



**Ana Alexandra
Festas Lopes**

**Estudo funcional das células T de gânglio
normal/reactivo e com doença linfoproliferativa
crónica de células B**

**Functional study of T cells in normal/reactive lymph
node and with B-cell chronic lymphoproliferative
disorder**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2015/2016

Ana Alexandra
Festas Lopes

Estudo funcional das células T de gânglio normal/reactivo e com doença linfoproliferativa crónica de células B

Functional study of T cells in normal/reactive lymph node and with B-cell chronic lymphoproliferative disorder

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica com especialização em Bioquímica Clínica, realizada sob orientação do Professor Doutor Artur Augusto Paiva, Coordenador da Unidade de Gestão Operacional de Citometria do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, e da Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira, Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais e irmão.

O júri

Presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor auxiliar no Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Artur Augusto Paiva
Coordenador da Unidade de Gestão Operacional de Citometria do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Prof. Doutora Catarina Isabel Batista Geraldês dos Santos
Assistente Hospitalar Graduada no CHUC, HUC
Assistente convidada da FMUC

Agradecimentos

Muito obrigada ao Professor Doutor Artur Paiva por todo o conhecimento transmitido, disponibilidade e por toda a exigência imposta para que tudo corresse sempre pelo melhor.

Obrigada à Professora Doutora Rita Ferreira por toda a preocupação, ajuda e orientação.

Obrigada a toda a equipa da Unidade de Gestão Operacional de Citometria por toda a ajuda, carinho e simpatia, em especial para à Isabel Silva e à Susana Pedreiro, por toda a disponibilidade, conselhos e ensinamentos.

Muito obrigada à Dr. Margarida Coucelo do laboratório de Hemato-oncologia do Hospital Pediátrico de de Coimbra.

Agradeço à Cátia, à Catarina e à Sofia por todos os momentos passados, companheirismo e entreajuda. Sem elas este percurso não seria a mesma coisa, certamente.

Ao Gonçalo, um obrigada muito especial pela paciência e incentivo para enfrentar todos os obstáculos.

Por último, mas não menos importante, um agradecimento à minha família, pais, irmão, madrinha e avós por toda a coragem e força que sempre me transmitiram para alcançar esta meta.

Palavras-chave

gânglio linfático; célula T; doenças linfoproliferativas crônicas de células B; linfoma linfocítico/LLC-B; linfoma não-hodgkin B.

Resumo

As doenças linfoproliferativas crônicas de células B são um grupo heterogêneo de entidades que representam cerca de 80-90% de todas as síndromes linfoproliferativas crônicas, nas quais podem ser observadas uma proliferação clonal de linfócitos B. Amostras de biópsia de gânglio linfático podem ser usadas para o diagnóstico destas doenças. Os gânglios linfáticos são o local adequado para as interações entre as células B e as células T e para ocorrer uma resposta imune. Neste sentido, é esperado que, na presença de células B malignas, com uma capacidade diferente para interagir com as células T, estas irão responder de uma forma diferente.

O objetivo do presente trabalho consistiu na análise numérica e funcional das células T, nomeadamente de células T ativadas, células T reguladoras, Th/c17 e Thc/1, bem como, das células NK e quantificação de monócitos e células dendríticas.

Foram analisadas dezanove amostras de biópsia de gânglio linfático, sete normais/reactivas, cinco com linfoma linfocítico/LLC-B e sete com linfomas Não-Hodgkin B. Quantificou-se as subpopulações de células T CD4 e CD8; Th/c17; Th/c1; Tregs; células T ativadas através da citometria de fluxo, e após purificação das células TCD4 e TCD8, procedeu-se à quantificação da expressão de mRNA para os genes *IL2* e *IL10*.

Os nossos resultados mostraram um aumento das células Treg bem como, um decréscimo das células Th/c17 e Th/c1 no grupo com linfomas linfocíticos/LLC-B e no grupo com LNH-B. Relativamente à expressão génica, verificou-se uma diminuição de *IL2* e um aumento de *IL10* tanto para as células T CD4, como para as células T CD8 no grupo com linfomas linfocíticos/LLC-B e no grupo com LNH-B.

Os resultados, embora preliminares, devido ao reduzido número de amostras estudadas, apontam para alterações significativas fenotípicas e funcionais nas células T e NK dos gânglios linfáticos com infiltração por células B patológicas, o que sugere diferenças ao nível da resposta imune anti-tumoral, que podem contribuir para o prognóstico destas entidades.

Keywords

lymph node; T cell; B-cell lymphoproliferative disorders; lymphocytic lymphoma/CLL-B; non-hodgkin lymphoma B.

Abstract

B cells Chronic lymphoproliferative diseases are a heterogeneous group of entities representing about 80-90% of all chronic lymphoproliferative syndromes, in which can be observed a clonal proliferation of B lymphocytes. Lymph node biopsy samples may be used to diagnosis of these diseases. Lymph nodes are suitable location for the interaction between B cells and T cells and an immune response to occur. Therefore, it is expected that in the presence of malignant B cells with a different capacity to interact with T cells, they will respond in a different way.

The objective of this study was to numerical and functional analysis of T cells, particularly of activated T cells, regulatory T cells, Th/c17 and Th/c 1, as well as quantitation of NK cells and monocytes and dendritic cells.

Nineteen lymph node biopsy samples were analyzed, seven normal/reactive, five with lymphocytic lymphoma/CLL-B and seven non-Hodgkin's lymphomas. Subpopulations of CD4 and CD8 T cells; Th/c17; Th/c1 Tregs; and T cells activated by flow cytometry were quantitated. After purification of CD4 and CD8 T cells, we proceeded to quantify the expression of mRNA for *IL-2* and *IL-10* genes.

Our results showed an increase of Treg cells as well as a decrease in Th/c17 cells and Th/c1 in the group with lymphocytic lymphoma/B-CLL and NHL-B group. For the gene expression, there was a decrease in *IL2* and an increase of *IL10* both CD4 T cells, as for CD8 T cells in the group with lymphocytic lymphomas/B-CLL and NHL-B group.

The results, although preliminary, due to the small number of samples analyzed, indicate phenotypic and functional significant changes in the T and NK cells from lymph nodes with infiltration by pathological B-cells, suggesting differences in anti-tumor immune response, which may contribute to the prognosis of these entities.

Índice

Índice

Abreviaturas.....	viii
1. Neoplasias Linfoides	3
1.1. Diferenciação e maturação normal da célula B	3
1.2. Doenças linfoproliferativas crónicas de células B.....	5
1.3. Classificação das DLPC-B	6
1.4. Diagnóstico das DLPC-B	8
2. Leucemia Linfocítica Crónica B/ Linfoma Linfocítico de pequenas células.....	8
3. Linfomas Não-Hodgkin B	10
4. Papel do sistema imune na resposta ao tumor.....	13
5. Mecanismos de escape dos tumores ao sistema imune	18
6. Objetivos	25
7. Material e Métodos.....	29
7.1. População em estudo	29
7.2. Caracterização fenotípica das diferentes populações celulares	29
7.3. Caracterização fenotípica da subpopulação de células T e avaliação da produção de citocinas	30
7.4. Aquisição por citometria de fluxo	30
7.5. Separação e purificação das populações celulares linfocitárias T CD4 e CD8	31
7.6. Avaliação da expressão génica	31
7.7. Análise estatística	33
8. Resultados	37
8.1. Celularidade geral do gânglio linfático	37
8.1.1. Percentagem de linfócitos totais, monócitos e células dendríticas.....	37
8.2. Células T.....	38
8.2.1. Percentagem de células T dentro dos linfócitos totais.....	38

8.2.2.	Percentagem de células T <i>helper</i> e T citotóxicas na globalidade das células T	39
8.2.3.	Percentagem de células T ativadas	40
8.2.4.	Percentagem de células T reguladoras dentro das células T helper	40
8.2.5.	Percentagem das subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 a produzir IL-17 e IFN- γ intracitoplasmático, após a ativação <i>in vitro</i> com PMA e ionomicina.	41
8.2.6.	Percentagem das células NK na celularidade global	43
8.2.7.	Percentagem de células B neoplásicas	45
8.2.8.	Quantificação das células T CD4 e T CD8 após separação em <i>cell sorting</i> e sua expressão de mRNA de <i>IL-2</i> e de <i>IL-10</i>	45
9.	Discussão.....	51
9.1.	Celularidade global do gânglio linfático	51
9.2.	Estudos funcionais das células T e NK do gânglio linfático	53
10.	Conclusão	59
11.	Bibliografia.....	63

Índice de Figuras

Figura 1: Etapas da maturação das células B. Adaptado [6].	5
Figura 2: Sistema de estadiamento Ann Arbor para Linfomas Não-Hodgkin-B. Adaptado de [24,25].	7
Figura 3: Interação entre a imunidade inata e adaptativa. Adaptado de [63].	13
Figura 4: Esquema dos principais passos da imunidade adaptativa e os diferentes tipos de células T. No gânglio linfático, as células dendríticas apresentam antígenos às células T normais (1), por sua vez estas são ativadas e diferenciam-se em diferentes tipos de células efetoras Th1, Th2, Th17 ou células Treg (2), as células T de memória efetora são geradas nestes processos e migram através dos vasos linfáticos aferentes para o tecido inflamado (3) para realizar a sua função na regulação de respostas imunes (4) ou a proteção contra agentes patogênicos (5) que constituem a segunda linha de respostas imunes, adaptado de [62]. ..	15
Figura 5: Células Th17 e a imunidade anti-tumoral, adaptado de [82].	17
Figura 6: A: Percentagem de linfócitos da celularidade global. B: Percentagem de monócitos corrigida em função da infiltração por células B neoplásicas da celularidade global. C: Percentagem de células dendríticas corrigida em função da infiltração por células B neoplásicas da celularidade global. A e C: Com significado estatístico para $p < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis e Mann Whitney.	38
Figura 7: Percentagem de células T nos linfócitos totais corrigida em função da infiltração por células B neoplásicas.	39
Figura 8: Percentagem das diferentes subpopulações de células T, CD4 e CD8 na globalidade das células T.	39
Figura 9: Percentagem de células T ativadas dentro das células T. Com significado estatístico para $p < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis e Mann Whitney.	40
Figura 10: Determinação da população de células Tregs. Legenda: Células Tregs selecionadas a preto.	40
Figura 11: Percentagem das células T reguladoras dentro das células T CD4.	41
Figura 12: Determinação da população de células Th17 e Tc17, respetivamente. Legenda: Células Th17 e células Tc17 selecionadas a preto.	41
Figura 13: Percentagem das células Th17 e Tc17 dentro das células T helper e das células T citotóxicas, respetivamente.	42

Figura 14: Determinação da população de células Th1 e Tc1, respetivamente. Legenda: Células Th17 e células Tc17 selecionadas a preto.	42
Figura 15: Percentagem das células Th1 e Tc1 dentro das células T helper e T citotóxicas.	43
Figura 16: Percentagem das células NK na celularidade global.	43
Figura 17: Percentagem de células NK CD56dim e de NK CD56bright a expressar IFN-gamma. Com significado estatístico para $p < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis e Mann Whitney.	44
Figura 18: Expressão genética de IL-2 das células T CD4 e T CD8. Com significado estatístico para $p < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis e Mann Whitney.	45
Figura 19: Expressão genética de IL-10 das células T CD4 e CD8. Com significado estatístico para $p < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis e Mann Whitney.	46

Índice de Tabelas

Tabela 1: Mecanismos de escape dos tumores ao sistema imunitário. Adaptado de [90,91].	18
Tabela 2: Conjunto de primers (Forward e Reverse) e temperaturas de annealing utilizadas para a expressão dos genes GAPDH, IL-2 e IL-10, respectivamente.	32
Tabela 3: Esquema do perfil da reação de qRT-PCR utilizado para a avaliação da expressão dos genes em estudo.	32
Tabela 4: Combinações de anticorpos monoclonais (com clones, fluorocromos e respectiva marca) para a caracterização fenotípica dos linfócitos T e respectivas subpopulações.	34
Tabela 5: Média das percentagens e desvio padrão das diferentes populações analisadas e a sua respectiva significância.	47

Abreviaturas

Abreviaturas

ABC- *Activated B cell like*

CD- *Clusters of Differentiation*

CF- Citometria de fluxo

DC- Células Dendríticas

DLPC-B- Doenças linfoproliferativas crônicas de células B

DNA- Deoxyribonucleic Acid

FISH- *Fluorescence in situ hybridization*

FoxP3- *Forkhead/winged-helix transcription factor box P3*

GCB- *Germinal center B cell like*

IFN- γ - Interferão Gamma

Ig- Imunoglobulina

IL- Interleucina

LLC-B- Leucemia linfocítica crônica B

LL- Linfoma linfocítico de pequenas células

LNH-B- Linfoma Não-Hodgkin B

MO- Medula Óssea

NK- *Natural Killer*

OMS- Organização Mundial de Saúde

PBS- *Phosphate-Buffered Saline*

PMA- *Phorbol 12-myristato 13 acetato*

PET- Estudo por emissão de positrões

RNA- Ribonucleic acid

SP- Sangue periférico

TAC- Tomografia computadorizada

TGF- β - *Transforming growth factor beta*

Th- *T helper*

TIL- Tumor-Infiltrating Lymphocytes

Tregs- T reguladoras

VIH- Vírus da imunodeficiência humana

ZAP-70- *Zeta-chain-associated protein kinase 70*

Estado da arte

1. Neoplasias Linfoides

Em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em colaboração com a Sociedade de Hematopatologia e a Associação Europeia de Hematopatologia publicaram uma classificação para as neoplasias dos tecidos linfoides e hematopoiéticos, tendo estratificado primariamente estas de acordo com a linhagem celular: mieloides, linfoides e histiocíticas/dendríticas [1]. Atualmente, a mais recente atualização da classificação da OMS de 2008, enfatiza não só a morfologia celular, como também a célula originária do tumor e as características genóticas e imunofenóticas como parte importante na diferenciação destas neoplasias [2]. Por outro lado, esta reformulação também teve como objetivo a incorporação de novas informações científicas e clínicas que surgiram após a publicação da edição anterior, a fim de refinar os critérios de diagnóstico das neoplasias já descritas, bem como a introdução de novas entidades recém-descobertas [3,4]. Como resultado, várias entidades previamente consideradas distintas foram agrupadas sob categorias diagnósticas únicas [2]. Assim sendo, surgiu um grupo restrito com potencial interesse denominado por doenças linfoproliferativas crónicas de células B (DLPC-B).

1.1. Diferenciação e maturação normal da célula B

Para se compreender a fisiopatologia das DLPC-B assim como, os mecanismos inerentes ao seu aparecimento, torna-se essencial perceber como ocorre a diferenciação e a maturação normal das células B. Deste modo, as células B são geradas a partir de células estaminais hematopoiéticas pluripotentes no fígado fetal e após o nascimento, na medula óssea. A maturação normal destas células pode ser dividida em 3 fases distintas: pré-centro germinal, centro germinal e pós-centro germinal [4]. Durante o estadio do pré-centro germinal, a célula progenitora B torna-se numa célula B madura que expressa a imunoglobulina M (IgM). Seguidamente, a célula B madura migra para o sangue periférico e para os tecidos linfoides secundários (baço, nódulos linfáticos e tecidos associados a mucosas) [5]. O centro germinal consiste num centro ativado de um folículo linfoide (num tecido linfoide secundário) e está associado com (i) a expansão clonal de células B, (ii) hipermutação somática (processo de mutação programado pelo qual ocorrem alterações na

sequência nucleotídica do DNA do gene da imunoglobulina da cadeia V durante o desenvolvimento. Este processo é induzido pela ativação da enzima citidina desaminase), (iii) seleção de células B com base na sua capacidade para receber sinais específicos do antígeno, e (iv) a indução subsequente da diferenciação para células B memória ou para células plasmáticas [6]. Neste compartimento, ocorrem também o *switch* da classe de imunoglobulinas que consiste no reordenamento gênico dos linfócitos B, resultando na substituição do tipo de região constante da cadeia pesada que é expressa. Isto permite que a resposta efetora se modifique, enquanto a especificidade da ligação antígeno (região variável) permaneça a mesma. A maioria das trocas de classe ocorre pela recombinação do ADN. Sendo assim, as células B mudam a sua classe de imunoglobulinas, de IgM para IgG ou para a IgA, começando posteriormente a produção de anticorpos de elevada afinidade para o antígeno, para o qual a célula B foi inicialmente exposta [7].

A reação que ocorre no centro germinal é condicionada por diferentes fatores moleculares [7]. Destes, destaca-se o BCL-6, um repressor de transcrição necessário nas células B maduras durante a reação, pois favorece o desenvolvimento do centro germinal e as células T *helper* foliculares [8]. O BCL-6 tem a particularidade de impedir a ativação prematura e a diferenciação das células B no centro germinal fornecendo assim um ambiente tolerante às quebras de ADN associadas aos mecanismos de remodelação do gene da imunoglobulina que estão envolvidas na produção de anticorpos de elevada afinidade de diferentes isotipos. As funções críticas exercidas pela BCL-6 durante o desenvolvimento das células B normais podem ser intermediadas pelo processo de transformação maligna. Assim, o gene *BCL-6* pode ser alvo de aberrações genéticas atuando como um oncogene em linfomas com a sua origem no centro germinal [9]. Desta forma, o BCL-6 pode reprimir os genes envolvidos na ativação das células B, a regulação negativa do ciclo celular, a resposta ao *stress* e a diferenciação em células B memória e células plasmáticas. A elevada regulação da expressão de BCL-6 pelos precursores das células B sugere um aumento no processo de adesão/interação das células B e T envolvendo integrinas.

Outros fatores têm sido descritos como adjuvantes ao desenvolvimento do centro germinal tais como, MEF2B [10], MEF2C [11] e MYC [12]. Os MEF2B e MEF2C têm papéis distintos durante a ativação das células B. A expressão de MEF2B pelas células B ativadas pelo antígeno precede a um aumento na regulação da expressão de BCL-6. Por outro lado, o MEF2C é necessário para a formação do centro germinal. O MYC tem um

papel crucial, pois suporta a proliferação celular, regulando diversos processos, incluindo a progressão do ciclo celular, metabolismo e manutenção dos telómeros.

Autores sugerem que o centro germinativo é a fonte da maior parte das DLPC-B nomeadamente, no caso dos linfomas difuso de grandes células B, linfoma folicular e linfoma de *Burkitt* [5,13]. Por fim, o pós-centro germinal, as células B diferenciam-se em células B memória e, em células precursoras das células plasmáticas (plasmoblastos) contribuindo assim, para a imunidade humoral (Figura 1) [6].

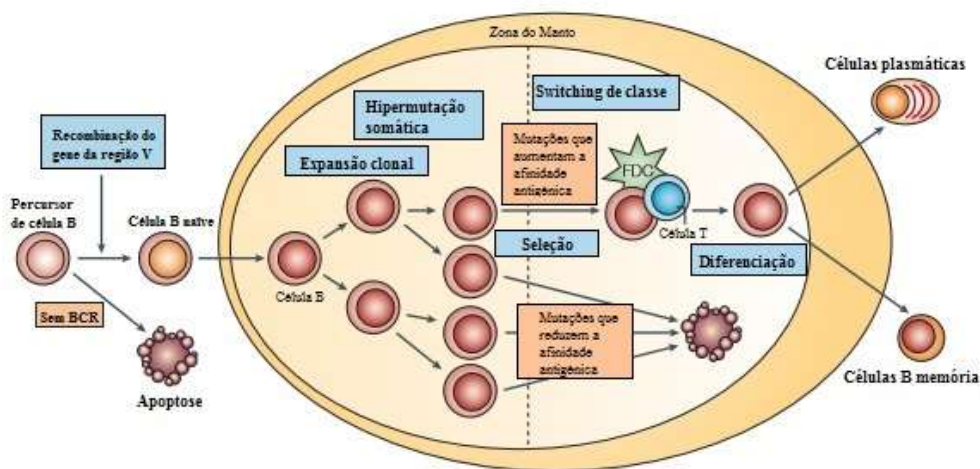


Figura 1: Etapas da maturação das células B. Adaptado [6].

1.2. Doenças linfoproliferativas crônicas de células B

As DLPC-B são um grupo heterogêneo de neoplasias linfoides distintas, tanto biológica como clinicamente, onde ocorre uma proliferação monoclonal de linfócitos B [14]. Neste grupo de neoplasias estão incluídos mais de 40 subtipos de patologias que derivam da transformação maligna de células B maduras [14,15]. Estas neoplasias podem surgir de células linfoides presentes nos respectivos órgãos hematopoiéticos e linfopoiéticos, como a medula óssea, os órgãos linfoides secundários, como os gânglios linfáticos e baço, ou os diversos tecidos linfoides associados à mucosa.

As DLPC-B representam cerca de 80-90% de todas as síndromes linfoproliferativas em todo o Mundo, representando aproximadamente 2,5% dos novos casos de cancro todos

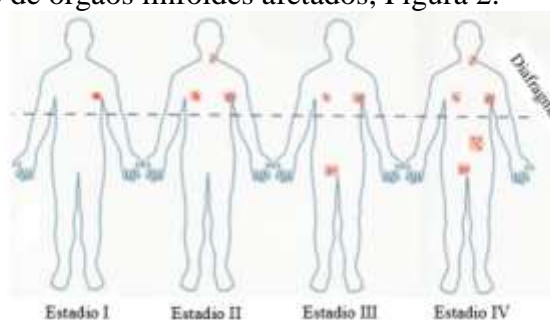
os anos [2]. Estudos epidemiológicos afirmam que estas patologias são mais comuns nos países desenvolvidos, principalmente nos Estados Unidos da América, Austrália, Nova Zelândia e Europa Ocidental [2,16]. Estudos recentes mostram um aumento da incidência em idosos do sexo masculino, tendo duplicado nos últimos 30 anos. Tal facto deve-se ao aumento da esperança média de vida da população.

A etiologia das DLPC-B ainda não é clara no entanto, estudos têm demonstrado que o risco de desenvolver DLPC-B aumenta em estados de imunodeficiência congénita e adquirida, incluindo o vírus da imunodeficiência humana (VIH) e outras desordens do sistema imunológico tais como, artrite reumatoide, lúpus sistémico eritematoso, doença celíaca e após do transplante de órgãos sólidos [15,17]. Por outro lado, estudos recentes têm sugerido que o estilo de vida e os fatores ambientais também podem estar associados ao aumento deste tipo de patologias. O tabagismo está associado a uma elevada prevalência da translocação t (14;18) [18]. Para além disso, o fumo contém hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que induzem mutações no gene supressor tumoral p53, sendo estes um fator de mau prognóstico [19]. Já a associação da radiação ultravioleta com o risco de DLPC-B é muito controversa, pois a heterogeneidade entre os estudos envolvidos nesta análise foi significativa [20–22].

1.3. Classificação das DLPC-B

Este grupo heterogéneo de neoplasias linfoides subdivide-se em vários subtipos, desde leucemia linfoide crónica B (LLC-B)/linfoma linfocítico de pequenas células B, linfoma esplênico de linfócitos B pequenos, tricoleucemia, leucemia prólinfocítica B, linfoma plasmocítico, linfoma follicular, linfoma difuso de grandes células B, linfoma de zona marginal, entre outros. A fim de clarificar com rapidez este vasto grupo, é necessário descobrir a sua localização e proliferação para que os clínicos percebam a extensão da doença e desta forma, definirem a qual subtipo se refere a patologia [15]. Para tal, a doença pode ser subdividida em (i) Classificação: baseia-se na evolução clínica do linfoma, designando-se por indolente (baixo grau ou de crescimento lento), ou então em agressivo (alto grau ou de crescimento rápido). No caso de se classificar em indolente, os doentes raramente apresentam sintomas na fase inicial, podendo atrasar o seu diagnóstico. Neste caso, normalmente os doentes podem não necessitar de tratamento imediato, mas quando

necessitam, este é quase sempre eficaz, levando à redução e/ou ao desaparecimento da doença. No entanto, também é frequente presença de doença residual, o que requer novamente tratamento. Já nos casos em que se classificam por agressivos, estes evoluem muito rapidamente requerendo tratamento imediato na maioria dos casos. Este tipo de linfomas apesar de serem classificados como agressivos, tende a responder muito bem ao tratamento, sendo a cura mais provável nestes casos. Exemplos de linfomas indolentes são o linfoma linfocítico de pequenas células, linfoma folicular entre outros, e de linfomas agressivos são o linfoma difuso de grandes células, linfoma do manto entre outros; (ii) Tipo: consoante a sua classificação em indolente ou agressivo a doença subdivide-se em diversos subtipos, em função do aspeto das células, colhidas por biópsia e analisadas ao microscópio; e (iii) Estadio: serve para indicar a localização e extensão do linfoma e denomina-se por Sistema de estadiamento *Ann Arbor* (AA) [23,24]. Este divide-se em estadios I, II, III ou IV, mediante o local onde se encontram as células do linfoma e do envolvimento dos órgãos linfoides secundários (gânglios linfáticos, baço ou outros órgãos e tecidos). O estadio depende ainda do número de órgãos linfoides afetados, Figura 2.



Sistema de Estadiamento <i>Ann Arbor</i> para Linfomas Não-Hodgkin-B	
<u>Estadio</u>	<u>Descrição</u>
I	Envolve apenas um grupo de gânglios linfáticos ou uma região, ou um órgão extralinfático (baço, timo);
II	Envolve duas ou mais regiões dos gânglios linfáticos do mesmo lado do diafragma;
III	Envolve as regiões de gânglios linfáticos ou órgãos extralinfáticos de ambos os lados do diafragma
IV	Envolve dois ou mais órgãos ou locais extralinfáticos (fígado, osso, medula óssea, baço, pulmão)
<u>Subclassificação</u>	
A	Ausência de classificação
B	Presença de, pelo menos um dos sintomas: perda de peso maior que 10% do peso basal em 6 meses, fíebre recorrente e sudorese noturna
Doença de Bulky	Massa que excede 10 cm no seu maior diâmetro ou massa mediastinal que ultrapasse 1/3 do diâmetro transversal transtorácico

Figura 2: Sistema de estadiamento *Ann Arbor* para Linfomas Não-Hodgkin-B. Adaptado de [24,25].

1.4. Diagnóstico das DLPC-B

O diagnóstico destas patologias pode ser estratificado através das características referentes à anatomia patológica/morfologia, fenotipagem recorrendo à citometria de fluxo e através do genótipo usando as técnicas de biologia molecular e citogenética.

A citometria de fluxo (CF) tem tido um papel crucial no auxílio ao diagnóstico das doenças hematológicas [26]. Esta técnica multiparamétrica proporciona uma avaliação precisa da expressão de vários marcadores de superfície *Cluster of Differentiation* (CD) e a sua intensidade de fluorescência, fornecendo uma análise rápida e simultânea de múltiplas características de células individuais. Estas características incluem, não só, o tamanho das células, como a complexidade citoplasmática/granularidade, o teor de ácido nucleico e a presença de várias proteínas intracelulares/membrana [27]. Devido à sua elevada sensibilidade, esta técnica permite a identificação de células fenotipicamente anormais nas suas diferentes linhagens, mesmo quando estão presentes em pequenas quantidades numa amostra. Outra particularidade desta técnica baseia-se na avaliação da infiltração de diferentes órgãos e tecidos, neste caso por células B neoplásicas. Este procedimento é fundamental para definir o estadió da doença assim como, para avaliar a resposta terapêutica e a respetiva monitorização da doença. Para além disso, algumas características fenotípicas podem auxiliar a seleção do tratamento e a avaliar o prognóstico da doença [26,28].

Por outro lado, o auxílio da biologia molecular e da citogenética através da hibridização *in situ* de fluorescência (FISH) também tem sido essencial para um diagnóstico mais rápido e eficaz. Com estas técnicas consegue-se analisar as sequências genéticas e detetar anomalias genéticas, como translocações cromossómicas específicas [15,29].

2. Leucemia Linfocítica Crónica B/ Linfoma Linfocítico de pequenas células

A leucemia linfocítica crónica B (LLC-B) é uma neoplasia incurável, crónica, caracterizada pela acumulação progressiva de linfócitos B maduros no sangue periférico (SP), na medula óssea (MO) e/ou tecidos linfáticos [30,31]. Quando a patologia envolve

principalmente o SP e a MO, é chamada de leucemia linfocítica crónica no entanto, quando envolve preferencialmente os tecidos linfáticos e com características morfológicas e imunofenotípicas idênticas à LLC-B, denomina-se por linfoma linfocítico de pequenas células (LL) [32].

Estudos epidemiológicos referem que esta neoplasia é a leucemia mais comum no Mundo Ocidental e em adultos com idade média superior ou igual a 60 anos [33]. A taxa de incidência corresponde a 2-6 casos por 100 000 pessoas por ano, sendo o sexo masculino o mais afetado [2]. Esta patologia permanece assintomática nos doentes, sendo maioritariamente descoberta em exames de rotina através da presença exacerbada de linfócitos B, pelo menos 5×10^9 linfócitos B por litro ($5000/\mu\text{L}$) numa amostra de SP, pelo menos durante 3 meses seguidos [32]. Atualmente, autores sugerem que todos os casos diagnosticados de LLC são precedidos de uma Linfocitose B Monoclonal. Esta define-se pela ausência de adenopatias, organomegalia, citopenias ou sintomas relacionados com a doença, mas com um aumento de linfócitos B, sendo detetada em cerca de 5% dos idosos e com um risco de progressão para LLC-B de 1-2% por ano [34,35].

Apesar de ser assintomática, 50% dos doentes com LLC-B apresentam fadiga severa e infeções frequentes. Em alguns casos tendem a ter os denominados sintomas B: períodos febris, episódios de sudorese noturna e perda de peso, podendo mesmo levar a casos de astenia e anorexia [32]. Caso os doentes apresentem sintomas, os mais característicos são as linfadenopatias, correspondendo a cerca de 50% dos casos, podendo estas serem generalizadas ou em locais específicos ou então, a presença de esplenomegalia [36]. Posto isto, o diagnóstico deve ser confirmado, sempre que possível com uma avaliação histopatológica de uma biópsia de um gânglio linfático. A aberração citogenética mais comum é a del (13q14) representando cerca de 55% de todos os casos. Esta anomalia está associada a uma progressão lenta da doença e por conseguinte, a um bom prognóstico [37]. A del (13q14) é tipicamente caracterizada por um caso de doença benigna e os miRNAs, miR-15a e 16-1 foram recentemente identificados como a região crítica desta deleção. O papel fisiopatológico destes miRNAs é ainda sublinhada pelo estudo do fenótipo em ratos geneticamente modificados com este tipo de deleção miR15a e 16-1 em combinação com uma deleção do gene dLEU2 de RNA não-codificante. Como resultado deste estudo, estes animais desenvolveram um distúrbio de células B monoclonais, semelhante a LLC-B e Linfoma linfocítico de células pequenas, sugerindo então, que de facto as miARNs 15a e 16-

1 desempenham um papel na gênese da LLC-B [38]. Por outro lado, também existe outra anomalia característica nesta patologia, a del (11q), identificada em pessoas mais jovens podendo ser diagnosticada em 10% dos doentes no estadio inicial e 25% com um estadio avançado da doença [39]. Além disso, os doentes portadores desta mutação apresentam frequentemente uma linfadenopatia volumosa, de rápida progressão, reduzindo o tempo de sobrevida dos doentes [40]. Curiosamente, algumas das características para um fraco prognóstico da del (11q) podem ser mediados com o uso da quimioterapia [41]. Por último, mas também com prognóstico desfavorável, existe a del (17q) que está associada a mutações no gene supressor de tumor, p53. Quando este gene fica danificado, pode facilitar a transmissão de DNA alterado e a formação de clones neoplásicos com elevado grau de sobrevivência, contribuindo para uma má resposta ao tratamento [42].

3. Linfomas Não-Hodgkin B

Dentro deste vasto grupo, incluem-se quatro tipos de linfomas, o linfoma folicular, o linfoma de zona marginal, o linfoma do manto e por último, o linfoma difuso de grandes células B [43]. O linfoma folicular pertence ao grupo dos linfomas indolentes, sendo o segundo mais comum na Europa Ocidental. Este tipo de linfoma representa cerca de 20% de todos os linfomas Não-Hodgkin B com uma incidência aos 60 anos de idade, tanto em mulheres como em homens [44]. Usualmente, é definido como indolor, apresentando uma linfadenopatia generalizada. Isto faz com que a maioria dos doentes apresentem uma doença num estadio avançado, com envolvimento dos gânglios linfáticos, da medula óssea (60-70%), do fígado (50%) e do baço (40%) [45]. Autores sugerem que as células neoplásicas do linfoma folicular surgem a partir de células B com origem no centro germinativo dos folículos linfoides, formados por uma mistura de centrócitos pequenos (linfócitos pequenos e clivados) e de centroblastos (linfócitos grandes com nucléolos) dispostos em estruturas foliculares. Estes folículos neoplásicos têm características morfológicas que ajudam na distinção entres os folículos reativos. Existe uma propagação destes folículos neoplásicos em número e de forma compacta, dissipando a forma nodal normal. Estas células B neoplásicas de linfoma folicular não residem somente em folículos, mas também na zona interfolicular em que eles formam um infiltrado difuso [46]. Este

infiltrado interfolicular contém principalmente centrócitos sendo considerado uma subpopulação, pois a maior parte da atividade proliferativa ocorre dentro do microambiente do folículo. A proporção de centroblastos e centrócitos varia de tumor para tumor no entanto, estudos verificaram que a proporção de centroblastos dentro dos folículos de um linfoma folicular pode prever uma evolução clínica [4].

O linfoma de zona marginal foi categorizado pela OMS em três entidades clínico-patológicas distintas: linfoma extraganglionar de células B da zona marginal do tecido linfoide associado às mucosas, linfoma ganglionar de células B da zona marginal e linfoma esplênico de células B da zona marginal [1]. Estas três entidades indolentes compartilham uma origem comum na célula da zona marginal no entanto, cada uma delas apresenta características clínicas e moleculares únicas tornando-se essencial a sua distinção para fins de diagnóstico, terapêutica e de prognóstico [47,48]. O linfoma extraganglionar de células B da zona marginal do tecido linfoide associado às mucosas localiza-se muitas vezes no trato gastrointestinal e nas glândulas salivares. Esta neoplasia é composta por células B de tamanho pequeno/intermédio e ocasionalmente por células plasmáticas. É responsável por 7-8% dos linfomas recém-diagnosticados. Devido à sua associação com causas infecciosas, tais como *Helicobacter pylori* ou *Chlamydomphila psittaci* e doenças autoimunes, surgiu o paradigma de uma malignidade conduzida pelo antigénio [49].

O linfoma ganglionar de células B da zona marginal, por definição apresenta-se como doença nodal, sem envolvimento da mucosa ou do baço [50]. A nível morfológico, o infiltrado ocupa a área interfolicular e/ou as zonas marginais de folículos residuais. Ao contrário do linfoma extraganglionar de células B da zona marginal do tecido linfoide associado às mucosas, existem estudos que tentam comprovar que este tipo de linfoma se encontra mal caracterizado biologicamente [51].

Por outro lado, o linfoma esplênico de células B da zona marginal apresenta uma etiologia desconhecida [52]. Esta patologia deriva de células B da zona marginal, afetando mais o sexo masculino com uma média de idades de 63 anos, com envolvimento do baço, medula óssea e do sangue periférico [52]. Os doentes frequentemente apresentam episódios de esplenomegalia, podendo causar algum desconforto abdominal.

O linfoma do manto consiste num linfoma de células B agressivo, frequentemente incurável. A população atingida apresenta uma média de idade de 68 anos, com predisposição para o sexo masculino [2]. Os doentes com este tipo de linfoma, tipicamente

apresentam linfadenopatias generalizadas (75%), embora com envolvimento extranodal, como no sangue periférico, medula óssea e do trato gastrointestinal [53]. O diagnóstico deve ser feito após uma biópsia excisional de um gânglio linfático aumentado. A maioria dos casos apresenta um infiltrado monomórfico de células de tamanho intermédio com uma variedade de padrões histológicos, nodular, difuso, pleomórfico e blastoide [2,54].

A presença da translocação cromossômica t(11;14)(q13;q32) é muito frequente nesta patologia. Esta translocação causa uma expressão aberrante de ciclina D1, que normalmente não é expressa em linfócitos normais. Esta resulta da junção do gene ciclina D1, presente no cromossoma 11, com o gene IGH, do cromossoma 14, causando um aumento da expressão de ciclina D1. Ocorre uma desregulação do ciclo celular e ativação de alguns mecanismos de sobrevivência celular, contribuindo para a patogenicidade da doença em causa [55]. Outro dado fulcral é a expressão da ciclina D1 por imunohistoquímica, embora uma pequena percentagem de casos seja ciclina D1 negativa [56]. Recentemente, o SOX11, um fator de transcrição neuronal, tem sido usado para identificar estes casos em que a ciclina D1 é negativa. Este marcador é expresso nas células B neoplásicas do linfoma do manto, sendo geralmente negativo nos outros linfomas [57,58].

Por último, o linfoma difuso de grandes células B representa o tipo mais comum de linfomas Não-Hodgkin sendo responsável por aproximadamente 30-40% de todos os diagnósticos em adultos incidindo aos 70 anos [59]. Esta patologia apresenta um envolvimento ganglionar, mas também os ossos, testículos, baço, glândulas salivares, fígado, rins, entre outros. O envolvimento da medula óssea corresponde a 11-27% dos casos e muitos destes correspondem a um estadio avançado da doença.

É uma neoplasia muito heterogénea, tanto em relação à sua morfologia, histologia, fenótipo, apresentação clínica como posteriormente, em relação ao seu tratamento [60]. Esta neoplasia pode ser dividida morfológicamente em três subtipos: centroblástica, imunoblástica e anaplásica. A forma mais comum é a centroblástica, constituída maioritariamente por centroblastos. A imunoblástica acarreta uma grande percentagem de imunoblastos, sendo associada a um pior prognóstico. Já a anaplásica caracteriza-se pela presença de células anaplásicas. Quanto à sua expressão imunofenotípica e genética, esta patologia categoriza-se em 2 subtipos distintos, GCB (*germinal center B cell like*) e em ABC (*activated B cell like*). Estes subtipos surgem devido a alterações genéticas específicas e à presença de diferentes vias de sinalização molecular [61].

4. Papel do sistema imune na resposta ao tumor

O sistema imune humano exerce um papel preponderante de proteção contra antígenos estranhos, ativando uma ação coletiva e coordenada entre diversas células e moléculas [62]. Para tal, o sistema imune promove dois tipos de resposta: a inata e a adquirida. A imunidade inata é um sistema de defesa geral que protege o hospedeiro de organismos desconhecidos e invasores, que conseguem romper as barreiras físicas. Este é descrito como sendo a primeira linha de defesa, constituído pela pele, mucosas e suas secreções. As células deste tipo de resposta imune incluem neutrófilos, eosinófilos, monócitos, macrófagos, células *NK* e células dendríticas (DCs), designadas por células fagocitárias, pois têm a capacidade de fagocitar o corpo estranho e destruí-lo. Para além desta capacidade, as DCs desempenham um papel crucial na interação da imunidade inata com a imunidade adaptativa (Figura 3).

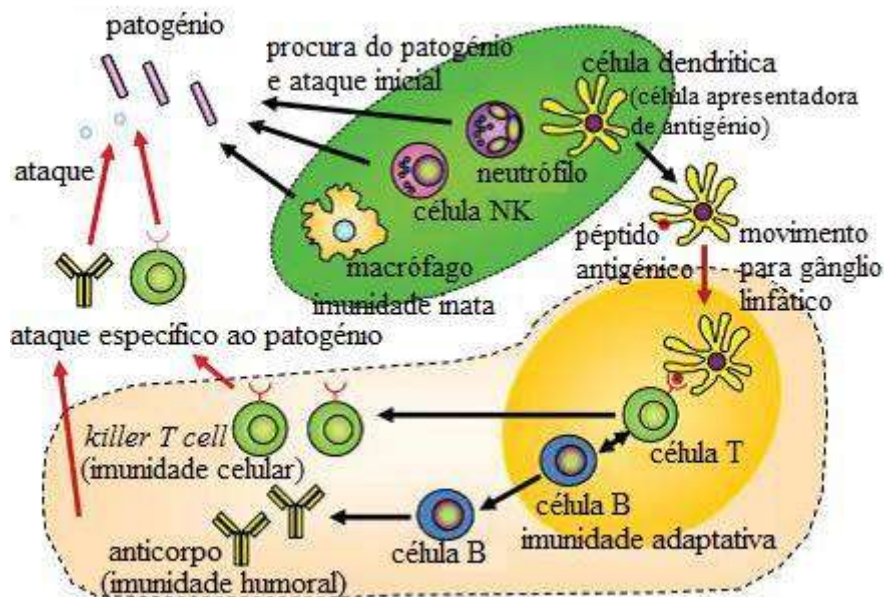


Figura 3: Interação entre a imunidade inata e adaptativa. Adaptado de [63].

As DCs definem-se como células apresentadoras de antígenos (APCs) com capacidade de iniciar e regular a resposta adaptativa e de reconhecer antígenos através dos *Toll-like receptors (TLRs)* [63,64]. Estas também conseguem processar e apresentar os antígenos, no contexto do Complexo Major de Histocompatibilidade de Classe I (MHC-I) e Classe II (MHC-II) juntamente com moléculas co-estimuladoras, às células T para que

estas iniciem uma resposta imune contra esses [65,66]. Por outro lado, a imunidade adquirida divide-se em imunidade humoral e em imunidade celular. A imunidade humoral encarrega-se do combate de corpos estranhos presentes na corrente sanguínea através da produção de anticorpos pelas células B, enquanto a imunidade celular é responsável pela eliminação de células tumorais e de microrganismos intracelulares mediada pela ação das células T [63]. As células T auxiliam outras células na resposta imune, matam as células infetadas, ou suprimem as respostas imunes indesejáveis. As células B diferenciam-se em células plasmáticas que segregam os anticorpos específicos para o antígeno e são responsáveis pela eliminação de antígenos extracelulares. Estes dois tipos de células são produzidas na medula óssea a partir de células progenitoras hematopoiéticas. Aproximadamente, metade delas vão para o timo onde ocorre a maturação, tornando-se células T. O resto das células realizam o seu processo de maturação na medula óssea e, tornam-se células B que produzem anticorpos específicos para cada antígeno. Esta imunidade adquirida induz memória que permite uma resposta mais rápida e específica do sistema imunitário a uma futura exposição ao agente patogénico e possível, disfunção imunológica [67].

Em suma, a resposta imune requer a ativação das células T e B, sendo esta, realizada principalmente por APCs, como as DCs, que após capturarem o antígeno, o processam e o transportam até aos gânglios linfáticos onde o apresentam às células T (Figura 4). Estes atuam como filtros, fazendo com que ocorra uma expansão clonal das células T e B específicas para o antígeno [68,69]. Assim, durante o processo de expansão, a estrutura interna complexa dos órgãos é mantida, revelando a existência de mecanismos capazes de equilibrar a integridade do sistema linfático com flexibilidade estrutural. Existe uma extensa remodelação arquitetónica que ocorre dentro dos gânglios linfáticos durante a resposta imune adaptativa, sendo regulada pelas DCs [70]. Enquanto o recetor das células B reconhece o antígeno na sua forma nativa, o recetor das células T apenas reconhece o antígeno na sua forma fragmentada (péptidos ou peptídeos) apresentado no contexto de moléculas de MHC. Sendo assim, deste reconhecimento resulta a ativação e diferenciação das células B, que irão produzir anticorpos específicos para o antígeno do invasor e a ativação e diferenciação das células T *helper* CD4 e das T citotóxicas CD8, que levarão à formação de células efetoras e reguladoras da resposta imune. Os linfócitos T CD4 interagem com moléculas MHC de classe II enquanto, os linfócitos T CD8 com moléculas MHC de classe I [63]. As células T CD4 ativam principalmente os macrófagos e secretam citocinas,

enquanto as células T CD8 são citotóxicas para as células malignas e assim, exercem papéis fundamentais na defesa contra tumores [71].

A interação cognata entre as células T e B do sistema imune adaptativo é essencial para a produção de anticorpos de elevada afinidade contra agentes patogênicos, e para o estabelecimento da memória imunológica a longo prazo. Os agentes patogênicos invasores iniciam uma resposta de anticorpos protetores por estimulação das células B foliculares localizadas nos órgãos linfóides secundários, tais como os gânglios linfáticos e o baço. Esta estimulação envolve o reconhecimento e interiorização do antígeno nativo por receptores de IgM e IgD expressas na superfície das células B [72,73].

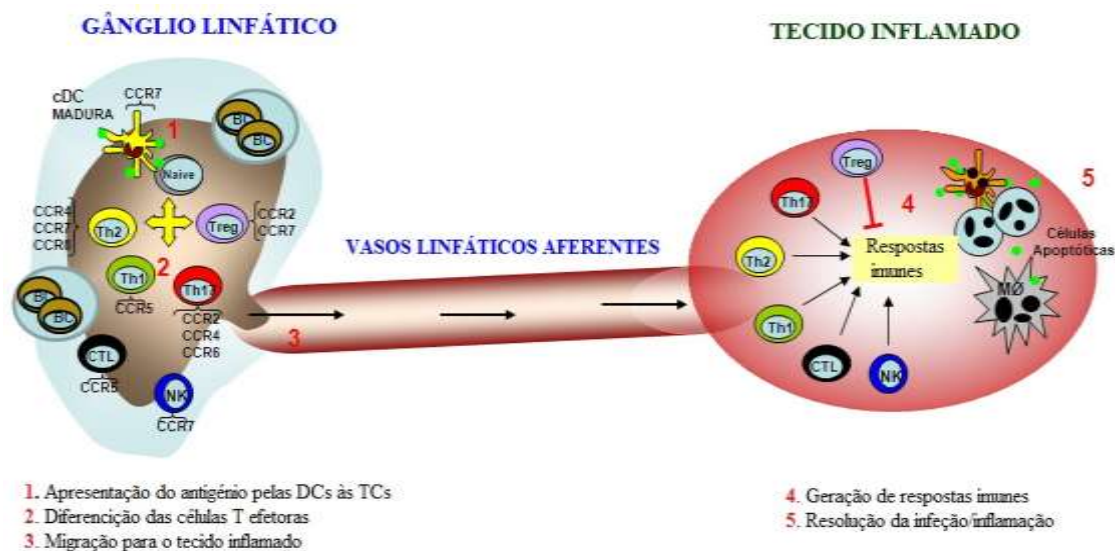


Figura 4: Esquema dos principais passos da imunidade adaptativa e os diferentes tipos de células T. No gânglio linfático, as células dendríticas apresentam antígenos às células T normais (1), por sua vez estas são ativadas e diferenciam-se em diferentes tipos de células efetoras Th1, Th2, Th17 ou células Treg (2), as células T de memória efetora são geradas nestes processos e migram através dos vasos linfáticos aferentes para o tecido inflamado (3) para realizar a sua função na regulação de respostas imunes (4) ou a proteção contra agentes patogênicos (5) que constituem a segunda linha de respostas imunes, adaptado de [62].

Assim, o papel das células do sistema imune, particularmente das células T, na deteção e supressão de células malignas é muito importante para se entender a patologia [71]. Todos estes tipos de células são capazes de produzir mediadores inflamatórios [74]. A deteção da infecção ou lesão do tecido pode resultar na ativação destes mediadores inflamatórios designados por moléculas quimiotáticas e moléculas de adesão [67]. Das moléculas quimiotáticas fazem parte as citocinas, quimiocinas, interleucinas e lípidos bioativos que causam a migração quimiotática de leucócitos, afetam a angiogénese, a produção de

colagénio e a proliferação de precursores hematopoiéticos, sendo cruciais na resposta do sistema imune. Dependendo das citocinas produzidas e das suas respectivas funções, as células T CD4 podem ser classificadas em vários subgrupos nomeadamente, em células Th1, Th2, Th9, Th foliculares, Th17, em células Treg CD4+, CD25+, entre outros [75,76]. As células Th1 são caracterizadas pela produção de IL-2, IFN- γ e TNF- β . A IL-2 têm como função regular o crescimento das próprias células Th1, como também das células T CD8. O IFN- γ exerce funções determinantes na amplificação da resposta imunológica nomeadamente, ao nível da ativação de macrófagos, do desenvolvimento das células Th1 e Tc1, do aumento da citotoxicidade das células Tc e NK e também do aumento da capacidade apresentadora de antígenos pelas DCs através do aumento da interação do complexo MHC com o péptido, na membrana plasmática. Por outro lado, as células Th2 são caracterizadas pela produção de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, citocinas anti-inflamatórias que interferem na regulação da produção de anticorpos por linfócitos B e inibem a resposta mediada pelas células Th1. Já as Th17 são células produtoras de IL-17A, IL-6 e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) estando envolvidas na promoção da inflamação na patogénese de muitas doenças [77,78]. Estas são responsáveis por promover respostas imunológicas contra bactérias extracelulares e fungos, através do recrutamento de monócitos e neutrófilos. As células Treg CD4⁺ CD25⁺ auxiliadas pelo *Forkhead/winged helix transcription factor* (FOX P₃⁺), sendo este um repressor de transcrição, inibem a proliferação das células T efectoras através da secreção do *transforming growth factor- β* (TGF- β) e da IL-10, desempenhando assim, o seu efeito de imunomodulação contra infeções e células tumorais, tornando-as responsáveis pela supressão das respostas do sistema imune [79,80].

Em diversos estudos, o papel das células T CD4 e das T CD8, bem como a sua proporção CD4/CD8 têm sido estudados. Dehghani *et al.* verificaram que a percentagem média de células T CD4 era inferior à percentagem média das células T CD8, contribuindo para uma diminuição do rácio CD4/CD8 [81]. Sendo a citotoxicidade contra células tumorais, a principal função das células T CD8, um aumento do número destas células T durante a presença de uma neoplasia é uma estratégia utilizada pelo sistema imunológico para combater as células tumorais.

O estudo das células Th17 em amostras neoplásicas tem causado muita controvérsia para os investigadores [82]. O desenvolvimento destas células é distinto do desenvolvimento das células Th1, Th2 e das células Treg, sendo caracterizada por fatores de transcrição e

requisitos únicos de citocinas [83,84]. Evidências recentes sugerem que este subconjunto de células T efetoras podem exercer uma função de imunidade anti-tumoral (Figura 4) [82]. Existem vários estudos sugerindo que as células Th17 podem promover respostas imunológicas anti-tumorais protetoras, o que sugere que as células Th17 associadas a tumores podem ser células T efetoras funcionais [85]. Consistente com esta possibilidade, as células Th17 estão negativamente correlacionadas com a presença das células Treg, como já foi descrito anteriormente, estando positivamente correlacionadas com as células efetoras imunitárias (células T efetoras IFN- γ +, células T CD8 + e células NK, no mesmo microambiente tumoral [86,87]. Estas observações foram comprovadas tanto em amostras patológicas de humanos, como de ratos [88,89].

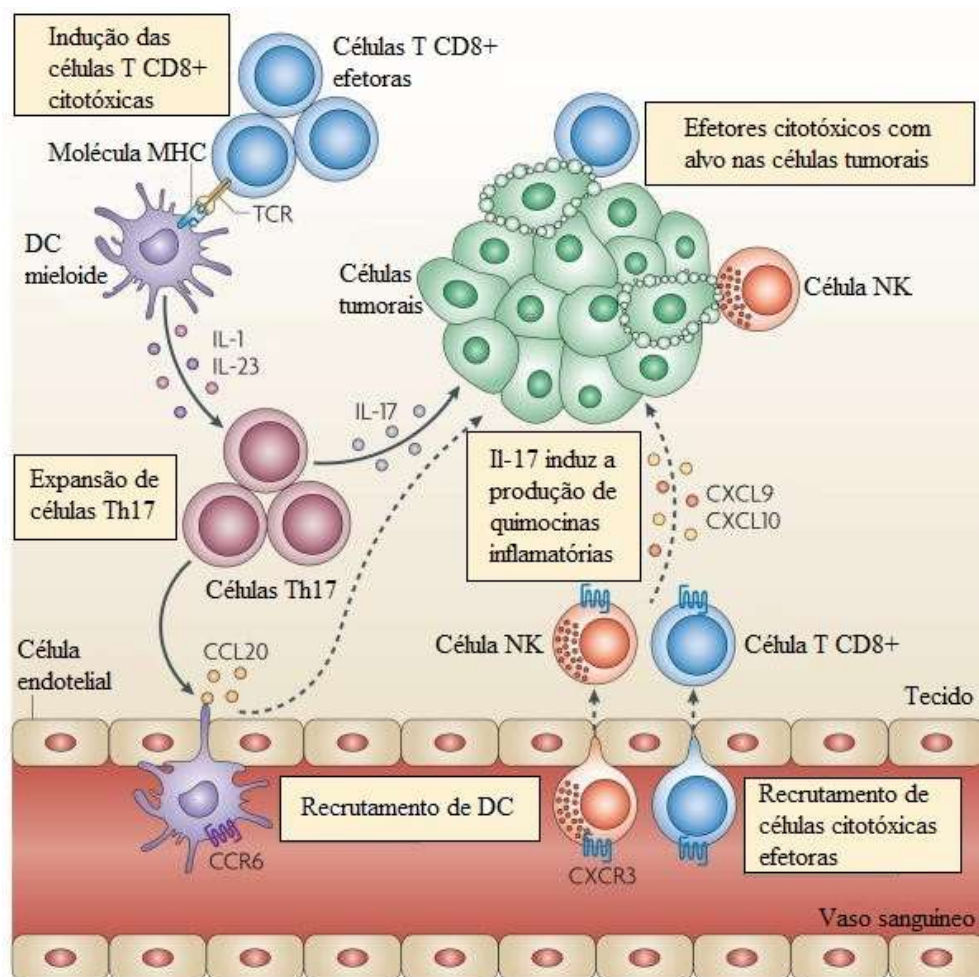


Figura 5: Células Th17 e a imunidade anti-tumoral, adaptado de [82].

5. Mecanismos de escape dos tumores ao sistema imune

Em muitos casos, os tumores têm a particularidade de estimular uma resposta imune anti-tumoral, no entanto tem-se tornado evidente que esta resposta é cada vez menos eficaz, já que as neoplasias têm aumentado significativamente ao longo dos anos. Esta falha do sistema imune surge de diversas causas, sendo descritas como mecanismos de escape (Tabela 1) [90].

Tabela 1: Mecanismos de escape dos tumores ao sistema imunitário. Adaptado de [90,91].

A. Interferência com a indução de respostas imunitárias anti-tumorais:

1. Redução da expressão de moléculas co-estimuladoras sobre o tumor ou células apresentadoras de antígenos;
2. Alterações na sinalização de *TCR* em *Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TIL)*;
3. Disfunção de DC e inadequada apresentação às células T;
4. Apoptose das DC no microambiente tumoral.

B. A função inadequada das células efetoras no microambiente tumoral:

1. Supressão das respostas de células T pelas células Treg;
2. Supressão de células do sistema imune por células supressoras mieloides;
3. Apoptose de células T efetoras no tumor e na periferia
4. Microvesículas secretadas pelos tumores que induzem a apoptose das células T CD8+ efetoras.

C. Sinais de reconhecimento insuficiente:

1. Regulação negativa da expressão de moléculas HLA em células tumorais;
2. Alterações na expressão do componente *antigen processing machinery (APM)* em células tumorais ou nas células apresentadoras de antígenos;
3. Supressão da atividade das células NK no microambiente tumoral.

D. Desenvolvimento da imunoresistência pelo tumor:

1. Ausência de suscetibilidade de células efetoras imunes;
2. Imunoseleção de variantes resistentes;
3. Células estaminais Tumorais

Estes mecanismos de imunossupressão impedem que as células exerçam as suas atividades anti-tumorais e por outro lado, permitem que o tumor escape do sistema imune do hospedeiro e progrida. Isto tem revelado um grande interesse científico, de forma a se encontrar inibidores terapêuticos seguros, eficazes e específicos, capazes de contrariar a

imunossupressão induzida pelo tumor. Muitos são os eventos celulares e moleculares que ocorrem no microambiente tumoral com a capacidade de orientarem o tumor para uma remodelação contínua a nível genético, epigenético e metabólico, de forma a adquirir resistência à apoptose [92].

Destes distintos mecanismos, a função inadequada das células efectoras no microambiente tumoral tem recebido especial atenção nos últimos anos, pois está claramente associada com a progressão da doença. Além disso, o tumor induz a acumulação de células Treg, células supressoras mieloides, citocinas e fatores que lhe permitem iludir o sistema imunitário, estando associado a um mau prognóstico em doentes com cancro [93]. Estas condicionantes, em conjunto com os fatores do estroma produzem um ambiente favorável para a sobrevivência, crescimento e metastização do tumor. O tumor ganha uma certa dinâmica durante a fase de fuga, contribuindo assim para uma alteração da sua antigenicidade. Como os tumores crescem, eles têm a capacidade de modular a sua antigenicidade de várias maneiras, de modo a evitar a resposta imune eficaz [94]. Kontani *et al.*, com um estudo de 26 doentes com cancro da mama, observaram a resistência à lise nas células tumorais com a perda do antigénio MUC1, (molécula alvo na morte de células de cancro da mama por linfócitos T citotóxicos). Com este estudo, concluíram que a proteína MUC1 é muito importante para imunidade anti-tumoral no entanto, o principal mecanismo de escape das células tumorais a partir de linfócitos T autólogos, consiste na perda e/ou modulação de antigenicidade de MUC1 em células tumorais, o que limitaria a eficácia de uma possível imunoterapia [95]. Por outro lado, também ocorrem alterações nas vias de morte celular do tumor. As células malignas apresentam um aumento da resistência à apoptose alterando o equilíbrio do sistema imunitário. Os níveis aumentados de citocinas como IL-4, IL-10, prostaglandina E2 (PGE2) e TGF- β secretadas pelas células tumorais foram encontrados para regular positivamente a expressão das moléculas anti-apoptóticas como, BCL-XL e MCL-1, que conferem resistência à apoptose das células tumorais [96,97].

A epigenética também está muito relacionada com eventos de escape por parte dos tumores, particularmente a metilação de DNA que está associada com a alteração da expressão de vários genes importantes. Estes podem incluir genes *HLA*, os genes que codificam *tumor antigens* (TAs) ou os que codificam citocinas [98].

As alterações nas vias de transdução de sinal também auxiliam o tumor a ultrapassar o sistema imune. As alterações nas vias NF- κ B e JAK/STAT têm desempenhado um papel

crucial de escape da resposta imune [99,100]. Vários tipos de STATs têm sido implicados na carcinogênese no entanto, o STAT3 tem sido descrito por auxiliar o tumor, evitando assim a resposta imunitária e aumentando as citocinas supressoras como TGF- β , IL-6, IL-10 e VEGF no microambiente tumoral [101].

Sob condições fisiológicas normais, as células Treg apresentam um papel benéfico na prevenção da auto-imunidade [102]. No entanto, em neoplasias, estas células expandem, migram para locais de tumor, regulam a proliferação de células T efetoras autólogas e suprimem as respostas anti-tumorais das células T, utilizando vias moleculares distintas [103]. Estudos sobre as células T reguladoras (Treg) têm descrito que estas são importantes para o desenvolvimento da tolerância imunológica em tumores e que, desempenham um papel crítico na indução de tolerância aos antígenos e na supressão da imunidade anti-tumoral associada ao tumor [104]. Anomalias genéticas ou agentes ambientais que especialmente afetem as células Treg causam ou predisõem para a auto-imunidade. Estas células são definidas através da expressão de CD4+, CD25+, CD127 débil e pelo fator transcricional (FoxP3). O FoxP3 é um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento e função das células Treg, sendo também considerado um bom marcador para estas células [105,106]. Pesquisas já efetuadas têm demonstrado a existência de percentagens elevadas de células Treg em doenças neoplásicas, Contudo os mecanismos moleculares e celulares responsáveis pelo aumento e manutenção destas percentagens elevadas de Tregs em tumores ainda não é muito clara. A infiltração destas células consiste num mecanismo importante para a inibição do microambiente tumoral. Já as células tumorais são necessárias para converter as DCs em células reguladoras que segregam TGF- β bioativo e que estimulam a proliferação de células Treg [107]. Outro estudo, relaciona o papel das células Treg intratumorais com o seu papel no microambiente do tumor, como no linfoma Não-Hodgkin de células B. Estes autores observaram que as células Treg existiam em maior quantidade nas zonas patológicas, levantando a questão se estas células poderiam ser ou não recrutadas a partir da circulação. Os seus resultados mostraram que, em parte, as células tumorais são responsáveis pela alta representação das células Treg intratumorais, através do recrutamento e talvez, posteriormente influenciarem a expansão destas células [108].

A alteração na expansão das moléculas de MHC de classe I das células tumorais causadas pela transformação maligna também ajuda no escape ao sistema imune. Esta alteração pode corresponder a uma diminuição ou perda completa da expansão destas

moléculas pelas células tumorais ocasionando uma falha da resposta imune mediada por linfócitos T CD8, que reconhecem apenas antígenos associados a moléculas do MHC de classe I [109].

Yang *et al.* mostraram que a desgranulação e subsequente atividade citotóxica das células T CD8+ expostas a células B neoplásicas torna-se completamente atenuada pela presença das células Treg intratumorais. Para além disto, estes autores verificaram que o aumento do número de células Treg intratumorais correlacionam-se com o número de células T CD8 em amostras de biópsia de doentes com linfoma Não-Hodgkin B. Estes resultados são suportados por experiências *in vitro* já realizadas anteriormente onde mostram que as células Treg inibem a proliferação de células T CD8 [110,111].

Por outro lado, também está descrito na literatura, que as células Th17 podem estar envolvidas na imunologia tumoral e ajudando na progressão do tumor. A IL-23 é um factor importante para a manutenção e a expansão das populações de células inflamatórias Th17 [112]. Esta citocina foi recentemente identificada como pró-carcinogénica, promovendo a angiogénese e a inflamação dentro do microambiente do tumor, diminuindo a quantidade de células T CD8+ [113]. Assim, este estudo verificou que a presença das células Th17 dentro do microambiente do tumor antagoniza a diferenciação e a função do IFN- γ produzido pelas células Th1, estando muito provavelmente envolvidas na promoção do crescimento do tumor [114,115].

Estudos indicam que existem menos células Th17 no microambiente tumoral e que curiosamente existe uma relação inversa entre as células Th17 e as Treg na mesma amostra neoplásica [86,116]. Isto sugere uma possível interação dinâmica entre estes dois tipos de células no microambiente tumoral [117]. Apesar dos elevados valores de IL-6 detetada em alguns cancros, o número de células Th17 é limitada no microambiente tumoral por isso, o efeito positivo de IL-6 na indução de células Th17 pode ser comprometido por um mecanismo não identificado [118].

Objetivos

6. Objetivos

Tem sido descritas diferenças significativas no microambiente tumoral, umas vezes mais pró-inflamatório e outras anti-inflamatório, o que condiciona a resposta imune anti-tumoral, e conseqüentemente o prognóstico e evolução desses tumores.

Os órgãos linfoides secundários, como os gânglios linfáticos, são os locais por excelência para ocorrer a disseminação da resposta imune, havendo uma interação privilegiada entre as células T, B e células dendríticas.

Neste sentido, o objetivo deste estudo centrou-se na caracterização fenotípica da celularidade do gânglio e avaliação funcional das células T e NK em casos de gânglios normais/reativos e com DLPC-B, na altura do diagnóstico, e desta forma perceber se ocorre, nestes últimos, uma resposta imune pró- ou anti-inflamatória.

Para este efeito procedeu-se à quantificação das:

- Populações celulares: linfócitos, monócitos, DCs e células NK;
- Percentagem das diferentes subpopulações de linfócitos T, T CD4, T CD8 e das Tregs;
- Percentagem de linfócitos Th e Tc a produzir IL-17 ou IFN- γ após a ativação *in vitro* com PMA e ionomicina;

Após *cell sorting* das populações de linfócitos T CD4 e T CD8, procedeu-se à quantificação da expressão de mRNA para os genes *IL-2* e *IL-10*.

Material e Métodos

7. Material e Métodos

7.1. População em estudo

Este estudo envolveu 19 biópsias de gânglios linfáticos, cinco com Linfoma linfocítico/LLC-B Linfocítico, dos quais três eram do sexo masculino com uma média de idades de $77,6 \pm 9,84$, sete classificados como Linfoma Não-Hodgkin B (LNH-B), (1 linfoma de zona marginal, 4 linfomas difusos de grandes células B e 2 linfomas foliculares), dos quais cinco eram do sexo masculino com uma média de idades de $56,0 \pm 12,9$ e sete biópsias de gânglios linfáticos normais/reactivos, sem doença hematoológica diagnosticada para o grupo controlo, dos quais dois eram do sexo masculino, com uma média de idades de $46,1 \pm 18,5$. Para ambas as populações em estudo, foram colhidas amostras de gânglios linfáticos e colocados em tampão fosfato-salino, pH 7.4 (PBS) (GIBCO, USA).

7.2. Caracterização fenotípica das diferentes populações celulares

As amostras foram caracterizadas funcionalmente utilizando a técnica de citometria de fluxo. Quantificou-se a expressão de proteínas membranares, nas diferentes subpopulações de células T.

O estudo efetuou-se através de um processo de marcação direta, de acordo com o seguinte procedimento. Pipetou-se 200 μL de amostra de gânglio linfáticos. De seguida, procedeu-se à incubação da amostra com os vários anticorpos monoclonais cujo volume usado se encontra descrito abaixo na tabela 5 (tubo 1). Incubou-se 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Efetuou-se a lise celular com 2mL de *FACS Lysing* (1x) (FACSTM Lysing Solution; Becton Dickinson Biosciences, U.S.A.), previamente diluído a 1:10 em água destilada durante 10 minutos à temperatura ambiente no escuro. Centrifugou-se durante 5 minutos a 540xg e decantou-se o sobrenadante. Por fim adicionou-se 1 mL de PBS (1x). Decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se com 250 mL de PBS (1x). Por fim, adquiriu-se a amostra no citómetro de fluxo.

7.3. Caracterização fenotípica da subpopulação de células T e avaliação da produção de citocinas

Para a ativação das células T usou-se: 500 μ L de uma solução RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMax™ (GIBCO, USA), com 500 μ L de amostra da biópsia de gânglio, juntamente com 25 μ L de uma diluição de 1:100 de PMA (Phorbol 12-myristato 13 acetato), com 2 μ L de Ionomicina *Calcium Salt From* de *Streptomyces globatus* (Sigma, USA) e com 2 μ L de Brefeldina A de *Penicillium brefeldianum* (Sigma, USA). Colocou-se numa estufa durante 4 horas, a 37° C, 5% de CO₂ e 95% de humidade.

Passadas as 4 horas, pipetou-se 200 μ L da amostra ativada e iniciou-se a marcação com o painel de anticorpos monoclonais de superfície (tabela 5, tubo 2). De seguida, procedeu-se à incubação da amostra com os vários anticorpos monoclonais durante 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Adicionou-se 100 μ L de reagent A (*Fix & Perm Medium A, Life Technologies, USA*) para fixar as células e colocou-se novamente 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de PBS, colocou-se na centrifuga durante 5 minutos a 540xg e decantou-se o sobrenadante. Adicionou-se 100 μ L de reagent B (*Fix & Perm Medium B, Life Technologies, USA*) para lisar e permeabilizar as células e de seguida, adicionou-se os anticorpos monoclonais intracitoplasmáticos e colocou-se novamente a incubar 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro.

Por fim, adicionou-se 1 mL de PBS e decantou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se com 250 μ L de PBS (1x) e de seguida, adquiriu-se a amostra no citometro de fluxo.

7.4. Aquisição por citometria de fluxo

A aquisição das amostras foi realizada num citometro de fluxo BD FACSCanto™ II, (*BD Biosciences*; San José, CA, USA), usando o *software* BD FACSDiva (v6.1.2; BD). Para a análise dos resultados obtidos por citometria de fluxo recorreu-se ao *software* Infinicyt 1.8 (*Cytognos, S.L., Salamanca, Spain*).

7.5. Separação e purificação das populações celulares linfocitárias T CD4 e CD8

Para a separação e purificação das populações de células T CD4 e CD8, a 2 mL de amostra foi adicionado 2 mL de lisante NH₄Cl durante 20 minutos. De seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão fosfato-salino (PBS) (Gibco). Após a lavagem, adicionou-se o painel de anticorpos monoclonais descritos na Tabela 5 (tubo 3). Após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente e no escuro, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão fosfato-salino (PBS) (Gibco, USA). A separação foi feita utilizando o separador celular *FACSAria™ III*, (BD Biosciences; San José, CA, USA). As populações celulares separadas foram centrifugadas durante 3 minutos a 0,4xg e o pellet ressuspenso em 350µL de tampão de lise RLT (Qiagen, Hilden, Germany), para posteriormente se proceder ao congelamento das respetivas amostras a -20°C.

7.6. Avaliação da expressão génica

Para se realizar a extração de mRNA total recorreu-se ao *RNeasy Micro Kit* (Quiagen, Germany) de acordo com as instruções do fornecedor. O mRNA foi transcrito reversamente, na sua totalidade, com o *KIT High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, USA) seguindo as instruções sugeridas pelo fabricante. O gene de referência utilizado foi *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*. Os conjuntos de primers usados nesta técnica serviram para avaliar a expressão dos genes pretendidos, estando descritos na Tabela 2.

A quantificação relativa da expressão génica por PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada no *Bio-Rad CFX Manager (CFX96 Real Time System C100 Thermal Cycler*, California). Para as reações de qRT-PCR utilizou-se 1X EvaGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1X QuantiTect Primer Assay e Nuclease-free water, prefazendo um total de 8 µL e de 2µL de amostra de cDNA, sendo o volume total da reação de 10 µL. A reação de qRT-PCR está representada na Tabela 3.

Tabela 2: Conjunto de primers (Forward e Reverse) e temperaturas de annealing utilizadas para a expressão dos genes GAPDH, IL-2 e IL-10, respectivamente.

Gene	Primers	Temperatura de Annealing (°C)
<i>GAPDH</i>	Forward 5'AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC3' Reverse 5'CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGT3'	60
<i>IL-2</i>	Forward 5'CCAAGAAGGCCACAGAACTGA3' Reverse 5'AATGGTTGCTGTCTCATCAGC3'	60
<i>IL-10</i>	Forward 5'CGAGATGCCTTCAGCAGAGT3' Reverse 5'GGCAACCCAGGTAACCCTTA3'	60

Tabela 3: Esquema do perfil da reação de qRT-PCR utilizado para a avaliação da expressão dos genes em estudo.

Etapa	Ativação da enzima Sso7d-fusion polymerase	PCR	
	Aquecimento	50 Ciclos	
		Desnaturação	Annealing/Extensão
Temperatura	95°C	95°C	Dependente dos primers
Tempo	30 seg	5 seg	5 seg

Assim, para cada gene foi estabelecida uma curva padrão através de diluições seriadas a fim, de determinar a eficiência da reação. Complementarmente, foram realizadas curvas de Melting para verificar a ausência de produtos inespecíficos. A normalização dos níveis de expressão dos genes de interesse foi calculada através do método delta-Ct.

7.7. Análise estatística

Para a determinação do significado estatístico de todas as variáveis em estudo foram feitos testes não paramétricos de amostras independentes (teste de Mann-Whitney) e (teste de Kruskal-Wallis) usando o software Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 23.0, Armonk, NY, USA). Os resultados foram expressos através de box-plot e com a percentagem da média \pm desvio padrão e as diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando o p value $\leq 0,05$. As linhas limite do box-plot representam o 1º quartil (25%) e o 3º quartil (75%); a linha a meio representa a mediana e as linhas verticais correspondem ao intervalo de 95% de confiança.

Tabela 4: Combinações de anticorpos monoclonais (com clones, fluorocromos e respectiva marca) para a caracterização fenotípica dos linfócitos T e respectivas subpopulações.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
PO (Pacific Orange)	CD45 (clone H130, BD Biosciences, USA)	CD45 (clone H130, BD Biosciences, USA)	-
PB (Pacific Blue)	HLA-DR (clone L243, BD Biosciences, USA)	CD4 (clone MOPC- 21, BD Biosciences, USA)	CD4 (clone MOPC- 21, BD Biosciences, USA)
APC-H7 (Allophycocyanin- hilite 7)	CD8 (clone SK1, BD Biosciences, USA)	CD8 (clone SK1, BD Biosciences, USA)	-
APC (Allophycocyanin)	CD3 (clone SK7, BD Biosciences, USA)	CD3 (clone SK7, BD Biosciences, USA)	CD3 (clone SK7, BD Biosciences, USA)
FITC (Fluorescein isothiocianate)	CD127 (clone R34.34 Beckman Coulter, USA)	IFN- γ (clone 4S.B3, BD Biosciences, USA)	-
PE (Phycoerythrin)	CD25 (clone B1.49.9, Beckman Coulter, USA)	IL-17 (clone SCPL1362, BD Biosciences, USA)	-
PerCP Cy5.5 (Peridinin chlorophyll protein-cyanine 5.5)	CD4 (clone SK3, BD Biosciences, USA)	-	-
PECy7 (Phycoerythrin- cyanine 7)	-	CD56 (clone N901 (NKH-1), Beckman Coulter, USA)	CD8 (clone SFCI21Thy2D3, Beckman Coulter, USA)

Resultados

8. Resultados

Através das amostras de biópsias de gânglios linfáticos, pretendeu-se perceber o comportamento de várias populações celulares tais como, linfócitos, monócitos e células dendríticas. Por outro lado, também foi essencial o estudo de várias subpopulações de células T mais concretamente, as células T ativadas, as células Treg, as células Th/c17 e por fim, as células Th/c1.

Os dados foram organizados em três grupos: o grupo de amostras de biópsia de gânglio linfático normal/reactivo (controlo) (n=7), o grupo de amostras de biópsia de gânglio linfático com Linfoma Linfocítico/LLC-B (n=5) e o grupo de amostras de biópsia de gânglio linfático com LNH-B (n=7), respetivamente. Os resultados foram agrupados na tabela 5, página 41.

8.1. Celularidade geral do gânglio linfático

8.1.1. Percentagem de linfócitos totais, monócitos e células dendríticas

Quantificou-se a percentagem dos linfócitos totais (A), monócitos (B) e células dendríticas (C) das amostras de gânglios linfáticos. Pela sua análise, verificou-se um aumento em média da percentagem de linfócitos totais, tanto no grupo com Linfoma Linfocítico/LLC-B, como no grupo dos LNH-B. Nesta análise, observou-se um significado estatístico vs o grupo controlo e vs o grupo com linfoma linfocítico.

Por outro lado, verificou-se um decréscimo acentuado na percentagem de monócitos corrigida em função da infiltração de células B neoplásicas do grupo controlo para o grupo com linfoma linfocítico/LLC-B. O mesmo já não se visualizou, quando comparado com o grupo dos LNH-B. Neste caso, observou-se um aumento da percentagem de monócitos corrigida em função da infiltração de células B neoplásicas nas amostras.

Através da imagem C, observou-se um decréscimo acentuado da percentagem das DCs corrigida em função da infiltração de células B neoplásicas em ambos os grupos com amostras patológicas relativamente ao grupo controlo. Neste caso com significado estatístico vs o grupo controlo em ambos os casos (Figura 6).

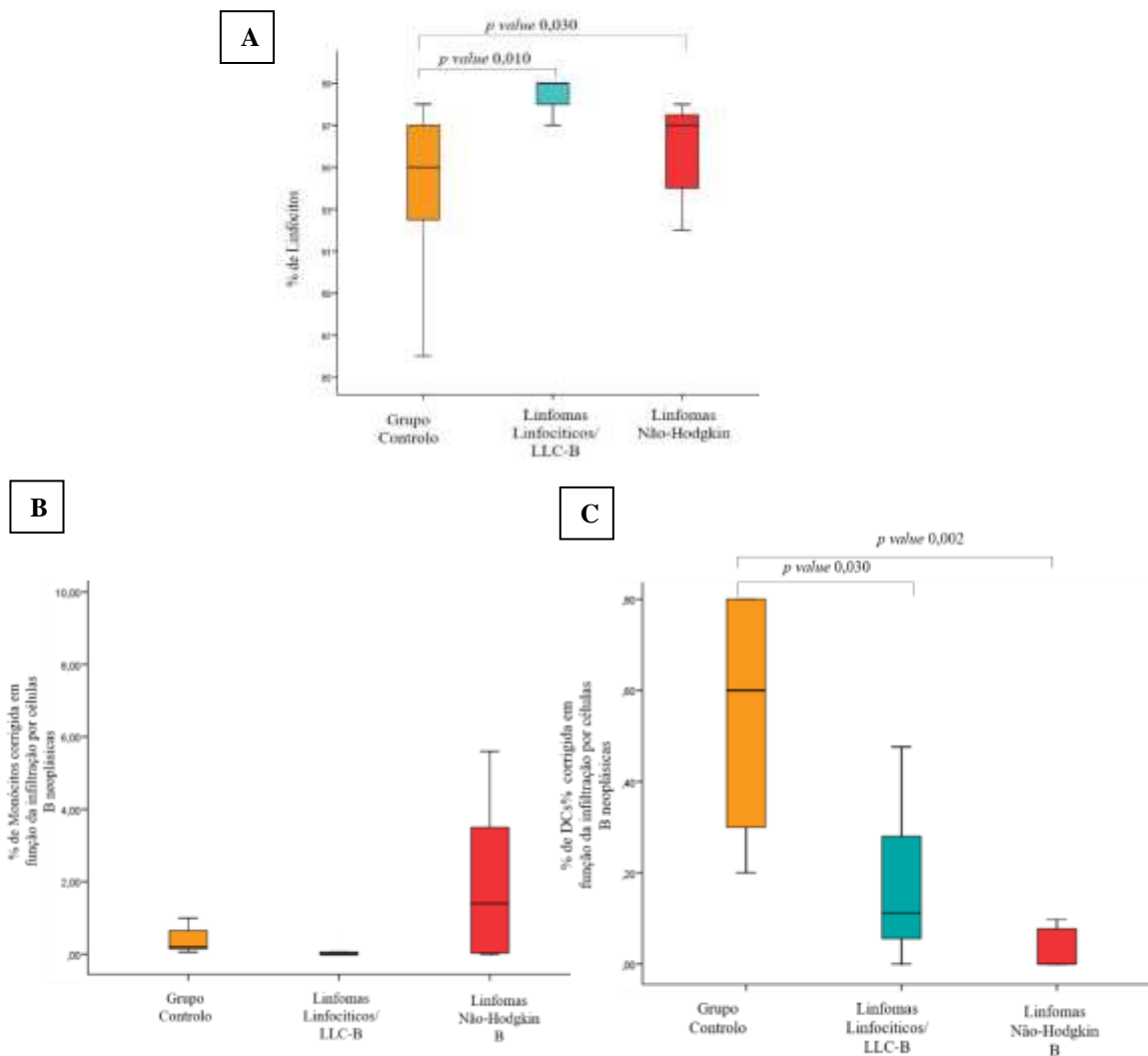


Figura 6: A: Percentagem de linfócitos da celularidade global. B: Percentagem de monócitos corrigida em função da infiltração por células B neoplásicas da celularidade global. C: Percentagem de células dendríticas corrigida em função da infiltração por células B neoplásicas da celularidade global. A e C: Com significado estatístico para $p < 0,05$; Teste de *Kruskal-Wallis* e *Mann Whitney*.

8.2. Células T

8.2.1. Percentagem de células T dentro dos linfócitos totais

Quantificou-se a percentagem das células T nos linfócitos totais, na qual se verificou uma diminuição com significado estatístico para o grupo com linfomas linfocíticos/LLC-B, relativamente ao grupo controle. Por outro lado, também se observou uma diminuição da percentagem destas células no grupo dos LNH-B porém, sem significado estatístico (Figura 7).

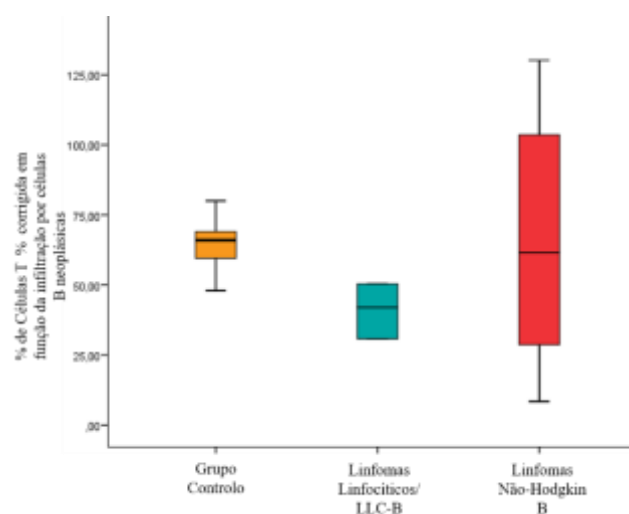


Figura 7: Percentagem de células T nos linfócitos totais corrigida em função da infiltração por células B neoplásicas.

8.2.2. Percentagem de células T *helper* e T citotóxicas na globalidade das células T

Verificou-se que ocorre um ligeiro aumento da percentagem das células T CD4 nas amostras patológicas, relativamente ao grupo controlo, principalmente no grupo de linfomas linfocíticos/LLC-B. Em relação às células T CD8, observou-se uma diminuição da sua percentagem nos grupos com amostras patológicas, comparativamente ao grupo controlo (Figura 8).

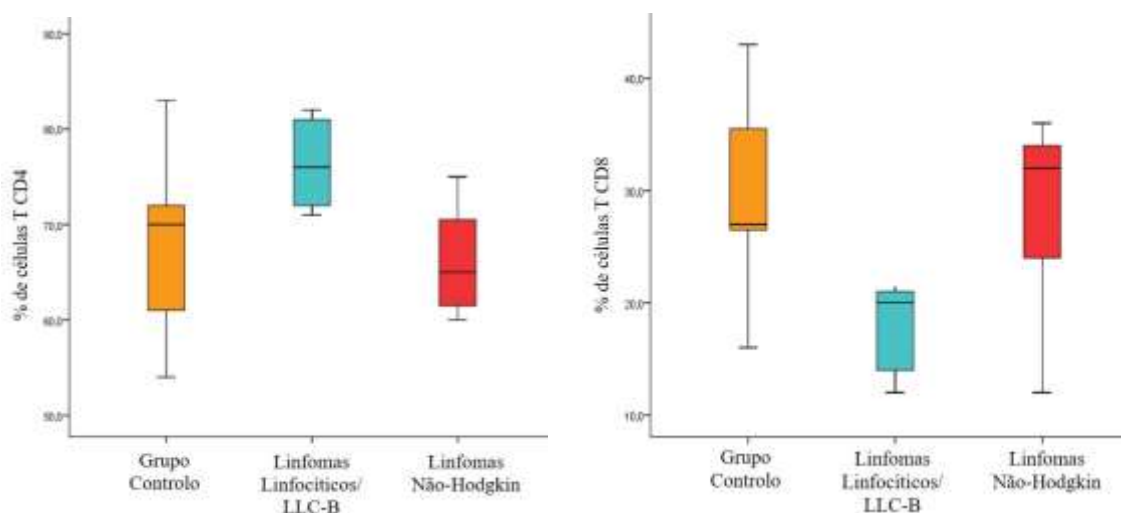


Figura 8: Percentagem das diferentes subpopulações de células T, CD4 e CD8 na globalidade das células T.

8.2.3. Percentagem de células T ativadas

Através da expressão de HLA-DR, verificou-se um aumento da percentagem de células T ativadas nas amostras de linfomas linfocíticos/LLC-B e nas amostras de LNH-B, em comparação com as amostras controlo. Esta percentagem de células T ativadas apresentou um significado estatístico vs o grupo controlo (Figura 9).

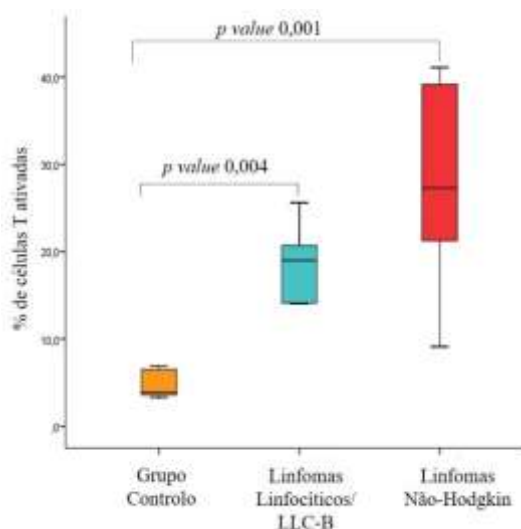


Figura 9: Percentagem de células T ativadas dentro das células T. Com significado estatístico para $p < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis e Mann Whitney.

8.2.4. Percentagem de células T reguladoras dentro das células T helper

Através da expressão de CD4, expressão forte de CD25 e débil de CD127 determinou-se a percentagem das células T reguladoras (Figura 10). Visualizou-se um aumento da percentagem destas células nas amostras de linfoma linfocítico/LLC-B e nas amostras de LNH-B, em relação às amostras controlo (Figura 11).

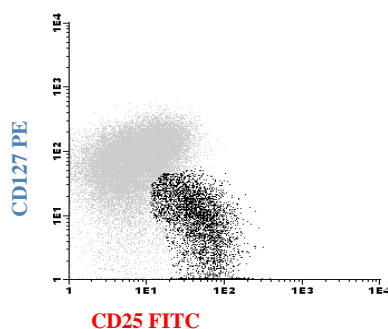


Figura 10: Determinação da população de células Tregs. Legenda: Células Tregs selecionadas a preto.

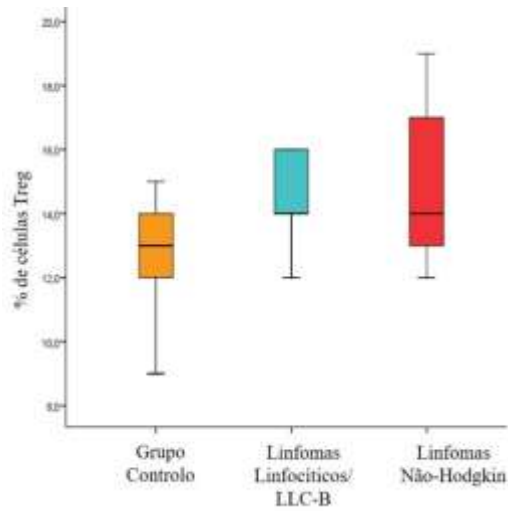


Figura 11: Percentagem das células T reguladoras dentro das células T CD4.

8.2.5. Percentagem das subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 a produzir IL-17 e IFN- γ intracitoplasmático, após a ativação *in vitro* com PMA e ionomicina.

8.2.5.1. Percentagem de células Th17 e Tc17 dentro das células T helper e T citotóxicas, respetivamente

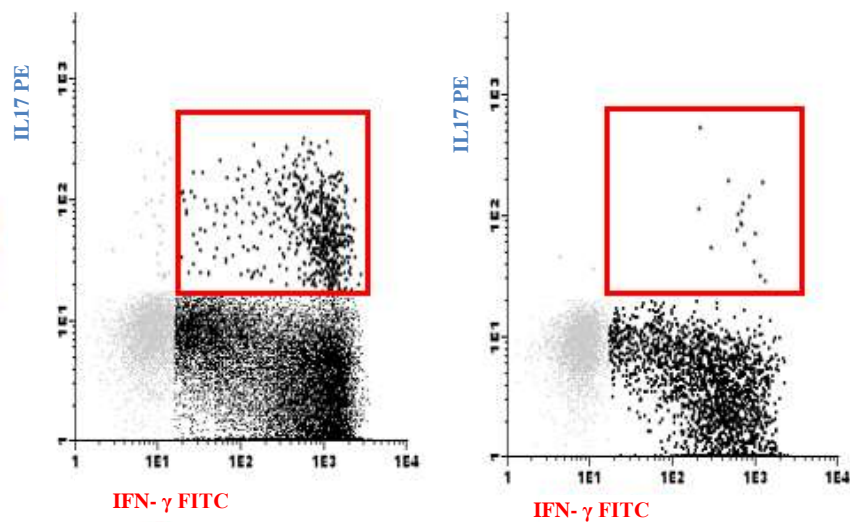


Figura 12: Determinação da população de células Th17 e Tc17, respetivamente. Legenda: Células Th17 e células Tc17 selecionadas a preto.

Observou-se uma elevada heterogeneidade no grupo controlo relativamente aos grupos com linfoma linfocítico/LLC-B e LNH-B, embora sem significado estatístico, tanto para as células Th17, como para as Tc17 (Figura 12).

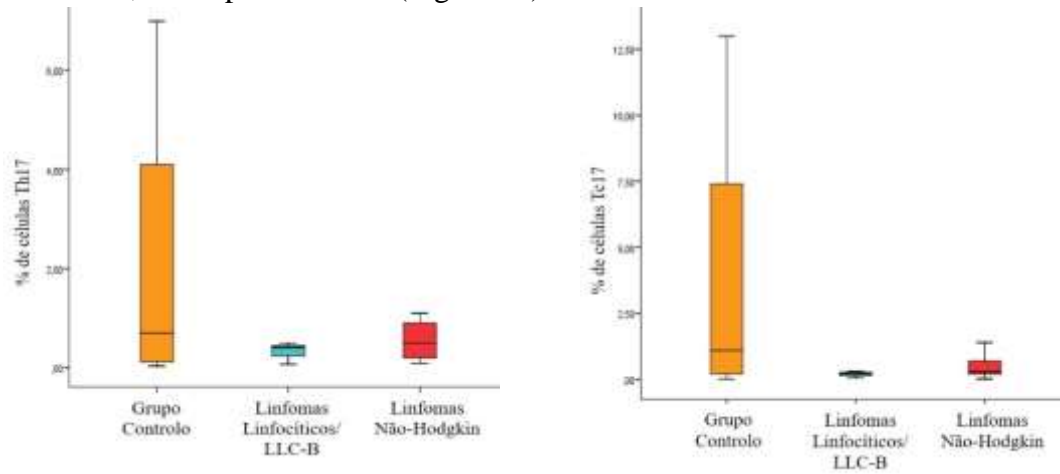


Figura 13: Percentagem das células Th17 e Tc17 dentro das células T helper e das células T citotóxicas, respetivamente.

8.2.5.2. Percentagem de células Th1 e Tc1 dentro das células T helper e T citotóxicas, respetivamente a produzir IFN- γ e sem IL-17

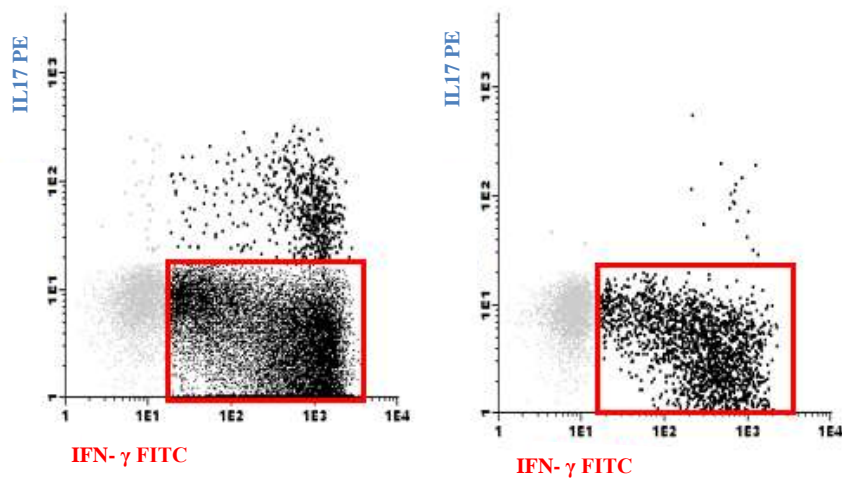


Figura 14: Determinação da população de células Th1 e Tc1, respetivamente. Legenda: Células Th17 e células Tc17 seleccionadas a preto.

Observou-se uma diminuição da percentagem de células Th1 e de células Tc1 no grupo dos linfomas linfocíticos/LLC-B bem como, no grupo dos LNH-B (Figura 13).

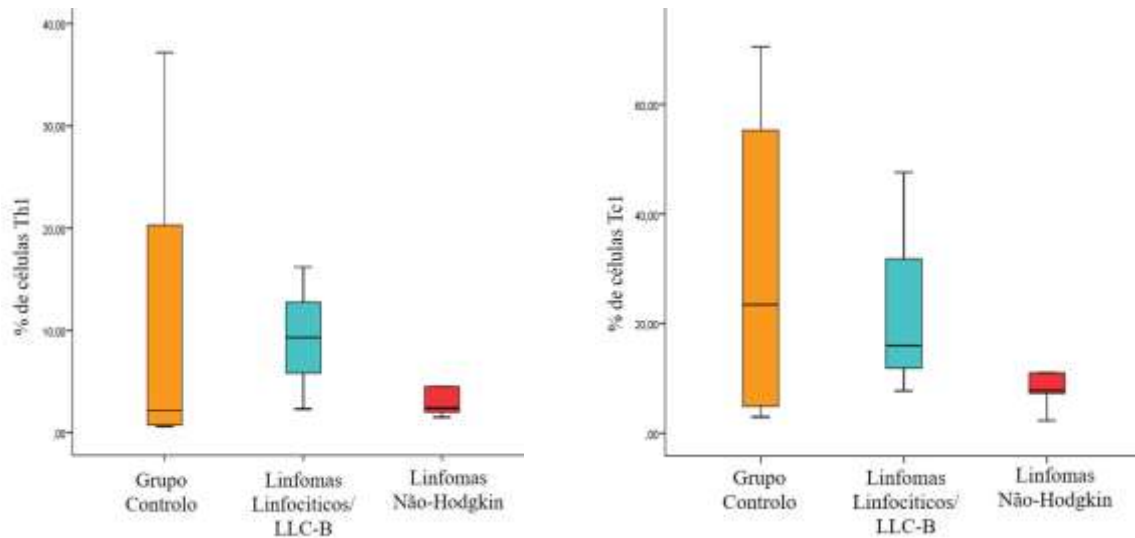


Figura 15: Percentagem das células Th1 e Tc1 dentro das células T *helper* e T citotóxicas.

8.2.6. Percentagem das células NK na celularidade global

Observou-se uma diminuição da percentagem de células NK, tanto na amostra de linfomas linfocíticos/LLC-B, como nas amostras de LNH-B. Esta percentagem de células NK da celularidade global do gânglio linfático apresentou um significado estatístico vs o grupo controlo (Figura 14).

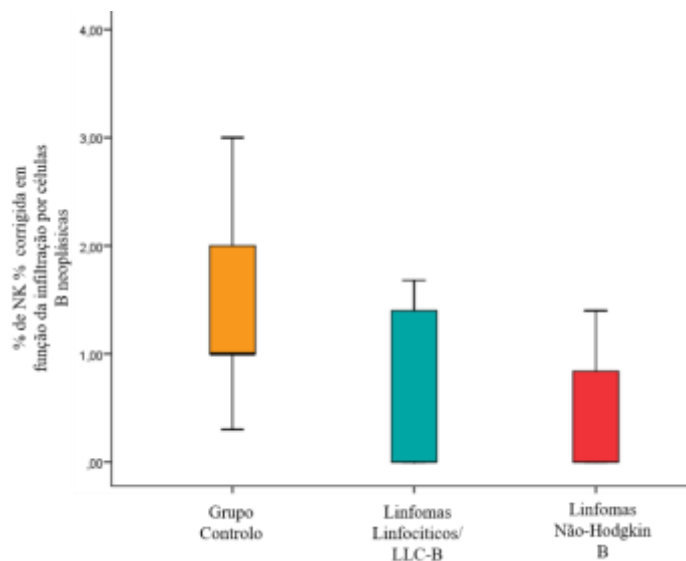


Figura 16: Percentagem das células NK na celularidade global.

8.2.6.1. Percentagem de células NK CD56^{dim} e de NK CD56^{bright} dentro da globalidade das células NK

Relativamente à percentagem de NK CD56^{dim}, analisou-se uma ligeira diminuição da sua percentagem no grupo de linfomas linfocíticos/LLC-B e no grupo dos LNH-B. O mesmo se verificou na percentagem das células NK CD56^{bright}. Estes dados podem ser observados na tabela 5.

8.2.6.2. Percentagem das células NK CD56^{dim} e de NK CD56^{bright} a expressar IFN- γ , após a ativação *in vitro* com PMA e ionomicina

Verificou-se uma diminuição acentuada da percentagem de células NK CD56^{dim} a produzir IFN- γ no grupo dos linfomas linfocíticos e no grupo dos LNH-B. O mesmo se analisou para as células NK CD56^{bright} a produzirem IFN- γ , mas neste caso, com significado estatístico vs o grupo controlo (Figura 15).

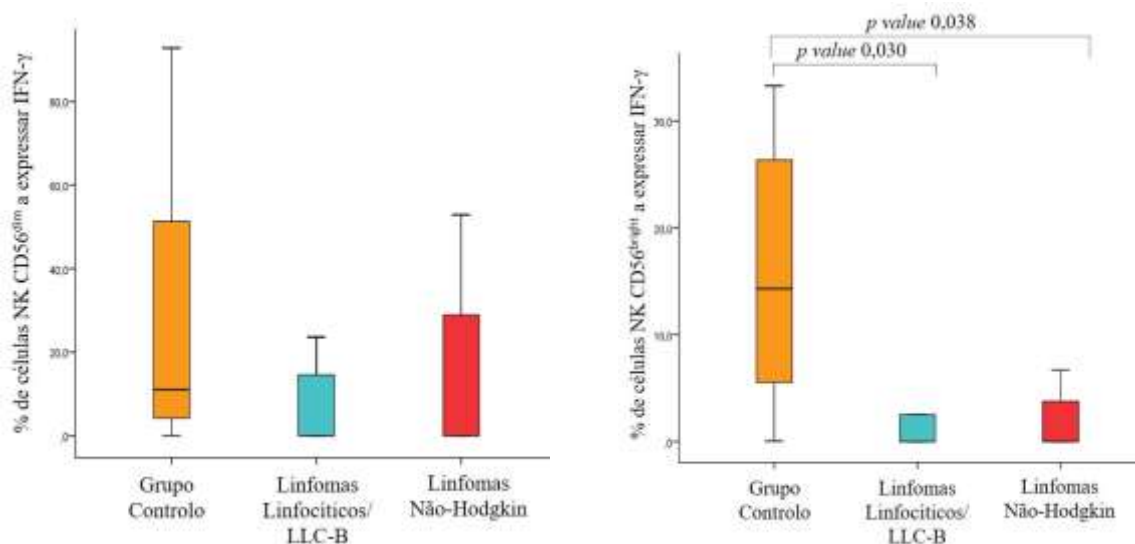


Figura 17: Percentagem de células NK CD56^{dim} e de NK CD56^{bright} a expressar IFN-gamma. Com significado estatístico para $p < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis e Mann Whitney.

8.2.7. Percentagem de células B neoplásicas

A percentagem de células B em gânglios normais/reativos comparativamente com a percentagem de células B em gânglios com DLPC-B, aumentou significativamente no grupo de linfomas linfocíticos/LLC-B e no grupo de LNH-B (Tabela 5).

8.2.8. Quantificação das células T CD4 e T CD8 após separação em *cell sorting* e sua expressão de mRNA de *IL-2* e de *IL-10*

8.2.8.1. Expressão de mRNA do gene *IL-2* para as células T CD4 e T CD8

No que diz respeito à expressão de mRNA de *IL-2* nas células T CD4, verificou-se uma diminuição da sua expressão dos grupos com linfomas linfocíticos/LLC-B e com LNH-B, relativamente ao grupo controlo. Quanto à expressão de mRNA de *IL-2* pelas células T CD8, registou-se também uma diminuição da expressão do gene no grupo dos linfomas linfocíticos/LLC-B e do grupo dos LNH-B, relativamente ao grupo controlo. Com estes resultados obteve-se um significado estatístico (Figura 16).

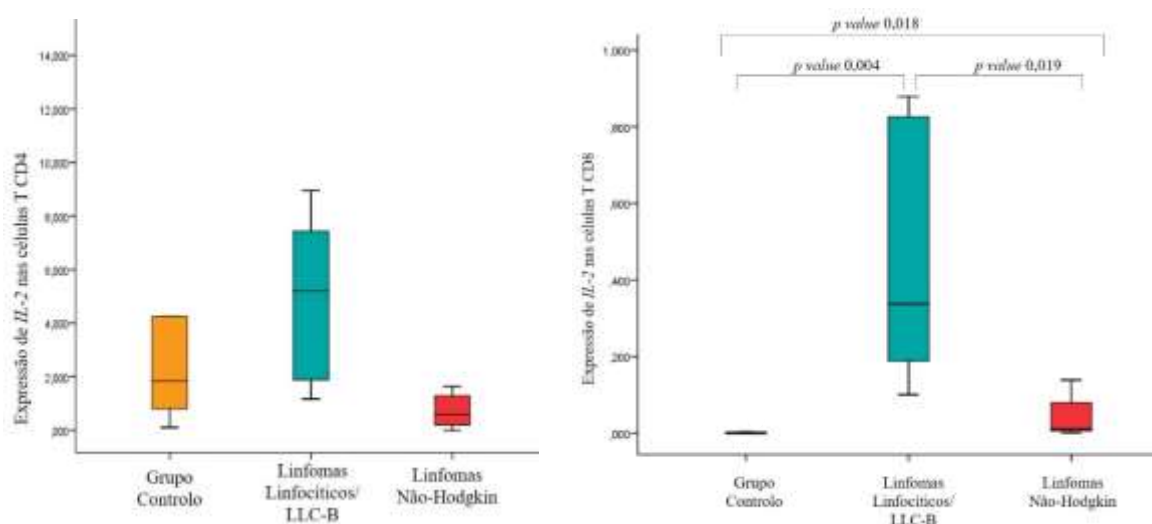


Figura 18: Expressão genética de *IL-2* das células T CD4 e T CD8. Com significado estatístico para $p < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis e Mann Whitney.

8.2.8.2. Expressão de mRNA do gene *IL-10* para as células T CD4 e T CD8

Para o gene *IL-10*, verificou-se um aumento da expressão de mRNA nas células T CD4 para o grupo com linfomas linfocíticos/LLC-B, relativamente ao grupo controlo. O mesmo se observou para o grupo dos LNH-B.

Quanto às células T CD8, observou-se um aumento gradual da expressão de *IL-10* do grupo de linfomas linfocíticos/LLC-B para o grupo de LNH-B, estatisticamente significativo (Figura 17).

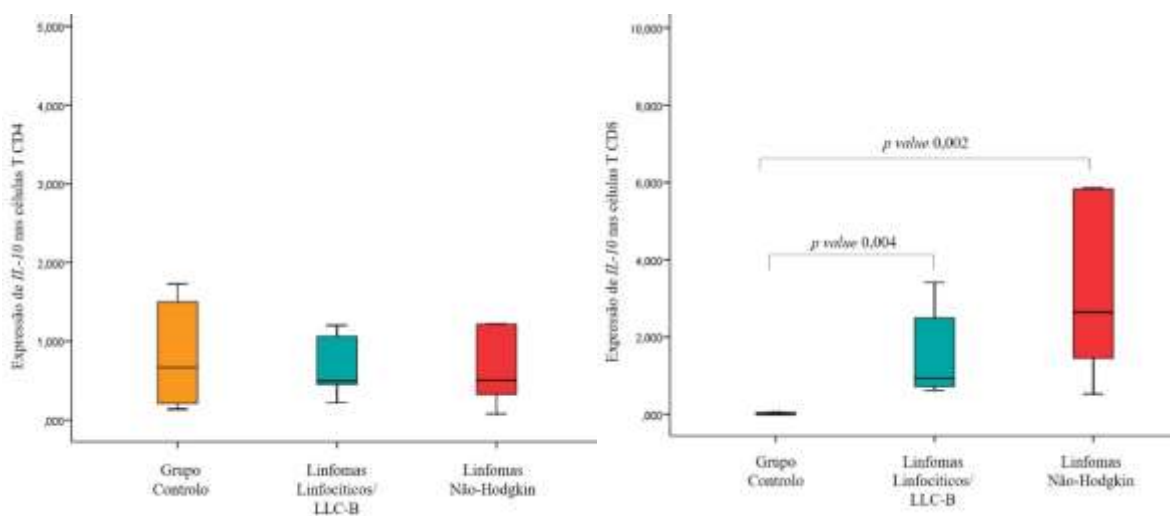


Figura 19: Expressão genética de *IL-10* das células T CD4 e CD8. Com significado estatístico para $p < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis e Mann Whitney.

Tabela 5: Média das percentagens e desvio padrão das diferentes populações analisadas e a sua respetiva significância.

	Controlos	Linfomas linfocíticos/LLC-B	Linfomas Não-Hodgkin B	Teste de <i>Kruskal-Wallis</i> , $p < 0,05$ (em relação aos três grupos)	Teste de <i>Mann-Whitney</i> , $p < 0,05$
% Linfócitos	94,0 ± 4,2	98,4 ± 0,89	92,7 ± 9,8	0,025	0,010 (controlo vs LL/LLC-B) 0,030 (controlo vs LNH-B)
% Monócitos	0,41 ± 0,41	0,04 ± 0,09	1,86 ± 2,7	0,078	-
% de Monócitos corrigida em função da infiltração por células B neoplásicas	-	0,12 ± 0,24	2,61 ± 3,7	0,130	-
% Células dendríticas	0,55 ± 0,26	0,07 ± 0,06	0,1 ± 0,08	0,007	0,004 (controlo vs LL/LLC-B) 0,024 (controlo vs LNH-B)
% de DCs corrigida em função da infiltração por células B neoplásicas	-	0,19 ± 0,19	0,10 ± 0,09	0,005	0,030 (controlo vs LL/LLC-B) 0,002 (controlo vs LNH-B)
% Linfócitos T	64,4 ± 10,3	19,8 ± 13,8	47,4 ± 33,7	0,028	0,004 (controlo vs LL/LLC-B)
% de linfócitos T corrigida em função da infiltração por células B neoplásicas	-	55,4 ± 38,8	66,4 ± 47,2	0,519	-
% Células T ativadas	4,68 ± 1,58	18,7 ± 4,87	28,3 ± 12,5	0,002	0,004 (controlo vs LL/LLC-B) 0,001 (controlo vs LNH-B)
% Células T CD4	62,3 ± 21,7	76,4 ± 5,03	64,4 ± 15,9	0,159	-
% Células T CD8	35,4 ± 21,0	18,8 ± 5,98	31,1 ± 14,3	0,091	-
% células Treg	14,9 ± 6,91	18,2 ± 9,50	15,9 ± 4,63	0,395	-
% células Th17	1,50 ± 2,48	0,26 ± 0,19	0,45 ± 0,40	0,752	-
% células Th1	7,97 ± 13,2	7,26 ± 6,33	6,53 ± 7,78	0,572	-
% células Tc17	2,35 ± 4,74	0,18 ± 0,10	0,41 ± 0,48	0,508	-
% células Tc1	24,3 ± 26,7	17,5 ± 17,6	18,3 ± 23,9	0,605	-
% células NK	1,61 ± 1,34	0,32 ± 0,46	0,31 ± 0,47	0,017	0,022 (controlo vs LL/LLC-B) 0,017 (controlo vs LNH-B)
% de NK corrigida em função da infiltração por células B neoplásicas	-	0,62 ± 0,85	0,44 ± 0,66	0,150	-
% células NK CD56 ^{dim}	58,5 ± 32,4	29,2 ± 39,9	32,8 ± 40,9	0,075	-
% células NK56 ^{bright}	42,2 ± 32,2	10,8 ± 14,8	10,1 ± 12,8	0,077	-
% células NK CD56 ^{dim} a expressar IFN- γ	30,7 ± 38,4	7,62 ± 10,9	15,8 ± 24,5	0,262	-
% células NK CD56 ^{bright} a expressar IFN- γ	21,0 ± 23,8	2,45 ± 4,2	4,47 ± 8,87	0,034	0,030 (controlo vs LL/LLC-B) 0,038 (controlo vs LNH-B)
Célula B neoplásica	-	78,1 ± 14,0	39,4 ± 37,9	0,088	-
Célula B normal	28,0 ± 13,4	-	-	-	-

Discussão

9. Discussão

As DLPC-B consistem em neoplasias que se caracterizam pela proliferação clonal e exacerbada de células B. Na literatura são poucos os dados disponíveis sobre a interação entre as células T e as células B no gânglio linfático em doentes com este tipo de entidades, embora já tenham sido observadas algumas alterações do sistema imune em outras patologias hemato-oncológicas [119,120].

Neste sentido, realizaram-se diversos estudos fenotípicos e funcionais nas células do sistema imune com um papel anti-tumoral mais relevante, com o objetivo de avaliar, num local privilegiado para ocorrerem interações entre células T, B, NK e células dendríticas, como são os gânglios linfáticos, se estamos na presença de uma resposta pró- ou anti-inflamatória.

9.1. Celularidade global do gânglio linfático

O gânglio linfático apresenta um microambiente complexo em termos de estrutura e composição celular, pois apresenta uma arquitetura e função única [121]. Este é composto por diversas células, nomeadamente por linfócitos, monócitos, NK, células dendríticas, entre outras.

Os monócitos correspondem a células efetoras imunes, equipadas com receptores de quimiocinas e de adesão celular que medeiam a migração a partir do sangue, para os tecidos na presença de processos inflamatórios. Têm a capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias e podem-se diferenciar em macrófagos ou células dendríticas [122].

Neste estudo verificou-se uma diminuição da percentagem de monócitos corrigida em função da infiltração por células B neoplásicas, no grupo dos linfomas linfocíticos/LLC-B e um aumento da sua percentagem em relação ao grupo dos LNH-B, relativamente ao grupo controlo. Estes resultados podem surgir devido ao facto dos LNH-B serem mais agressivos, pois os monócitos são reguladores da inflamação e fazem parte da resposta imune inata.

Em relação às células dendríticas verificou-se uma diminuição da sua percentagem corrigida em função da infiltração por células B neoplásicas em ambos os grupos com

neoplasias, apresentando significado estatístico pois, são potentes células apresentadoras de antígenos e como tal, agarram e processam os antígenos, transportando-os para os gânglios linfáticos. De seguida, apresentam-os às células T para se iniciar as respostas imunes. Em suma, estas células são fundamentais para o desenvolvimento da tolerância e memória imunológica [123].

Por sua vez, o aumento da percentagem dos linfócitos totais nos grupos dos linfomas linfocíticos/LLC-B e com LNH-B sugere uma ativação mais eficiente das células T específicas para o antígeno [124], fazendo com que os linfócitos se comportem como células de defesa. Neste grupo estão incluídos as (i) as células B que são responsáveis pelo reconhecimento dos antígenos e ativam a produção dos anticorpos, (ii) as células T que possuem a função de ativar os anticorpos específicos para os antígenos, e (iii) as células NK, com a capacidade de atacar e destruir as células hostis ao Homem [125,126].

Estudos indicam que o aumento do número de células B em gânglios linfáticos reativos sugere a existência de uma resposta imune envolvendo as interações entre as células T e B [127]. A percentagem de células B neoplásicas, tanto no grupo dos linfomas linfocíticos/LLC-B, como no grupo dos LNH-B aumentou em relação ao grupo controlo com células B normais.

As células T auxiliam outras células que intervêm na resposta imune, no entanto, também conseguem regular negativamente as respostas imunes indesejáveis ou exacerbadas. Neste estudo, verificou-se uma diminuição da percentagem das células T corrigida em função da infiltração por células B neoplásicas no grupo com linfomas linfocíticos/LLC-B e no grupo com LNH-B, o que sugere que estas células, em conjunto com os macrófagos, mastócitos e neutrófilos encontram-se presentes no microambiente tumoral para inibir o crescimento do tumor [128].

Neste estudo, observou-se um aumento da percentagem de células T CD4 e uma diminuição das células T CD8. Estes resultados estão em concordância com alguma literatura descrita. Por exemplo, Jones *et al.* estudaram doentes com cancro da mama, onde concluíram que existia um elevado número de células T CD4 em gânglios linfáticos, e que este aumento se relacionava com uma maior sobrevida livre da doença [129]. No cancro do pulmão, um rácio elevado T CD4:CD8 parece estar associado a um bom prognóstico [130]. A maioria dos linfócitos T CD4 que infiltram os tumores (TIL) mostraram ter a capacidade de adquirirem memória (CD4+/CD45RO+), e a sua presença em áreas ricas em células B de

linfoma, parece estar associada a uma taxa inferior de proliferação das células B malignas [131].

As células T ativadas aumentaram significativamente nos grupos com linfoma linfocítico/LLC-B e LNH-B, neste estudo. Ansell *et al.* descreveram que uma maior presença de células CD4 T ativadas em amostras de biópsia de doentes com linfoma difuso de grandes células B, parecia ser indicativo de bom prognóstico. Esta descoberta foi de grande interesse para a investigação de protocolos de imunoterapia celular para estes tipos de neoplasias [132]. Totterman *et al.* verificou que a monitorização de subconjuntos de células T ativadas e fenotipicamente funcionais, pode ser útil na previsão da progressão da doença e no tempo da terapêutica em doentes com linfomas linfocíticos/LLC-B [133].

As células NK induzem a apoptose de células alvo que não expressam moléculas de MHC de classe I à superfície [134]. As moléculas de MHC de classe I correspondem aos ligandos para receptores inibidores da célula NK. Na ausência de expressão de MHC de classe I nas células alvo, as células NK iniciam a formação de poros de perforina e a libertação de grânulos de proteases de serina, tais como granzima B que ativam a cascata de caspases induzindo a apoptose celular [135]. Neste estudo, a percentagem das células NK corrigida em função da infiltração por células B neoplásicas diminuiu nas amostras com linfomas linfocíticos/LLC-B e no grupo de LNH-B, apesar de não apresentar significado estatístico. Este facto, está em concordância com um estudo em LLC-B, onde se verificou que as células tumorais inibiam a função das células NK através da redução da sua capacidade para lisar as células tumorais [136]. Semelhante ao observado com as células T, as células NK apresentam uma capacidade reduzida para formar sinapses imunológicas com células tumorais de LLC-B [137].

9.2. Estudos funcionais das células T e NK do gânglio linfático

Durante uma resposta imune, há produção de citocinas no microambiente tumoral. Através da expressão da citocina IL-17 intracitoplasmática, consegue-se determinar a frequência das células Th/c17. Assim sendo, vários são os autores que tentam perceber a verdadeira função destas células. Neste estudo, observou-se uma diminuição na percentagem de células Th/c17, tanto no grupo com linfomas linfocíticos/LLC-B como, no grupo com LNH-B, relativamente ao grupo controlo. Em concordância com os nossos resultados, Lu *et*

al. observaram uma diminuição significativa na percentagem de células Th17 no sangue periférico de 57 pacientes com LNH-B em comparação com indivíduos saudáveis [138]. Em relação às células Tc17 pouco ainda se sabe sobre elas no entanto, Jadidi-Niaragh *et al.* estudaram a relação das células Th/c17 com as células Treg e verificaram uma diminuição na percentagem de células Th/c17 e um aumento das células Treg nos doentes com LLC-B relativamente ao grupo controlo. Estes autores concluíram que a regulação negativa de células T produtoras de IL-17 está associada à expansão das células Treg e à progressão da LLC-B [139].

Por outro lado, as células Th1 são células com a capacidade de conduzir a imunidade celular de forma a combater os agentes patogénicos intracelulares, incluindo vírus e bactérias. Contudo, também são importantes na potenciação da resposta imune anti-tumoral, ajudando as células T citotóxicas a exercer esta função. Estas células têm a capacidade de produzirem IL-2, IFN- γ , TNF- β e TNF- α [140]. Neste estudo, observou-se uma diminuição, tanto das células Th1, como das células Tc1 no grupo com linfomas linfocítico/LLC-B e no grupo com LNH-B, sugerindo uma fraca resposta anti-tumoral.

Estudos efetuados têm mostrado que os polimorfismos no gene da IL-2 estão associadas com vários cancros. Esta é produzida pelas células Th1 e desempenha um papel central na ativação das respostas imunes mediadas pelas células T. Aumenta a atividade citolítica das células NK e tem um papel determinante para a expansão das células T ativadas que reconheceram o antigénio. A IL-2 tem sido associada à imunidade anti-tumoral [141]. Os nossos resultados demonstraram uma diminuição da expressão de mRNA de *IL-2* no grupo dos LNH-B. Em concordância com os nossos resultados, Jones *et al.* avaliaram a relação das células Th1/Th2 e a expressão de citocinas de IL-2, IFN- γ e IL-4. Estes autores verificaram também uma redução significativa no grupo com LNH-B destas citocinas [142].

Assim, estes resultados sugerem uma interligação entre as células Th/c1 e o mRNA de *IL-2* nas células T CD4 e T CD8, pelo facto que a diminuição da percentagem de células Th/c1 poderá estar relacionada com a baixa expressão de mRNA de *IL-2* nas células T citotóxicas. Estes resultados também sugerem que se há menos percentagem de células Th/c17, menos percentagem de Th/c1 e menos expressão de mRNA por *IL-2*, é muito provável que ocorra menos resposta imune mediada pelas células T, contribuindo assim para uma menor atividade anti-tumoral. Isto pode ocorrer pela baixa percentagem de produção das moléculas co-estimuladoras essenciais para a célula T (por exemplo, CD80) expressas

na superfície das células B que são essenciais para a ativação das células T, em DLPC-B [143]. Trentin *et al.* verificaram que as células B de DLPC-B expressavam menos CD86 do que as células B normais, podendo-se relacionar com o que já foi descrito anteriormente [144].

Os fatores micro-ambientais desempenham um papel crítico em LNH-B. Poucos são os estudos que enfatizam o papel das células NK. Estas células incluem um subconjunto menos maduro (CD56^{bright}/CD16-) e um subconjunto mais maduro (CD56^{dim}/CD16+). A maior proporção de células NK foi vista em linfomas difusos de grandes células B versus outros linfomas não-Hodgkin B, enquanto LLC-B continha menos células NK. Penack *et al.* foram capazes de mostrar que a população de células NK CD56^{dim}/CD16- era o principal responsável pela atividade citotóxica contra alvos tumorais [145]. Os nossos resultados demonstram um decréscimo de NK CD56^{dim} e NK CD56^{bright} no grupo com linfoma linfocítico/LLC-B e no grupo com LNH-B. Relativamente às células NK CD56^{dim} e NK CD56^{bright} a expressar IFN- γ também se verificou uma diminuição em ambos os grupos patológicos. Estas células ativadas segregam rapidamente uma variedade de citocinas e quimiocinas, tais como o IFN- γ , que amplificam o recrutamento e a ativação de outros componentes para auxiliarem a resposta anti-tumoral. Assim os resultados deste estudo sugerem uma fraca resposta anti-tumoral por parte destas células [146].

As células Treg podem ser recrutadas, expandidas ou convertidas no microambiente tumoral. No entanto, pouco se sabe sobre a causa da forte tolerância periférica em doentes com LNH-B. Como esperado, pelo que já se encontra descrito na literatura, as células Treg parecem encontrar-se em frequências elevadas nas DLPC-B. Han *et al.* demonstraram a existência de uma elevada percentagem de células T CD4+CD25+FoxP₃+CD127^{lo}, fenótipo característico das células Treg no SP, MO e nos tecidos linfáticos de doentes com linfomas Não-Hodgkin. Este facto pode desempenhar um papel crítico na supressão da resposta imune do hospedeiro com o tumor [147]. Um estudo em LLC-B também verificou um aumento das células Treg circulantes, o que resultava numa regulação negativa da resposta imune específica para o tumor, levando à expansão tumoral e à progressão da doença [148]. Neste estudo, verificou-se um aumento das células Treg no grupo com linfomas linfocíticos/LLC-B e no grupo com LNH-B, estando em concordância com a literatura descrita.

As células B também podem regular negativamente as respostas imunitárias celulares através da sua produção de citocinas imunomoduladoras, como por exemplo a IL-10. Os

efeitos anti-inflamatórios de IL-10 são mediados por mecanismos múltiplos envolvendo a resposta imune inata e a adaptativa. Em células inatas, estes mecanismos incluem a regulação negativa da produção de citocina pró-inflamatória, a diminuição da expressão de MHC-II e as moléculas de co-estimulação, resultando na diminuição da ativação de células T [149]. A IL-10 é conhecida pela sua capacidade de inibir a ativação e a função efetora de células T, monócitos e macrófagos. Esta também desempenha um papel fundamental na diferenciação e função das células Treg [150]. Nas respostas imunes, a IL-10 possui fortes efeitos imunossupressores através da inibição das células T pró-inflamatórias, como as Th1, e, por outro lado, estimula a proliferação e diferenciação de células Th2 e de células B [150]. Burdin *et al.* descreveu a IL-10 como sendo secretada pelas células Tr1 (Tr1), células estas, definidas pelo seu perfil de produção de citocinas específicas, que inclui a secreção de níveis elevados de IL-10 e de TGF- β [151]. Ramachandra *et al.* verificaram em modelos animais que a IL-10 podia aumentar a proliferação e o desenvolvimento da malignidade das células B, em vez da produção de anticorpos pela subpopulação de células B. Assim, estes autores sugerem que a IL-10 desempenha um papel importante em doenças malignas B e a regulação negativa de IL-10 pode ser um dos mecanismos prováveis para a ocorrência de DLPC-B [152]. Em pacientes com LNH-B, os níveis de IL-10 estão significativamente aumentados em comparação com indivíduos normais e de pacientes com LNH-B em remissão. Estes resultados sugerem que a IL-10 poderá ter algum papel patogénico nos LNH-B [153].

Assim, no nosso estudo observou-se uma maior expressão de mRNA de IL-10 nas células T CD8, no grupo de linfomas linfocítico/LLC-B e no grupo LNH-B. Contudo, verificou-se um aumento mais acentuado no grupo com LNH-B, o que sugere uma relação com o facto de no mesmo grupo haver uma diminuição de mRNA de IL-2 nas células T CD8 e diminuição de Th1 e de Tc17.

Conclusão

10. Conclusão

Neste estudo, e apesar do pequeno número de amostras, verificaram-se alterações fenotípicas e funcionais nas células T e NK nos gânglios linfáticos com DLPC-B.

Nos doentes com linfoma linfocítico/LLC-B parece ocorrer um aumento da resposta Th1, conseqüentemente com aumento da resposta imune mediada por células Tcitotóxicas e NK, enquanto que nos doentes com LNH-B parece haver um ambiente mais anti-inflamatório com aumento da frequência das células Treg e de mRNA de IL-10.

Como perspectivas futuras, seria relevante associar estas alterações com a sobrevida livre de doença e a sobrevida global destes doentes.

Bibliografia

11. Bibliografia

1. Jaffe E., Harris N., Stein J. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2001.
2. Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, Thiele J, Vardiman J. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. 2008.
3. Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact.* 2010;184(1-2):16–20.
4. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood.* 2011;117(19):5019–32.
5. Allen CDC, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity.* 2007;27(2):190–202.
6. MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:117–39.
7. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):137–48.
8. Kitano M, Moriyama S, Ando Y, Hikida M, Mori Y, Kurosaki T, Okada T. Bcl6 Protein Expression Shapes Pre-Germinal Center B Cell Dynamics and Follicular Helper T Cell Heterogeneity. *Immunity.* 2011;34(6):961–72.
9. Basso K, Dalla-Favera R. Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol Rev.* 2012;247(1):172–83.
10. Ying CY, Dominguez-Sola D, Fabi M, Lorenz IC, Hussein S, Bansal M, Califano A, Pasqualucci L, Basso K, Dalla-Favera R. MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Immunol.* 2013;14(10):1084–92.
11. Khiem D, Cyster JG, Schwarz JJ, Black BL. A p38 MAPK-MEF2C pathway regulates B-cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(44):17067–72.
12. Dang C V. MYC on the path to cancer. *Cell.* 2012;149(1):22–35.
13. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med.* 2010;362(15):1417–29.
14. Dalla-Favera R, Pasqualucci L. Molecular Pathogenesis of B Cell Lymphomas. In: *Molecular Biology of B Cells.* 2015. p. 399–416.
15. Lowry L, Linch D. Non-Hodgkin's lymphoma. *Medicine (Baltimore).* 2013;41(5):282–9.
16. Rodriguez-Abreu D, Bordoni A, Zucca E. Epidemiology of hematological malignancies. *Ann Oncol.* 2007;18 Suppl 1:i3–8.
17. Gao Y, Kristinsson SY, Goldin LR, Björkholm M, Caporaso NE, Landgren O. Increased risk for non-Hodgkin lymphoma in individuals with celiac disease and a potential familial association. *Gastroenterology.* 2009;136(1):91–8.
18. Morton LM, Hartge P, Holford TR, Holly EA, Chiu BCH, Vineis P, Stagnaro E, Willett E V, Franceschi S, La Vecchia C, Hughes AM, Cozen W, Davis S, Severson RK, Bernstein L, Mayne ST, Dee FR, Cerhan JR, Zheng T. Cigarette smoking and

- risk of non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis from the International Lymphoma Epidemiology Consortium (interlymph). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(4):925–33.
19. Lo Coco F, Gaidano G, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood.* 1993;82(8):2289–95.
 20. Hughes AM, Armstrong BK, Vajdic CM, Turner J, Grulich AE, Fritschi L, Milliken S, Kaldor J, Benke G, Krickler A. Sun exposure may protect against non-Hodgkin lymphoma: a case-control study. *Int J cancer.* 2004;112(5):865–71.
 21. Zhang Y, Holford TR, Leaderer B, Boyle P, Zhu Y, Wang R, Zou K, Zhang B, Wise JP, Qin Q, Kilfoy B, Han J, Zheng T. Ultraviolet radiation exposure and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Epidemiol.* 2007;165(11):1255–64.
 22. Smedby KE, Hjalgrim H, Melbye M, Torráng A, Rostgaard K, Munksgaard L, Adami J, Hansen M, Porwit-MacDonald A, Jensen BA, Roos G, Pedersen BB, Sundström C, Glimelius B, Adami H-O. Ultraviolet radiation exposure and risk of malignant lymphomas. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(3):199–209.
 23. Zelenetz A, Horwitz S. Oncology. In: Chang AE, Hayes DF, Pass HI, Stone RM, Ganz PA, Kinsella TJ, Schiller JH, Strecher VJ, editors. *The Non-Hodgkin's Lymphomas.* 2006.
 24. Guerard EJ, Bishop MR. Overview of non-Hodgkin's lymphoma. *Dis Mon.* 2012;58(4):208–18.
 25. Staging Lymphomas [Internet]. 2004 [cited 2016 Mar 28]. Available from: <http://www.lymphomation.org/stage.htm>
 26. Heel K, Tabone T, Röhrig KJ, Maslen PG, Meehan K, Grimwade LF, Erber WN. Developments in the immunophenotypic analysis of haematological malignancies. *Blood Rev.* 2013;27(4):193–207.
 27. Woo J, Baumann A, Arguello V. Recent advancements of flow cytometry: new applications in hematology and oncology. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014;14(1):67–81.
 28. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood.* 2008;111(8):3941–67.
 29. Jorgensen JL. State of the Art Symposium: flow cytometry in the diagnosis of lymphoproliferative disorders by fine-needle aspiration. *Cancer.* 2005;105(6):443–51.
 30. Kostareli E, Smilevska T, Stamatopoulos K, Kouvatsi A, Anagnostopoulos A. Chronic lymphocytic leukaemia: an immunobiology approach. *136(5-6):319–23.*
 31. Keating MJ, Chiorazzi N, Messmer B, Damle RN, Allen SL, Rai KR, Ferrarini M, Kipps TJ. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003;153–75.
 32. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood.* 2008;111(12):5446–56.

33. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 2006;107(1):265–76.
34. Gaidano G, Foà R, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3432–8.
35. Strati P, Shanafelt TD. Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood*. 2015;126(4):454–62.
36. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, Gibellini F, Njuguna N, Lee E, Stennett L, Raghavachari N, Liu P, McCoy JP, Raffeld M, Stetler-Stevenson M. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;117(2):563–74.
37. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524–9.
38. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, Ambesi-Impiombato A, Califano A, Migliazza A, Bhagat G, Dalla-Favera R. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2010;17(1):28–40.
39. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(1):37–50.
40. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 1997;89(7):2516–22.
41. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, Hensel M, Hopfinger G, Hess G, von Grünhagen U, Bergmann M, Catalano J, Zinzani PL, Caligaris-Cappio F, Seymour JF, Berrebi A, Jäger U, Cazin B, Trneny M, Westermann A, Wendtner CM, Eichhorst BF, Staib P, Bühler A, Winkler D, Zenz T, Böttcher S, Ritgen M, Mendila M, Kneba M, Döhner H, Stilgenbauer S. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376(9747):1164–74.
42. Cordone I, Masi S, Mauro FR, Soddu S, Morsilli O, Valentini T, Vegna ML, Guglielmi C, Mancini F, Giuliacci S, Sacchi A, Mandelli F, Foa R. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood*. 1998;91(11):4342–9.
43. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*. 2012;380(9844):848–57.
44. Glass AG, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer*. 1997;80(12):2311–20.
45. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Pathogenesis of follicular lymphoma. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3424–31.

46. Dogan A, Du MQ, Aiello A, Diss TC, Ye HT, Pan LX, Isaacson PG. Follicular lymphomas contain a clonally linked but phenotypically distinct neoplastic B-cell population in the interfollicular zone. *Blood*. 1998;91(12):4708–14.
47. Mollejo M, Camacho FI, Algara P, Ruiz-Ballesteros E, García JF, Piris MA. Nodal and splenic marginal zone B cell lymphomas. *Hematol Oncol*. 2005;23(3-4):108–18.
48. Olszewski AJ, Castillo JJ. Survival of patients with marginal zone lymphoma: analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer*. 2013;119(3):629–38.
49. Raderer M, Kiesewetter B, Ferreri AJM. Clinicopathologic characteristics and treatment of marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma). *CA Cancer J Clin*. 2016;66(2):152–71.
50. Maes B, De Wolf-Peeters C. Marginal zone cell lymphoma--an update on recent advances. *Histopathology*. 2002;40(2):117–26.
51. Camacho FI, Algara P, Mollejo M, García JF, Montalbán C, Martínez N, Sánchez-Beato M, Piris MA. Nodal marginal zone lymphoma: a heterogeneous tumor: a comprehensive analysis of a series of 27 cases. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(6):762–71.
52. Chacón JI, Mollejo M, Muñoz E, Algara P, Mateo M, Lopez L, Andrade J, Carbonero IG, Martínez B, Piris MA, Cruz MA. Splenic marginal zone lymphoma: clinical characteristics and prognostic factors in a series of 60 patients. *Blood*. 2002;100(5):1648–54.
53. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood*. 1997;89(6):2067–78.
54. Bertoni F, Ponzoni M. The cellular origin of mantle cell lymphoma. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(10):1747–53.
55. Hsu P, Yang T, Sheikh-Fayyaz S, Brody J, Bandovic J, Roy S, Laser J, Kolitz JE, Devoe C, Zhang X. Mantle cell lymphoma with in situ or mantle zone growth pattern: a study of five cases and review of literature. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(3):1042–50.
56. Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Dave S, Wright G, Rosenwald A, Chiorazzi M, Iqbal J, Gesk S, Siebert R, De Jong D, Jaffe ES, Wilson WH, Delabie J, Ott G. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*. 2005;106(13):4315–21.
57. Carvajal-Cuenca A, Sua LF, Silva NM, Pittaluga S, Royo C, Song JY, Sargent RL, Espinet B, Climent F, Jacobs SA, Delabie J, Naresh KN, Bagg A, Brousset P, Warnke RA, Serrano S, Harris NL, Swerdlow SH, Jaffe ES, Campo E. In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. *Haematologica*. 2012;97(2):270–8.
58. Mozos A, Royo C, Hartmann E, De Jong D, Baró C, Valera A, Fu K, Weisenburger DD, Delabie J, Chuang S-S, Jaffe ES, Ruiz-Marcellan C, Dave S, Rimsza L, Braziel R, Gascoyne RD, Solé F, López-Guillermo A, Colomer D, Staudt LM, Rosenwald A, Ott G, Jares P, Campo E. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica*. 2009;94(11):1555–62.

59. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997;89(11):3909–18.
60. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503–11.
61. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltnane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, López-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(25):1937–47.
62. Madrid FS, Martin P. Avizores del Sistemas Inmune, Guardianes del Organismo. 2011.
63. Akira S. Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011;366(1579):2748–55.
64. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245–52.
65. Benencia F, Sprague L, McGinty J, Pate M, Muccioli M, Benencia F, Sprague L, McGinty J, Pate M, Muccioli M. Dendritic Cells The Tumor Microenvironment and the Challenges for an Effective Antitumor Vaccination. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:1–15.
66. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767–811.
67. Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt's Essential Immunology. 12th ed. 2011. 3-283 p.
68. Lämmermann T, Sixt M. The microanatomy of T-cell responses. *Immunol Rev*. 2008;221:26–43.
69. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(11):867–78.
70. Acton SE, Reis e Sousa C. Dendritic cells in remodeling of lymph nodes during immune responses. *Immunol Rev*. 2016;271(1):221–9.
71. Sznurkowski JJ, Zawrocki A, Emerich J, Biernat W. Prognostic significance of CD4+ and CD8+ T cell infiltration within cancer cell nests in vulvar squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2011;21(4):717–21.
72. Batista FD, Iber D, Neuberger MS. B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature*. 2001;411(6836):489–94.
73. Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature*. 1985;314(6011):537–9.

74. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature*. 2012;481(7381):278–86.
75. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996;383(6603):787–93.
76. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. 1996;17(3):138–46.
77. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007;8(4):345–50.
78. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1133–41.
79. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006;212:8–27.
80. Atanackovic D, Cao Y, Luetkens T, Panse J, Faltz C, Arfsten J, Bartels K, Wolschke C, Eiermann T, Zander AR, Fehse B, Bokemeyer C, Kroger N. CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T regulatory cells reconstitute and accumulate in the bone marrow of patients with multiple myeloma following allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2008;93(3):423–30.
81. Dehghani M, Sharifpour S, Amirghofran Z, Zare HR. Prognostic significance of T cell subsets in peripheral blood of B cell non-Hodgkin's lymphoma patients. *Med Oncol*. 2012;29(4):2364–71.
82. Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(4):248–56.
83. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1123–32.
84. Wynn TA. T(H)-17: a giant step from T(H)1 and T(H)2. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1069–70.
85. Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornstein E, Asher TE, Samri A, Schnuriger A, Theodorou I, Costagliola D, Rouzioux C, Agut H, Marcelin A-G, Douek D, Autran B, Appay V. Superior control of HIV-1 replication by CD8⁺ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med*. 2007;204(10):2473–85.
86. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Huang E, Finlayson E, Simeone D, Welling TH, Chang A, Coukos G, Liu R, Zou W. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*. 2009;114(6):1141–9.
87. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 2004;10(9):942–9.

88. Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, Yang XO, Yamazaki T, Lu S, Hwu P, Restifo NP, Overwijk WW, Dong C. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*. 2009;31(5):787–98.
89. Kryczek I, Wei S, Szeliga W, Vatan L, Zou W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood*. 2009;114(2):357–9.
90. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. 2008;27(45):5904–12.
91. Whiteside TL. Immune suppression in cancer: Effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol*. 2005;
92. Bhatia A, Kumar Y. Cellular and molecular mechanisms in cancer immune escape: a comprehensive review. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(1):41–62.
93. Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP, Gabrilovich DI. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res*. 2000;6(5):1755–66.
94. Zhou G, Lu Z, McCadden JD, Levitsky HI, Marson AL. Reciprocal changes in tumor antigenicity and antigen-specific T cell function during tumor progression. *J Exp Med*. 2004;200(12):1581–92.
95. Kontani K, Taguchi O, Narita T, Izawa M, Hiraiwa N, Zenita K, Takeuchi T, Murai H, Miura S, Kannagi R. Modulation of MUC1 mucin as an escape mechanism of breast cancer cells from autologous cytotoxic T-lymphocytes. *Br J Cancer*. 2001;84(9):1258–64.
96. Jung Y-J, Kim J-Y, Park J-H. TGF-beta1 inhibits Fas-mediated apoptosis by regulating surface Fas and cFLIPL expression in human leukaemia/lymphoma cells. *Int J Mol Med*. 2004;13(1):99–104.
97. España L, Fernández Y, Rubio N, Torregrosa A, Blanco J, Sierra A. Overexpression of Bcl-xL in human breast cancer cells enhances organ-selective lymph node metastasis. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;87(1):33–44.
98. Serrano A, Castro-Vega I, Redondo M. Role of gene methylation in antitumor immune response: implication for tumor progression. *Cancers (Basel)*. 2011;3(2):1672–90.
99. Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, Dörken B, Zenke M, Stein H, Scheidereit C. Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med*. 2002;196(5):605–17.
100. Schoof N, von Bonin F, Trümper L, Kube D. HSP90 is essential for Jak-STAT signaling in classical Hodgkin lymphoma cells. *Cell Commun Signal*. 2009;7:17.
101. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(1):41–51.
102. Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:423–49.
103. Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo M-G. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(2):227–35; quiz 236–7.

104. Yang S, Fujikado N, Kolodin D, Benoist C, Mathis D. Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance. *Science*. 2015;348(6234):589–94.
105. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*. 2005;22(3):329–41.
106. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057–61.
107. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B, Zitvogel L. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med*. 2005;202(7):919–29.
108. Yang Z-Z, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;107(9):3639–46.
109. Villalba M, Rathore MG, Lopez-Royuela N, Krzywinska E, Garaude J, Allende-Vega N. From tumor cell metabolism to tumor immune escape. 2013;45(1):106–13.
110. Yang Z-Z, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM. Attenuation of CD8(+) T-cell function by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res*. 2006;66(20):10145–52.
111. Chen M-L, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von Boehmer H, Khazaie K. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(2):419–24.
112. Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, Lee H, Liu Y, Harris T, Drake C, Pardoll D, Yu H. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2009;15(2):114–23.
113. Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, Basham B, McClanahan T, Kastelein RA, Oft M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*. 2006;442(7101):461–5.
114. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*. 2010;140(6):845–58.
115. Lin W-W, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1175–83.
116. Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwaijri S, Szeliga W, Kolls J, Chang A, Zou W. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol*. 2007;178(11):6730–3.
117. Weaver CT, Hatton RD. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(12):883–9.
118. Kryczek I, Gryboś M, Karabon L, Klimeczak A, Lange A. IL-6 production in ovarian carcinoma is associated with histiotype and biological characteristics of the tumour and influences local immunity. *Br J Cancer*. 2000;82(3):621–8.
119. Fozza C, Longinotti M. T-cell receptor repertoire usage in hematologic malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;86(3):201–11.

120. Fozza C, Longinotti M. The role of T-cells in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: passengers and drivers. *Leuk Res.* 2013;37(2):201–3.
121. Webster B, Ekland EH, Agle LM, Chyou S, Ruggieri R, Lu TT. Regulation of lymph node vascular growth by dendritic cells. *J Exp Med.* 2006;203(8):1903–13.
122. Serbina N V, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:421–52.
123. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:271–96.
124. Tan KW, Yeo KP, Wong FHS, Lim HY, Khoo KL, Abastado J-P, Angeli V. Expansion of Cortical and Medullary Sinuses Restrains Lymph Node Hypertrophy during Prolonged Inflammation. *J Immunol.* 2012;188(8):4065–80.
125. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 2008;112(5):1570–80.
126. Disis ML. Immune regulation of cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(29):4531–8.
127. Lores B, García-Estevez JM, Arias C. Lymph nodes and human tumors (review). *Int J Mol Med.* 1998;1(4):729–33.
128. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *T Cell-Mediated Immunity.* 2001;
129. Kohrt HE, Nouri N, Nowels K, Johnson D, Holmes S, Lee PP. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLoS Med.* 2005;2(9):e284.
130. Nakamura H, Saji H, Ogata A, Hosaka M, Hagiwara M, Kawasaki N, Konaka C, Kato H. Immunologic parameters as significant prognostic factors in lung cancer. *Lung Cancer.* 2002;37(2):161–9.
131. Ansell SM, Stenson M, Habermann TM, Jelinek DF, Witzig TE. Cd4+ T-cell immune response to large B-cell non-Hodgkin's lymphoma predicts patient outcome. *J Clin Oncol.* 2001;19(3):720–6.
132. Ansell SM, Stenson M, Habermann TM, Jelinek DF, Witzig TE. Cd4+ T-cell immune response to large B-cell non-Hodgkin's lymphoma predicts patient outcome. *J Clin Oncol.* 2001;19(3):720–6.
133. Tötterman TH, Carlsson M, Simonsson B, Bengtsson M, Nilsson K. T-cell activation and subset patterns are altered in B-CLL and correlate with the stage of the disease. *Blood.* 1989;74(2):786–92.
134. Delves PJ, Roitt IM. The Immune System. <http://dx.doi.org/101056/NEJM200007063430107>. 2009;
135. Lanier LL. Natural killer cell receptors and MHC class I interactions. *Curr Opin Immunol.* 1997;9(1):126–31.
136. Kay NE, Zarling JM. Impaired natural killer activity in patients with chronic lymphocytic leukemia is associated with a deficiency of azurophilic cytoplasmic granules in putative NK cells. *Blood.* 1984;63(2):305–9.
137. Xing D, Ramsay AG, Gribben JG, Decker WK, Burks JK, Munsell M, Li S, Robinson SN, Yang H, Steiner D, Shah N, McMannis JD, Champlin RE, Hosing C, Zweidler-

- Mckay PA, Shpall EJ, Bollard CM. Cord Blood Natural Killer Cells Exhibit Impaired Lytic Immunological Synapse Formation That Is Reversed With IL-2 Ex vivo Expansion. *J Immunother.* 2010;33(7):684–96.
138. Lu T, Yu S, Liu Y, Yin C, Ye J, Liu Z, Ma D, Ji C. Aberrant Circulating Th17 Cells in Patients with B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *PLoS One.* 2016;11(1):e0148044.
 139. Jadidi-Niaragh F, Ghalamfarsa G, Memarian A, Asgarian-Omran H, Razavi SM, Sarrafnejad A, Shokri F. Downregulation of IL-17-producing T cells is associated with regulatory T cell expansion and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Tumor Biol.* 2013;34(2):929–40.
 140. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(4):532–62.
 141. Song H, Chen L, Cha Z, Bai J. Interleukin 2 gene polymorphisms are associated with non-Hodgkin lymphoma. *DNA Cell Biol.* 2012;31(7):1279–84.
 142. Jones EA, Pringle JH, Angel CA, Rees RC. Th1/Th2 cytokine expression and its relationship with tumor growth in B cell non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Leuk Lymphoma.* 2002;43(6):1313–21.
 143. O'Neill SK, Cao Y, Hamel KM, Doodes PD, Hutas G, Finnegan A. Expression of CD80/86 on B cells is essential for autoreactive T cell activation and the development of arthritis. *J Immunol.* 2007;179(8):5109–16.
 144. Trentin L, Zambello R, Sancetta R, Facco M, Cerutti A, Perin A, Siviero M, Basso U, Bortolin M, Adami F, Agostini C, Semenzato G. B lymphocytes from patients with chronic lymphoproliferative disorders are equipped with different costimulatory molecules. *Cancer Res.* 1997;57(21):4940–7.
 145. Penack O, Gentilini C, Fischer L, Asemissen AM, Scheibenbogen C, Thiel E, Uharek L. CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. *Leukemia.* 2005;19(5):835–40.
 146. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(11):836–48.
 147. Han Y, Wu J, Bi L, Xiong S, Gao S, Yin L, Jiang L, Chen C, Yu K, Zhang S. Malignant B cells induce the conversion of CD4+CD25- T cells to regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *PLoS One.* 2011;6(12):e28649.
 148. Jadidi-Niaragh F, Yousefi M, Memarian A, Hojjat-Farsangi M, Khoshnoodi J, Razavi SM, Jeddi-Tehrani M, Shokri F. Increased frequency of CD8+ and CD4+ regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: association with disease progression. *Cancer Invest.* 2013;31(2):121–31.
 149. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):170–81.
 150. Moore KW, Malefyt R de W, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. 2003;
 151. Schering-Plough. B-cell-derived IL-10: production and function. 1997;
 152. Ramachandra S, Metcalf RA, Fredrickson T, Marti GE, Raveche E. Requirement for

- increased IL-10 in the development of B-1 lymphoproliferative disease in a murine model of CLL. *J Clin Invest.* 1996;98(8):1788–93.
153. Cortes J, Kurzrock R. Interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 1997;26(3-4):251–9.