

**U. PORTO**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO



**“Linfomas cutâneos de células T: papel das células  
NK e T circulantes na defesa anti-tumoral”**

Ana Bernadete Cerqueira Aguiar

Dissertação de Mestrado em Oncologia

2009

Ana Bernadete Cerqueira Aguiar

**“Linfomas cutâneos de células T: papel das células NK e dos linfócitos T circulantes na defesa anti-tumoral”**

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Oncologia submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Prof.<sup>a</sup> Doutora Margarida Maria de Carvalho Lima

Categoria – Assistente Hospitalar Graduada de Imunohemoterapia, Professora Auxiliar Convidada.

Afiliação – Centro Hospitalar do Porto, Unidade Hospital de Santo António, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Co-orientador – Dr<sup>a</sup> Maria Luís Queirós

Categoria – Assessora do Ramo Laboratorial.

Afiliação – Centro Hospitalar do Porto, Unidade Hospital de Santo António.

“Se o consegues sonhar, consegues fazê-lo”

Walt Disney (1901-1966)

## Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>iii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>iv</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Resumé</b> .....	<b>vi</b>
<b>Índice de Quadros e Tabelas</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Símbolos</b> .....	<b>ix</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Linfomas T cutâneos</b> .....	<b>2</b>
1.1 Epidemiologia .....	2
1.2 Etiopatogenia .....	3
1.3 Sistemas de classificação.....	4
<b>2. Mucose Fungóide e Síndrome de Sezary</b> .....	<b>5</b>
2.1 Diagnóstico.....	6
2.2 Estadiamento.....	7
2.3 Prognóstico.....	7
2.4 Tratamento .....	8
<b>3. Resposta anti-tumoral</b> .....	<b>9</b>
3.1 Antígenos tumorais e reconhecimento imunológico .....	10
3.2 Mecanismos imunológicos efectores .....	11
3.3 Mecanismos de escape ao sistema imune .....	12
<b>4. Células envolvidas na resposta anti-tumoral</b> .....	<b>13</b>
4.1 Macrófagos e monócitos.....	13
4.2 Células NK.....	13
4.3 Linfócitos T .....	16
<b>Objectivos</b> .....	<b>19</b>
Objectivo Geral.....	20
Objectivos Específicos .....	20
<b>Material e Métodos</b> .....	<b>21</b>
<b>Questões éticas</b> .....	<b>22</b>
<b>Doentes e controlos</b> .....	<b>22</b>
<b>Produtos biológicos</b> .....	<b>22</b>
<b>Estudos fenotípicos</b> .....	<b>23</b>
Quantificação e caracterização fenotípica dos LT e das CNK .....	23

Material.....	23
Métodos.....	24
<b>Estudos funcionais .....</b>	<b>26</b>
Avaliação da produção de citocinas pelos LT .....	26
Material.....	26
Métodos.....	27
<b>Análise Estatística .....</b>	<b>29</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>30</b>
<b>Caracterização do grupo de controlos .....</b>	<b>31</b>
<b>Caracterização do grupo de doentes .....</b>	<b>31</b>
<b>Avaliação dos parâmetros hematológicos.....</b>	<b>31</b>
<b>Quantificação dos LT, LB e CNK .....</b>	<b>32</b>
<b>Quantificação das subpopulações de LT e de CNK .....</b>	<b>33</b>
<b>Imunofenotipagem das CNK .....</b>	<b>34</b>
<b>Imunofenotipagem dos LT .....</b>	<b>35</b>
<b>Avaliação da produção de citocinas pelos LT activados in vitro .....</b>	<b>37</b>
<b>Discussão .....</b>	<b>39</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>46</b>

## Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Margarida Lima, pela ideia deste projecto, pela oportunidade de o poder realizar e pelo seu apoio e incentivo. Muito Obrigada!

À Dr. Maria Luís Queirós, co-orientadora, pela ajuda prestada na parte laboratorial. Sem si seria muito mais complicado realizar todos os procedimentos.

A todos os elementos do Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia, o meu obrigada pela disponibilidade e simpatia com que sempre me receberam.

À Enfermeira Graça, pela amizade e ajuda na recolha das amostras dos doadores.

Ao Professor Doutor Carlos Lopes queria aqui deixar o meu apreço e admiração como responsável pelo Mestrado de Oncologia. Gostaria também de agradecer à D. Céu, todos os esclarecimentos prestados.

Aos meus Pais por tudo aquilo que sou! E por estarem sempre presentes!

Ao Luís pelo teu apoio constante e por acreditares, e me fazeres acreditar, em mim e no meu trabalho. Quando eu preciso, tu estás sempre aí!

Às minha amigas pela nossa grande amizade.

## Resumo

O cancro é uma doença complexa caracterizada por um crescimento descontrolado de células próprias do organismo. O sistema imune tem a capacidade de identificar estas células e desenvolver mecanismos de forma a eliminá-las.

Na tentativa de melhorar o conhecimento sobre como o sistema imune reage perante a presença de células neoplásicas, têm sido realizados inúmeros estudos, envolvendo diferentes tipos de tumores.

Os linfomas cutâneos de células T (LCCT), grupo de patologias malignas caracterizado pela proliferação de linfócitos T (LT) na pele, têm sido alvo destes estudos. Contudo, embora alguns demonstrem que as células imunológicas intervêm ao longo da evolução da doença, outros são ainda tema de alguma controvérsia.

Desta forma, realizou-se este trabalho tendo como objectivo principal avaliar a resposta anti-tumoral das células NK (CNK) e dos LT circulantes nos LCCT.

A nível laboratorial, recorrendo ao uso da citometria de fluxo, caracterizou-se imunofenotipicamente os LT e as CNK circulantes de um grupo de doentes com LCCT e de um grupo controlo. Avaliou-se também em ambos os grupos a capacidade de os LT desenvolverem uma resposta Th1, através da medição da expressão intracelular do factor de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) nestas células.

Os resultados obtidos não demonstraram alterações significativas a nível do fenótipo das CNK e dos LT. O TNF- $\alpha$  foi expresso em maior quantidade nos LT CD8<sup>+</sup> dos doentes (62,8 vs 36,4 p<0.05).

Ao contrário do esperado, de uma forma geral, este estudo não conseguiu provar a existência, por parte das células imunes circulantes, de uma resposta anti-tumoral efectiva. Tal facto, pode ser explicado devido à reduzida dimensão da nossa amostra, e aos doentes contemplados no estudo se encontrarem em estadios iniciais de LCCT.

Estudos futuros semelhantes, apresentando um maior número de doentes, e em fases mais avançadas da doença seriam importantes para confirmarem as nossas conclusões.

## **Abstract**

Cancer is a complex disease characterized by an uncontrollable growth of cells in the organism. The immune system has the ability of identifying these cells and develops mechanisms to eliminate them.

In order to better understand how the immune system reacts in the presence of malignant cells, a variety of studies have been performed with different types of tumors.

Cutaneous T- cell lymphomas (CTCL), group of malignant pathologies characterized by T lymphocytes (TL) proliferation in skin, have been the target of these studies. Although some have shown that immunological cells intervene during this disease's evolution, others are still somewhat controversial.

The main objective of this study is to evaluate the anti-tumoral response of the natural killer cells (NKC) and the TL circulating cells in the CTCL.

TL and NKC circulating cells of a group of patients with CTCL and a control group were characterized according to their immunophenotype in the laboratory by flow cytometry. In both groups the ability of Lt developing a Th1 response was also evaluated, by measuring the intracellular tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) expression of these cells.

The results obtained did not indicate significant alterations relatively to the NKC and TL phenotypes. The TNF-  $\alpha$  was greatly expressed in the TL CD8 of patients (62,8 vs 36.4  $p < 0.05$ ).

Contrarily to what was expected, overall, this study was not able to prove the presence of an anti-tumoral response of the immune circulating cells. This however is probably due to the reduced amount of samples used, as well as the early stage of CTCL in these patients.

Future similar studies with a greater amount of patients as well as a more advanced phase of the disease are important in order to confirm our conclusions.

## Résumé

Le cancer est une maladie complexe caractérisée par une croissance incontrôlée de cellules propres de l'organisme. Le système immunitaire a la capacité d'identifier ces cellules et développer des mécanismes de façon à les éliminer.

Dans la tentative d'améliorer la connaissance sur comme le système immunitaire réagit devant la présence de cellules cancéreuses, a été réalisé d'innombrables études, en impliquant différents types de tumeurs.

Les lymphomes cutanés à cellules T (LCCT), groupe de pathologies malignes caractérisé pour la prolifération de lymphocytes T (LT) dans la peau, ont été l'objet de ces études. Néanmoins, bien que quelques-uns démontrent qu'aux cellules immunologiques intervient au long de l'évolution de la maladie, autres sont encore objet de quelque controverse.

De cette forme, s'est réalisé ce travail en ayant comme objectif principal évaluer la réponse anti-tumoral des cellules NK (CNK) et des LT circulants dans les LCCT.

En laboratoire, en faisant appel à l'utilisation de la cytométrie en flux, s'est caractérisé l'immunophénotypique des LT et des CNK circulantes d'un groupe de malades avec LCCT et d'un groupe témoin. S'est évaluée aussi dans les deux les groupes, la capacité de LT développer une réponse Th1, à travers de la mesure de l'expression intracellulaire du TNF- $\alpha$  dans ces cellules.

Les résultats obtenus n'ont pas démontré de modifications significatives à niveau de la phénotype de CNK et de LT. Le TNF- $\alpha$  nous a été exprimé en plus grande quantité LT CD8+ des malades (62,8 contre 36,4  $p < 0,05$ ).

Au contraire de toute attente, d'une forme générale, cette étude n'a pas prouvé l'existence, de la part des cellules immunisées circulantes, d'une réponse anti-tumoral. Tel fait, peut être expliqué par la dimension réduite de notre échantillon, et que les malades concernés soient dans une phase initiale de LCCT.

Des études futures concernant un plus grand nombre de malades, et en phase plus avancée de la maladie, seraient importantes pour confirmer nos conclusions.

## Índice de Quadros e Tabelas

<b>Quadro 1.</b> Classificação WHO/EORTC dos linfomas cutâneos com manifestações cutâneas primárias .....	<b>5</b>
<b>Quadro 2.</b> Classificação TNM para os linfomas cutâneos de células T .....	<b>7</b>
<b>Quadro 3.</b> Estadiamento dos linfomas cutâneos de células T .....	<b>8</b>
<b>Tabela 1.</b> Especificidades, clones, fluorocromos e fornecedores dos anticorpos monoclonais utilizados no estudo imunofenotípico dos linfócitos.....	<b>23</b>
<b>Tabela 2.</b> Combinações de anticorpos monoclonais utilizadas para quantificação das populações linfocitárias e caracterização fenotípica das CNK e dos LT.....	<b>24</b>
<b>Tabela 3.</b> Especificidades, clones, fluorocromos e fornecedores dos anticorpos monoclonais utilizados no estudo funcional dos LT. ....	<b>26</b>
<b>Tabela 4.</b> Combinações de anticorpos monoclonais utilizadas para quantificação da produção de citocinas pelos LT .....	<b>27</b>
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros hematológicos dos doentes com LCCT e dos controlos. ....	<b>31</b>
<b>Tabela 6.</b> Populações dos LT, LB e CNK do sangue periférico dos doentes com LCCT e dos controlos.....	<b>32</b>
<b>Tabela 7.</b> Subpopulações dos LT e das CNK do sangue periférico dos doentes com LCCT e dos controlos. ....	<b>33</b>
<b>Tabela 8.</b> Características imunofenotípicas das CNK CD56 <sup>+</sup> do sangue periférico dos doentes com LCCT e dos controlos.....	<b>35</b>
<b>Tabela 9.</b> Características Imunofenotípicas das CNK CD56 <sup>++</sup> do sangue periférico dos doentes com LCCT e dos controlos.....	<b>35</b>
<b>Tabela 10.</b> Subpopulações de LT que migram para a pele e reguladores do sangue periférico de doentes com LCCT e dos controlos.....	<b>36</b>
<b>Tabela 11.</b> Subpopulações de LT activados e citotóxicas do sangue periférico dos doentes com LCCT e dos controlos.....	<b>37</b>
<b>Tabela 12.</b> Expressão de TNF $\alpha$ nos LT dos doentes com LCCT e dos controlos.. ..	<b>37</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Histograma biparamétrico, tipo “dot plot”, obtido por citometria de fluxo exemplificando a expressão de CD16+56 e CD3 nos linfócitos de sangue periférico. . . . .	<b>32</b>
<b>Figura 2</b> – Histogramas biparamétricos, tipo “dot plot”, obtidos por citometria de fluxo exemplificando as subpopulações de LT e de CNK. . . . .	<b>33</b>
<b>Figura 3</b> – Histogramas biparamétricos, tipo “dot plot”, obtidos por citometria de fluxo exemplificando a expressão dos vários antígenos nas CNK. . . . .	<b>34</b>
<b>Figura 4</b> – Histogramas biparamétricos, tipo “dot plot”, obtidos por citometria de fluxo exemplificando as subpopulações dos LT CCR4 <sup>+</sup> e LT reguladores. . . . .	<b>36</b>
<b>Figura 5</b> – Histogramas biparamétricos, tipo “dot plot”, obtidos por citometria de fluxo exemplificando as subpopulações dos LT activados e citotóxicos. . . . .	<b>36</b>
<b>Figura 6</b> – Histogramas biparamétricos, tipo “dot plot”, obtidos por citometria de fluxo exemplificando os LT (CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) produtores de TNF- $\alpha$ , antes e após a estimulação. . . . .	<b>38</b>

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

<b>ADCC</b>	<b>Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity</b> Citotoxicidade mediada por anticorpos
<b>AMP</b>	<b>Adenosine MonoPhosphate</b> Adenosina Monofosfato
<b>CD</b>	<b>Cluster or Differentiation</b> “Cluster” de diferenciação
<b>cDNA</b>	<b>Complementary DeoxyriboNucleic Acid</b> Ácido desoxirribonucleico complementar
<b>CHP</b>	<b>Centro Hospitalar do Porto</b>
<b>CLA</b>	<b>Cutaneous Lymphocyte Antigen</b> Antigénio dos linfócitos cutâneos
<b>CMLC</b>	<b>Consulta Multidisciplinar de Linfomas Cutâneos</b>
<b>CNK</b>	<b>Células Natural Killer</b>
<b>CTLA</b>	<b>Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen</b> Antigénio associado aos linfócitos T citotóxicos
<b>EBV</b>	<b>Epstein-Barr Virus</b> Vírus Epstein Barr
<b>EORTC</b>	<b>European Organization for Research and Treatment of Cancer</b> Organização europeia para o diagnóstico e tratamento do cancro
<b>FAS</b>	<b>Fatty Acid Synthase</b> Sintetase dos ácidos gordos
<b>GM-CSF</b>	<b>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</b> Factor estimulador dos granulócitos e macrófagos
<b>hMLH1</b>	<b>MutL Homolog 1</b>
<b>HPV</b>	<b>Human Papiloma Virus</b> Papiloma vírus humano
<b>HTLV</b>	<b>Human T Lymphotropic Virus</b> Vírus linfotrópico T humano
<b>IgG</b>	<b>Imunoglobulina G</b>
<b>IL</b>	<b>InterLeukin</b> Interleucina
<b>IFN</b>	<b>InterFeroN</b> Interferão
<b>ISCL</b>	<b>International Society of Cutaneous Lymphoma</b> Sociedade Internacional de Linfomas Cutâneos
<b>JUNB</b>	<b>JUN B</b> proto-oncogene Proto-oncogene JunB

<b>KIR</b>	<b>Killer Ig-like Receptor</b> Receptores de morte celular da família das imunoglobulinas
<b>LAK</b>	<b>Lymphokine Activated Killer</b> Célula citotóxica activada por citocinas
<b>LB</b>	<b>Linfócitos B</b>
<b>LCCT</b>	<b>Linfomas Cutâneos de Células T</b>
<b>LFA-1</b>	<b>Lymphocyte Function-associated Antigen-1</b> Antigénio associado à função dos linfócitos T
<b>LGL</b>	<b>Large Granular Lymphocytes</b> Linfócitos grandes granulares
<b>LT</b>	<b>Linfócitos T</b>
<b>MF</b>	<b>Micose Fungóide</b>
<b>MHC</b>	<b>Major Histocompatibility Complex</b> Complexo maior de histocompatibilidade
<b>MIF</b>	<b>Machophage Migration Inhibitory Factor</b> Factor inibidor da migração dos macrófagos
<b>PUVA</b>	<b>Psoralenos e UltraVioleta tipo A</b> Tratamento com psoralenos e radiações ultravioleta tipo A
<b>RAG</b>	<b>Recombinase Activating Gene</b> Gene activador da recombinase
<b>STAT1</b>	<b>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</b> Transdutor de sinal e activador da transcrição tipo 1
<b>SS</b>	<b>Síndrome de Sezary</b>
<b>TIL</b>	<b>Tumor-Infiltrating Lymphocytes</b> Linfócitos infiltrantes do tumor
<b>TCR</b>	<b>T-Cell Receptor</b> Receptor da célula T
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	<b>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math>1</b> Factor transformador de crescimento tumoral beta1
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></b> Factor de necrose tumoral alfa
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	<b>Tumor Necrosis Factor-<math>\beta</math></b> Factor de necrose tumoral beta
<b>TNM</b>	<b>Tumor-Node-Metastasis</b> Tumor-Gânglios-Metástases
<b>UV</b>	<b>Ultra Violeta</b>
<b>WHO</b>	<b>World Health Organization</b> Organização mundial de Saúde

## **INTRODUÇÃO**

## Introdução

### 1. Linfomas T cutâneos

Os Linfomas cutâneos de células T (LCCT) são um grupo heterogêneo de neoplasias da pele com origem nos linfócitos T (LT) e apresentam uma grande variedade de características clínicas, histológicas e imunofenotípicas. Representam entre 75 a 80% de todos os linfomas cutâneos primários. Caracterizam-se pela acumulação de LT clonais no microambiente cutâneo, que são responsáveis por muitos fenómenos imunopatológicos.

Durante muito tempo, a Micosse Fungóide (MF) e o Síndrome de Sézary (SS) foram os únicos tipos conhecidos de LCCT. Actualmente, fazem parte deste grupo cerca de trinta patologias diferentes, que embora partilhem o envolvimento da pele, possuem grandes diferenças a nível de manifestações clínicas, prognóstico e resposta ao tratamento (Massone, Chott e col. 2004; Paulli and Berti 2004; Rosen and Querfeld 2006).

#### 1.1 Epidemiologia

Os LCCT são considerados doenças neoplásicas raras.

Têm sido realizados vários estudos para calcular a incidência e a prevalência dos linfomas cutâneos, contudo a falta de uniformização de critérios de diagnóstico e as dificuldades de classificação, tornam as comparações difíceis (Burg and Kempf 2005).

De acordo com os dados de um programa epidemiológico desenvolvido nos EUA, desde 1973 até 1984, a incidência aumentou significativamente, sendo em 1984 de 0,4 casos por 100.000 habitantes. Entre 1984 e 1992 não houve evidência do aumento das taxas de incidência (Koh, Charif e col. 1995; Weinstock 1994; Willenze 2003).

De acordo com uma análise realizada recentemente nos EUA, a incidência ajustada à idade, desde 1973 até 2002 foi de 6,4 casos/ano por milhão de habitantes. Esta incidência tem vindo a aumentar ao longo das últimas três décadas, o que pode ser resultado de um melhor diagnóstico (Criscione and Weinstock 2007).

A doença é cerca de 2 vezes mais comum nos homens do que nas mulheres e a população negra tem o dobro da probabilidade de a desenvolver em relação à população caucasiana (Morales, Llopis e col. 2000).

A incidência dos LCCT aumenta com a idade, da mesma forma que se verifica nos linfomas em geral. A idade média de apresentação é de aproximadamente 50 anos, tendo a maioria dos doentes idades entre os 40 e 60 anos (Kim, Liu e col. 2003). Contudo também estão descritos casos em doentes jovens (Crowley, Nikko e col. 1998).

## 1.2 Etiopatogenia

As causas que levam ao aparecimento de LCCT estão ainda longe de serem bem compreendidas. Muitos investigadores acreditam que a génese destes linfomas representa um processo complexo e multifactorial onde determinantes genéticos, ambientais, infecciosos e imunológicos podem intervir (Burg, Kempf e col. 2005).

O facto de existirem casos dentro da mesma família levou a suspeitar que alterações genéticas poderiam estar envolvidas na génese dos LCCT e durante as últimas décadas, muitos estudos foram realizados (Baykal, Buyukbabani e col. 2002). Contudo, comparando com outras neoplasias, a informação obtida é insuficiente e ainda não foi encontrado um padrão consistente. Factores como a variedade fenotípica da doença, a dificuldade em obter quantidades substanciais de células tumorais de biópsias de pele, e a ausência ou raridade de células tumorais no sangue periférico, contribuem para a pouca informação obtida.

A análise citogenética demonstrou anomalias tanto a nível numérico como a nível estrutural (Karenko, Hahtola e col. 2007; Sterry 2007).

Estudos utilizando hibridização genómica comparativa demonstraram perdas cromossomais nas regiões 1p, 10q, 17q e 19.

Scarbrick e col. demonstraram que 22% dos pacientes estudados com LCCT tinham instabilidade de microsátélites e apresentavam o promotor do gene hMLH1 hipermetilado (Scarbrick, Mitchell e col. 2003).

Outro estudo identificou regiões mínimas de deleção no cromossoma 10, numa alta proporção de casos de MF e SS, o que levou a suspeitar que esta zona contenha genes críticos para a patogénese dos LCCT (Mao, Lillington e col. 2002).

Em vários doentes com LCCT, foi observada a inactivação dos genes P15 e P16, por hipermetilação e/ou perda alélica no braço curto do cromossoma 9, bem como do gene P53, devido a mutações. Foram também encontradas, embora mais raramente, mutações no gene Fas (Whittaker 2006).

Ensaio com cDNA demonstraram uma sobreexpressão da T-plastina, do factor de transcrição oncogénica Twist e do receptor de tirosinas quinases EphA4 (van Doorn, Dijkman e col. 2004)

Por último, foram também verificadas alterações nas vias de sinalização dos LT: 71% dos pacientes com MF e SS apresentavam amplificação genómica do gene JUNB, que é responsável por regular a proliferação celular, a diferenciação e a transformação (Mao, Orchard e col. 2003).

Alguns investigadores tentaram relacionar o desenvolvimento de LCCT com a exposição a metais, pesticidas e solventes orgânicos, uma vez que as pessoas que

trabalhavam na construção e indústria têxtil pareciam apresentar um risco aumentado de os desenvolver. Contudo dois grandes estudos caso-controlado realizados não conseguiram provar a existência de uma relação entre a exposição ocupacional a químicos e o desenvolvimento de MF (Tuyp, Burgoyne e col. 1987; Whittemore, Holly e col. 1989).

Numerosos estudos têm investigado o envolvimento de vírus, particularmente o vírus linfotrópico T humano (HTLV) e o vírus Epstein Barr (EBV), na gênese dos LCCT (Wood, Salvekar e col. 1996; Chang, Liu e col. 1998)

Pancake e col. encontraram nos linfócitos de indivíduos com LCCT a sequência Tax do HTLV-1 (Pancake, Wassef e col. 1996). Outros estudos revelaram que embora numa minoria de doentes se tenha detectado sequências do gene HTLV, a maioria dos casos de LCCT são negativos para anticorpos dirigidos a proteínas estruturais do vírus, sugerindo que este não seja um agente etiológico primário (Whittaker and Luzzatto 1993; Li, Vowels e col. 1996; Kikuchi, Nishikawa e col.1997; Zucker-Franklin 2001).

### **1.3 Sistemas de classificação**

Ao longo de várias décadas, foram feitas algumas tentativas para tentar estabelecer uma classificação dos linfomas cutâneos que conseguisse o acordo de dermatologistas e hemato-oncologistas (Prince, O’Keefe e col. 2002; Willemze and Meijer 2006).

Com o aumento do número de estudos, e com o avanço do conhecimento destes linfomas a vários níveis, após muitos esforços para adoptar aos LCCT as classificações dos linfomas sistémicos, concluiu-se finalmente que os linfomas cutâneos deveriam ter um sistema de classificação diferente, por apresentarem comportamentos clínicos e prognósticos muito específicos. Surgiram assim duas classificações, da organização mundial de saúde (WHO) e da organização europeia para o diagnóstico e tratamento do cancro (EORTC), que apresentavam algumas diferenças entre si, e originaram várias discussões (Willenze, Kerl e col. 1997; Jaffe, Harris e col. 2001). De forma a uniformizar ao máximo a linguagem entre especialistas, em 2005 e após vários encontros, a WHO e a EORTC esforçaram-se para criar um consenso e uma única classificação para as doenças linfoproliferativas cutâneas, surgindo assim a classificação WHO/EORTC (Willenze, Jaffe e col. 2005) (Quadro 1).

**Quadro 1.** Classificação WHO/EORTC dos linfomas cutâneos com manifestações cutâneas primárias

<b>Linfomas cutâneos das células T e NK</b>
Micose Fungóide
Variantes e subtipos da Micose Fungóide
▪ Micose fungóide foliculotrópica
▪ Reticuloide pagetóide
▪ Pele laxa granulomatosa
Síndrome de Sezary
Linfoma/leucemia de células T do adulto
Doenças Linfoproliferativas cutâneas primárias CD30+
▪ Linfoma cutâneo primário células grandes anaplasticas
▪ Papulose linfomatóide
Linfoma subcutâneo de células T semelhante a paniculite
Linfoma extranodal de células T/NK, tipo nasal
Linfoma cutâneo primário de células T periféricas, não especificado
Linfoma cutâneo primário de células T CD8+ epidermotrópico agressivo (provisório)
Linfoma cutâneo de células T $\gamma/\delta$ (provisório)
Linfoma cutâneo primário de células T CD4+ pleomórficas tamanho pequeno /médio (provisório)
<b>Linfomas cutâneos das Células B</b>
Linfoma cutâneo primário de células B da zona marginal
Linfoma cutâneo primário de células B do centro folicular
Linfoma cutâneo primário de células B grandes difuso, tipo perna
Linfoma cutâneo primário de células B grandes difuso, outro
Linfoma intravascular de células B grandes
Neoplasia de células hematológicas precursoras
Neoplasia hematodérmica CD4+/CD56+ (linfoma blástico de células NK)

## **2. Micose Fungóide e Síndrome de Sezary**

A MF é o tipo mais comum de LCCT, compreendendo cerca de 50% de todos os linfomas cutâneos primários.

Apresenta geralmente um curso clínico indolente com uma progressão lenta durante anos, por vezes décadas, desde manchas a placas mais infiltrativas e tumores. Em alguns casos, nos estadios mais avançados, a disseminação da doença pode afectar os gânglios linfáticos e os órgãos viscerais, como o fígado e o baço. Muitos doentes apresentam história de lesões na pele, normalmente dermatoses não específicas.

Em muitos casos, observa-se uma progressão: inicialmente manchas limitadas, seguidas de manchas mais generalizadas, placas, tumores e envolvimento visceral. As manchas características são ligeiramente eritematosas, e aparecem normalmente nas zonas protegidas do sol, nas extremidades e no tronco. As placas são mais infiltradas, com margens bem definidas, e por vezes apresentam descamação. Podem aparecer em zonas com manchas que depois evoluem para placas, ou em zonas inicialmente não afectadas. As lesões tumorais tendem a ser mais tardias, e estão associadas a manchas ou placas prévias. Podem localizar-se em qualquer parte do corpo, e apresentam frequentemente ulceração (Kazakov, Burg e col. 2005; Hwang, Janik e col. 2008)

O SS é um LCCT que se apresenta com aspectos clínicos distintos como eritrodermia generalizada, hiperqueratose palmo-plantar, linfadenopatias, e presença de LT neoplásicos no sangue periférico com características morfológicas típicas. É um linfoma raro, que corresponde a menos de 5% de todos os LCCT (Kempf, Kazakow e col. 2005).

## **2.1 Diagnóstico**

O diagnóstico de MF é normalmente feito pela presença das manifestações clínicas características da doença, após exame histológico da pele afectada.

A observação ao microscópio de secções de pele coradas com hematoxilina-eosina continua a ser o “golden standard” do diagnóstico. Contudo, em estadios muito iniciais esta observação pode não ser muito útil, uma vez que outras dermatoses inflamatórias crónicas apresentam histologia da pele muito semelhante. Assim, em muitos casos é necessário recorrer a testes laboratoriais adicionais como o estudo imunohistoquímico, a imunofenotipagem por citometria de fluxo, e a análise do rearranjo dos genes que codificam para o receptor da célula T (TCR) por técnicas moleculares (Kazakow, Burg e col. 2005).

O diagnóstico do SS é baseado na combinação de manifestações clínicas e na detecção de células tumorais no sangue periférico. Neste caso, o exame histológico da pele apresenta muitas vezes aspectos não específicos e é apenas de valor diagnóstico em casos onde as características típicas de epidermotropismo estão presentes.

Devido a estas dificuldades, a Sociedade Internacional de Linfomas Cutâneos (ISCL) estabeleceu critérios para o diagnóstico do SS para que este fosse feito de uma forma mais rigorosa e objectiva. Assim, perante a suspeita clínica, para se efectuar o diagnóstico do SS, pelo menos um dos seguintes critérios tem de estar presente: número de células de Sézary circulantes de pelo menos 1000/mm<sup>3</sup>, anomalias imunofenóticas nos LT com razão CD4:CD8 igual ou superior a 10, perda de um ou mais antigénios dos LT circulantes (CD2, CD3, CD4 e/ou CD5) e demonstração de um clone de LT no sangue

periférico recorrendo ao uso de técnicas de biologia molecular ou citogenética (Olsen 2007).

## 2.2 Estadiamento

Vários sistemas de estadiamento foram propostos para a MF ao longo do tempo. O sistema mais simples e mais frequentemente utilizado, baseia-se no sistema tumor-gânglios-metástases (TNM) (Bunn and Lamberg 1979) (Quadros 2 e 3). Este combina aspectos clínicos e histopatológicos, e actualmente, depois de sofrer várias revisões, inclui também o facto de existirem ou não células atípicas no sangue.

## 2.3 Prognóstico

O prognóstico da doença é definido pelo estadiamento: doentes com estadios precoces têm um prognóstico excelente, com sobrevida igual a um indivíduo saudável da mesma idade, sexo e raça. Com o avanço do estadio e da idade (acima dos 60 anos), o prognóstico vai piorando. Quando ocorre envolvimento extracutâneo, a sobrevida média é normalmente inferior a um ano (Keehn, Belongie e col. 2007)

**Quadro 2.** Classificação TNM para os linfomas cutâneos de células T

Classificação		Descrição
Pele		
T	T0	Lesões clínicas ou histopatológicas sugestivas de LCCT
	T1	Placas limitadas, pápulas ou manchas eritematosas em menos de 10% da
	T2	Placas, pápulas ou manchas eritematosas em mais de 10% da superfície da
	T3	Tumor cutâneo
	T4	Erodermia generalizada
Gânglios		
N	N0	Adenopatias não palpáveis, estudo anatomo-patológico negativo
	N1	Adenopatias palpáveis, estudo anatomo-patológico negativo
	N2	Adenopatias não palpáveis, estudo anatomo-patológico positivo
	N3	Adenopatias palpáveis, estudo anatomo-patológico positivo
Órgãos Viscerais		
M	M0	Sem envolvimento dos órgãos viscerais
	M1	Com envolvimento dos órgãos viscerais, patologia presente
Sangue		
B	B0	Ausência de células atípicas em circulação (<5%)
	B1	Presença de células atípicas em circulação (≥5%)
	B2	

**Quadro 3.** Estadiamento dos linfomas cutâneos de células T

<b>Estadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
IA	1	0	0
IB	2	0	0
IIA	1-2	1	0
IIB	3	0-1	0
III	4	0-1	0
IVA	1-4	2-3	0
IVB	1-4	0-3	1

Kim e col. demonstraram que 2% dos pacientes que apresentavam lesões localizadas morreram após 32 anos de evolução, e que apenas 9% mostraram progressão da MF (Kim, Chow e col. 1999).

De acordo com vários estudos, a sobrevida em 10 anos é de 97% para doentes com lesões não infiltradas ou placas localizadas (< 10% da superfície cutânea), 83% para doentes com lesões generalizadas ( $\geq 10\%$  da superfície cutânea), 42% para doentes com tumores e 20% para doentes com infiltração ganglionar (van Doorn, Van Haselen e col. 2000; Vergier, de Muret e col. 2000; Zackheim, Amin e col. 1999).

## 2.4 Tratamento

Uma vez que a MF e o SS são raramente curáveis, o objectivo principal do tratamento é controlar a doença, com o mínimo de efeitos colaterais.

Nos estadios iniciais utilizam-se frequentemente tratamentos tópicos, como os corticoesteróides e retinóides sintéticos (bexaroteno). Em alguns doentes, quando este tratamento não resulta, recorre-se ao uso de terapias baseadas na luz ultravioleta: fototerapia com radiações ultravioleta B (UVB), ou A (UVA), em associação com psoralenos (PUVA) ou irradiação local (Kim, Hess e col., 2005; Dummer, Cozzio e col., 2006; Trautinger, Knobler e col. 2006).

Quando a doença começa a avançar são introduzidos agentes sistémicos como as citocinas (interferão alfa) por via subcutânea e retinóides sintéticos (bexaroteno) por via oral, e em alguns casos, recorre-se à fotoférese extracorporeal (Hymes 2007; Geskin 2007).

Nos últimos anos têm surgindo novas terapêuticas com agentes biológicos, como os inibidores da deacetilase das histonas e os inibidores de fosforilase dos nucleosídeos da purina ou os anticorpos monoclonais (Dummer 2006; Duvic and Foss 2007; Horwitz 2008).

### 3. Resposta anti-tumoral

O cancro é uma doença celular complexa induzida por alterações multifactoriais da informação genética da célula. Estas alterações levam a que as células proliferem desreguladamente ou escapem à apoptose. Ao longo de todo este processo, ocorre perda e ganho de material genético (processo denominado por instabilidade genética), o que conseqüentemente leva ao surgimento de novas proteínas (Lynch and Houghton 1993).

O sistema imune tem como principal função proteger o nosso organismo de agentes estranhos, potencialmente nocivos, que ele não reconheça como “próprio”, e por isso ele ataca e elimina bactérias, vírus e também células neoplásicas.

Em 1909, Paul Ehrlich, postulou que o cancro poderia ocorrer numa frequência muito maior se não fossem os mecanismos de defesa do hospedeiro (Ehrlich 1909). Mais tarde, já na década de 50, Lewis Thomas e Macfarlane Burnett propuseram a teoria da imunovigilância tumoral, que afirmava que o sistema imune tinha a capacidade de vigiar constantemente o organismo e de identificar células tumorais, desenvolvendo respostas efectoras conducentes à sua eliminação (Thomas 1959; Burnett 1970). Deste modo, segundo este conceito, as células tumorais eram antigenicamente distintas das células “próprias”, e no microambiente tumoral existiam condições que permitiam o desenvolvimento de uma resposta imune. Esta teoria foi bastante revolucionária e deu origem a uma nova era de ensaios clínicos focados na resposta imunológica do hospedeiro contra a célula tumoral, muitos dos quais demonstraram resultados promissores.

Vários estudos foram realizados em ratinhos deficientes em genes essenciais para a imunidade (inata e adquirida), como RAG, STAT1, interferão gama (IFN- $\gamma$ ), perforina entre outros, e demonstraram existir um aumento significativo da incidência e do espectro tumoral (Kaplan, Shankarem e col. 1998; Engle, Hoying e col. 1999; Smyth, Thia e col 2000; Street, Trapani e col. 2002; Trapani and Smyth 2002). Outras equipas utilizaram ratinhos com inactivação de células imunes, como as células NK (CNK) ou os LT, e os resultados foram semelhantes, reforçando a ideia de que realmente o sistema imune parecia estar envolvido na defesa contra o cancro (Gallimore and Godkin 2008).

Também nos humanos, vários investigadores tem fornecido evidências que suportam o conceito de vigilância anti-tumoral. Em doentes transplantados a fazer terapêutica imunossupressora verificou-se um aumento da incidência de certas neoplasias. Da mesma maneira, indivíduos com imunodeficiências primárias e secundárias apresentaram um risco aumentado de desenvolver cancro (Phann, Kormos e col. 1995; Pen 1996; Pen 1999). É de salientar que em todos estes casos se observaram formas raras de tumores e não ocorreu simplesmente um aumento da predisposição para

as neoplasias mais frequentemente encontradas. Muitas equipas de investigação, utilizando biópsias de vários tipos de tumores humanos concluíram que existiam infiltrados de células imunes no tumor, nomeadamente linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) (Aaltomaa, Lipponen e col. 1992; Naito, Saito e col. 1998; Haanen, Baars e col. 2006; Smyth, Dunn e col. 2006; Swann and Smyth 2007). Em 2003, Zhang e col. publicaram um estudo onde observaram que pacientes com cancro do ovário com TIL possuíam uma sobrevida maior aos cinco anos e um prognóstico melhor após cirurgia, comparativamente com os pacientes com cancro do ovário que não apresentavam TIL (Zhang, Conejo-Garcia e col. 2003). Deste modo concluíram que no cancro do ovário existia uma interacção clara entre o sistema imune e o tumor, e que este facto se correlacionava com um melhor prognóstico, tal como já se tinha observado noutras neoplasias como o cancro da mama, o carcinoma hepatocelular e linfomas, entre outras.

Contudo, o papel do sistema imune no controlo do desenvolvimento e crescimento do cancro ainda não está totalmente conhecido, e ao longo dos anos tem sido tema de investigação e alguma controvérsia.

### **3.1 Antígenos tumorais e reconhecimento imunológico**

A transformação maligna é acompanhada de várias alterações a nível do genótipo e fenótipo da célula, que originam a perda de alguns componentes e o ganho ou a sobre-expressão de outros. Os novos componentes produzidos pelas células tumorais podem ser reconhecidos pelo sistema imune como estranhos e, nesse caso, denominam-se antígenos tumorais (Gilboa 1999).

Desta forma, a eficácia do sistema imune em eliminar as células neoplásicas está dependente das alterações destas células serem reconhecidas e suficientes para desencadear uma resposta eficaz.

Muitas células neoplásicas produzem antígenos que podem ser libertados na corrente sanguínea ou permanecer na superfície celular. Várias equipas de investigação identificaram antígenos em linfomas de Burkitt, neuroblastomas, osteosarcomas, carcinoma da mama e do pulmão, cancro da próstata e do cólon.

Inicialmente os antígenos tumorais foram classificados em duas categorias tendo por base o seu padrão de expressão: antígenos específicos do tumor, quando estavam presentes apenas nas células tumorais e antígenos associados ao tumor, quando estavam presentes no tumor de forma aberrante ou descontrolada, mas também em células normais (Houghton 1994).

Com o desenvolvimento dos estudos, esta classificação mostrou-se imperfeita, uma vez que muitos antígenos que se pensavam ser específicos do tumor não o eram. Surgiu assim uma nova classificação baseada na origem e estrutura molecular dos

antigénios tumorais, que engloba várias categorias: produtos de oncogenes e genes supressores tumorais mutados, produtos de outros genes mutados, proteínas celulares sub-expressas ou aberrantemente expressas, antigénios tumorais produzidos por vírus oncogénicos, antigénios oncofetais, glicoproteínas e glicolípidos da superfície celular alterados (Van der Eyende and Boon 1997; Rosenberg 1999; Graziano and Finn 2005).

A alfa-fetoproteína e o antigénio carcinoembrionário são dois exemplos de antigénios oncofetais. Estas proteínas são produzidas nos estados de desenvolvimento embrionário e depois desaparecem quando o sistema imune está completamente desenvolvido. Os níveis séricos de antigénio carcino-embriónico estão geralmente elevados nos adenocarcinomas do tubo digestivo e as determinações periódicas deste antigénio são úteis para monitorizar a eficácia da terapia anti-tumoral e para detectar a recidiva do tumor. A alfa-fetoproteína está elevada na maioria dos doentes com carcinoma hepatocelular e com carcinomas dos testículos e ovários (Sahin, Tureci e col. 1997)

As células infectadas por oncovírus, como o EBV ou o papiloma vírus humano (HPV), também podem produzir proteínas anormais, uma vez que o seu DNA contém material genético vírico.

### **3.2 Mecanismos imunológicos efectores**

O reconhecimento pelo sistema imune de células tumorais desencadeia uma resposta imunológica que pode ser dividida em dois grandes grupos, inata e adquirida, estando estas intimamente relacionadas (Naftzger and Houghton 1991; Houghton and Guevara-Patino 2004; Rubin 2009).

A resposta inata ou natural, como o próprio nome indica, é responsável pela destruição directa das substâncias estranhas, sem ser necessário o desencadeamento de processos complexos de reconhecimento, proliferação e diferenciação de células imunes. É considerada a primeira linha de defesa e é activada na luta contra tumores, mas também em infecções víricas e na rejeição de transplantes. É desenvolvida principalmente pelos granulócitos, monócitos/macrófagos e pelas CNK. Embora seja independente da imunidade adaptativa, esta resposta é regulada por produtos deste sistema, como por exemplo o IFN- $\gamma$  e outras citocinas (Davies 2008).

A resposta adaptativa requer inicialmente o reconhecimento de um antigénio, que pode ser tumoral, o que vai desencadear uma série de processos celulares, mediados essencialmente pelos LT.

A activação dos LT condiciona a sua diferenciação em células com funções imunomoduladoras, indutoras ou supressoras da resposta imune, assim como em LT citotóxicos (LTc), fundamentalmente de tipo CD8. Os LTc CD8+ reconhecem antigénios

tumorais em associação com moléculas da classe I do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) (Klaus 2001).

O sistema imune apresenta também uma componente humoral constituída por uma variedade de moléculas que são também importantes na resposta anti-tumoral (Honeyman and Harrison 2004; Moser and Willmann 2004).

A interleucina 2 (IL2) é essencial para a divisão dos LT e a diferenciação dos linfócitos B (LB) em plasmócitos. Também é importante na amplificação das CNK e na geração de células citotóxicas activadas, capazes de destruir células de vários tipos de tumor.

O Factor de Inibição da Migração dos Macrófagos (MIF) liga-se a receptores na membrana dos macrófagos e aumenta o nível de AMP cíclico intracelular, resultando no aumento da polimerização de microtúbulos e diminuição da migração, conseguindo deste modo reter os macrófagos junto do tumor.

Os interferões são citocinas conhecidas pelas suas propriedades anti-víricas e imunomoduladoras, aumentam a citotoxicidade das CNK, assim como induzem a expressão de moléculas MHC classe I e II nas células adjacentes. O IFN $\gamma$ , inicialmente conhecido como Factor de Activação dos Macrófagos, activa estas células e aumenta a sua actividade tumoricida.

Os factores quimiotáxicos recrutam células fagocíticas para local do tumor e os factores mitogénios incluem moléculas com funções semelhantes às descritas para a IL-2.

### **3.3 Mecanismos de escape ao sistema imune**

Embora o sistema imune tenha a capacidade de identificar as células tumorais e desenvolva respostas para as tentar eliminar (e prova disso são os vários estudos que foram referidos anteriormente), o cancro é uma doença cada vez mais incidente na população em geral, o que leva a suspeitar que as células malignas conseguem escapar à acção controladora da imunidade, desenvolvendo para isso os chamados mecanismos de escape (Finn 2008).

Foram realizados numerosos estudos que demonstraram que estes mecanismos podem estar relacionados com a localização do tumor, com as características e apresentação dos antigénios e com a supressão, de variadas formas, do sistema imune (Kiessling, Wasserman e col. 1999; Algarra, Garcia-Lora e col. 2004; Mapara and Sykes 2004; Rivoltini, Canese e col. 2005; Seliger 2005).

A localização anatómica do tumor pode ser, por si só, um mecanismo de escape, uma vez que pode ser inacessível ou de acesso difícil à resposta anti-tumoral, ou até ser um local onde vários factores imunossupressores estão presentes.

Por outro lado, as células tumorais podem ter a capacidade de produzir factores supressores da resposta imune, como o factor transformador de crescimento tumoral (TGF- $\beta$ 1) que inibe a proliferação dos LT e regula a sua apoptose (Tada, Ohzeki e col. 1991; Teicher 2007).

Alguns antigénios tumorais, como os oncofetais, podem não ser suficientemente imunogénicos para gerarem uma resposta anti-tumoral. Por outro lado, existem casos em que ocorre uma apresentação do antigénio inadequada uma vez que o tumor provoca alterações na expressão das moléculas do complexo MHC classe I. Outros antigénios da superfície celular podem estar mascarados por um excesso de mucina, açúcares e ácido siálico, impedindo o reconhecimento pelo sistema imune. Todos estes factores podem condicionar o não reconhecimento dos antigénios tumorais por parte das células do sistema imune.

#### **4. Células envolvidas na resposta anti-tumoral**

Os macrófagos, as CNK e os LT, como já foi referido, são intervenientes-chave na imunidade tumoral. De seguida faz-se uma breve caracterização destes três tipos de células.

##### **4.1 Macrófagos e monócitos**

Dentro do sistema imune aferente, os macrófagos tem o papel chave de células apresentadoras de antigénio: restos celulares tumorais são fagocitados, processados e apresentados ao sistema imune. Esta apresentação é feita em associação com os antigénios de classe II do MHC.

No sistema imune eferente, os macrófagos “armados” pelos seus receptores para os fragmentos Fc da imunoglobulina G (IgG) são um dos protagonistas na lise por citotoxicidade mediada por anticorpos (ADCC) (Todd 2005).

Além destas funções, está claramente demonstrado que os monócitos e os macrófagos podem reagir espontaneamente contra células tumorais após activação por citocinas (principalmente IFN- $\gamma$ ) e endotoxinas. Esta actividade é independente do reconhecimento de antigénios tumorais. Após o contacto, os macrófagos secretam substâncias citostáticas e citolíticas agindo através de enzimas lisossomais, da produção de superóxido e da síntese de factores citotóxicos. A actividade macrofágica é controlada negativamente pela secreção da prostaglandina E2 (Bartholeyns 1993).

##### **4.2 Células NK**

Vários estudos efectuados indicaram que as deficiências quantitativas e qualitativas das CNK estão frequentemente associadas com o desenvolvimento e

progressão do cancro, infecções víricas, doenças autoimunes e quadros de imunodeficiência em geral (Robertson and Ritz 1990; Becknell and Caligiuri 2008). Os avanços recentes na caracterização fenotípica e funcional das CNK têm contribuído para uma melhor compreensão do envolvimento destas células em várias doenças (Lima e col., 2004).

#### Origem das CNK

A origem precisa das CNK é desconhecida. Contudo muitos estudos sugerem que estas células derivam de precursores da medula óssea e não estão dependentes do timo para o seu desenvolvimento. Depois de “maduras” apresentam-se principalmente em circulação no sangue periférico ou no baço. (Yoon, Chung e col. 2007; Caligiuru 2008)

#### Características morfológicas das CNK

As CNK integram, juntamente com os LTc, um subgrupo de linfócitos com características morfológicas de linfócitos grandes granulares (LGL), que correspondem a cerca de 5-15% dos linfócitos do sangue. A nível morfológico, estas células apresentam um diâmetro médio de 7 a 8 µm no estado normal, e quando activadas este aumenta para os 10 a 12µm. Num esfregaço sanguíneo, corado com May-Grunwald-Giemsa, os LGL são facilmente reconhecidos pelos seus núcleos reniformes e pela presença no citoplasma de numerosos grânulos azurofílicos. No entanto, para reconhecer as CNK no sangue ou em fluidos corporais, a morfologia não é suficiente uma vez que os LTc podem adquirir a mesma aparência (Frag and Caligiuri 2006).

#### Características fenotípicas das CNK

Para se conseguir distinguir as CNK dos LT, é necessário recorrer ao estudo imunofenotípico por citometria de fluxo, através do uso de anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos, que reconhecem marcadores de superfície celular distintos.

As CNK circulantes maduras caracterizam-se pela presença do antígeno de superfície CD56 e distinguem-se dos LT pela ausência de expressão de CD3 e do TCR. Ao contrário dos LB, não expressam imunoglobulinas de superfície, mas expressam receptores para os fragmentos Fc das imunoglobulinas, como o Fcγ RIII (CD16). Este receptor activa a citotoxicidade das CNK e desempenha um papel determinante na proliferação destas células (Miller 2002).

Muitas moléculas de superfície expressas nas CNK, existem também noutras células hematológicas, em particular nos LT. Entre os receptores avaliados neste estudo que podem ser expressos pelos LT e pelas CNK, embora com diferentes intensidades, salientamos os seguintes: CD2, CD7, CD8, CD16, CD56, CD57, CD94 e HLA-Dr.

#### Subpopulações de CNK

De acordo com a intensidade/densidade de expressão de CD56 na superfície destas células, distinguem-se 2 subgrupos distintos: as CNK com expressão fraca de CD56 (CNK CD56<sup>+fraco</sup>, adiante designadas por CNK CD56<sup>+</sup>), e as CNK com expressão forte de CD56 (CNK CD56<sup>+forte</sup>, adiante designadas por CNK CD56<sup>++</sup>) (Sedlmayr, Schallhammer e col. 1996; Cooper, Fehniger e col. 2001a; Di Santo 2008).

As CNK CD56<sup>+</sup> expressam níveis elevados de CD16 e receptores de morte celular (KIR) da família das imunoglobulinas. A nível funcional, são células citotóxicas efectoras, eficientes na lise celular natural dependente de anticorpos e têm receptores de afinidade intermédia para a IL2.

As NK CD56<sup>++</sup> são células agranulares, que não expressam (ou expressam com intensidade fraca) CD16, têm níveis elevados de lectinas tipo-C, mas praticamente não expressam receptores KIR da família das imunoglobulinas. Funcionalmente, são células imunoreguladoras produtoras de citocinas, que apresentam receptores de alta afinidade para a IL2. (Cooper, Fehniger e col., 2001b)

#### Características funcionais das CNK

A capacidade para lisar espontaneamente células infectadas por vírus ou células tumorais é a função melhor conhecida das CNK (Brittenden, Heys e col., 1996; Biron and Brossay 2001; Schmitt, Ghazi e col. 2008)

A lise das células-alvo envolve uma sequência de passos: reconhecimento pelas CNK através de mecanismos ainda pouco conhecidos; ligação das CNK às células alvo (formação do conjugado), envolvendo várias moléculas de adesão celular; activação das CNK, levando ao rearranjo de grânulos citoplasmáticos e à libertação de enzimas formadoras de poros na membrana das células alvo; agressão e lise destas últimas (Chambers and Brissette-Storkus 1995; Timonen 1997; Hallett and Murphy 2004).

As CNK reconhecem as células-alvo através de receptores de superfície. Estes são divididos em várias categorias: moléculas de adesão, receptores activadores, receptores inibidores e receptores co-estimuladores. Uma outra categoria pode ainda surgir, referente aos receptores ambivalentes, que podem ser activadores e/ou inibidores (Frag, Fehniger e col. 2002; Inngjerdigen, Damaj e col. 2001; Biassoni, Cantoni e col. 2003).

Todos estes receptores podem ter sinais positivos e negativos. Os sinais positivos incluem a fosforilação de proteínas, o “turnover” de fosfoinositol e a elevação da concentração do cálcio intracelular, o que activa a migração, os mecanismos citolíticos e a produção de citocinas. Os sinais negativos incluem acções opostas às enumeradas, o que inibe a citotoxicidade e a produção de certas citocinas (Lanier 1998; Radaev and Sun 2003; Biassoni 2009).

Dentro dos linfócitos, as CNK são as primeiras a responder à activação por IL2, produzindo uma variedade de citocinas: IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , factor estimulador dos granulócitos e macrófagos (GM-CSF), IL3 e IL8 (Fehniger, Cooper e col. 2003; Makrigiannis and Anderson 2003).

Este perfil de citocinas levou a sugerir que as CNK podem ser importantes na geração de imunidade celular mediada pelos LT, na regulação da hematopoiese, na resistência a vírus e no recrutamento de leucócitos para locais de inflamação (Biron and Brossay 2001).

Por último, existem alguns estudos que atribuem às CNK actividades responsáveis pela interface entre o sistema imune e outros sistemas, como o reprodutivo e o neurológico (Lotzova 1993; Whiteside and Herberman 1994). A nível da reprodução, embora o papel das CNK ainda não esteja bem esclarecido, parece que desempenham um papel regulador na implantação do embrião e na formação da placenta. Em momentos de stress, as CNK, uma vez que expressam receptores para hormonas neuroendocrinas e moléculas de adesão neural à sua superfície, ajudam a modular a resposta imune (Caligiuru 2008).

### **4.3 Linfócitos T**

#### Origem dos LT

Os LT, assim designados pelo facto da sua maturação ocorrer em determinada fase no timo, são originados de precursores hematopoiéticos da medula óssea.

#### Características morfológicas dos LT

A maioria dos LT do sangue periférico normal são linfócitos pequenos sem características particulares, morfológicamente indistintos dos LB. Quando estimulados, os LT aumentam de tamanho e o seu citoplasma torna-se maior e mais basófilo.

Como já foi mencionado, os LTc têm características morfológicas de LGL, tal como as CNK, que são células citotóxicas por excelência (Klaus 2001).

#### Características fenotípicas dos LT

O marcador mais característico dos LT é o complexo CD3/TCR. O CD3 é um complexo de sinalização, constituído por quatro cadeias ( $\delta, \gamma, \epsilon, \xi$ ) que se associam formando diferentes combinações. As regiões citoplasmáticas destas cadeias são responsáveis pela transmissão de sinais intracelulares resultantes do reconhecimento do antígeno pelo TCR (Arosa e Cardoso 2007).

O CD4 e o CD8, componentes do complexo TCR, actuam como co-receptores para a activação dos LT, induzidos pelo antígeno MHC classe II e classe I respectivamente.

A molécula CD4 é uma glicoproteína de membrana com um peso aproximado de 55kDA, codificada por um gene localizado no cromossoma 12 dos humanos. É expressa pelos LT e monócitos/macrófagos. O CD8 é uma glicoproteína de membrana dimérica de 30 kDA, que pode ser constituída por dois tipos de cadeias ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e é expressa pelos LT e pelas CNK (Arosa e Cardoso 2007).

O CD2 é expresso em quase todos os linfócitos T e NK. Esta glicoproteína, membro da superfamília das imunoglobulinas, participa na adesão e activação dos LT.

O antigénio de diferenciação CD7, também está implicado na adesão celular e é um receptor de sinalização dos LT.

O CD57 é um oligossacarídeo com resíduos de ácido glucorónico sulfatados, expresso nos LT durante fases avançadas da resposta imune e em cerca de 50% das CNK. Vários estudos levam a concluir que esteja envolvido na adesão celular.

O CD25, cadeia  $\alpha$  do receptor da IL-2, está presente nos LT activados, e conjuntamente com o CD127 (receptor  $\alpha$  da IL-7), importante na diferenciação e proliferação dos LT, permitem identificar os LT reguladores. Ao contrário dos LT activados, as células T reguladoras naturais expressam CD25 com intensidade forte, mas não expressam CD127.

O antigénio CD45RA é expresso nos LT “virgens”, que ainda não tiveram contacto com o antigénio. À medida que estas células são activadas a expressão deste antigénio diminui e a expressão de CD45RO aumenta.

#### Subpopulações de LT

De acordo com as cadeias que constituem o TCR, os LT podem ser divididos em dois grupos:  $LT\alpha\beta$  e  $LT\gamma\delta$ , cujo receptores são constituídos pelas cadeias alfa beta e gama delta, respectivamente.

Os  $LT\gamma\delta$  representam apenas uma pequena fracção dos linfócitos do sangue periférico (1-5%), contudo a nível intra-epitelial representam grande parte destas células. Distinguem-se dos  $LT\alpha\beta$  pelo seu desenvolvimento poder ser independente do timo, pela ausência de restrição ao MHC e pela sua capacidade em reconhecer proteínas solúveis e antigénios não proteicos. A nível das funções são considerados por um lado, células do sistema inato, uma vez que desenvolvem uma resposta rápida contra agentes estranhos, por outro são considerados células do sistema adaptativo, pois desenvolvem memória e desempenham funções importantes no controlo da inflamação e do cancro (Carding and Egan 2002; Girardi 2006; Hayday 2000).

Os  $LT\alpha\beta$  representam mais de 90% dos LT maduros circulantes e o seu TCR reconhece péptidos em associação com moléculas do MHC-I e MHC-II. De acordo com

este reconhecimento, estes linfócitos podem ser divididos em duas populações: os LT CD4<sup>+</sup> e os LT CD8<sup>+</sup>.

Os LT CD4<sup>+</sup> representam cerca de 60% dos LT circulantes. São seleccionados por moléculas de MHC classe II e tem como principal função auxiliar as respostas imunes, e por isso são também conhecidos por LT helper (LTh): ajudam os LB a produzir anticorpos e os macrófagos nas suas funções.

Os LT CD8<sup>+</sup> correspondem a cerca de 40% dos LT circulantes e são seleccionados por moléculas de MHC classe I. São células predominantemente citotóxicas, responsáveis pela destruição de células infectadas por vírus e células tumorais (Masopust, Vezys e col. 2007). Os LTc têm grânulos com perforina e granzimas, utilizados na eliminação das células-alvo.

Após activação, os LT CD4<sup>+</sup> “virgens” podem ainda diferenciar-se em duas grandes populações, de acordo com o padrão de citocinas: os LT Th1 e os LT Th2 (Arosa e Cardoso 2007). Esta diferenciação é determinada no momento em que os LT são activados, e é influenciada por factores genéticos (ao nível das células apresentadoras de antígenos) e por factores ambientais (citocinas).

Os LT Th1 secretam IL2, IFN $\gamma$  e TNF $\beta$  e estão envolvidos na regulação de respostas celulares associadas à citotoxicidade e às reacções inflamatórias locais. Para além desta função, produzem também citocinas, como o TNF $\alpha$ , que contribuem para a defesa do organismo a vários níveis (ex: inibem a replicação viral, activam os macrófagos). O TNF $\alpha$  é uma citocina multifuncional envolvida na apoptose, sobrevivência celular, inflamação e imunidade activada via 2 receptores. É uma proteína de 17 kDA constituída por 157 aminoácidos.

Os LT Th2 libertam IL4, IL5, IL9, IL10 e IL13 e participam na regulação de respostas humorais: estimulam a proliferação e produção de anticorpos pelos LB.

Existem ainda um outro tipo de linfócitos, capazes de inibir respostas imunológicas específicas desenvolvidas pelos outros LT, são os LT reguladores/supressores (Sakaguchi, Wing e col. 2007; Gallimore and Godkin 2008).

## **OBJECTIVOS**

## **Objectivos**

Alguns estudos demonstraram que nos linfomas cutâneos de melhor prognóstico existe uma resposta anti-tumoral mais activa, facto que levantou grande interesse para novas investigações, uma vez que na grande maioria das doenças neoplásicas, o tumor consegue enganar o sistema imunológico, tornando-o débil e não eficaz.

Como foi fundamentado anteriormente, os LT e as CNK são elementos importantes na resposta anti-tumoral.

Recorrendo ao uso da citometria de fluxo é possível caracterizar o estado de activação das CNK e dos LT através da seu perfil imunofenotípico, nomeadamente através da análise do padrão de expressão de moléculas envolvidas na activação e adesão celular. Por outro lado, a resposta imune dos LT ao tumor pode ser medida através da quantificação das citocinas produzidas por estas células.

Com este trabalho pretendemos quantificar as CNK e LT circulantes e caracterizar o seu estado de activação em doentes com diferentes tipos de LCCT, em diferentes estadios, comparando-os com uma população controlo, bem como avaliar os LT a nível funcional, de forma a tentar relacionar a resposta anti-tumoral com o comportamento clínico e biológico do tumor.

### **Objectivo Geral**

- Avaliar a resposta anti-tumoral das CNK e LT nos LCCT.

### **Objectivos Específicos**

- Quantificar os LT e as CNK circulantes de doentes com LCCT;
- Caracterizar os LT e as CNK circulantes de doentes com LCCT, nomeadamente quanto à representação de diferentes subpopulações celulares e quanto ao estado de activação, através do estudo do seu perfil fenotípico;
- Avaliar funcionalmente os LT circulantes de doentes com LCCT, através do estudo da produção de citocinas Th1;
- Comparar o número de CNK e de LT circulantes, o perfil fenotípico destas células e a função dos LT dos doentes com LCCT com os observados em indivíduos saudáveis;
- Correlacionar o número e estado de activação das CNK do sangue periférico dos doentes, com o estadio do linfoma.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## **Material e Métodos**

### **Questões éticas**

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar do Porto (CHP).

Foi explicado a todos os participantes (doentes e controlos) o objectivo do estudo, e estes aceitaram participar de livre vontade, assinando um termo de consentimento informado.

### **Doentes e controlos**

Neste trabalho estudaram-se dois grupos distintos de indivíduos: o grupo de doentes e o grupo de controlos.

O primeiro grupo foi constituído por 18 doentes com LCCT da Consulta Multidisciplinar de Linfomas Cutâneos (CMLC) do CHP, que no momento do estudo não estavam a efectuar qualquer tipo de tratamento sistémico, nem tinham efectuado tratamento nos 3 meses precedentes (6 homens, 12 mulheres, idade média 60 anos, dos 36 aos 78 anos).

O diagnóstico foi efectuado tendo por base as manifestações clínicas que apresentavam, nomeadamente o tipo de lesões da pele e a extensão destas, bem como o resultado da biópsia da pele e de outros exames de diagnóstico requeridos.

Para cada doente, foi também realizada uma história médica completa e efectuados os estudos analíticos e imagiológicos necessários ao estadiamento.

O segundo grupo foi composto por 11 indivíduos saudáveis, dadores benévolos de sangue observados na Consulta de Dadores de Sangue do CHP, que não tinham tido nenhuma doença intercorrente durante os 6 meses precedentes, e já não era a primeira vez que davam sangue (6 homens, 5 mulheres, idade média 43 anos, dos 23 aos 56 anos).

### **Produtos biológicos**

Os estudos foram efectuados em amostras de sangue periférico colhidas em tubo com EDTA-K3 (no caso dos estudos imunofenotípicos) ou heparina sódica (no caso dos estudos funcionais dos LT para avaliação da produção de citocinas).

## Estudos fenotípicos

### Quantificação e caracterização fenotípica dos LT e das CNK

Os estudos imunofenotípicos foram realizados no mesmo dia das colheitas de sangue.

#### Material

##### Anticorpos monoclonais

Foram utilizados anticorpos monoclonais com diferentes especificidades, conjugados com diferentes fluorocromos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Especificidades, clones, fluorocromos e fornecedores dos anticorpos monoclonais utilizados no estudo imunofenotípico dos linfócitos.

Especificidade	Clone	Isotipo	Fluorocromo	Fornecedor
CD2	SFCI3Pt2H9	IgG <sub>1</sub>	FITC	BC
CD3	SK7; UCHT <sub>1</sub>	IgG <sub>1</sub> ; IgG <sub>1</sub>	APC; FITC	BDB; IOT
CD4	SK3	IgG <sub>1</sub>	PERCP	BDB
CD7	3A1E-12H7	IgG <sub>2b</sub>	PE	BC
CD8	SK1	IgG <sub>1</sub> , κ	PE	BDB
CD11b	D12	IgG <sub>2a</sub>	PE	BDB
CD11c	S-HCL-3	IgG <sub>2b</sub>	PE	BDB
CD16 + CD56	3G8+N901	IgG <sub>1</sub>	PE	IOT
CD19	SJ25C1	IgG <sub>1</sub>	APC	BDB
CD25	2A3	IgG <sub>1</sub>	PE	BDB
CD38	HB7	IgG <sub>1</sub>	FITC	BDB
CD45	2D1	IgG <sub>1</sub>	PERCP	BDB
CD45RA	L48	IgG <sub>1</sub>	FITC	BDB
CD45RO	UCHL-1	IgG <sub>2a</sub>	APC	BDB
CD56	NKH-1	IgG <sub>1</sub>	PC5	IOT
CD57	HNK-1	IgM, κ	FITC	BDB
CD94	HP-3D9	IgG <sub>1</sub>	FITC	PH
CD127	HIL-7R-M21	IgG <sub>1</sub> , κ	Alexa Fluor 647	PH
Anti-HLA DR	L243; L243	IgG <sub>2a</sub> ; IgG <sub>2a</sub>	PE; FITC	BDB
CCR-4	IG1	IgG <sub>1</sub> , κ	PE	PH

Legenda: BDB (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA); BC (Beckman Coulter, Miami, FL); IOT (Immunotech, Marselha, FR); PH (Pharmingen, San Diego, CA)

Estes anticorpos foram usados nas combinações indicadas na Tabela 2, com o objectivo de quantificar os LT, os LB e as CNK (tubo 1), as subpopulações dos LT (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) (tubo 2) e das CNK (tubo 3) (CD56<sup>+</sup> e CD56<sup>++</sup>), bem como caracterizar o perfil fenotípico das CNK (tubos 3 a 6) e dos LT (tubos 7 e 8).

**Tabela 2.** Combinações de anticorpos monoclonais utilizadas para quantificação das populações linfocitárias e caracterização fenotípica das CNK e dos LT.

	<b>FL1 (APC)</b>	<b>FL2 (PERCP ou PC5)</b>	<b>FL3 (PE)</b>	<b>FL4 (FITC)</b>
<b>Tubo 1</b>	CD19	CD45	CD16+CD56	CD3
<b>Tubo 2</b>	CD3	CD45	CD8	CD4
<b>Tubo 3</b>	CD3	CD56	CD7	CD2
<b>Tubo 4</b>	CD3	CD56	CD11b	CD38
<b>Tubo 5</b>	CD3	CD56	CD11c	CD57
<b>Tubo 6</b>	CD3	CD56	HLA-DR	CD94
<b>Tubo 7</b>	CD127	CD4	CD25	HLA-DR
<b>Tubo 8</b>	CD45RO	CD4	CCR4	CD45RA

### Outros consumíveis

Solução para lise dos eritrócitos e fixação das membranas dos leucócitos (FACSlysing®, Becton Dickinson Biosciences, BDB).

Tampão salino-fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS, pH7.3) com azida sódica (0.1% p/v), para lavagem e suspensão das células.

## **Métodos**

### Procedimento técnico

Inicialmente pipetou-se os anticorpos monoclonais conjugados com os diferentes fluorocromos, para os respectivos tubos, de acordo as combinações mencionadas na Tabela 2. Os volumes utilizados foram os recomendados pelos fabricantes, de forma a proporcionar uma concentração saturante de anticorpos durante a incubação.

De seguida, juntou-se a cada tubo 100 µl de sangue periférico, contendo 0.5 a 2x10<sup>6</sup> leucócitos, homogeneizou-se no vortex e colocou-se os tubos a incubar, protegidos da luz e à temperatura ambiente, de forma a garantir as condições óptimas de ligação dos anticorpos à superfície das células.

Decorrido este período, adicionou-se a cada tubo 2 mL de FACSLysing® (BDB) diluído a 1/10 em água destilada, de forma a efectuar a lise dos eritrócitos e a fixação das membranas dos leucócitos. Colocou-se novamente a incubar durante 10 minutos sob as mesmas condições.

Por último, de forma a eliminar os anticorpos que não se tinham ligado, procedeu-se a uma centrifugação (2000rpm, 540g, 5 min) seguida de rejeição do sobrenadante, e lavagem com PBS com azida sódica. Suspendeu-se as células em 0,5ml desse tampão.

#### Leitura das amostras no citómetro de fluxo

Para avaliar a expressão dos marcadores celulares utilizados anteriormente, recorreu-se ao citómetro de fluxo FACS-Calibur (BDB), equipado com dois lasers, um de argón (488nm) e um de néon (625nm), o que permitiu avaliar quatro fluorescências em simultâneo. Para a leitura das amostras no citómetro, foi utilizada a aplicação informática CellQUEST (BDB). Para cada amostra foram adquiridos 200.000 eventos do total de células, de forma a garantir a representatividade das várias populações estudadas.

#### Análise dos resultados

A análise da expressão antigénica, através dos dados obtidos por citometria de fluxo, foi efectuada no programa Paint-a-Gate (BDB). As diferentes populações estudadas foram seleccionadas utilizando diferentes estratégias.

#### Quantificação dos LT, dos LB e das CNK

Os LT foram seleccionados e quantificados tendo em consideração que são linfócitos que expressam CD3 na membrana. As CNK foram seleccionadas e quantificadas tendo em consideração que são linfócitos que se caracterizam pela ausência de expressão de CD3 e pela expressão de CD16 e/ou CD56 (CD3<sup>-</sup>CD16/CD56<sup>+</sup>). Os LB foram seleccionados e quantificados tendo em consideração que são linfócitos que expressam CD19.

#### Caracterização das CNK

Dentro das CNK, foi avaliada a representação das subpopulações CD56<sup>+</sup> e CD56<sup>++</sup> e, em cada uma destas subpopulações foi avaliada a expressão dos diferentes antigénios de membrana, através dos seguintes parâmetros:

- percentagem de células positivas;
- intensidade de expressão de cada um dos antigénios estudados, avaliada pela intensidade média de fluorescência (IMF);

- padrão de expressão de cada antígeno (homogéneo ou heterogéneo), avaliado pelo coeficiente de variação (CV) da IMF.

#### Caracterização dos LT

Dentro dos LT, foi avaliada a representação das subpopulações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, e no total destas células (CD3<sup>+</sup>) foi avaliada a expressão de vários antígenos de membrana, através dos parâmetros referidos anteriormente para CNK, de forma a se conseguir identificar várias subpopulações: LT activados, LT citotóxicos, LT reguladores e LT com capacidade de migração para a pele.

### **Estudos funcionais**

#### **Avaliação da produção de citocinas pelos LT**

Os LT foram avaliados do ponto de vista funcional, nomeadamente quanto à sua capacidade para, uma vez estimulados *in vitro*, produzirem citocinas, especificamente TNF- $\alpha$ .

O TNF $\alpha$  produzido foi mantido propositadamente dentro das células, através da utilização de um inibidor do transporte de proteínas, a brefeldina. Esta interfere com o transporte vesicular do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, permitindo que as citocinas sintetizadas pelas células se acumulem no seu interior.

No final, os LT que produziram TNF $\alpha$  foram detectados através de anticorpos monoclonais específicos anti-TNF $\alpha$  (para avaliar os LT Th1)

### **Material**

#### Anticorpos monoclonais

O estudo funcional dos LT foi efectuado com anticorpos monoclonais com diferentes especificidades, conjugados com diferentes fluorocromos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Especificidades, clones, fluorocromos e fornecedores dos anticorpos monoclonais utilizados no estudo funcional dos LT.

<b>Especificidade</b>	<b>Clone</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Fornecedor</b>
CD3	SK7	IgG <sub>1</sub>	APC	BDB
CD8	SK1	IgG <sub>1</sub>	PERCP	BDB
TNF- $\alpha$	Mab11	IgG <sub>1</sub>	PE	PH

Legenda: BDB (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA); PH (Pharmingen, San Diego, CA)

Estes anticorpos foram usados nas combinações indicadas na Tabela 4, com o objectivo de quantificar a produção de TNF $\alpha$  pelos LT CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.

**Tabela 4.** Combinações de anticorpos monoclonais utilizadas para quantificação da produção de citocinas pelos LT

	<b>FL1 (APC)</b>	<b>FL2 (PERCP)</b>	<b>FL3 (PE)</b>
<b>Tubo 1</b>	CD3	CD8	TNF- $\alpha$

#### Outros consumíveis

Soluções para fixação e permeabilização da membrana das células (Fix and Perm®, Caltag)

Tampão salino-fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS, pH7.3) com azida sódica (0.1% p/v), para lavagem e suspensão das células.

Tampão salino-fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS, pH7.3) com azida sódica (0.1% p/v) e albumina bovina (Bovine Serum Albumin, BSA, Sigma) (0.2% p/v), para lavagem e suspensão das células (PBS-BSA).

Meio de cultura (RPMI, Sigma) completo, com 10% de soro fetal, para cultura de células.

Forbol-mirestato-acetato (Phorbol Myrestate Acetate, PMA, Sigma) e ionomicina (Sigma), para estimulação das células em cultura.

Placas de cultura, tubos de poliestireno e outro material consumível.

#### **Métodos**

##### Activação celular “in vitro”

Para cada poço da placa de cultura, pipetou-se 500 $\mu$ l de sangue periférico heparinizado e igual quantidade do meio de cultura (RPMI). Adicionou-se também 2 $\mu$ l de brefeldina (concentração final:10 $\mu$ g/mL). Por último, pipetou-se 25 $\mu$ l de forbol-mirestato-acetato (PMA) (concentração final:25ng/mL) e 20 $\mu$ l de Ionomicina (concentração final:1 $\mu$ g/mL), essenciais para que os linfócitos fossem activados, e conseqüentemente produzissem citocinas.

Num outro poço da placa, pipetou-se exactamente as mesmas soluções e amostra excepto o PMA e a Ionomicina. Este poço funcionou como controlo negativo de activação.

A placa foi a incubar durante 4 horas a 37°C, numa atmosfera estéril, com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de humidade.

Findo este tempo, antes de se iniciarem as marcações com anticorpos, fez-se uma lavagem das células em PBS-BSA, centrifugou-se a 2000rpm/540g durante 5 minutos, aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em PBS-BSA.

É de salientar que, tanto as marcações de superfície, como as marcações intracitoplasmáticas, foram realizadas em duplicado: num tubo colocou-se o sangue activado, noutra colocou-se o controlo negativo de activação.

#### Marcação de superfície (antígenos de membrana)

Os linfócitos a estudar, foram marcados na superfície com o anticorpo monoclonal anti-CD3 conjugado com APC, e com o anticorpo monoclonal anti-CD8 conjugado com PERCP.

Inicialmente pipetou-se os anticorpos monoclonais conjugados com os diferentes fluorocromos, para os respectivos tubos, e 100 µl de sangue activado ou controlo negativo. Os volumes de anticorpos utilizados foram os recomendados pelos fabricantes, de forma a proporcionar uma concentração saturante de anticorpos durante a incubação.

Colocou-se os tubos a incubar durante 15 minutos, protegidos da luz e à temperatura ambiente, de forma a garantir as condições óptimas de ligação dos anticorpos à superfície das células.

Findo este tempo, procedeu-se a uma lavagem com PBS - azida sódica, seguida de centrifugação a 2000rpm/540g durante 5 minutos, e rejeitou-se o sobrenadante.

#### Marcação intracelular (citocinas)

Antes de se proceder à marcação intracelular, foi necessário fixar e permeabilizar as células, e para tal recorreu-se ao uso dos reagentes Fix and Perm (Caltag)

Ressuspendeu-se gentilmente as células, e adicionou-se a cada tubo 100 µl de solução fixadora (Fix and Perm, Reagente A).

Colocou-se novamente os tubos a incubar sobre as mesmas condições anteriores, e de seguida procedeu-se a um passo de lavagem com PBS-azida sódica, seguida de centrifugação a 2000rpm/540g durante 5 minutos, e rejeitou-se o sobrenadante.

Voltou-se a ressuspender as células, e adicionou-se 100 µl de de solução permeabilizante (Fix and Perm, Reagente B), e 20 µl anticorpo anti-TNF $\alpha$ .

Os tubos foram sujeitos a outra incubação durante 15 minutos, protegidos da luz e à temperatura ambiente. Por último as células foram submetidas a nova lavagem, segundo descrito anteriormente, e suspendidas em 0,5ml de PBS-azida sódica.

#### Leitura das amostras no citómetro de fluxo

As amostras foram lidas no citómetro de fluxo FACSCalibur (BDB) e foi utilizada a aplicação informática CellQUEST (BDB).

Para cada amostra foram adquiridos 200.000 eventos do total de células, de forma a garantir a representatividade das várias populações estudadas.

#### Análise dos resultados

A análise dos resultados foi efectuada no programa Paint-a-Gate (BDB).

#### Quantificação da Produção de Citocinas

Os LT CD8 foram seleccionados, tendo em consideração que são linfócitos que expressam CD3 e CD8 na membrana (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>). Os LT CD4 foram seleccionados, tendo em consideração que são linfócitos que expressam CD3, mas não expressam CD8 na membrana (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>). Em cada uma das populações de LT foi quantificada a percentagem de células que expressavam TNF $\alpha$ .

#### **Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada com o auxílio dos programas Excel e Statistical Package for Social Sciences (Versão 16.0, SPSS Inc, 2007) para o Windows, e os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, mínimo – máximo, e mediana.

Foi utilizado o teste de Mann-Whitney/Kruskal-Wallis para verificar a associação entre as variáveis nos dois grupos. O valor de p foi calculado e considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0,05.

## **RESULTADOS**

## Resultados

### Caracterização do grupo de controlos

O grupo de controlos era constituído por 5 indivíduos do sexo feminino e 6 do sexo masculino. Apresentava uma média de idades de 42 anos, com um desvio padrão de 9 e uma mediana de 41 anos.

O número de indivíduos incluídos neste grupo não foi o dobro do número de doentes, contudo, a homogeneidade entre grupos no que respeita a idade e sexo foi garantida.

### Caracterização do grupo de doentes

Ao grupo de doentes pertenciam 6 mulheres e 12 homens, com uma média de idades de 60 anos, desvio padrão de 12 e mediana de 64 anos. Todos possuíam LCCT (critério de inclusão): 3 apresentavam-se com SS em estadio IV, e os restantes com MF de estadio I ou II.

A função renal estava normal em todos os pacientes, e a função hepática apenas estava ligeiramente alterada em dois indivíduos.

Em relação aos níveis de desidrogenase láctica (DHL) no sangue, apenas em dois doentes se verificou um ligeiro aumento (237U/L e 374U/L; intervalo de referencia: 135-225U/L). A  $\beta$ 2-microglobulina apresentava-se aumentada em três indivíduos.

### Avaliação dos parâmetros hematológicos

A Tabela 5 apresenta os vários parâmetros hematológicos determinados, no grupo de controlos e no grupo de doentes.

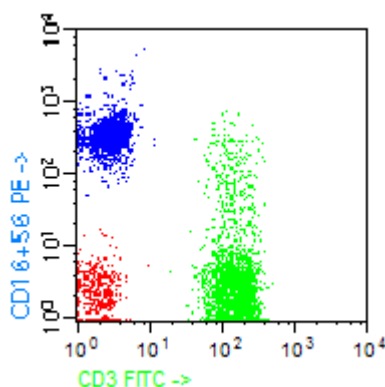
**Tabela 5.** Parâmetros hematológicos dos doentes com LCCT e dos controlos.

	HGB (g/dL)	Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	Leucócitos (x10 <sup>3</sup> / $\mu$ L)	Neutrófilos (10 <sup>3</sup> / $\mu$ L)	Linfócitos (10 <sup>3</sup> / $\mu$ L)
<b>Controlos</b>					
Média $\pm$ desvio padrão	14,2 $\pm$ 1,5	214,6 $\pm$ 76,6	8,3 $\pm$ 1,9	4,8 $\pm$ 1,5	2,6 $\pm$ 0,60
Médiana	14,3	205	8,20	4,6	2,5
Mínimo – Máximo	12,3 - 16,8	104 - 355	5,50 - 11,70	2,2 - 7,9	1,7 - 4,0
<b>Doentes</b>					
Média $\pm$ desvio padrão	14,7 $\pm$ 1,4	230,1 $\pm$ 63,3	7,5 $\pm$ 3,4	4,2 $\pm$ 1,8	2,2 $\pm$ 1,5
Médiana	14,7	227	6,4	3,8	1,8
Mínimo – Máximo	12,5 - 17,5	143 - 445	2,7 - 16,1	2,0 - 9,3	0,4 - 7,2
<b>p</b>	0,418	0,559	0,177	0,216	0,027

Comparativamente com os controlos, o grupo dos doentes apresentava valores ligeiramente inferiores de concentração de leucócitos no sangue periférico, o que se traduzia no número de neutrófilos e linfócitos. Contudo apenas nos linfócitos esta diminuição era significativa ( $p < 0.05$ )

### Quantificação dos LT, LB e CNK

A análise por citometria de fluxo permitiu determinar a percentagem de LT ( $CD3^+$ ), de LB ( $CD19^+$ ) e de CNK ( $CD16$  e/ou  $56^+/CD3^-$ ) (Figura 1). A Tabela 6 resume os resultados obtidos para ambos os grupos. Embora os doentes com LCCT apresentassem uma percentagem ligeiramente inferior de LT e uma percentagem ligeiramente superior de CNK do que os controlos, as diferenças não foram estatisticamente significativas.



**Figura 1** – Histograma biparamétrico, tipo “dot plot”, obtido por citometria de fluxo exemplificando a expressão de CD16+56 e CD3 nos linfócitos de sangue periférico. A população verde representa os LT, a azul as CNK e a vermelha os LB.

**Tabela 6.** Populações dos LT, LB e CNK do sangue periférico dos doentes com LCCT e dos controlos.

		% Linfócitos		
		LT	LB	CNK
<b>Controlos</b>	Média $\pm$ desvio padrão	78,1 $\pm$ 4,9	9,5 $\pm$ 2,6	12,4 $\pm$ 3,9
	Mediana	77,2	9,1	11,6
	Mínimo – Máximo	70,7 - 86,7	5,9 - 14,5	7,4 - 18,9
<b>Doentes</b>	Média $\pm$ desvio padrão	73,3 $\pm$ 10,7	9,8 $\pm$ 4,7	16,8 $\pm$ 9,3
	Mediana	71,7	9,3	14,0
	Mínimo – Máximo	53,1 - 93,4	0,8 - 18,8	4,2 - 38,6
<b>p</b>		0,146	0,947	0,238

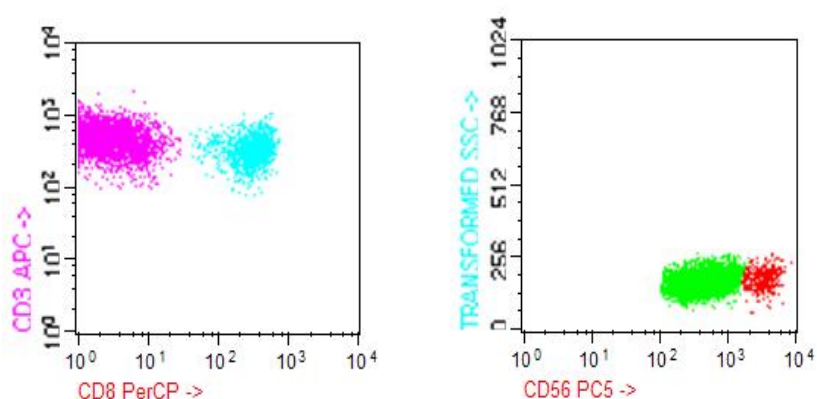
### Quantificação das subpopulações de LT e de CNK

Dentro dos LT, determinou-se a percentagem de LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup>.

As CNK foram divididas em dois grupos: as CNK CD56<sup>+</sup> e as CNK CD56<sup>++</sup>.

A Figura 2 exemplifica estas populações em histogramas obtidos por citometria de fluxo, e a Tabela 7 resume os resultados obtidos.

Ao nível das subpopulações dos LT, os valores obtidos foram muito semelhantes nos dois grupos, enquanto nas CNK, verificou-se um aumento significativo da representação das CNK CD56<sup>+</sup> e conseqüentemente uma ligeira diminuição da representação das CNK CD56<sup>++</sup> ( $p < 0.05$ ).



**Figura 2** – Histogramas biparamétricos, tipo “dot plot”, obtidos por citometria de fluxo exemplificando as subpopulações de LT e de CNK. A população rosa representa os LT CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>) e a população azul celeste os LT CD8<sup>+</sup>. A população verde representa as CNK CD56<sup>+</sup> e a vermelha as CNK CD56<sup>++</sup>.

**Tabela 7.** Subpopulações dos LT e das CNK do sangue periférico dos doentes com LCCT e dos controlos.

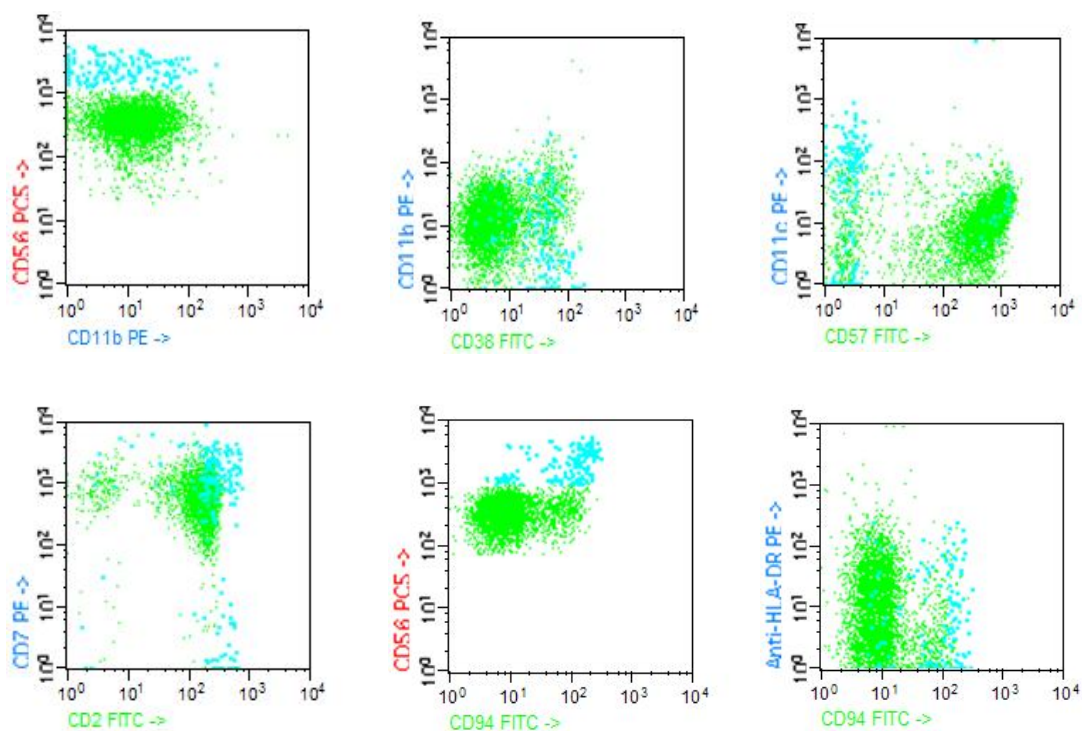
		LT		CNK	
		CD4+ (%LT)	CD8+ (%LT)	CD56+ (%CNK)	CD56++ (%CNK)
<b>Controlos</b>	Média ± desvio padrão	66,3 ± 17,7	33,7 ± 13,2	94,6 ± 3,0	5,4 ± 3,0
	Médiana	71,6	27,8	94,4	5,6
	Mínimo – Máximo	19,3 - 81,1	15,8 - 43,5	90,5 - 98,3	1,7 - 9,5
<b>Doentes</b>	Média ± desvio padrão	67,1 ± 19,3	32,9 ± 19,3	97,1 ± 1,6	2,9 ± 1,6
	Médiana	71,6	28,4	97,1	2,9
	Mínimo – Máximo	41,0 - 84,2	15,8 - 59,0	94,3 - 99,74	0,3 - 5,7
<b>p</b>		0,865	0,865	0,025	0,025

### Imunofenotipagem das CNK

Como já foi referido anteriormente, as CNK podem ser divididas em dois grupos, de acordo com a expressão do CD56, que apresentam funções e características fenotípicas distintas. Assim neste trabalho, ao analisar o perfil fenotípico destas células, separamos estas duas subpopulações, de forma a conseguirmos identificar se existiam alterações em ambas ou apenas só numa delas (Figura 3).

As Tabelas 8 e 9 resumizam as médias e os desvios padrão da percentagem de células positivas, da intensidade média de fluorescência (IMF) e do coeficiente de variação da IMF (CV), dos vários marcadores estudados, nas CNK CD56<sup>+</sup> e CD56<sup>++</sup> no grupo de doentes e no grupo controlo.

Embora em alguns marcadores se observasse um ligeiro aumento (CD11c, CD57) e noutros uma ligeira diminuição (CD2, CD94 e HLA-DR), a nível estatístico não se obteve nenhuma diferença significativa entre o grupo de doentes com LCCT e o grupo controlo, em nenhuma das subpopulações de CNK.



**Figura 3** – Histogramas biparamétricos, tipo “dot plot”, obtidos por citometria de fluxo exemplificando a expressão dos vários antígenios nas CNK. A população azul celeste representa as CNK CD56<sup>++</sup> e a população verde as CNK CD56<sup>+</sup>.

**Tabela 8.** Características imunofenotípicas das CNK CD56<sup>+</sup> do sangue periférico dos doentes com LCCT e dos controlos. Os resultados são apresentados em média ± desvio padrão.

		CNK CD56 <sup>+</sup>							
		CD2	CD7	CD11b	CD11c	CD38	CD57	CD94	Anti-HLA DR
Controlos	%células +	81,3±9,51	98,2±2,47	100,0	69,8±18,78	100,0	60,7±13,86	55,9±17,70	22,8±16,73
	MFI	126,4±36,71	944,7±166,23	49,9±20,77	123,9±30,64	36,6±16,23	409,5±166,41	49,5±11,69	48,4±15,95
	CV	54,9±8,81	76,2±16,58	205,1±142,2	93,3±10,63	109,9±29,25	85,7±21,32	54,0±11,18	162,3±53,17
Doentes	%células+	74,2±16,36	97,9±2,51	100,0	78,5±20,34	100,0	66,8±13,64	46,0±17,66	13,3±12,43
	MFI	120,6±34,90	1175,0±350,60	51,4±18,22	142,0±36,60	39,2±19,39	329,6±117,47	48,8±12,34	67,0±45,09
	CV	55,8±11,11	68,8±13,71	157,2±90,83	105,7±22,08	97,4±28,60	90,7±19,45	54,2±8,72	209,6±69,00
<b>p</b>		0,492	0,122	---	0,256	---	0,296	0,707	0,092

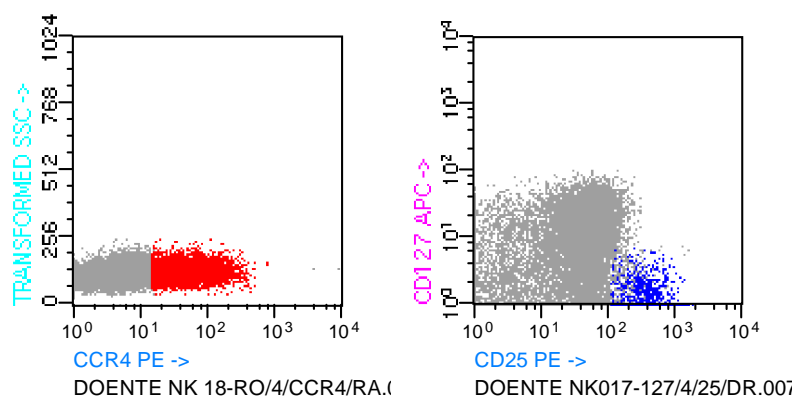
**Tabela 9.** Características Imunofenotípicas das CNK CD56<sup>++</sup> do sangue periférico dos doentes com LCCT e dos controlos. Os resultados são apresentados em média±desvio padrão.

		CNK CD56 <sup>++</sup>							
		CD2	CD7	CD11b	CD11c	CD38	CD57	CD94	Anti-HLA DR
Controlos	%células+	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	42,88±14,39
	MFI	278,1±65,08	2128,9±312,59	57,7±64,59	203,7±59,20	39,5±11,46	Negativo	109,6±32,60	66,62±18,77
	CV	34,1±3,84	50,0±5,39	313,3±357,48	72,3±6,37	101,1±38,15	Negativo	48,5±6,86	121,93±12,75
Doentes	%células+	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	52,30±15,01
	MFI	318,7±40,66	2540,7±711,29	57,8±55,18	232,1±95,35	45,8±17,51	Negativo	102,5±29,58	62,92±22,49
	CV	34,7±6,26	61,8±10,72	167,0±136,51	71,1±9,65	84,5±13,21	Negativo	58,9±21,88	102,24±27,37
<b>p</b>		---	---	---	---	---	---	---	0,465

### Imunofenotipagem dos LT

No grupo dos LT, foram quantificados os LT reguladores (CD25<sup>+</sup> e CD127<sup>+</sup>), os LT CCR4<sup>+</sup> (receptor de quimiocinas que confere capacidade de migração para a pele).(Figura 4), os LT activados (CD45RO<sup>+</sup>; HLA-DR<sup>+</sup>);e por último os LT citotóxicos (CD56<sup>+</sup>; CD57<sup>+</sup>) (Figura 5).

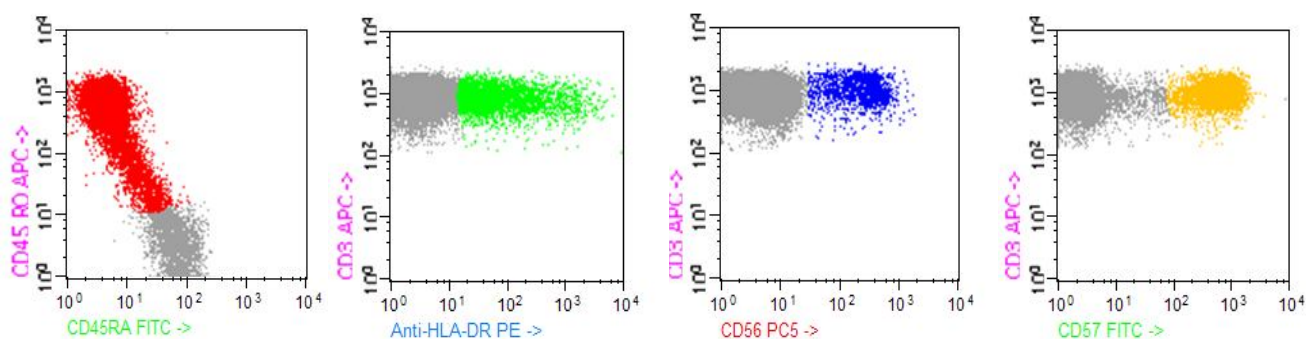
As tabelas seguintes resumem os resultados obtidos em ambos os grupos.



**Figura 4** – Histogramas biparamétricos, tipo “dot plot”, obtidos por citometria de fluxo exemplificando as subpopulações dos LT CCR4<sup>+</sup> e LT reguladores.

**Tabela 10.** Subpopulações de LT que migram para a pele e reguladores do sangue periférico de doentes com LCCT e dos controlos. Os resultados são apresentados em média±desvio padrão (mediana).

		LT migram pele CCR4 <sup>+</sup>	LT Reguladores CD25 <sup>+</sup>   CD127 <sup>+</sup>	
<b>Controlos</b>	%células +	19,4±5,1 (17,7)	7,6±1,3 (7,6)	
	MFI	46,7±13,2 (51,3)	179,6±31,1 (168,3)	1,9±0,3 (1,8)
	CV	81,9±7,2 (83,0)	74,8±7,4 (71,8)	69,4±8,4 (70,9)
<b>Doentes</b>	%células +	28,0±11,9 (22,6)	8,3±2,1 (8,2)	
	MFI	55,0±23,2 (55,0)	213,9±51,9 (195,5)	1,8±0,2 (1,8)
	CV	79,9±6,5 (79,0)	77,3±7,3 (77,0)	71,6±6,1 (70,9)
<b>p</b>		0,225	0,398	



**Figura 5** – Histogramas biparamétricos, tipo “dot plot”, obtidos por citometria de fluxo exemplificando as subpopulações dos LT activados e citotóxicos.

**Tabela 11.** Subpopulações de LT activados e citotóxicos do sangue periférico dos doentes com LCCT e dos controlos. Os resultados são apresentados em média±desvio padrão (mediana).

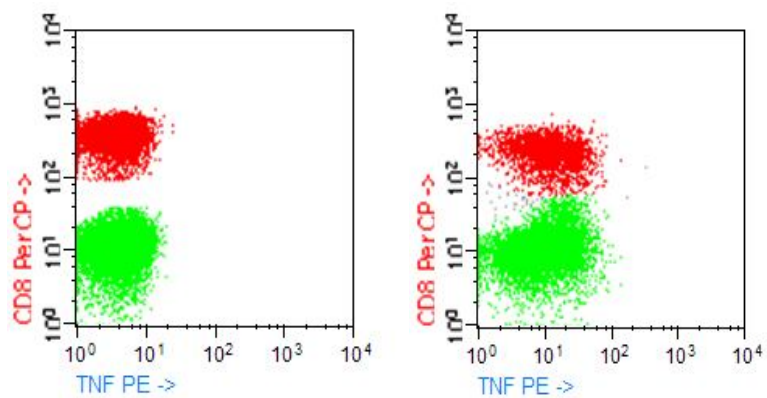
		LT Activados		LT Citotóxicos	
		CD45RO <sup>+</sup>	Anti-HLA DR <sup>+</sup>	CD56 <sup>+</sup>	CD57 <sup>+</sup>
<b>Controlos</b>	% Células +	59,9±15,5 (57,3)	17,7±6,5 (15,2)	8,8±6,2 (7,5)	15,2±8,0 (14,3)
	MFI	462,9±125,4 (427,6)	176,8±57,6 (162,0)	201,6±60,3 (197,9)	291,4±95,1 (291,8)
	CV	68,2±8,9 (67,3)	236,3±28,1 (244,9)	94,0±20,3 (92,0)	106,2±17,0 (103,1)
<b>Doentes</b>	% Células +	75,1±10,2 (77,5)	20,6±6,1 (20,5)	10,5±9,3 (8,2)	19,4±13,4 (16,6)
	MFI	484,4±133,4 (495,2)	188,8±43,1 (189,1)	217,6±81,3 (196,2)	408,6±158,3 (393,9)
	CV	68,7±13,5 (66,7)	228,6±25,7 (234,8)	92,0±15,7 (91,3)	93,6±16,1 (93,5)
<b>p</b>		0,085	0,157	0,560	0,467

#### Avaliação da produção de citocinas pelos LT activados in vitro

A síntese de TNF- $\alpha$  pelos LT CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> após estimulação encontra-se apresentada na Tabela 12. A percentagem células produtoras de TNF- $\alpha$  foi superior, tanto na população CD4<sup>+</sup> como na CD8<sup>+</sup>, nos doentes com LCCT comparativamente com os controlos (22,3% vs. 33,0% e 36,4% vs. 62,8%, respectivamente), contudo este aumento apenas foi estatisticamente significativo nos LT CD8<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 12.** Expressão de TNF $\alpha$  nos LT dos doentes com LCCT e dos controlos. Os resultados são apresentados em percentagem de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que expressavam TNF $\alpha$ .

		TNF $\alpha$	
		CD4 <sup>+</sup> (%LT)	CD8 <sup>+</sup> (%LT)
<b>Controlos</b> (n= 8)	Média ± desvio padrão	22,3 ± 15,8	36,4 ± 27,4
	Mediana	13,2	24,3
<b>Doentes</b> (n=4)	Média ± desvio padrão	33,0 ± 18,1	62,8 ± 12,0
	Mediana	39,2	60,4
<b>p</b>		0,126	0,004



**Figura 6** – Histogramas biparamétricos, tipo “dot plot”, obtidos por citometria de fluxo exemplificando os LT (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) produtores de TNF- $\alpha$ , antes e após a estimulação.

## **DISCUSSÃO**

## Discussão

Os LCCT compreendem um grupo muito heterogéneo de doenças a nível de manifestações clínicas e prognóstico, mas que se caracterizam por uma acumulação de LT clonais no microambiente cutâneo que são responsáveis por vários fenómenos imunopatológicos.

A participação de células da imunidade inata e adquirida na defesa contra tumores tem sido amplamente estudada.

Muitos estudos, realizados ao longo dos últimos anos, demonstraram existir, em doentes com vários tipos de neoplasias, entre elas os LCCT, respostas anti-tumorais não só no local onde o tumor se apresentava, mas também nas células circulantes, como os LT e as CNK, dois grupos “major” da imunidade celular.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar os LT e as CNK do sangue periférico de doentes com LCCT, comparando com um grupo controlo, de forma a verificar se existia por parte destas últimas, evidência de resposta anti-tumoral, e se esta se poderia correlacionar com o estado e/ou prognóstico da doença.

Numa fase inicial, avaliou-se os principais parâmetros hematológicos de ambos os grupos, bem como as principais populações e subpopulações linfocitárias.

Na maioria dos parâmetros não se observaram diferenças significativas. A única diferença significativa encontrada refere-se ao número de linfócitos totais, consideravelmente menor nos doentes que nos dadores. Tal observação não é surpreendente, uma vez que o grupo de doentes padece de LCCT, doença caracterizada por uma acumulação de linfócitos na pele.

Em relação às populações (LT, LB e CNK) e subpopulações (LT CD4<sup>+</sup>, LT CD8<sup>+</sup>, CNK 56<sup>+</sup> e CNK 56<sup>++</sup>) linfocitárias, pode-se constatar que os dois grupos apresentavam percentagens semelhantes, e que estas estavam de acordo com as descritas na literatura. A única diferença significativa entre os dois grupos foi a percentagem das subpopulações das CNK: as CD56<sup>+</sup>, com funções de citotoxicidade, apresentavam uma percentagem superior nos doentes (97,1 vs 94,6) e conseqüentemente as CD56<sup>++</sup>, com funções imunoreguladoras, uma percentagem inferior (2,9 vs 5,4).

Com o objectivo de estudar as possíveis alterações imunofenotípicas que ocorrem nas CNK circulantes de indivíduos com LCCT, analisamos estas células por citometria de fluxo em ambos os grupos.

Nesta caracterização, para além dos marcadores típicos das CNK (CD16, CD56), avaliamos a expressão de alguns marcadores de activação, como o HLA-DR e o CD38, de alguns receptores “killer” (CD94) e de algumas moléculas de adesão (CD2, CD11b).

Estudos anteriores demonstraram que as CNK activadas expressam moléculas que estão ausentes (ou presentes em níveis muito baixos) nas CNK não activadas, e por outro lado podem apresentar aumento ou diminuição de vários receptores expressos constitutivamente nas CNK maduras (Jonges, Albertsson e col. 2001).

De acordo com a literatura, as CNK activadas podem apresentar de novo HLA-DR, CD19, CD40L, CD25 e CD132. A expressão de CD2, CD26, CD44, CD56 e CD58 pode aumentar, enquanto os níveis de CD7, CD11b, CD11c e CD16 podem diminuir (Levine and Ritz 1990; Rabinowich, Herberman e col. 1993; Rabinowich, Pricop e col. 1994; Yamabe, Takakura e col. 1997; Macias, Ballester e col. 2000)

Embora exista uma grande variabilidade inter-individual, de uma forma generalizada, pode-se afirmar que, numa pessoa saudável, as CNK circulantes CD56<sup>+</sup> apresentam o seguinte fenótipo: CD2<sup>-/+débil</sup>, CD7<sup>+forte</sup>, HLA-DR<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup> e CD38<sup>+</sup>. A expressão de CD11c e CD57 é heterogénea e variável (Lima, Teixeira e col., 2001).

Segundo Lima e col., os doentes com infecções crónicas e tumores apresentam, no sangue periférico, CNK cronicamente activadas com características fenóticas únicas: CD2<sup>+forte</sup>, CD7<sup>-/+débil</sup>, CD38<sup>-/+lo</sup> e CD11b<sup>-/+lo</sup>. A maioria destas CNK são negativas para o HLA-DR, expressam de forma homogénea CD57 e de forma variável e heterogénea CD11c (Lima, Almeida e col. 2004).

Neste trabalho, tal como descrito por vários autores, conseguimos observar que as CNK CD56<sup>+</sup> e CD56<sup>++</sup> apresentam características imunofenóticas distintas.

De acordo com os resultados obtidos, verificamos que praticamente todas as CNK exprimem CD2, CD7 e CD11b, embora as CNK CD56<sup>++</sup> apresentem intensidades médias de expressão superiores. Em relação ao CD57, mais de metade das CNK CD56<sup>+</sup> expressam este antigénio, enquanto nas CNK CD56<sup>++</sup> não está presente. A expressão de CD94 e de HLA-DR nas CNK CD56<sup>++</sup> foi maior do que nas CD56<sup>+</sup>.

Contudo, quando comparamos estas subpopulações de CNK nos doentes com LCCT e nos controlos não encontramos diferenças significativas em nenhum dos antigénios estudados.

Estas conclusões, de acordo com os poucos estudos realizados e com o que foi descrito anteriormente, são contraditórias, contudo tal facto pode dever-se a inúmeros aspectos.

Muitas das alterações que se observam nas CNK activadas dependem do tipo e intensidade do estímulo que está a provocar a activação.

No estudo de Lima e col., a amostra era constituída por pacientes com vários tipos de tumores, provavelmente em estados mais avançados, o que poderá explicar as alterações apresentadas. No nosso estudo, centramo-nos especificamente num grupo de neoplasias, LCCT, e em estados precoces, uma vez que a maioria dos nossos pacientes

se encontrava nos estadios I e II, o que poderá justificar, o facto das CNK circulantes destes doentes não se encontrarem activadas, já que o estímulo, que seria provocado pelas células tumorais na pele, pode não ser suficiente para provocar alterações significativas nas CNK do sangue periférico. Em estudos futuros, será importante realizar um estudo semelhante, mas analisando CNK localizadas nas zonas da pele afectadas, pois uma vez que se encontram mais próximas do estímulo, certamente apresentar-se-ão activadas.

Por outro lado, muitos estudos realizados nesta área, recorrem a CNK activadas *in vitro*. No nosso estudo, as células utilizadas foram provenientes do sangue periférico, e não foram submetidas a qualquer tipo de activação. As diferenças inerentes a uma activação *in vivo* e *in vitro*, podem justificar as alterações observadas nas CNK.

Em relação aos LT, o nosso objectivo neste trabalho foi, através do perfil fenotípico, quantificar alguns subgrupos com funções específicas. Deste modo, os anticorpos utilizados (CD25, CD45RO, CD56, CD57, CD127, CCR4, HLA-DR) permitiram a identificação dos LT: activados, citotóxicos, reguladores e de migração para a pele. Embora as diferenças encontradas não fossem suficientes para terem significado estatístico, em todos os subgrupos a percentagem de células positivas foi sempre superior nos doentes. Esta conclusão, por um lado, leva-nos a suspeitar que os LT estão a desenvolver uma resposta anti-tumoral, uma vez que os LT activados e citotóxicos se encontram aumentados. Porém, uma vez que os LT reguladores também se encontram em maior quantidade, faz-nos pensar exactamente no contrário.

O facto dos LT de migração para a pele estarem aumentados vai de encontro com vários autores, uma vez que nos LCCT, os LT malignos caracterizam-se por apresentarem marcadores para a pele, como o CCR4 e o antigénio associado aos linfócitos cutâneos (CLA) (Ferenczi, Fuhlbrigge e col. 2002; Yawalkar, Ferenczi e col. 2003).

Os estudos efectuados envolvendo LT circulantes nos LCCT, têm identificado uma grande variedade de alterações, que se tornam mais profundas nos estados mais avançados.

Asadullah e col. caracterizaram imunofenotipicamente os leucócitos circulantes de doentes com LCCT primários indolentes e verificaram um aumento do número de LT CD8<sup>+</sup> que expressavam antigénios de activação (HLA-DR) bem como CD11a (LFA-1) (Asadullah, Friedrich e col. 1997).

Estudos anteriores demonstraram que os LT activados, que expressavam CLA e CD11a estavam envolvidos na adesão e migração destas células para a pele. Por outro lado foi demonstrado que lesões da pele de pacientes com MF, que continham infiltrados

de LT CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> tinham um melhor prognóstico. Analisando estes dois aspectos, juntamente com as conclusões do seu trabalho, Assadulhah concluiu que as células HLA-DR<sup>+</sup> e CD11a<sup>+</sup> eram importantes na imunovigilância de dermatoses malignas como os LCCT.

Gilmore e col demonstraram que nos pacientes com LCCT se observava uma redução dos LT "virgens" (CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>) independente do estado da doença, duração e tratamento (Gilmore, Benson e col. 1991)

Num estudo mais recente, Jakob e col. investigaram a expressão de alguns marcadores nos LT periféricos em doentes com LCCT, dividindo-os de acordo com o estadio: LCCT precoce (estados I e II) e LCCT avançado (estado III e IV). Após a análise dos resultados, chegaram à conclusão que apenas nos estados mais avançados se observaram padrões distintos (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD7<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>), apresentando os estados precoces valores muito semelhantes aos indivíduos saudáveis (Jakob, Neuber e col. 1996).

Em relação à produção de citocinas pelos LT, foi demonstrado ser um evento essencial na maioria dos sistemas imunoreguladores, como é o caso da vigilância tumoral. Uma perturbação do padrão normal de citocinas, quer seja sub ou sobreexpressão pode levar a uma alteração da função imunológica normal.

Varios estudos demonstraram resultados controversos com respeito à produção de citocinas em doentes com LCCT. Por isso neste estudo resolvemos determinar a frequência de LT produtores de citocinas: tanto nos doentes com LCCT como nos controlos, quantificarmos os LT CD4<sup>+</sup> e os LT CD8<sup>+</sup> e procedemos a uma estimulação *in vitro* destas células, de forma a caracterizarmos a produção da citocina TNF- $\alpha$  por parte destas células.

A quantificação de citocinas pode ser determinada recorrendo a técnicas de ELISA, mRNA e citometria de fluxo. Neste caso recorreremos ao uso desta última, uma vez que de acordo com vários investigadores tem a vantagem de medir de uma forma rápida a produção de citocinas de milhares de células individuais, permitindo deste modo identificar a fonte celular da citocina.

Os resultados obtidos mostraram uma percentagem mais elevada de LT produtores de TNF- $\alpha$  nos doentes com LCCT, embora esta produção apenas foi significativamente superior à observada no grupo controlo, nos LT CD8<sup>+</sup>.

Muitos grupos de investigadores confirmaram que as células do sangue periférico de pacientes com LCCT produziam padrões anormais de citocinas, que poderiam relacionar-se com algumas das alterações imunes observadas ao longo da progressão da doença.

Vowels e col. utilizando sangue periférico de pacientes com SS, demonstraram que os LT produziam quantidades aumentadas de IL-4 e apresentavam uma deficiente capacidade em produzir IL-2 e IFN- $\gamma$ . Contudo quando se tratavam de doentes em remissão os níveis das citocinas eram muito semelhantes aos dos controlos (Vowels, Casin e col. 1992)

Dummer e col. recorrendo à técnica de ELISA, quantificaram a produção de IL-4, IL-6 e IFN- $\gamma$  pelos LT do sangue periférico de doentes com LCCT. A nível da produção de IL-6 não se observaram diferenças relativamente aos controlos, no entanto a nível da IL-4 verificou-se um aumento, contrariamente à IFN- $\gamma$  que diminuiu (Dummer, Kohl e col., 1993).

Outros estudos examinaram, nas lesões cutâneas o tipo de citocinas que os LT aí infiltrados produziam.

Saed e col. usando técnicas de biologia molecular, detectou mRNA de IL-4 e IL-5 no sangue e na pele de pacientes com SS, contudo em pacientes com MF apenas encontrou mRNA de IL-2 e IFN- $\gamma$ .

Hoppe e col. observaram em lesões precoces de LCCT, infiltrados abundantes de LT citotóxicos CD8<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  (Hoppe, Medeiros e col. 1995).

Tendo em consideração todos estes estudos, Rook e Heald concluíram que existiam fortes evidências para afirmar que as células malignas dos LCCT são do tipo Th2 e que os LTh1 em circulação e presentes nas lesões representam LT com resposta anti-tumoral (Rook and Heald, 1995).

Em resumo, neste trabalho não conseguimos identificar, através do perfil imunofenotípico, a existência, por parte das CNK e dos LT circulantes, de uma resposta anti-tumoral.

A discrepância entre os nossos resultados e os de outros estudos pode ser devido ao carácter heterogéneo deste grupo de patologias. No caso da MF, para um mesmo estadiamento existem pacientes com apresentações clínicas muito diversas do ponto de vista de comportamento biológico, que apresentam evoluções diferentes em relação às respostas terapêuticas, intervalo livre de doença e tempo de sobrevida.

Por outro lado, o facto de a maioria da nossa amostra ser constituída por doentes com estados iniciais da doença, pode explicar estas diferenças, e levamos a suspeitar que provavelmente só em estados mais avançados é que se observam de uma forma generalizada, alterações no fenótipo.

A dimensão da nossa amostra é outro aspecto que não podemos deixar de referir, uma vez que apresenta um número reduzido de doentes e de controlos.

Desta forma seria importante continuar o estudo, aumentando a amostra e incluindo um maior número de doentes em estadios III e IV.

Ao nível da produção de citocinas, em particular do TNF- $\alpha$  nos LT CD8<sup>+</sup>, parece existir nos doentes com LCCT uma resposta anti-tumoral, uma vez que a produção desta citocina se encontra aumentada, contudo estudos com uma dimensão da amostra maior serão necessários para confirmar esta conclusão.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## Referências Bibliográficas

Aaltomaa, S; Lipponen, P; Eskelinen, M; Kosma, VM; Marin, S; Alhava, E e col. (1992). Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast câncer. Eur J Cancer; 28:859-864.

Albertsson, PA; Basse, PH; Hokland, M; Goldfarb, RH; Nagelkerke, JF; Nannmark, U e col. (2003). NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. Trends Immunol; 24(11):603-9.

Algarra, I; García-Lora, A; Cabrera, T; Ruiz-Cabello, F; Garrido, F. (2004). The selection of tumor variants with altered expression of classical and non-classical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. Cancer Immunol Immunother; 53 (10): 904-10

Arosa, FA; Cardoso, EM. (2007). Linfócitos T. In: Arosa, FA; Cardoso, EM; Pacheco, FC, editores. Fundamentos de Imunologia. Lisboa: Lidel, edições técnicas Lda; 123-145.

Asadullah, K; Friedrich, M; Döcke, WD; Jahn, S; Volk, HD; Sterry, W. (1997). Enhanced expression of T-cell activation and natural killer cell antigens indicates systemic anti-tumor response in early primary cutaneous T-cell lymphoma. J Invest Dermatol; 108(5):743-7.

Bagot, M; Nikolova, M; Schirm-Chabanette, F; Wechsler, J; Bousmell, L; Bensussan, A. (2001). Crosstalk between tumor T lymphocytes and reactive T lymphocytes in cutaneous T cell lymphomas. Ann N Y Acad Sci; 941:31-8.

Balkwill, F. (2004) Cancer and the chemokine network. Nat Rev Cancer; 4(7):540-50.

Bartholeyns, J. (1993). Monocytes and macrophages in cancer immunotherapy. Res Immunol; 144(4):288-91

Baykal, C; Büyükbabani, N; Kaymaz, R. (2002). Familial mycosis fungoides. *Br J Dermatol*; 146(6):1108-10.

Becknell B, Caligiuri MA. (2008). Natural killer cells in innate immunity and cancer. *J Immunother*; 31(8):685-92.

Berger, CL; Tigelaar, R; Cohen, J; Mariwalla, K; Trinh, J; Wang, N e col. (2005). Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells. *Blood*; 105(4):1640-7.

Biassoni R. (2009). Human natural killer receptors, co-receptors, and their ligands. *Curr Protoc Immunol*; 14:14-10.

Biassoni, R; Cantoni, C; Marras, D; Giron-Michel, J; Falco, M; Moretta, L e col. (2003). Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure. *J Cell Mol Med*; 7(4):376-87.

Biron, CA; Brossay, L. (2001). NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol*; 13(4):458-64.

Boon, T; Cerottini, JC; Van den Eynde, B; van der Bruggen, P; Van Pel, A. (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Ann Ver Immunol*; 12:337-365.

Bouaziz, JD; Ortonne, N; Giustiniani, J; Schiavon, V; Huet, D; Bagot, M e col. (2005). Circulating natural killer lymphocytes are potential cytotoxic effectors against autologous malignant cells in sezary syndrome patients; 125(6):1273-8.

Brittenden, J; Heys, SD; Ross, J; Eremin, O. (1996). Natural killer cells and cancer. *Cancer*; 77(7):1226-43.

Brutkiewicz, RR; Sriram, V. (2002). Natural killer T (NKT) cells and their role in antitumor immunity. *Crit Rev Oncol Hematol*; 41(3):287-98.

Bunn, PA Jr; Lamberg, SI. (1979). Report of the committee on staging and classification of cutaneous T-cell lymphomas. *Cancer Treat Rep*; 63(4): 725-8.

Burg, G; Kempf, W. (2005). Epidemiology. In: Burg, G; Kempf, W; editors. Cutaneous Lymphomas 1st ed. New York: Taylor & Francis Group; 13-19.

Burg, G; Kempf, W; Dummer, R; Kazakov, DV; Nestle, FO; Cozzio, A. (2005). Etiology and pathogenesis of cutaneous lymphomas. In: Burg, G; Kempf, W; editors. Cutaneous Lymphomas 1st ed. New York: Taylor & Francis Group; 461-474.

Burnet, FM. (1970). The concept of immunological surveillance. Prog Exp Tumor Res; 13:1-27.

Caligiuri, MA. (2008). Human natural killer cells. Blood; 112(3):461-9.

Carding, SR; Egan, PJ. (2002). Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. Nat Rev Immunol; 2(5):336-45.

Carlsten M, Malmberg KJ, Ljunggren HG. (2009). Natural killer cell-mediated lysis of freshly isolated human tumor cells. Int J Cancer; 124(4): 757-62

Chambers, WH; Brissette-Storkus, CS. (1995). Hanging in the balance: natural killer cell recognition of target cells. Chem Biol; 2(7):429-35.

Chang, YT; Liu, HN; Chen, CL; Chow, KC. (1998). Detection of Epstein-Barr vírus and HTLV-I in T-cell lymphomas of skin in Taiwan.

Chong, BF; Wilson, AJ; Gibson, HM; Hafner, MS; Luo, Y; Hedgcock, CJ e col. (2008). Immune function abnormalities in peripheral blood mononuclear cell cytokine expression differentiates stages of cutaneous T-cell lymphoma/mycosis fungoides. Clin Cancer Res; 14(3):646-53.

Chung JW, Yoon SR, Choi I. (2008). The regulation of NK cell function and development. Front Biosci; 1(13):6432-42

Colonna, M. (2008). NK cells: new issues and challenges. Eur J Immunol; 38(11):2927-9.

Cooper, MA; Fehniger, TA; Caligiuri, MA. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol; 22(11):633-40.

Cooper, MA; Fehniger, TA; Turner, SC; Chen, KS; Ghaheri, BA; Ghayur, T e col. (2001). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*; 97(10):3146-51.

Costello, RT; Fauriat, C; Sivori, S; Marcenaro, E; Olive, D. (2004). NK cells: innate immunity against hematological malignancies? *Trends Immunol*; 25(6):328-33.

Criscione, VD; Weinstock, MA. (2007). Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973-2002. *Arch Dermatol*; 143:854-59.

Crowley, JJ; Nikko, A; Varghese, A; Hoppe, RT; Kim, YH. (1998). Mycosis fungoides in young patients: clinical characteristics and outcome. *J Am Acad Dermatol*; 38(5):696-701.

Davies, DH. (2008). Immune system. In: *Encyclopedia of life sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

Di Santo JP. (2008). Functionally distinct NK-cell subsets: developmental origins and biological implications. *Eur J Immunol*; 38(11): 2948-51.

Dummer, R. (2006). Future perspectives in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Semin Oncol*; 33(1):S33-6.

Dummer, R; Cozzio, A; Urosevic, M. (2006). Pathogenesis and therapy of cutaneous lymphomas--progress or impasse? *Exp Dermatol*; 15(5):392-400.

Dummer, R; Kohl, O; Gillessen, J; Kagi, M; Burg, G. (1993). Peripheral blood mononuclear cells in patients with nonleukemic cutaneous T-cell lymphoma. Reduced proliferation and preferential secretion of a T-helper-2-like cytokine pattern on stimulation. *Arch Dermatol*; 129:433-36.

Duvic M, Foss FM. (2007). Mycosis fungoides: pathophysiology and emerging therapies. *Semin Oncol*; 34(6):S21-8.

Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned.Tijdschr. Geneesk*; 5:273-290.

Engle, SJ; Hoying, JB; Boivin, GP; Ormsby, I; Gartside, PS; Doetschman, T. (1999). Transforming growth factor beta1 suppresses nonmetastatic colon cancer at an early stage of tumorigenesis. *Cancer Res*; 59:3379–86.

Farag, SS; Caligiuri, MA. (2006). Human natural killer cell development and biology. *Blood*; 20(3):123-37.

Farag, SS; Fehniger, TA; Ruggeri, L; Velardi, A; Caligiuri, MA. (2002). Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*; 100(6):1935-47.

Fehniger, TA; Cooper, MA; Nuovo, GJ; Cella, M; Facchetti, F; Colonna, M e col. (2003). CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*; 101(8):3052-7.

Ferenczi, K; Fuhlbrigge, RC; Pinkus, J; Pinkus, GS; Kupper, TS. (2002). Increased CCR4 expression in cutaneous T cell lymphoma. *J Invest Dermatol*; 119(6):1405-10.

Finn OJ. (2008). Cancer immunology. *N Engl J Med*; 358(25):2704-15

Fischer, TC; Gellrich, S; Muche, JM; Sherev, T; Audring, H; Neitzel, H e col. (2004). Genomic aberrations and survival in cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol*; 122(3):579-86.

Foss, FM. (2002). Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin Oncol*; 29(3 Suppl 7):5-11.

Frey, AB; Monu, N. (2008). Signaling defects in anti-tumor T cells. *Immunol Rev*; 222:192-205.

Gallimore, A; Godkin, A. (2008). Regulatory T cells and tumour immunity - observations in mice and men. *Immunology*; 123(2):157-63.

Geskin, L. (2007). ECP versus PUVA for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Skin Therapy Lett*; 12(5):1-4.

Ghoreschi, K; Thomas, P; Breit, S; Dugas, M; Mailhammer, R; van Eden, W e col. (2003). Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nat Med*; 9(1):40-6.

Gilboa, E. (1999). The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity*; 11(3):263-70

Gilmore, SJ; Benson, EM; Kelly, JW. (1991). T-cell subsets with naive phenotype are selectively decreased in the peripheral blood of patients with mycosis fungoides. *J Invest Dermatol*; 96:50-56.

Girardi, M. (2006). Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *J Invest Dermatol*; 126(1):25-31.

Graziano, DF; Finn, OJ. (2005). Tumor antigens and tumor antigen discovery. *Cancer Treat Res*; 123:89-111.

Guitart, J. (2006). What's new in cutaneous T-cell lymphomas: 2006. *Semin Cutan Med Surg*; 25(2):87-90.

Haanen, JB; Baars, A; Gomez, R; Weder, P; Smits, M; de Gruijl, TD e col. (2006). Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother*; 55:451-458.

Hallett, WH; Murphy, WJ. (2004). Natural killer cells: biology and clinical use in cancer therapy. *Cell Mol Immunol*; 1(1):12-21.

Hayday AC. (2000). [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol*; 18:975-1026.

Honeyman, MC; Harrison, LC. (2004). Immunity: humoral and cellular. In: *Encyclopedia of life sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

Hoppe RT, Medeiros LJ, Warnke RA, Wood GS. (1995). CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes influence the long-term survival of patients with mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol*; 32(3):448-53.

Houghton, AN. (1994). Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. *J Exp Med*; 180(1):1-4.

Houghton, NA; Guevara-Patiño, JA. (2004). Immune recognition of self in immunity against cancer. *J Clin Invest*; 114(4):468-71

Horwitz SM. (2008). Novel therapies for cutaneous T-cell lymphomas. *Clin Lymphoma Myeloma*; 8:187-92.

Hwang, ST; Janik, JE; Jaffe, ES; Wilson, WH. (2008). Mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Lancet*; 371(9616):945-57.

Hymes, KB. (2007). Choices in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Oncology (Williston Park)*; 21(2):18-23.

Inman, BA; Frigola, X; Dong, H; Kwon, ED. (2007). Costimulation, coinhibition and cancer. *Curr Cancer Drug Targets*; 7(1):15-30.

Inngjerdigen, M; Damaj, B; Maghazachi, AA. (2001). Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood*; 97(2):367-75.

Jaffe, ES. (2006). Pathobiology of peripheral T-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*; 317-22.

Jaffe, ES; Harris, NL; Stein, H; Vardiman, JW; eds. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC press, 2001

Jakob, T; Neuber, K; Altenhoff, J; Kowalzik, L; Ring, J. (1996). Stage-dependent expression of CD7, CD45RO, CD45RA and CD25 on CD4-positive peripheral blood T-lymphocytes in cutaneous T-cell lymphoma. *Acta Derm Venereol*; 76:34-36.

Jonges, LE; Albertsson, P; van Vlierberghe, RL; Ensink, NG; Johansson, BR; van de Velde, CJ e col. (2001). The phenotypic heterogeneity of human natural killer cells: presence of at least 48 different subsets in the peripheral blood. *Scand J Immunol*; 53(2):103-10.

Kallinich, T; Muche, JM; Qin, S; Sterry, W; Audring, H; Kroczeck, RA. (2003). Chemokine receptor expression on neoplastic and reactive T cells in the skin at different stages of mycosis fungoides. *J Invest Dermatol*; 121(5):1045-52.

Kamarashev, J; Burg, G; Mingari, MC; Kempf, W; Hofbauer, G; Dummer R. (2001). Differential expression of cytotoxic molecules and killer cell inhibitory receptors in CD8+ and CD56+ cutaneous lymphomas. *Am J Pathol*; 158(5):1593-8.

Kaplan, DH; Shankaran, V; Dighe, AS; Stockert, E; Aguet, M; Old, LJ e col. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci*; 95:7556-7561.

Karenko, L; Hahtola, S; Ranki, A. (2007). Molecular cytogenetics in the study of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL). *Cytogenet Genome Res*; 118(2-4):353-61.

Kazakov, DV; Burg, G; Kempf, W. (2005). Mycosis fungoides. In: Burg, G; Kempf, W; editors. *Cutaneous Lymphomas* 1st ed. New York: Taylor & Francis Group; 101-112.

Keehn, CA; Belongie, IP; Shistik, G; Fenske, NA; Glass, LF. (2007). The diagnosis, staging, and treatment options for mycosis fungoides. *Cancer Control*; 14(2):102-11.

Kempf, W; Kazakov, DV; Burg, G. (2005). Sézary syndrome. In: Burg, G; Kempf, W; editors. *Cutaneous Lymphomas* 1st ed. New York: Taylor & Francis Group; 153-161.

Kiessling, R; Wasserman, K; Horiguchi, S; Kono, K; Sjoberg, J; Pisa, P e col. (1999). Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer Immunol Immunother*; 48:353-62.

Kikuchi, A; Nishikawa, T; Ikeda, Y; Yamaguchi, K. (1997). Absence of human T-lymphotropic virus type I in Japanese patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*; 89:1529-1532.

Kim, EJ; Hess, S; Richardson, SK; Newton, S; Showe, LC; Benoit, BM e col. (2005). Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest*; 115(4):798-812.

Kim, YH; Chow, S; Varghese, A. (1999). Clinical characteristics and long-term outcome of patients with generalized patch and/or plaque mycosis fungoides. *Arch Dermatol*; 135:26-32.

Kim, YH; Liu, HL; Mraz-Gernhard, S; Varghese, A; Hoppe, RT. (2003). Long-term outcome of 525 patients with mycosis fungoides and Sezary syndrome: clinical prognostic factors and risk for disease progression. *Arch Dermatol*; 139(7):857-66.

Klaus, G. (2001). Lymphocytes. In: *Encyclopedia of life sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

Koh, HK; Charif, M; Weinstock, MA. (1995). Epidemiology and clinical manifestations of cutaneous T-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*; 9:943-960.

Kuzel, TM; Roenigk, HH; Jr, Rosen, ST. (1991). Mycosis fungoides and the Sézary syndrome: a review of pathogenesis, diagnosis, and therapy. *J Clin Oncol*; 9(7):1298-313.

Lanier, LL. (1998). NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*; 16:359-93.

Lanier, LL. (2005). NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*; 23:225-74.

Lee, BN; Duvic, M; Tang, CK; Bueso-Ramos, C; Estrov, Z; Reuben, JM. (1999). Dysregulated synthesis of intracellular type 1 and type 2 cytokines by T cells of patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Diagn Lab Immunol*; 6(1):79-84

Lima, M; Almeida, J; dos Anjos Teixeira, M; Queirós, ML; Justiça, B; Orfão A. (2002). The "ex vivo" patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR expression identify acute/early and chronic/late NK-cell activation states. *Blood Cells Mol Dis*; 28(2):181-90.

Li, G; Vowels, BR; Benoit, BM; Rook, AH; Lessin, SR. (1996). Failure to detect human T-lymphotropic virus-I proviral DNA in cell lines and tissues from patients with cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*; 107:308-313.

Lima, M; Almeida, J; Teixeira, MA; Santos, AH; Queirós, ML; Fonseca, S e col. (2004). Reactive phenotypes after acute and chronic NK-cell activation. *J Biol Regul Homeost Agents*; 18(3-4):331-4.

Lima, M; Teixeira, MA; Queirós, ML; Leite, M; Santos, AH; Justiça, B e col. (2001). Immunophenotypic characterization of normal blood CD56+lo versus CD56+hi NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties. *Blood Cells Mol Dis*; 27(4):731-43.

Lorincz, AL. (1996). Cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides) *Lancet*; 347(9005):871-6.

Lotzova, E. (1993). Definition and functions of natural killer cells. *Nat Immun*; 12:169-76.

Loza, MJ; Perussia, B. (2004). The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions. *J Immunol*; 172(1):88-96.

Lynch, SA; Houghton AN. (1993). Cancer immunology. *Curr Opin Oncol*; 5(1):145-50.

Macías, C; Ballester, JM; Hernández, P. (2000). Expression and functional activity of the very late activation antigen-4 molecule on human natural killer cells in different states of activation. *Immunology*; 100(1):77-83.

Malmberg, KJ; Ljunggren, HG. (2006). Escape from immune- and nonimmune-mediated tumor surveillance. *Semin Cancer Biol*; 16(1):16-31.

Mao, X; Lillington, D; Scarisbrick, JJ; Mitchell, T; Czepulkowski, B; Russell-Jones, R e col. (2002). Molecular cytogenetic analysis of cutaneous T-cell lymphomas: identification of common genetic alterations in Sézary syndrome and mycosis fungoides. *Br J Dermatol*; 147(3):464-75.

Mao, X; Orchard, G; Lillington, DM; Russell-Jones, R; Young, BD; Whittaker, SJ. (2003). Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*; 101(4):1513-9.

Mapara, MY; Sykes, M. (2004). Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol*; 22: 1136-51.

Massone, C; Chott, A; Metze, D; Kerl, K; Citarella, L; Vale, E; Kerl, H; Cerroni, L. (2004). Subcutaneous, blastic natural killer (NK), NK/T-cell, and other cytotoxic lymphomas of the skin: a morphologic, immunophenotypic, and molecular study of 50 patients. *Am J Surg Pathol*; 28(6):719-35.

Makrigiannis, AP; Anderson, SK. (2003). Regulation of natural killer cell function. *Cancer Biol Ther*; 2(6):610-6.

Moser, B; Willmann, K. (2004). Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis*; 63 Suppl 2:ii84-ii89.

Masopust, D; Vezys, V; Wherry, EJ; Ahmed, R. (2007). A brief history of CD8 T cells. *Eur J Immunol*; 37 Suppl 1:S103-10.

Miller, JS. (2002). Biology of natural killer cells in cancer and infection. *Cancer Invest*; 20(3): 405-19.

Morales Suarez-Varela, MM; Llopis Gonzalez, A; Marquina Vila, A; Bell, J. (2000). Mycosis fungoides: review of epidemiological observations. *Dermatology*; 201:21-28.

Moretta, L; Ciccone, E; Mingari, MC; Biassoni, R; Moretta, R. (1994). Human natural killer cells: origin, clonality, specificity and receptors. *Adv Immunol*; 155:341-80.

Muche, JM; Lukowsky, A; Asadullah, K; Gellrich, S; Sterry, W. (1997). Demonstration of frequent occurrence of clonal T cells in the peripheral blood of patients with primary cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*; 90(4):1636-42.

Naito, Y; Saito, K; Shiiba, K; Ohuchi, A; Saigenji, K; Nagura, H e col. (1998). CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res*; 58:3491-4.

Naftzger, C; Houghton, AN. (1991). Tumor immunology. *Curr Opin Oncol*; 3(1):93-9.

Nikolova, M; Bagot, M; Boumsell, L; Bensussan, A. (2002). Identification of cell surface molecules characterizing human cutaneous T-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma*; 43(4):741-6

Olsen, E; Vonderheid, E; Pimpinelli, N; Willemze, R; Kim, Y; Knobler, R e col. (2007). Pittelkow, M; Bernengo, MG; Sterry, W; Laroche, L; Trautinger, F; Whittaker, S; ISCL/EORTC. 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*; 110(6):1713-22.

Pancake, BA; Wassef, EH; Zucker-Franklin, D. (1996). Demonstration of antibodies to human T-cell lymphotropic vírus-I tax in patients with cutaneous T-cell lymphoma, mycosis fungoides, who are seronegative for antibodies to the structural proteins of the vírus. *Blood*; 88:3004-3009.

Papadavid, E; Economidou, J; Psarra, A; Kapsimali, V; Mantzana, V; Antoniou, C e col. (2003). The relevance of peripheral blood T-helper 1 and 2 cytokine pattern in the evaluation of patients with mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Br J Dermatol*; 148(4):709-18.

Paulli, M; Berti, E. (2004). Cutaneous T-cell lymphomas (including rare subtypes). Current concepts. II. *Haematologica*; 89(11):1372-88.

Penn, I. (1996). Malignant melanoma in organ allograft recipients. *Transplantation*; 61:274-8.

Penn, I. (1999). Posttransplant malignancies. *Transplant Proc*;31:1260–2.

Pham, SM; Kormos, RL; Landreneau, RJ; Kawai, A; Gonzalez-Cancel, I; Hardesty, RL; Hattler, BG; Griffith, BP. (1995). Solid tumors after heart transplantation: lethality of lung cancer. *Ann Thorac Surg*; 60:1623–6.

Prince, HM; O'Keefe, R; McCormack, C; Ryan, G; Turner, H; Waring, P e col. (2002). Cutaneous lymphomas: wich pathological classification? *Pathology*; 34:36-45.

Rabinowich, H; Herberman, RB; Whiteside, TL. (1993). Differential effects of IL12 and IL2 on expression and function of cellular adhesion molecules on purified human natural killer cells. *Cell Immunol*; 152(2):481-98.

Rabinowich, H; Pricop, L; Herberman, RB; Whiteside, TL. (1994). Expression and function of CD7 molecule on human natural killer cells. *J Immunol*; 152(2):517-26.

Radaev, S; Sun, PD. (2003). Structure and function of natural killer cell surface receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*; 32:93-114.

Rivoltini L, Canese P, Huber V, Iero M, Pilla L, Valenti R e col. (2005). Escape strategies and reasons for failure in the interaction between tumour cells and the immune system: how can we tilt the balance towards immune-mediated cancer control? *Expert Opin Biol Ther*; 5(4):463-76.

Robert, C; Kupper, TS. (1999). Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med*; 341(24):1817-28.

Robertson, MJ; Ritz, J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*; 76(12):2421-38.

Rook, AH; Heald, P. (1995). The immunopathogenesis of cutaneous T-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*; 9(5):997-1010.

Rosen, ST; Querfeld, C. (2006). Primary cutaneous T-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*; 513:323-30.

Rosenberg, SA. (1999). A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity*; 10(3):281-7

Rubin B. (2009). Natural immunity has significant impact on immune responses against cancer. *Scand J Immunol*; 69(3):275-90.

Saed G, Fivenson DP, Naidu Y, Nickoloff BJ. (1994). Mycosis fungoides exhibits a Th1-type cell-mediated cytokine profile whereas Sezary syndrome expresses a Th2-type profile. *J Invest Dermatol*; 103(1):29-33.

Sahin, U; Tureci, O; Pfreundschuh, M. (1997). Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol*; 9(5):709-16

Sakaguchi, S; Wing, K; Miyara, M. (2007). Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol*; 37 Suppl 1:S116-23.

Santucci, M; Pimpinelli, N; Massi, D; Kadin, ME; Meijer, CJ; Müller-Hermelink, HK e col. (2003). EORTC Cutaneous Lymphoma Task Force. Cytotoxic/natural killer cell cutaneous lymphomas. Report of EORTC Cutaneous Lymphoma Task Force Workshop. *Cancer*; 97(3):610-27.

Scarisbrick, JJ; Mitchell, TJ; Calonje, E; Orchard, G; Russell-Jones, R; Whittaker, SJ. (2003). Microsatellite instability is associated with hypermethylation of the hMLH1 gene and reduced gene expression in mycosis fungoides. *J Invest Dermatol*; 121(4):894-901.

Schmitt, C; Ghazi, B; Bensussan, A. (2008). NK cells and surveillance in humans. *Reprod Biomed Online*; 16(2):192-201.

Sedlmayr, P; Schallhammer, L; Hammer, A; Wilders-Truschnig, M; Wintersteiger, R; Dohr, G. (1996). Differential phenotypic properties of human peripheral blood CD56<sup>dim+</sup> and CD56<sup>bright+</sup> natural killer cell subpopulations. *Int Arch Allergy Immunol*; 110:308-313.

Seliger, B. (2005). Strategies of tumor immune evasion. *BioDrugs*; (6):347-54.

Smith, BD; Wilson, LD. (2007). Cutaneous lymphomas. *Semin Radiat Oncol*; 17(3):158-68.

Smyth, MJ; Dunn, GP; Schreiber, RD. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol*; 90:1–50.

Smyth, MJ; Thia, KY; Street, SE; MacGregor, D; Godfrey, DI; Trapani, JA. (2000). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med*; 192:755–760.

Stagg, J; Johnstone, RW; Smyth, MJ. (2007). From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy. *Immunol*; 20:82-101.

Sterry, W. (2007). Cutaneous T-cell lymphoma: molecular and cytogenetic findings. *Oncology (Williston Park)*; 21(2 Suppl 1):13-7

Street, SE; Trapani, JA; MacGregor, D; Smyth, MJ. (2002). Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med*; 196:129–34.

Stuge, TB; Holmes, SP; Saharan, S; Tuettenberg, A; Roederer, M; Weber, JS; Lee, PP. (2004). Diversity and recognition efficiency of T cell responses to cancer. *PLoS Med*; 1(2):e28.

Swann, JB; Smyth, MJ. (2007). Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*; 117(5):1137-46.

Tada, T; Ohzeki, S; Utsumi, K; Takiuchi, H; Muramatsu, M; Li, XF; Shimizu, J; Fujiwara, H; Hamaoka, T. (1991). Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function: susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol*; 146 (3): 1077-82.

Teicher BA. (2007). Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res*; 13:6247-51.

Terabe, M; Berzofsky, JA. (2004). Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr Opin Immunol*; 16(2):157-62.

Teicher BA. (2007). Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin Cancer Res*; 13:6247-51.

Thomas, L. (1959). Cellular and humoral aspects of the hypersensitived states. New York: Hoeber-Harper; 529-532.

Timonen, T. (1997). Natural killer cells: endothelial interactions, migration, and target cell recognition. *J Leukoc Biol*; 62(6):693-701.

Tracey, L; Villuendas, R; Dotor, AM; Spiteri, I; Ortiz, P; Garcia, JF; Peralto, JL; Lawler, M; Piris, MA. (2003). Mycosis fungoides shows concurrent deregulation of multiple genes involved in the TNF signaling pathway: an expression profile study. *Blood*; 102(3):1042-50.

Trapani, JA; Smyth, MJ. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*; 2:735-47.

Trautinger, F; Knobler, R; Willenze, R; Peris, K; Stadler, R; Laroche, L; D'Incan, M; Ranki, A; Pimpinelli, N; Ortiz-Romero, P; Dummer, R; Estrach, T; Whittaker, S. (2006). EORTC consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/Sézary syndrome. *Eur J Cancer*; 42:1014-30.

Tsuchiyama, J; Yoshino, T; Toba, K; Harada, N; Nishiuchi, R; Akagi, T; Furukawa, T; Takahashi, M; Fuse, I; Aizawa, Y; Harada, M. (2002). Induction and characterization of cutaneous lymphocyte antigen on natural killer cells. *Br J Haematol*; 118(2):654-62.

Todd, I. (2005). Cells of the immune system. In: *Encyclopedia of life sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

Tuyp, E; Burgoyne, A; Aitchison, T; Mackie, R. (1987). A case-control study of possible causative factors in mycosis fungoides. *Arch Dermatol*; 123:196-200.

Van den Eynde, BJ; Boon, T. (1997). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int J Clin Lab Res*; 27(2):81-6.

van Doorn, R; Dijkman, R; Vermeer, MH; Out-Luiting, JJ; van der Raaij-Helmer, EM; Willemze, R e col. (2004). Aberrant expression of the tyrosine kinase receptor EphA4 and the transcription factor twist in Sézary syndrome identified by gene expression analysis. *Cancer Res*; 64(16):5578-86.

van Doorn, R; Van Haselen, CW; van Voorst Vader, PC; Geerts, ML; Heule, F; de Rie, M; Steijlen, PM e col. (2000). Mycosis fungoides: disease evolution and prognosis of 309 Dutch patients. *Arch Dermatol*; 136(4):504-10.

Vergier, B; de Muret, A; Beylot-Barry, M; Vaillant, L; Ekouevi, D; Chene, G; Carlotti, A e col. (2000). Transformation of mycosis fungoides: clinicopathological and prognostic features of 45 cases. French Study Group of Cutaneous Lymphomas. *Blood*; 95(7):2212-8.

Vowels, BR; Cassin, M; Vonderheid, EC; Rook, AH. (1992). Aberrant cytokine production by Sezary syndrome patients: cytokine secretion pattern resembles murine Th2 cells. *J Invest Dermatol*; 99:90-94.

Waldhauer I, Steinle A.(2008). NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*; 27(45): 5932-43.

Wallace, ME; Smyth, MJ. (2005). The role of natural killer cells in tumor control--effectors and regulators of adaptive immunity. *Springer Semin Immunopathol*; 27(1):49-64.

Weinstock, MA. (1994). Epidemiology of mycosis fungoides. *Semin Dermatol*; 13:154-159.

Whittemore, AS; Holly, EA; Lee, IM; Abel, EA; Adams, RM; Nickoloff, BJ e col. (1989). Mycosis fungoides in relation to environmental exposures and immune response: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*; 81:1560-1567.

Whiteside, TL; Herberman, RB. (1994). Role of human natural killer cells in health and disease. *Clin Diagn Lab Immunol*; 1(2):125-33.

Whittaker, S. (2006). Biological insights into the pathogenesis of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL). *Semin Oncol*; 33(1 Suppl 3):S3-6.

Whittaker, SJ; Luzzatto, L. (1993). HTLV-1 provirus and mycosis fungoides. *Science*; 259:1470-1471.

Willemze, R. (2003). Cutaneous T-cell lymphoma: epidemiology, etiology, and classification. *Leuk Lymphoma*; 44 Suppl 3:S49-54.

Willemze, R; Jaffe, ES; Burg, G; Cerroni, L; Berti, E; Swerdlow, SH e col. (2005). WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*; 105(10):3768-85.

Willemze, R; Kerl, H; Sterry, W; Berti, E; Cerroni, L; Chimenti, S e col. (1997). EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood*; 90(1):354-71.

Willenze, R; Meijer, CJ. (2006). Classification of cutaneous T-cell lymphoma: from Alibert to WHO-EORTC. *J Cutan Pathol*; 33(1):18-26.

Wodnar-Filipowicz, A; Kalberer, CP. (2006). Function of natural killer cells in immune defence against human leukaemia. *Swiss Med Wkly*; 136(23-24):359-64.

Wood, GS; Salvekar, A; Schaffer, J; Crooks, CF; Henghold, W; Fivenson, DP e col. (1996). Evidence against a role for human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in the pathogenesis of American cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*; 107(3):301-7.

Yamabe, T; Takakura, K; Sugie, K; Kitaoka, Y; Takeda, S; Okubo, Y; Teshigawara, K; Yodoi, J; Hori, T.(1997). Induction of the 2B9 antigen/dipeptidyl peptidase IV/CD26 on human natural killer cells by IL-2, IL-12 or IL-15. *Immunology*; 91(1):151-8.

Yawalkar, N; Ferenczi, K; Jones, DA; Yamanaka, K; Suh, KY; Sadat, S; Kupper, TS. (2003). Profound loss of T-cell receptor repertoire complexity in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*; 102(12):4059-66.

Yoon, SR, Chung, JW; Choi, I. (2007). Development of natural killer cells from hematopoietic stem cells. *Mol Cells*; 24(1):1-8.

Zackheim, H; Amin, S; Kashani-Sabet, M; McMilan, A. (1999). Prognostic in cutaneous T-cell lymphoma by skin stage: long term survival in 489 patients. *J Am Acad Dermatol*; 40:418-25.

Zhang, L; Conejo-Garcia, JR; Katsaros, D; Gimotty, PA; Massobrio, M; Regnani, G; Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. (2003) Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*; 348:203–13.

Zucker-Franklin, D. (2001). The role of human T cell lymphotropic vírus type I tax in the development of cutaneous T cell lymphoma. *Ann N Y Acad Sci*; 941:86-96.