta rede pode-se observar que a maioria dos genes estão modulados negativamente (cor azul). Fatores relacionados com a via NF $\kappa$ B, também estão modulados negativamente. Estes dados confirmam as observações proteicas por imunohistoquímica de LN, que mostrou diminuição da expressão de IL-1 $\beta$ .

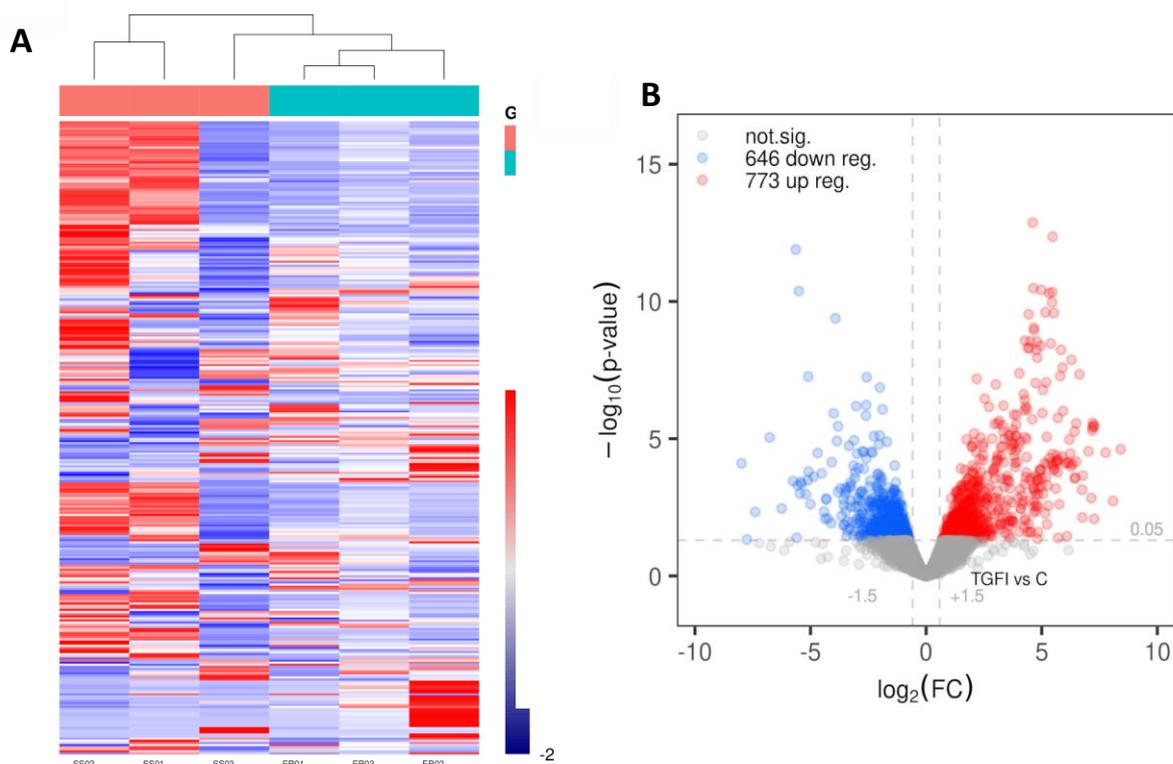
A **Figura 11** mostra o mapa de calor z-score não supervisionado de contagens normalizadas dos 300 genes mais variáveis e expressos. As amostras foram segregadas em seus grupos esperados e apresentam um perfil de expressão semelhante.

A amostra SS03 se comporta como uma amostra de controle e, de fato, corresponde ao estágio N1. A análise diferencial da expressão gênica resultou em 773 genes regulados positivamente e 646 genes regulados negativamente, ambos, nas amostras SS comparadas às amostras EI.

Os dados preliminares sugerem que as alterações estão de acordo com o acometimento do LN com as células tumoral, considerando que as alterações são mais proeminentes nos estágios N2 e N3. Confirma também que há uma ampla modulação negativa de IL-1 $\beta$  nos pacientes Sezary.



**Figura 10.** Rede dos genes das vias de sinalização de IL-1 $\beta$ . Os genes das vias de sinalização de IL-1 $\beta$  têm bordas magenta. Os genes com regulado positivamente no grupo SS em comparação com o grupo EI são coloridos em tons de vermelho e os genes regulados negativamente são coloridos em tons de azul. Os genes quadrados são os que mais interagem com os genes sinalizadores de IL-1 $\beta$ .



**Figura 11.** Análises transcriptômicas de linfonodos de SS e EI. **A)** O grupo EI está colorido em ciano e o grupo SS está em rosa. Tons de vermelho significam expressão acima da média da linha e tons de azul significam expressão abaixo da média. **B)** Gráfico de vulcão de  $-\log_{10}(\text{p-value})$  em função de  $\log_2(\text{FC})$ . Os genes regulados para cima são representados por ciclos vermelhos e os genes regulados para baixo são representados por ciclos azuis. Os ciclos de cinza representam genes alterados não significativos. As linhas verticais tracejadas representam os limites absolutos dos valores de FC de 1,5 e a linha tracejada horizontal representa o nível de significância do valor p de 0,05.

## 5 Discussão

Os linfonodos na síndrome de Sézary são frequentemente reativos, aumentados de volume, denominado de linfadenopatia dermatopática. É caracterizado pela presença de células tumorais e perda da arquitetura nodal, estágio N1, sem presença de célula neoplásica e arquitetura preservada; N2, presença de células neoplásicas sem perda da arquitetura nodal e N3 alteração da arquitetura nodal parcial ou completa)(16).

Nossos resultados mostram maior expressão da proteína IL-18 em linfonodos de estágio N2/N3 de pacientes com SS em comparação com pacientes com eritrodermia idiopática, ou seja sem acometimento nodal. O aumento de IL-18 pode ser devido ao déficit na produção de IFN- $\gamma$ , já bem estabelecido na SS (78), já que a citocina é um potente indutor de IFN- $\gamma$ . Ensaio de imunofluorescência de co-localização com IL-18, sugerem que a célula secretora de IL-18 são majoritariamente macrófagos (CD68+) do que linfócitos T CD4+, tanto na pele quanto nos linfonodos. Entretanto, esses resultados são preliminares devido ao pequeno grupo amostral.

Macrófagos presentes no microambiente tumoral são chamados de macrófagos associados ao tumor (TAM). Foi constatado em diversos cânceres maior frequência de perfil M2, o que favorece a remodelação da matriz, angiogênese e crescimento de células tumorais e inibição da imunidade adaptativa (79). Em pacientes com SS e MF foi visto anteriormente aumento da razão de células CD163/CD68, indicando polarização M2 de acordo com progressão da doença(80), o que nos leva a acreditar que a expressão de macrófagos M2 e o perfil clássico de citocinas Th2 em SS, contribui com o aumento de IL-18. Sabe-se que na ausência de níveis elevados de IL-12, a IL-18 não consegue impulsionar a produção de tipos de IFN- $\gamma$ , pois a IL-12 induz a expressão do receptor de IL-18 (IL-18R) induzindo a produção de IFN- $\gamma$ , a ausência IL-12 e IFN- $\gamma$ , contribui com a resposta inflamatória Th2 no LCCT (51). Assim, nossos resultados sugerem que o aumento de IL-18 observado nos LN pode ser devido macrófagos de perfil M2, entre outras células.

Juntamente com o aumento da expressão de IL-18 em linfonodos, sendo produzidos possivelmente por macrófagos de perfil M2 vimos também uma diminuição da expressão de IL-1 $\beta$  nas amostras de LN de estágio avançado em comparação ao grupo EI. A análise diferencial da expressão gênica não só confirma a menor expressão do transcrito de IL-1 $\beta$  observada nos ensaios anteriores, mas também evidencia vias relacionadas a IL-1 $\beta$ , como parte dos componentes da via de sinalização de NF $\kappa$ B, MyD88, IRAK4 e MAPK8 também estão menos expressos em comparação a LN do grupo EI.

É possível também que o microambiente de replicação das células neoplásicas possa estar contribuindo para esse cenário. Se a maturação ou a secreção de IL-1 $\beta$  e IL-18 é regulada por inflamassomas, é possível também que a inibição de IL-1 $\beta$  pode ser uma evasão tumoral para a piroptose

Apesar da expressão anormal de IL-18 e IL-1 $\beta$  nos LN de estágios N2/N3 de pacientes com SS, os componentes de inflamassoma (NLRP1, NLRP3, AIM-2) encontram-se expressos de maneira similar entre os estágios N1 e N2/N3. Salientamos que, apesar da expressão similar dos componentes de inflamassoma, disfunção das citonas pro-inflamatórias, outro aspecto funcional quanto a ativação de gasdermina e piroptose não foi avaliada.

Sabemos que as células malignas induzem alterações graves não somente em linfonodos, mas também na pele, prejudicando a barreira cutânea. O comprometimento da barreira cutânea pode aumentar a suscetibilidade a infecções bacterianas, como no caso da *Staphylococcus aureus* (SA), que de fato constitui uma importante fonte de morbidade e mortalidade (81). Assim, analisamos a expressão dos componentes do inflamassoma na pele.

Observamos expressão atípica de IL-1 $\beta$  e IL-18 na pele eritrodérmica de pacientes SS na porção dérmica e epidérmica. Na camada epidérmica, identificamos aumento de IL-1 $\beta$  concomitante com diminuição na expressão de IL-18 em comparação com ambos controles, a pele de pacientes eritrodérmicos idiopáticos e de doadores saudáveis. De fato, na análise de imunofluorescência foi observado poucas células positivas IL-18 na epiderme. É importante salientar que os achados das análises de imunofluorescência são preliminares devido ao pequeno grupo amostral (n=1). Quanto a expressão elevada de IL-1 $\beta$ , supomos que possa ter relação com a ativação contínua por antígenos bacterianos presentes na pele dos pacientes com SS, uma vez que, IL-1 $\beta$  desencadeia a produção de outras citocinas inflamatórias, para o local da inflamação e também expressão de moléculas de adesão celular, fosfolipase tipo 2, ciclooxigenase-2, prostaglandina E2 e produção de óxido nítrico (82). A expressão oposta da IL-1 $\beta$  em linfonodo e epiderme, demonstra que essa citocina age de formas diferente em tecidos diferente, em dependência do estímulo.

Na camada epidérmica, foi detectado uma diminuição da expressão de NLRP1, alterações na expressão de NLRP1 são descritas em algumas doenças dermatológicas, como vitiligo (83), lúpus eritematosos sistêmicos (84) e carcinoma palmoplantar múltiplo, incluindo síndromes de suscetibilidade ao câncer (84). Entretanto, essas mutações de maneira geral levam a um aumento de NLRP1, através do bloqueio do efeito auto inibitório do domínio NLRP1 PYD. A diminuição de IL-18, pode estar sendo regulada pela baixa expressão

de NLRP1 em uma tentativa de contrarregulação do aumento da IL-1 $\beta$ , porém mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Observamos que os casos de amostras de pele de eritrodermia idiopática, não tem o mesmo perfil de SS, sugerindo que outros mecanismos inflamatórios estejam envolvidos nesse cenário. Mais investigações são necessárias para entender os fatores causadores da eritrodermia.

Sabe-se que as células tumorais de SS eritrodermicos, migram da pele para a circulação periférica, por isso é importante avaliar a expressão dos componentes do inflamassoma em CMNs. Salientamos que as células de Sézary estão presentes na composição celular das células mononucleares em pacientes SS.

Vale a pena ressaltar que as linhas celulares Sz4 e HUT78 mostraram baixa expressão de IL-1 $\beta$  e uma regulação positiva de IL-18, CARD-8 e NLRP1 em Hut78. A ativação do inflamassoma CARD8 pode desencadear piroptose em células T humanas de condição saudável. A via de piroptose induzida por CARD-8 é engajada em células de repouso, mas não em células T ativadas (85). Não há evidências sobre regulação positiva de CARD8 em células de Sezary. Portanto, mais investigações são necessárias para entender sua relação com ativação de Caspase 1 ou piroptose.

A IL-18 parece estar elevada em diversos compartimentos em pacientes SS, inclusive a nível sérico. Sabe-se que a atividade de IL-18 é balanceada pela presença do ligante IL-18BP, que também foi detectado em grandes quantidades no soro dos pacientes com SS. É possível que os níveis elevados de IL-18BP seja uma tentativa de neutralização de IL-18, com o objetivo de reverter o viés Th2. Foi descrito que os pacientes com LCCT apresentam níveis plasmáticos elevados de IL-18 e caspase-1 independentemente do estágio (86). Os níveis séricos de IL-18BP estão significativamente elevados na sepse e em doenças inflamatórias e alguns tipos de câncer (87, 88).

A menor expressão de IL-1 $\beta$  (de transcrito e proteína) em pacientes com SS pode sugerir uma forma de evitar a hiper ativação pelo inflamassoma. A sinalização do inflamassoma e a secreção celular de IL-1 $\beta$  em sua forma madura são frequentemente acompanhadas de piroptose. Um sistema de detecção de perigo e alerta imunológico, que pode levar à hiperativação pelo inflamassoma. Seu mecanismo de contrarregulação é crucial para evitar a IL-1 $\beta$ , uma vez que é um mediador chave da resposta inflamatória.

Embora nossos achados de análise diferencial da expressão gênica (transcriptoma) tenham demonstrado que células de pacientes SS possuem regulação negativa de fatores relacionados com a via NFκB, outros estudos viram que em linhagens tumorais de LCCT a via de NFκB é constitutivamente ativa e causa resistência a apoptose (89).

De fato, pacientes SS possuem a imunidade prejudicada, com diminuída produção de citocinas Th1, o que facilita a resistência à apoptose, que é uma característica fundamental das células malignas. Várias vias se combinam para induzir essa resistência no LCCT, como expressão BCL2, que promove a sobrevivência celular (90), expressão diminuída de FAS/CD95, que reduz a sensibilidade a apoptose (91), deleção do supressor tumoral TNFAIP3 (92), entre outros fatores, que favorecem o escape tumoral.

Avaliamos a ativação de caspase-1 em células TCD4+CD7- em amostra de CMNs, população considerada células tumorais. A perda de CD7 é utilizada na rotina para a detecção de células de Sézary, e chegamos a 10% de células positivas para caspase, quando tratado com LPS/ATP.

Notamos também em nossos resultados que em condição sem estímulos a atividade de caspase-1 de SS de células TCD4+CD7- é semelhante ao grupo CTRL. Entretanto após ativação via LPS/ATP, a atividade de caspase-1 é aumentada, possivelmente com a participação de receptores NLRP1 e NLRP3, pois são capazes de reconhecer LPS e RNA bacteriano, demonstrando que mesmo em linfócitos T a via de caspase-1 é ativada e funcional. No grupo de pacientes com SS, 2 pacientes expressaram níveis acima de 15% de células positivas para caspase-1, ou seja, possivelmente são células que podem ser conduzidas à piroptose. É possível que a atividade de Caspase-1 em CMNs tenha influência de outras células, para confirmar se a atividade de Caspase-1 reflete somente as células tumorais, seria necessário a purificação de células primárias desses pacientes.

Uma limitação do presente estudo é não validar os achados em PBMC em células tumorais primárias de pacientes com SS. Assim, linhagens tumorais de LCCT foram usadas como representações das células tumorais e confirmam achados evidenciados no LN, como baixa expressão de componentes do inflamassoma, mas elevada expressão de CARD8 .

Nosso trabalho evidencia expressão alterada de IL-1β e IL-18 em CMNs, na pele e em LN de pacientes com SS, é possível que IL-18 tenha contribuição na sustentação do perfil de citocinas Th2. Maiores investigações são necessárias para compreender o papel dessas duas citocinas na imunopatogênese da síndrome de Sézary.

## 6 CONCLUSÕES

Em pacientes Sézary,

- O aumento da expressão de IL-18 nos linfonodos em estágio N2/N3, foi confirmado no transcrito, a nível proteico no soro, e na camada dérmica. A célula produtora de IL-18 foi principalmente o macrófago (CD68), onde pode contribuir com a angiogênese e favorecer o crescimento de células tumorais de perfil Th2.
- É possível que a baixa expressão proteica e transcricional de IL-1 $\beta$ , nos linfonodos e sangue periférico, seja reflexo da regulação negativa das vias NF $\kappa$ B, e isso contribua com a evasão tumoral e piroptose, porém a regulação positiva de IL-1 $\beta$  na camada epidérmica pode estar relacionado com ativação contínua por antígeno bacteriano.
- Os resultados evidenciam importantes alterações na via do inflamassoma que necessitam de mais estudos para melhor ser compreendida e podem sugerir novos alvos terapêuticos para LCCT

## Referências

1. Ansell SM. Hodgkin lymphoma: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2014;89(7):771-9.
2. Bradford PT, Devesa SS, Anderson WF, Toro JR. Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases. *Blood.* 2009;113(21):5064-73.
3. Dummer R, Vermeer MH, Scarisbrick JJ, Kim YH, Stonesifer C, Tensen CP, et al. Cutaneous T cell lymphoma.
4. Willemze R, Cerroni L, Kempf W, Berti E, Facchetti F, Swerdlow SH, et al. The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood.* 2019;133(16):1703-14.
5. Lutzner M, Edelson R, Schein P, Green I, Kirkpatrick C, Ahmed A. Cutaneous T-cell lymphomas: the Sézary syndrome, mycosis fungoides, and related disorders. *Ann Intern Med.* 1975;83(4):534-52.
6. 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.
7. A S. Eritrodermia com presença de células monstruosas na derme e no sangue circulante. In: Y B, editor. *Bulletin de la Société française de dermatologie et de syphiligraphie, Paris.*1938.
8. Main RA, Goodall HB, Swanson WC. Sezary's syndrome. *Br J Dermatol.* 1959;71:335-43.
9. DR. M. Caracterização demográfica, clínica, histopatológica, imunopatológica, molecular, laboratorial e evolutiva de coorte observada no ambulatório de linfomas cutâneos da divisão de clínica dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo entre os anos de 1989 e 2018 In: JA. SJ, editor. 2021.
10. Geller S, Lebowitz E, Pulitzer MP, Horwitz SM, Moskowitz AJ, Dusza S, et al. Outcomes and prognostic factors in African American and black patients with mycosis fungoides/Sézary syndrome: Retrospective analysis of 157 patients from a referral cancer center. *J Am Acad Dermatol.* 2020;83(2):430-9.
11. Quaglino P, Maule M, Prince HM, Porcu P, Horwitz S, Duvic M, et al. Global patterns of care in advanced stage mycosis fungoides/Sezary syndrome: a multicenter retrospective follow-up study from the Cutaneous Lymphoma International Consortium. *Ann Oncol.* 2019;30(3):494.
12. 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.
13. Kubica AW, Davis MD, Weaver AL, Killian JM, Pittelkow MR. Sézary syndrome: a study of 176 patients at Mayo Clinic. *J Am Acad Dermatol.* 2012;67(6):1189-99.
14. Klemke CD, Booken N, Weiss C, Nicolay JP, Goerdts S, Felcht M, et al. Histopathological and immunophenotypical criteria for the diagnosis of Sézary syndrome in differentiation from other erythrodermic skin diseases: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Cutaneous Lymphoma Task Force Study of 97 cases. *Br J Dermatol.* 2015;173(1):93-105.
15. 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.
16. 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.
17. Lamberg SI, Bunn PA, Jr. Cutaneous T-cell lymphomas. Summary of the Mycosis Fungoides Cooperative Group-National Cancer Institute Workshop. *Arch Dermatol.* 1979;115(9):1103-5.
18. Zackheim HS, Amin S, Kashani-Sabet M, McMillan A.

19. Litvinov IV, Shtreis A, Kobayashi K, Glassman S, Tsang M, Woetmann A, et al. Investigating potential exogenous tumor initiating and promoting factors for Cutaneous T-Cell Lymphomas (CTCL), a rare skin malignancy. *Oncoimmunology*. 2016;5(7):e1175799.
20. Clark RA. Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *J Invest Dermatol*. 2010;130(2):362-70.
21. 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.
22. 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.
23. Kallinich T, Mucic 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.
24. Hochheiser K, Bedoui S, Gebhardt T. Multilayered T-cell memory in human skin. *Annals of Translational Medicine*; Vol 3, No 20 (November 2015): *Annals of Translational Medicine*. 2015.
25. Krejsgaard T, Lindahl LM, Mongan NP, Wasik MA, Litvinov IV, Iversen L, et al. Malignant inflammation in cutaneous T-cell lymphoma—a hostile takeover. *Semin Immunopathol*. 2017;39(3):269-82.
26. McGirt LY, Baerenwald DA, Vonderheid EC, Eischen CM. Early changes in miRNA expression are predictive of response to extracorporeal photopheresis in cutaneous T-cell lymphoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(11):2269-71.
27. Yang XP, Ghoreschi K, Steward-Tharp SM, Rodriguez-Canales J, Zhu J, Grainger JR, et al. Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nat Immunol*. 2011;12(3):247-54.
28. Abraham RMQZ, N. Odum and M. A Wasik. *Câncer Bio Ther*.
29. Eriksen KW, Kaltoft K, Mikkelsen G, Nielsen M, Zhang Q, Geisler C, et al. Constitutive STAT3-activation in Sezary syndrome: tyrphostin AG490 inhibits STAT3-activation, interleukin-2 receptor expression and growth of leukemic Sezary cells. *Leukemia*. 2001;15(5):787-93.
30. Brender C, Lovato P, Sommer VH, Woetmann A, Mathiesen AM, Geisler C, et al. Constitutive SOCS-3 expression protects T-cell lymphoma against growth inhibition by IFN $\alpha$ . *Leukemia*. 2005;19(2):209-13.
31. Numasaki M, Lotze MT, Sasaki H. Interleukin-17 augments tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced elaboration of proangiogenic factors from fibroblasts. *Immunol Lett*. 2004;93(1):39-43.
32. Nicolay JP, Felcht M, Schledzewski K, Goerdts S, Géraud C. Sézary syndrome: old enigmas, new targets. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2016;14(3):256-64.
33. Quaglino P, Osella-Abate S, Novelli M, Lisa F, Comessatti A, Bernengo MG. Peripheral blood involvement in a mycosis fungoides patient with limited skin lesions: phenotypical features and homing molecule pattern. *Eur J Dermatol*. 2001;11(6):560-3.
34. Manfrere KCG, Torrealba MP, Miyashiro DR, Oliveira LMS, de Carvalho GC, Lima JF, et al. Toll-like receptor agonists partially restore the production of pro-inflammatory cytokines and type I interferon in Sézary syndrome. *Oncotarget*. 2016. p. 74592-601.
35. Manfrere CK, Torrealba MP, Miyashiro DR, Pereira NZ, Yoshikawa FSY, de MOL, et al. Profile of differentially expressed Toll-like receptor signaling genes in the natural killer cells of patients with Sézary syndrome. *Oncotarget*. 2017;8(54):92183-94.
36. Torrealba MP, Manfrere KC, Miyashiro DR, Lima JF, de MOL, Pereira NZ, et al. Chronic activation profile of circulating CD8+ T cells in Sezary syndrome. *Oncotarget*. 2018;9(3):3497-506.
37. Torrealba MP, Manfrere KCG, Yoshikawa FSY, Pereira NZ, Branco A, Teixeira FME, et al. IFN- $\gamma$  reshapes monocyte responsiveness in Sezary syndrome. *Int J Dermatol*. 2021;60(1):e3-e6.
38. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 454. England 2008. p. 436-44.

39. Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat Immunol.* 13. United States 2012. p. 343-51.
40. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, et al. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem.* 2007;55(5):443-52.
41. Dunn JH, Ellis LZ, Fujita M. Inflammasomes as molecular mediators of inflammation and cancer: potential role in melanoma. *Cancer Lett.* 314. Ireland: Published by Elsevier Ireland Ltd.; 2012. p. 24-33.
42. Henao-Mejia J, Elinav E, Strowig T, Flavell RA. Inflammasomes: far beyond inflammation. *Nat Immunol.* 13. United States 2012. p. 321-4.
43. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 140. United States: 2010 Elsevier Inc; 2010. p. 805-20.
44. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 140. United States: 2010 Elsevier Inc; 2010. p. 821-32.
45. Di Virgilio F. The therapeutic potential of modifying inflammasomes and NOD-like receptors. *Pharmacol Rev.* 65. United States 2013. p. 872-905.
46. Gurung P, Kanneganti TD. Autoinflammatory Skin Disorders: The Inflammasome in Focus. *Trends Mol Med.* 2016;22(7):545-64.
47. Ito H, Kanbe A, Sakai H, Seishima M. Activation of NLRP3 signalling accelerates skin wound healing. *Exp Dermatol.* 2018;27(1):80-6.
48. Rathinam VAK, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling.
49. Perregaux DG, Bhavsar K, Contillo L, Shi J, Gabel CA. Antimicrobial peptides initiate IL-1 beta posttranslational processing: a novel role beyond innate immunity. *J Immunol.* 2002;168(6):3024-32.
50. Konishi H, Tsutsui H, Murakami T, Yumikura-Futatsugi S, Yamanaka K, Tanaka M, et al. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(17):11340-5.
51. 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.
52. Zhao X, Zhang C, Hua M, Wang R, Zhong C, Yu J, et al. NLRP3 inflammasome activation plays a carcinogenic role through effector cytokine IL-18 in lymphoma. *Oncotarget.* 2017;8(65):108571-83.
53. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell.* 157. United States: 2014 Elsevier Inc; 2014. p. 1013-22.
54. Lindahl LM, Willerslev-Olsen A, Gjerdrum LMR, Nielsen PR, Blümel E, Rittig AH, et al. Antibiotics inhibit tumor and disease activity in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology.* 2019;134(13):1072-83.
55. LJ G. Interleukin-13 is overexpressed in cutaneous T-cell lymphoma cells and regulates their proliferation. In: Viragova S SD, Fuschiotti P., editor. 2015.
56. Setrerrahmane S, Xu H. Tumor-related interleukins: old validated targets for new anti-cancer drug development. *Mol Cancer.* 2017;16(1):153.
57. Huanosta-Murillo E, Alcántara-Hernández M, Hernández-Rico B, Victoria-Acosta G, Miranda-Cruz P, Domínguez-Gómez MA, et al. NLRP3 Regulates IL-4 Expression in TOX(+) CD4(+) T Cells of Cutaneous T Cell Lymphoma to Potentially Promote Disease Progression. *Front Immunol.* 2021;12:668369.
58. Niebuhr M, Baumert K, Heratizadeh A, Satzger I, Werfel T. Impaired NLRP3 inflammasome expression and function in atopic dermatitis due to Th2 milieu. *Allergy.* 2014;69(8):1058-67.

59. Baldini C, Santini E, Rossi C, Donati V, Solini A. The P2X7 receptor-NLRP3 inflammasome complex predicts the development of non-Hodgkin's lymphoma in Sjogren's syndrome: a prospective, observational, single-centre study. *J Intern Med*. 2017;282(2):175-86.
60. Jarrousse V, Quereux G, Marques-Briand S, Knol AC, Khammari A, Dreno B. Toll-like receptors 2, 4 and 9 expression in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome). *Eur J Dermatol*. 2006;16(6):636-41.
61. de Koning HD, Bergboer JG, van den Bogaard EH, van Vlijmen-Willems IM, Rodijk-Olthuis D, Simon A, et al. Strong induction of AIM2 expression in human epidermis in acute and chronic inflammatory skin conditions. *Exp Dermatol*. 2012;21(12):961-4.
62. Andrews S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: [bioinformatics.babraham2010](http://bioinformatics.babraham2010).
63. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(10):e108.
64. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014;30(7):923-30.
65. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
66. Xie Z, Bailey A, Kuleshov MV, Clarke DJB, Evangelista JE, Jenkins SL, et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Curr Protoc*. 2021;1(3):e90.
67. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003;13(11):2498-504.
68. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
69. Vonderheid EC, Bernengo MG. The Sezary syndrome: hematologic criteria. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2003;17(6):1367-89, viii.
70. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity*. 2019;50(4):778-95.
71. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519-50.
72. Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev*. 2008;223:20-38.
73. Gazdar AF, Carney DN, Bunn PA, Russell EK, Jaffe ES, Schechter GP, et al. Mitogen requirements for the in vitro propagation of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*. 1980;55(3):409-17.
74. Netchiporouk E, Gantchev J, Tsang M, Thibault P, Watters AK, Hughes JM, et al. Analysis of CTCL cell lines reveals important differences between mycosis fungoides/Sézary syndrome vs. HTLV-1(+) leukemic cell lines. *Oncotarget*. 2017;8(56):95981-98.
75. Kaltoft K, Bisballe S, Rasmussen HF, Thestrup-Pedersen K, Thomsen K, Sterry W. A continuous T-cell line from a patient with Sezary syndrome. *Arch Dermatol Res*. 1987;279(5):293-8.
76. Abrams JT, Lessin S, Ghosh SK, Ju W, Vonderheid EC, Nowell P, et al. A clonal CD4-positive T-cell line established from the blood of a patient with Sézary syndrome. *J Invest Dermatol*. 1991;96(1):31-7.
77. Checinska A, Giaccone G, Hoogeland BS, Ferreira CG, Rodriguez JA, Kruyt FA. TUCAN/CARDINAL/CARD8 and apoptosis resistance in non-small cell lung cancer cells. *BMC Cancer*. 2006;6:166.
78. Yamanaka K, Clark R, Dowgiert R, Hurwitz D, Shibata M, Rich BE, et al. Expression of interleukin-18 and caspase-1 in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2006;12(2):376-82.
79. Ohmatsu H, Humme D, Gonzalez J, Gulati N, Möbs M, Sterry W, et al. IL-32 induces indoleamine 2,3-dioxygenase(+)CD1c(+) dendritic cells and indoleamine 2,3-

dioxygenase(+)CD163(+) macrophages: Relevance to mycosis fungoides progression. *Oncoimmunology*. 2017;6(2):e1181237.

80. El-Guindy DM, Elgarhy LH, Elkholy RA, Ali DA, Helal DS. Potential role of tumor-associated macrophages and CD163/CD68 ratio in mycosis fungoides and Sézary syndrome in correlation with serum sCD163 and CCL22. *J Cutan Pathol*. 2022;49(3):261-73.

81. Tokura Y, Heald PW, Yan SL, Edelson RL. Stimulation of cutaneous T-cell lymphoma cells with superantigenic staphylococcal toxins. *J Invest Dermatol*. 1992;98(1):33-7.

82. Cerroni L. Mycosis fungoides-clinical and histopathologic features, differential diagnosis, and treatment. *Semin Cutan Med Surg*. 2018;37(1):2-10.

83. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*. 2007;130(6):1071-82.

84. Zhong FL, Mamai O, Sborgi L, Boussofara L, Hopkins R, Robinson K, et al. Germline NLRP1 Mutations Cause Skin Inflammatory and Cancer Susceptibility Syndromes via Inflammasome Activation. *Cell*. 167. United States: 2016 Elsevier Inc; 2016. p. 187-202 e17.

85. Linder A, Hornung V. Inflammasomes in T cells. *J Mol Biol*. 2022;434(4):167275.

86. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*. 19. United States2001. p. 423-74.

87. Novick D, Schwartzburd B, Pinkus R, Suissa D, Belzer I, Stoege Z, et al. A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18. *Cytokine*. 2001;14(6):334-42.

88. Mazodier K, Marin V, Novick D, Farnarier C, Robitail S, Schleinitz N, et al. Severe imbalance of IL-18/IL-18BP in patients with secondary hemophagocytic syndrome. *Blood*. 2005;106(10):3483-9.

89. Giri DK, Aggarwal BB. Constitutive activation of NF-kappaB causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT-78 cells. Autocrine role of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem*. 1998;273(22):14008-14.

90. 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.

91. 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.

92. Braun FC, Grabarczyk P, Möbs M, Braun FK, Eberle J, Beyer M, et al. Tumor suppressor TNFAIP3 (A20) is frequently deleted in Sézary syndrome. *Leukemia*. 25. England2011. p. 1494-501.

## Anexos

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

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

---

##### **DADOS DA PESQUISA**

#### **TÍTULO DO PROTOCOLO DA PESQUISA: “ Avaliação do inflamassoma na Síndrome de Sèzary”**

- 1. Pesquisador principal:** Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Maria Notomi Sato  
**Laboratório:** LIM56 Departamento De Dermatologia  
Convidamos o (a) Sr. Para participar desta pesquisa;
- 2. DESENHO DO ESTUDO E OBJETIVOS:** O presente estudo tem como objetivo investigar e entender melhor o desenvolvimento da síndrome de Sèzary, com a proposta final de estudar como potencializar a defesa do organismo no combate ao câncer. Essas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntaria no presente estudo.
- 3. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS:** com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: serão realizados exames laboratoriais, não rotineiros, para estudar os fatores de defesa das células malignas presentes no sangue. Será realizada coleta 30 mL (dez colheres de sopa) de sangue, por punção periférica da veia do antebraço. As amostras serão enviadas para o laboratório para serem analisadas. 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.
- 4. EXPLICITAÇÃO DE POSSÍVEIS DESCONFORTOS E RISCOS DECORRENTES DA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA:** 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 controles saudáveis será realizada a biopsia 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 biopsia, pode ocorrer uma pequena cicatriz. Em pacientes com Sèzary que estiverem com o diagnóstico confirmado serão realizados a punção do linfonodo para saber o grau de gravidade da doença ( estadiamento) esse exame será realizado apenas em pacientes que estiverem internado no hospital das clínicas, parte desse material será separado para a pesquisa com a finalidade de identificar a expressão de alguns marcadores que podem ou não contribuir para a evolução da doença.

5. **BENEFÍCIOS ESPERADOS 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. **ACOMPANHAMENTO E ASSISTENCIA AOS PARTICIPANTES DA PESQUISA:** Os pacientes continuarão a ser acompanhados como sempre no ambulatório da 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 penalização alguma de sigilo ou privacidade.
7. **GARANTIA DE LIBERDADE DA RETIRADA:** de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
8. **DIREITO DE CONFIDENCIALIDADE:** As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;
9. **DIREITO DE SER MANTIDO ATUALIZADO:** sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
10. **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.
11. **COMPROMISSO DO PESQUISADOR:** de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa;

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: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: [cap-pesq.adm@hc.fm.usp.br](mailto:cap-pesq.adm@hc.fm.usp.br)

Você, participante, deverá receber uma via do termo de consentimento livre e esclarecido.

---

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Caracterização proteômica de exossomas na Síndrome de Sézary”

Eu discuti com os pesquisadores sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do participante /representantelegal

-----  
Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Assinatura do responsável pelo estudo

-----  
Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE 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 (.....)..



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP ESQUISA

**Título da Pesquisa:** Caracterização proteômica de exossomas na Síndrome de Sézary

**Pesquisador:** Maria Notomi

**Sato Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 65115317.7.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.624.527

#### **Apresentação do Projeto:**

Os pesquisadores vão estudar o perfil proteômico de exossomas séricos de pacientes com Síndrome de Sézary sem tratamento e ainda vão avaliar as citocinas que podem interferir ou regular o perfil supressor das células malignas. O projeto apresenta grande importância na área médica e não apresenta riscos para o sujeito da pesquisa.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Os pesquisadores vão avaliar no presente projeto o perfil proteômico e molecular, com ênfase em citocinas supressoras e fatores relacionados a eritrodermia e metaloproteínas, em exossomas circulantes de pacientes com síndrome de Sézary. Os objetivos do estudo estão bem definidos e apresentam relevância científica e faz parte da linha de pesquisa do grupo.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O protocolo proposto não apresenta riscos para o sujeito da pesquisa.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A caracterização das proteínas nesta Síndrome é de grande importância na especialidade médica.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE está adequado para o desenvolvimento do estudo.

#### **Recomendações:**

Recomendamos sua aprovação.

<b>Endereço:</b> Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar		
<b>Bairro:</b> Cerqueira Cesar	<b>CEP:</b> 05.403-010	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> SAO PAULO	
<b>Telefone:</b> (11)2661-7585	<b>Fax:</b> (11)2661-7585	<b>E-mail:</b> cappesq.adm@hc.fm.usp.br



### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

**Aprovado.**

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_863222.pdf	28/02/2018 13:40:20		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	01/02/2018 14:12:03	Maria Notomi Sato	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa.pdf	30/01/2018 18:44:16	Maria Notomi Sato	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	30/01/2018 18:28:49	Maria Notomi Sato	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	22/07/2017 21:20:52	Maria Notomi Sato	Aceito
Outros	Registro_online_16214.pdf	23/02/2017 11:01:52	Maria Notomi Sato	Aceito

**Situação do Parecer:**

**Aprovado**

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 26 de Abril de 2018

---

**Assinado por:**  
**ALFREDO JOSE MANSUR**