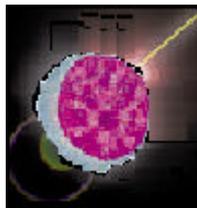

MARGARIDA MARIA DE CARVALHO LIMA

DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS T E NK

**CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E PARA O
CONHECIMENTO DOS MECANISMOS REGULADORES ENVOLVIDOS NA
GÉNESE E NO COMPORTAMENTO CLÍNICO E BIOLÓGICO**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DE ABEL SALAZAR, UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO, 2003

Margarida Maria de Carvalho Lima

Licenciada em Medicina, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto
Assistente Hospitalar Graduada em Imuno-Hemoterapia, Serviço de Hematologia, Hospital Geral de Santo António, SA
Porto

DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS T E NK

CONTRIBUTO PARA A CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E PARA O
CONHECIMENTO DOS MECANISMOS REGULADORES ENVOLVIDOS NA GÉNESE E
NO COMPORTAMENTO CLÍNICO E BIOLÓGICO

**Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor em Ciências Médicas,
submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar.**

Orientador:

Prof. Doutor Alberto Órfão de Matos Correia e Vale

Professor Titular do Departamento de Medicina da Universidade de Salamanca
Director do Serviço de Citometria do Hospital Universitário de Salamanca
Universidade de Salamanca
Salamanca

Co-orientador:

Prof. Doutor Artur Perez Águas

Professor Catedrático do Departamento de Anatomia Normal do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Presidente do Conselho Científico do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Universidade do Porto
Porto

ESTA DISSERTAÇÃO BASEIA-SE EM ARTIGOS PUBLICADOS OU SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO COMO CONSEQUÊNCIA DO TRABALHO EFECTUADO.

ESTES ARTIGOS SÃO APRESENTADOS NA SECÇÃO DE MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS.

PARA ALÉM DISSO, NA INTRODUÇÃO E NA DISCUSSÃO É EFECTUADA REFERÊNCIA A RESULTADOS AINDA NÃO PUBLICADOS NEM SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO E A OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS PELA CANDIDATA QUE, EMBORA NÃO INTEGREM A DISSERTAÇÃO PRÓPRIAMENTE DITA, SE RELACIONAM COM O TRABALHO EFECTUADO.

OS PRIMEIROS SÃO APRESENTADOS NO ANEXO 1 DESTE VOLUME.

OS SEGUNDOS FORAM NUMERADOS POR ORDEM CRONOLÓGICA E ESTÃO LISTADOS NO ANEXO 2, DE FORMA A DISTINGUIREM-SE DAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS APRESENTADAS NO RODAPÉ DE CADA PÁGINA.

NA CONTRA-CAPA DESTE VOLUME ENCONTRA-SE UM CD-ROM QUE CONTEM A PRESENTE DISSERTAÇÃO, O *CURRICULUM VITAE* DA CANDIDATA E AINDA OS ARTIGOS REFERIDOS NO ANEXO 2, GRAVADOS EM FORMATO PDF, COM O OBJECTIVO DE FACILITAR O ACESSO AO SEU CONTEÚDO.

ESTRUTURA DA TESE

Pré-dissertação

Pensamento
Dedicatórias e Agradecimentos
Prefácio
Abreviaturas
Resumo / Summary / Résumé
Súmula
Índice

Dissertação

Introdução
Objectivos
Materiais, Métodos e Resultados
Discussão
Conclusões
Perspectivas futuras

Pós-dissertação

Pensamento
Anexos

Anexo 1: Tabelas e figuras de resultados não incluídos em capítulos anteriores e que consideramos serem de apoio à discussão e interpretação global deste trabalho.

Anexo 2: Listagem das publicações mais relevantes relacionadas com este trabalho.

PENSAMENTO

“Quando tinha seis anos vi uma vez uma imagem magnífica num livro sobre a Floresta Virgem que se chamava “Histórias Vividas”. Representava uma jibóia a engolir uma fera. No livro dizia-se: “As jibóias engolem a sua presa inteira, sem a mastigar. Em seguida, já não conseguem mexer-se e dormem durante os seis meses da sua digestão”. Reflecti então muito sobre as aventuras da selva e consegui, por minha vez, fazer com um lápis de cor, o meu primeiro desenho.

O meu desenho número 1 era assim:



Mostrei a minha obra-prima às pessoas crescidas e perguntei-lhes se o meu desenho lhes fazia medo. Elas respondiam-me: Porque é que um chapéu havia de fazer medo?

O meu desenho não representava um chapéu. Representava uma jibóia digerindo um elefante.

Desenhei então o interior da jibóia para que as pessoas crescidas pudessem compreender. Elas precisam sempre de explicações.

O meu desenho número 2 era assim:



As pessoas crescidas aconselharam-me a pôr de lado os desenhos das jibóias, abertas ou fechadas, e dedicar-me de preferência à Geografia, à História, à Aritmética e à Gramática. Foi assim que aos 6 anos eu abandonei uma magnífica carreira de pintor. Tinha sido desencorajado pelo insucesso do meu desenho número 1 e do meu desenho número 2. As pessoas crescidas nunca conseguem perceber nada sozinhas e é muito cansativo, para as crianças, estar sempre a dar-lhes explicações. Tive pois que escolher outra profissão e aprendi a pilotar aviões...

... Quando encontrava uma pessoa que me parecia um pouco lúcida fazia com ela a experiência do meu desenho número 1 que conservei sempre comigo. Queria saber se ela era verdadeiramente compreensiva. Mas ela respondia-me sempre: É um chapéu! Então, não lhe falava de jibóias, nem de florestas virgens, nem de estrelas. Aproximava-me dela. Falava-lhe de bridge, de golfe, de política e de gravatas. E a pessoa ficava muito contente por conhecer um homem tão razoável.”

Antoine de Saint-Exupéry em “O Príncipezinho”

DEDICATÓRIAS E AGRADECIMENTOS

À melhor parte do meu ADN
Por ter nascido!

E às outras partes não menos importantes
Por me terem feito nascer e por me manterem viva!

Ao Prof. Doutor Teixeira da Silva

Pelos primeiros passos!

Ao Prof. Doutor António Coutinho

Pela Imunologia!

Ao Prof. Doutor Alberto Orfão

Pela Citometria!

Ao Prof. Doutor Artur Águas

Pelo impulso final!

Ao Dr. Benvindo Justiça
Por ter acreditado!

À equipe fantástica com que tenho trabalhado durante os últimos anos

Por tudo!

E todos os colegas que de alguma forma fizeram parte dela

Bem-Hajam!

Aos que por cá passaram para aprender, e me deixaram saudades

Pelo que aprendi convosco!

Aos velhos amigos da Imunologia do ICBAS

Por isso mesmo!

Aos doentes
Pela lição de vida!

Em memória do Prof. Doutor Mário Arala Chaves
A quem dedico este trabalho.

PREFÁCIO

As doenças linfoproliferativas crónicas (DLPC) de linfócitos T e de células NK representam menos de 10% das doenças linfoproliferativas. Por isso, e em comparação com as DLPC de linfócitos B, o seu estudo tem despertado, em geral, menos interesse, o que tem feito com que as DLPC-T e NK sejam vítimas de sistemas de classificação pouco pormenorizados e, em geral, pouco adequados. Ricas, porém, são as manifestações clínicas que se lhes associam, relacionadas, muitas delas, com o tropismo tecidular e as funções imunoreguladoras e efectoras destas células. Em conjunto, estes constituíram, em grande medida, os motivos da escolha do tema para este trabalho: “Doenças linfoproliferativas crónicas T e NK: contributo para a caracterização imunofenotípica e para o conhecimento dos mecanismos reguladores envolvidos na génese e no comportamento clínico e biológico”. Trata-se de um projecto que desde o seu início, e de forma progressiva, adquiriu grande relevância pessoal, mas cujas dimensões se estenderam para além da minha pessoa e do próprio Serviço de Hematologia do Hospital Geral de Santo António, dirigido durante muitos anos pelo Dr. Benvindo Justiça que acompanhou de perto e desde o seu começo este trabalho. Teve também uma influência muito especial na planificação deste estudo o Prof. Doutor Mário Arala Chaves que infelizmente não pode chegar a vê-lo concluído.

Os principais obstáculos à identificação, caracterização e compreensão das doenças linfoproliferativas T e NK, no momento de tomar a decisão de iniciar este trabalho, eram diversos. Deles merece salientar a ausência de critérios que permitissem de forma rápida, universal e reprodutível estabelecer um diagnóstico de suspeita de (mono) clonalidade e o desconhecimento sobre a existência de fenótipos aberrantes e sobre a sua possível incidência nas DLPC-T e NK. Ambos factores limitavam a possibilidade de realizar o diagnóstico correcto destas doenças.

A principal dificuldade prática para a realização deste trabalho estava provavelmente na impossibilidade de, num período razoável de tempo, poder efectuar o estudo de um número significativo de doentes que permitisse, por uma lado, alcançar conclusões definitivas em algumas áreas e, por outro, levantar novas perguntas que pudessem orientar num futuro próximo o nosso esforço investigador. Desta forma, para alcançar os objectivos deste projecto foi decisivo o esforço realizado para o estabelecimento de um protocolo multicêntrico para o estudo destas doenças na forma de uma rede que envolveu mais de 30 hospitais diferentes de Portugal e da Espanha e na qual actuaram como centro de referência o Hospital Geral de Santo António e a Universidade/Hospital Universitário de Salamanca. Este esforço comum permitiu alcançar, neste momento, uma das séries mais numerosas de DLPC-T e NK. A este respeito, uma palavra muito especial de admiração e de apreço ao Prof. Doutor Alberto Orfão, pela forma como acarinhou e orientou esta iniciativa. E, como o esforço deste trabalho foi feito sobretudo pelos e para os doentes, é para eles e para os seus médicos o maior agradecimento por terem colaborado em todos os momentos neste projecto. Para eles também a promessa de continuar a investigação nesta área.

ABREVIATURAS

AcMo: Anticorpo (s) monoclonal (is)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ag: Antígeno (s)

CF: Citometria de Fluxo

CLA: “Cutaneous Lymphocyte Antigen”; antígeno associado aos linfócitos cutâneos

CMV: Citomegalovirus

CNK: Célula (s) NK

CS: Célula (s) de Sezary

DHL: Desidrogenase láctica

DLP: Doença linfoproliferativa

DLPC: Doença linfoproliferativa crónica

EBV: “Epstein Barr Virus”; vírus de Epstein Barr

EORTC: “European Organization for Research and Treatment of Cancer”; Organização Europeia para Investigação e Tratamento do Cancro

FasL: Ligando do Fas

FSC: “Forward light scatter”; dispersão frontal da luz

Gp: Glicoproteínas

GPI: Glicosil-fosfatidil-inositol

HBV: “Hepatitis B Virus”; vírus da hepatite B

HCV: “Hepatitis C Virus”; vírus da hepatite C

HERV-K: “Human Endogenous RetroVirus K”; retrovirus endógeno humano K

HHV: Human Herpes Vírus; vírus herpes humano

HIV: “Human Immunodeficiency Virus”; vírus da imunodeficiência humana

HLA: “Human Leukocyte Antigens”, antígenos leucocitários humanos

HSV: “Herpes Simplex Virus”; vírus herpes simplex

HTLV: “Human T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus”; vírus da leucemia/linfoma de células T

IF: Imunofenotipagem, (tipo), (típico)

Igs: Imunoglobulinas

IFN: “Interferon”; interferão

IL: Interleucina (s)

KIR: “Immunoglobulin-like killer receptor”; receptor de morte celular da família das imunoglobulinas

KLR: “Lectin-like killer receptor”; receptor de morte celular da família das lectinas

KR: “Killer receptor”; receptor de morte celular

LB: Linfócito (s) B

LGL: “Large Granular Lymphocytes”; linfócitos grandes granulares

LT: Linfócito (s) T

MALT: “Mucosae Associated Lymphoid Tissue”; tecido linfóide associado às mucosas

MF: Micose fungóide

MFI: “Mean Fluorescence Intensity”; intensidade média de fluorescência

MHC: “Major Histocompatibility Complex”; complexo maior de histocompatibilidade

MMTV: “Mouse mamary tumor vírus”; vírus do tumor mamário do ratinho

MO: Medula óssea

NK: “Natural-Killer”; citotóxica natural

NKa: “Natural-Killer associated”; associados às células NK

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCR: “Polimerase Chain Reaction”; reacção em cadeia da polimerase do ADN.

REAL: “Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasms”

SAg: Superantigénio (s)

SALT: “Skin Associated Lymphoid Tissue”; tecido linfóide associado às mucosas

SP: Sangue periférico

SS: Síndrome de Sezary

SSC: “Sideward light scatter”; dispersão lateral da luz.

TCR: “T-cell receptor”; receptor da célula T.

TCR-V: Repertório de famílias de regiões variáveis das cadeias alfa, beta, gama ou delta do receptor da célula T

TCR-V : Repertório de famílias de regiões variáveis da cadeia beta do receptor da célula T

TNF: “Tumor Necrosis Factor”; factor de necrose tumoral

VZV: “Varicella Zoster Virus”; vírus varicela zoster

RESUMO

As doenças linfoproliferativas crônicas (DLPC) de linfócitos T e de células NK são doenças raras com características clínico-biológicas ainda pouco definidas. Para além da sua raridade, os maiores obstáculos à sua identificação e caracterização têm sido a diversidade e complexidade fenotípica dos linfócitos T e das células NK, associados à ausência de critérios fenotípicos que permitam estabelecer o diagnóstico de suspeita de (mono) clonalidade e ao desconhecimento sobre a existência e incidência de fenótipos verdadeiramente aberrantes associados a estas DLPC.

Este trabalho teve como objectivo aprofundar o conhecimento das DLPC de linfócitos T e de células NK maduras, utilizando uma abordagem baseada na avaliação da utilidade dos estudos imunofenotípicos para confirmação de suspeita de (mono) clonalidade, para a identificação e caracterização de células T e NK neoplásicas e para a compreensão das manifestações clínico-biológicas e da etiopatogenia destas doenças.

Com o intuito de estabelecer as bases para definir os critérios fenotípicos de (mono) clonalidade e identificação de linfócitos T e de células NK neoplásicas, efectuamos o estudo imunofenotípico detalhado dos linfócitos T e das células NK do sangue periférico de indivíduos adultos saudáveis e de indivíduos adultos com diferentes condições patológicas associadas à estimulação aguda ou crónica destas células e comparamos o perfil imunofenotípico e o repertório de famílias de regiões variáveis da cadeia do receptor da célula T de expansões monoclonais de linfócitos T e de células NK com os de expansões policlonais e oligoclonais das mesmas células.

Para ultrapassar os obstáculos inerentes à raridade destas DLP, estabelecemos um protocolo multicêntrico centralizado no Hospital Geral de Santo António (Porto) e no Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca) e orientamos a nossa atenção para a identificação e caracterização de fenótipos aberrantes associados às neoplasias de células T e NK.

Das DLPC estudadas, escolhemos como modelos de estudo três grupos: as linfocitoses crônicas de linfócitos grandes granulares T CD4⁺ e as linfocitoses crônicas de linfócitos grandes granulares NK, cujas características clínico-biológicas eram, até hoje, praticamente desconhecidas e o Síndrome de Sezary, uma forma particular de linfoma T cutâneo que, embora já bem definido do ponto de vista clínico e histopatológico, estava ainda mal caracterizado do ponto de vista fenotípico. Nestes três tipos de DLPC, fizemos um estudo detalhado do perfil fenotípico e funcional da célula linfóide neoplásica, caracterizamos e interpretamos as manifestações clínicas da doença e avançamos com algumas hipóteses relativamente à sua etiopatogenia.

SUMMARY

T-cell and natural killer (NK) cell derived chronic lymphoproliferative disorders (CLPD) are rare diseases whose clinico-biological features are still poorly defined. Besides their rarity, the major obstacles to their identification and characterization have been the T and NK-cell diversity and phenotypic complexity, the absence of phenotypic criteria for diagnosis of (mono) clonality and our ignorance about the existence and incidence of true aberrant T- and NK-cell phenotypes.

With the purpose of going deeper in our knowledge on T- and NK-cell CLPD, we used an approach based on the evaluation of the utility of the immunophenotypic studies to confirm the (mono) clonal nature of a given T- and NK-cell proliferation, to identify and characterize the neoplastic T- and NK-cells and to understand the clinico-biological features and the etiopathogeny of these CLPD.

In order to establish the bases to define the phenotypic criteria for (mono) clonality and to identify neoplastic T- and NK-cells, we did a detailed immunophenotypic study of peripheral blood T- and NK-cells from adult healthy individuals and from individuals with various pathological conditions that have been associated to acute and chronic T and NK-cell stimulation; in addition, we compared the immunophenotypic patterns and the Tcell receptor α -chain variable region repertoire observed in monoclonal T- and NK-cell proliferations with that found on polyclonally e oligoclonally expanded T- and NK-cells.

To overcome difficulties related to the rarity of T- and NK-cell CLPD, we established a multicentric protocol centralized in the Hospital Geral de Santo António (Porto) and in the Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca) and we focused our attention on the identification and characterization of aberrant phenotypes associated to T- and NK-cell neoplasias.

From the T- e NK-cell CLPD that have been studied, three specific groups have been chosen as models: NK-cell and CD4⁺ T-cell derived chronic large granular lymphocytosis, whose clinico-biological features were largely unknown and the Sezary syndrome, a particular type of CD4⁺ cutaneous T-cell lymphoma with well-defined clinical and histopathological features, whose phenotypic features were still poorly established. Taking these CLPD as models, we did a detailed phenotypic and functional study of the neoplastic cell, we characterized the clinical and biological features of these T- and NK-cell CLPD and hypothesized about its etiopathogeny.

RÉSUMÉ

Les maladies lymphoprolifératives chroniques (MLPC) des lymphocytes T et des cellules NK sont rares, et elles ont des caractéristiques clinico-biologiques peu définies. En plus de sa rareté, les plus grands obstacles à l'identification et à la caractérisation des MLPC-T et NK sont la diversité et la complexité phénotypique des lymphocytes T et des cellules NK, l'absence de critères phénotypiques qui permettent d'établir le diagnostic de suspicion de (mono) clonalité et l'ignorance sur l'existence et l'incidence de phénotypes vraiment aberrants associés à ces MLPC.

L'objectif de ce travail était l'approfondissement de la connaissance des MLPC des lymphocytes T et des cellules NK matures, en utilisant une approche basée sur l'évaluation de l'utilité des études immunophénotypiques pour confirmation de suspicion de (mono) clonalité, pour l'identification et la caractérisation de cellules T et NK néoplasiques et pour la compréhension des manifestations clinico-biologiques de ces maladies et de sa étiopathogénie.

Avec l'intention d'établir les bases pour définir les critères phénotypiques de (mono) clonalité et d'identification des lymphocytes T et des cellules NK néoplasiques, on a développé une étude immunophénotypique détaillée des lymphocytes T et des cellules NK du sang périphérique des individus adultes saines et des individus adultes avec de différentes conditions pathologiques associées à la stimulation aiguë ou chronique de ces cellules; on a aussi comparé le profil immunophénotypique et le répertoire des familles de régions variables de la chaîne α du récepteur de la cellule T en individus avec des expansions monoclonales de lymphocytes T et des cellules NK, et ceux avec d'expansions polyclonales et oligoclonales de les mêmes cellules.

Afin de dépasser la rareté de ces MLPC, on a l'établi un protocole multicentrique centralisée dans l'Hospital Geral de Santo António (Porto) et dans l'Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca) et on a orienté la attention pour l'identification et la caractérisation de phénotypes aberrants associées aux néoplasies T et NK.

D'entre les MLPC étudiées, on a choisi comme des modèles d'étude trois groupes: les lymphocytoses chroniques de lymphocytes grands granulés T CD4⁺ et les lymphocytoses chroniques de lymphocytes grands granulés NK (donc les caractéristiques cliniques et biologiques étaient, jusqu'à aujourd'hui, pratiquement méconnues) et le Syndrome de Sezary (une forme particulière de lymphoma T cutanée qui, bien que déjà bien défini du point de vue clinique et histopathologique, est encore était mal caractérisée du point de vue phénotypique). Dans ces trois types de MLPC, on a fait une description détaillée du profil phénotypique et fonctionnel de la cellule lymphoïde néoplasique, on a caractérisé et interprétée les manifestations cliniques de ces maladies et on a développé quelques hypothèses à l'égard de sa étiopathogénie.

SÚMULA

INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

As doenças linfoproliferativas crónicas (DLPC) de linfócitos T (LT) e de células NK (CNK) são doenças linfoproliferativas (DLP) raras, que incluem várias entidades, algumas com comportamento clínico agressivo e outras de carácter crónico e indolente, muitas das quais com características clínico-biológicas ainda pouco esclarecidas. Entre estas últimas incluem-se as DLPC de linfócitos grandes granulares (LGL) T TCR⁺/CD4⁺ e as DLPC de LGL-NK. Noutros casos, embora as manifestações clínicas e os requisitos histopatológicos e citológicos que devem fundamentar o diagnóstico estejam já bem definidos, este falha frequentemente pelo facto de se desconhecerem os critérios fenotípicos que definem a célula neoplásica. Deste último caso, é exemplo o Síndrome de Sezary (SS), uma forma de linfoma cutâneo T TCR⁺/CD4⁺ que se caracteriza pela existência de eritrodermia e pela presença de células de Sezary (CS) no sangue periférico (SP).

Para além da sua raridade, os maiores obstáculos à identificação e caracterização destas DLP têm sido a diversidade e complexidade fenotípica dos LT e das CNK, a ausência de critérios fenotípicos que permitam, de forma rápida e reprodutível, estabelecer o diagnóstico de suspeita de (mono) clonalidade e o desconhecimento sobre a existência de fenótipos verdadeiramente aberrantes e sobre a sua incidência nestas DLPC.

Este trabalho teve como objectivo geral aprofundar o conhecimento das DLPC de LT e de CNK maduras, das suas manifestações clínico-biológicas e da sua etiopatogenia, utilizando uma abordagem baseada na avaliação da utilidade dos estudos imunofenotípicos (IF) para confirmação de suspeita de (mono) clonalidade e para a identificação de células linfóides neoplásicas.

Assim, foram propostos os seguintes OBJECTIVOS concretos: 1) Estabelecer as bases para a definição de critérios fenotípicos úteis para o diagnóstico de expansões (mono) clonais de LT e de CNK e para a identificação dos LT e das CNK neoplásicas; 2) definir as características fenotípicas e funcionais da célula linfóide neoplásica em DLPC-T e NK pouco conhecidas, caracterizando as manifestações clínico-biológicas associadas e 3) aprofundar o conhecimento da base biológica da homogeneidade / heterogeneidade de subtipos concretos de DLPC-T e NK, tomando como modelo o estudo de entidades bem definidas do ponto de vista clínico e histológico.

METODOLOGIA E PLANIFICAÇÃO DO TRABALHO

Com o objectivo de estabelecer as bases para definir os critérios fenotípicos de (mono) clonalidade e identificação de LT e CNK neoplásicas, efectuamos o estudo IF detalhado dos LT e das CNK do SP de indivíduos adultos saudáveis e de indivíduos adultos com diferentes condições patológicas associadas à estimulação aguda ou crónica destas células; por outro lado, comparamos o perfil IF e o repertório de

famílias de regiões variáveis da cadeia β do receptor da célula T (TCR-V β) de expansões monoclonais de LT e de CNK com os de expansões policlonais e oligoclonais das mesmas células.

Com a finalidade de ultrapassar os obstáculos inerentes à raridade destas DLP, estabelecemos um protocolo multicêntrico centralizado no Hospital Geral de Santo António (Porto) e no Hospital Universitário de Salamanca (Salamanca), que envolveu mais de 30 hospitais de Portugal e de Espanha e orientamos a nossa atenção para a identificação e caracterização de fenótipos aberrantes associados às neoplasias T e NK, conjugando esta informação com seu perfil funcional e com as manifestações clínicas destas doenças.

Das DLPC-T e NK com características clínico-biológicas pouco conhecidas até à data, foram seleccionadas como modelos de estudo um tipo particular de linfocitoses crónicas de LGL-NK que se caracteriza, entre outros, pela ausência, ou quase ausência de expressão de CD56 (CD56^{-/+débil}) e as linfocitoses crónicas de LGL-T TCR β ⁺/CD4⁺; para além disso, entre as DLP-T bem caracterizadas do ponto de vista clínico e histológico, seleccionamos como modelo de estudo o SS.

RESULTADOS

No que diz respeito ao estabelecimento de critérios de diagnóstico de suspeita de (mono) clonalidade dos LT e das CNK:

Em relação ao fenótipo dos LT e das CNK do SP de indivíduos saudáveis ou de indivíduos com situações patológicas associadas à estimulação aguda ou crónica destas células, verificamos que as CNK CD56⁺ e as CNK CD56⁺⁺ normais têm características fenotípicas estáveis mas distintas entre si, que podem contribuir para explicar diferenças nas suas propriedades funcionais, requisitos de activação e capacidade de migração. Por outro lado, os estudos imunofenotípicos das CNK CD56⁺ que predominam no SP de indivíduos com infecções víricas agudas ou com infecções víricas crónicas/tumores permitiram-nos definir perfis IF associados a estadios de activação recente/aguda e tardia/crónica destas células. De forma similar, os LT de indivíduos com infecção vírica aguda mononucleósica mostram perfis IF diferentes dos LT normais e parecidos com os das CNK activadas de indivíduos com infecções agudas. Estas alterações fenotípicas são muito evidentes nos LT TCR β ⁺/CD8⁺ e, ainda que menos exuberantes, são observadas também nos LT TCR β ⁺/CD4⁺ e nos TCR β ⁺. No seu conjunto, estes padrões constituíram a base para poder distinguir as CNK e os LT normais e activados das CNK e dos LT neoplásicos.

Em relação à utilidade da análise do repertório de famílias de regiões variáveis da cadeia β do TCR para a identificação de expansões monoclonais de LT TCR β ⁺, os indivíduos com infecção aguda mononucleósica, os indivíduos com expansões policlonais/oligoclonais de LGL-T TCR β ⁺ e os doentes com dermatite reactiva mostram um repertório T normal ou pequenas expansões de uma ou mais famílias TCR-V β dentro das LT TCR β ⁺/CD4⁺, dos LT TCR β ⁺/CD8⁺ ou de ambos; no entanto, estas expansões nunca chegam a representar uma proporção significativa dos LT dentro de

cada uma destas populações, ao contrário do que é observado na maioria dos casos de expansões monoclonais de LT TCR⁺/CD4⁺ ou TCR⁺/CD8⁺, incluindo as linfocitoses de LGL-T TCR⁺ monoclonais e o Síndrome de Sezary. Desta forma, a análise IF por citometria de fluxo do repertório de famílias TCR-V é de grande utilidade no diagnóstico de (mono) clonalidade T, especialmente se combinada com a identificação de fenótipos aberrantes.

No que diz respeito à caracterização clínico-biológica de DLPC-T e NK pouco conhecidas:

Identificamos e caracterizamos do ponto de vista clínico-biológico um grupo de DLPC-NK que designamos por DLPC de LGL-NK CD56^{-/+débil}. Estas DLPC caracterizam-se pela existência de uma linfocitose crónica de CNK com morfologia de LGL e um perfil IF aberrante cuja característica mais relevante consiste numa diminuição acentuada ou ausência de expressão de glicoproteínas (Gp) de membrana (CD56 e CD11b). As DLPC de LGL-NK CD56^{-/+débil} são doenças com um curso clínico indolente, determinado habitualmente pela presença de outra neoplasia (27%), associação com infecções víricas (46%) e citopenias – anemia (43%), neutropenia (39%) e trombocitopenia (25%) – e com alterações da imunidade humoral. As CNK CD56^{-/+débil} produzem citocinas de tipo Th1 – Interferão (IFN-) e Factor de Necrose Tumoral (TNF-) – quando estimuladas e, para além das características referidas acima, têm em comum: 1) um perfil IF aberrante sugestivo de activação celular: CD11a^{+forte}, CD2^{+forte,hom}, CD7^{-/+débil,het}, HLA-DR^{+,het} e co-expressão de CD45RA e CD45RO em alguns casos; 2) expressão muito forte e homogénea de CD11c e CD94, associada à expressão variável, débil e heterogénea de CD57, CD158a e CD161 e 3) outras alterações menos frequentes, como diminuição de expressão de CD38 e CD16.

Caracterizamos do ponto de vista clínico-biológico um grupo de DLPC-T que designamos por DLPC de LGL-T TCR⁺/CD4⁺. Verificamos que as expansões monoclonais de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ são frequentemente detectadas em estudos analíticos de rotina e que têm um curso clínico indolente, usualmente determinado pela presença de outra neoplasia associada (29% dos casos), cujas primeiras manifestações podem preceder, ser concomitantes ou suceder ao diagnóstico desta DLP e que, ao contrário das DLP de LGL-T TCR⁺/CD8⁺, não se associam a citopenias e a fenómenos de autoimunidade, nomeadamente artrite reumatóide. Os LGL-T TCR⁺/CD4⁺ monoclonais têm um perfil IF aberrante sugestivo de activação celular prévia e de diferenciação terminal em célula efectora de tipo citotóxico, que se caracteriza, entre outros, por: 1) ausência de expressão de CD28; 2) co-expressão de CD56, CD57 e granzima B e 3) expressão débil e heterogénea de CD8; 4) co-expressão de CD45RA e CD45RO ou predomínio de expressão de CD45RA; 5) expressão forte e homogénea de CD2 e CD11a, associada a expressão débil e heterogénea de CD7. Para além disso, expressam um número restrito de famílias do repertório TCR-V, em particular da família TCR-V 13.1 (35% dos casos) e produzem preferencialmente citocinas de tipo Th1 (IFN-, TNF- e, por vezes e em menor quantidade, interleucina 2).

As expansões não monoclonais de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ diferem das primeiras em termos quantitativos (pela magnitude da expansão) e em termos qualitativos (pelo fenótipo dos linfócitos expandidos). Tal como as LGL-T TCR⁺/CD4⁺ monoclonais, estes linfócitos têm um perfil fenotípico sugestivo de activação celular, mas neste caso observa-se com frequência expressão débil e heterogénea de CD28 em parte das células, a expressão de CD57 predomina claramente sobre a de CD56 e a expressão de CD45RO sobre a de CD45RA.

No que diz respeito à caracterização fenotípica de DLPC-T com características clínicas, histológicas e citológicas bem estabelecidas:

Caracterizamos o perfil fenotípico aberrante mais frequentemente observado nas CS e observamos que, na presença de um quadro de eritrodermia, a detecção, no SP, de uma população de LT TCR⁺/CD4⁺/CD28⁺/CD5⁺ sem expressão de antígenos associados às CNK (NKa) e com expressão diminuída de CD3, TCR^β, CD4, CD7 e/ou CD2 na membrana, apoia o diagnóstico de SS. Verificamos também que, apesar disso, no SS existe uma grande heterogeneidade IF intra-tumoral (intra-clonal), manifestada pela presença de duas ou mais subpopulações de CS que diferem no tamanho, na intensidade de expressão dos antígenos (Ag) testados e/ou no conteúdo celular de ADN. Observamos ainda que, durante a evolução da doença, são frequentes alterações IF das CS que afectam a distribuição e as características destas populações tumorais no mesmo indivíduo. O estudo do repertório TCR-V_β revelou uma expansão TCR-V_β em todos os casos (73 ± 27% dos LT TCR⁺/CD4⁺, correspondente à população de LT TCR⁺/CD4⁺ com IF aberrante); por outro lado, sugeriu a utilização preferencial de um número restrito de famílias TCR-V_β pelas CS, pelo facto de não ter sido possível identificar a família expandida em 70% dos casos de SS e ainda pela utilização preferencial da família TCR-V_β 13.6 em 17% dos casos.

O perfil fenotípico aberrante encontrado nas CS nunca foi observado nos LT TCR⁺/CD4⁺ de doentes com eritrodermia reactiva; por outro lado, nestes últimos, foi menor a proporção de casos em que foram detectadas expansões de famílias TCR-V_β (50% dos casos) e também muito inferior a magnitude das mesmas (10 ± 9%).

DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O conhecimento do perfil fenotípico dos LT e das CNK normais e do seu comportamento em resposta à activação celular foram de importância fundamental para a interpretação dos estudos efectuados nas DLPC-T e -NK. O estudo destas últimas permitiu acrescentar duas novas entidades às previamente descritas – as DLPC de LGL-NK CD56^{-/+débil} e as DLPC de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ – e caracterizá-las do ponto de vista clínico-biológico. Contribuiu ainda para caracterizar o perfil fenotípico aberrante das CS, optimizando, desta forma, os critérios para o diagnóstico desta doença e permitindo compreender melhor a biologia da célula tumoral e alguns dos aspectos clínicos do SS.

Os resultados obtidos no estudo das patologias escolhidas como modelos de investigação das DLPC -T e -NK permitiram ainda avançar com algumas hipóteses relativas à etiopatogenia das DLPC-T e NK abordadas neste trabalho:

Relativamente às DLPC de LGL-NK CD56^{-/+débil}, consideramos e discutimos a hipótese de na origem destas DLP estar uma infecção vírica que condiciona a activação crónica das CNK e determina deficiência de Gp de membrana (CD11b e CD56) com grande importância para a adesão, migração e actividade citotóxica das CNK; tendo na sua base o pressuposto de que este é um mecanismo utilizado pelo vírus para garantir a sua sobrevivência no hospedeiro, esta hipótese permitiria, simultaneamente, explicar a acumulação de CNK activadas no SP, a grande incidência de neoplasias nestes doentes e a forte associação com citopenias de causa periférica.

No que respeita às DLPC de LGL-T TCR⁺/CD4⁺, os nossos resultados sugerem que na génese das expansões de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ (e ao contrário do que parece acontecer nas DLPC de LGL-T TCR⁺/CD8⁺) esteja envolvida a estimulação crónica dos LT CD4⁺ por um superantígeno (SAg) capaz de desencadear uma expansão de LT de carácter policlonal que evolui, posterior e sucessivamente, de forma oligoclonal e monoclonal. Considera-se e discute-se a hipótese das expansões monoclonais de LGL-T T⁺/CD4⁺ terem na sua origem a infecção por um vírus capaz de, directa ou indirectamente, levar à produção de SAg. Esta hipótese poderia justificar quer a expansão crónica de LT activados que expressam um número restrito de famílias TCR-V , quer a grande incidência de outras neoplasias nestes doentes.

Em relação ao Síndrome de Sezary, os resultados obtidos apoiam as evidências pré-existentes de que as CS são células com grande instabilidade genética e ajudam a compreender as manifestações clínicas associadas à doença. Apoiam também a hipótese previamente colocada por alguns autores de que o SS tenha origem na estimulação dos LT CD4⁺ cutâneos por SAg de provável origem bacteriana, nomeadamente produzidos pelo *Staphylococcus aureus*. Discutem-se estes aspectos e dá-se relevo à interacção entre os LT CD4⁺ e as células cutâneas apresentadoras de Ag (células de Langerhans e queratinócitos).

Embora ainda no âmbito da especulação, estas hipóteses abrem-nos novos horizontes na compreensão destas doenças e novas perspectivas de trabalho multidisciplinar.

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO	28
1.1. CONCEITO DE DOENÇA LINFOPROLIFERATIVA CRÓNICA	29
1.1.1. Definições.....	29
1.1.2. Pre (conceitos).....	29
1.1.2.1. Clonalidade.....	29
1.1.2.2. Neoplasia.....	30
1.1.2.3. Malignidade.....	30
1.1.3. Origem.....	30
1.1.3.1. Migração	30
1.1.3.2. Distribuição tecidual.....	31
1.1.4. Etiopatogenia.....	32
1.1.4.1. Infecções.....	32
1.1.4.1.a) Infecções víricas.....	32
1.1.4.1.b) Infecções bacterianas.....	33
1.1.4.2. (Super) antigénios.....	34
1.1.4.3. Alterações genéticas.....	35
1.1.4.4. Desregulação da apoptose e proliferação celular.....	36
1.1.4.4.a) Inibição da apoptose	36
1.1.4.4.b) Indução da proliferação celular.....	37
1.1.5. Manifestações clínicas.....	37
1.5.1.1. Manifestações neoplásicas.....	37
1.5.1.2. Manifestações paraneoplásicas.....	37
1.1.6. Classificações.....	38
1.1.6.1. Doenças linfoproliferativas NK.....	39
1.1.6.1.a) Doenças linfoproliferativas crónicas de linfócitos grandes granulares NK.....	39
1.1.6.2. Doenças linfoproliferativas T.....	40
1.1.6.2.a) Doenças linfoproliferativas crónicas de linfócitos grandes granulares T.....	40
1.1.6.2.b) Síndrome de Sezary	42
1.2. CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS.....	44
1.2.1. Identificação imunofenotípica das células linfóides neoplásicas.....	44
1.2.1.1. Conceitos de imunofenótipo aberrante, indicador clono-fenotípico e perfil clono-fenotípico.....	44
1.2.1.2. O equivalente normal do linfócito neoplásico	46
1.2.1.3. Perfil imunofenotípico das células NK e dos linfócitos T maduros.....	46
1.2.1.4. Modificações fenotípicas resultantes da activação e diferenciação celular terminal.....	47
1.2.1.5. Indicadores e perfis clono-fenotípicos nas doenças linfoproliferativas crónicas T e NK.....	50
1.2.1.6. O repertório de famílias de regiões variáveis do receptor da célula T como indicador clono-fenotípico T.....	51

1.2.2. Contribuição dos estudos imunofenotípicos para a classificação das doenças linfoproliferativas T e NK.....	52
1.2.2.1. Doenças linfoproliferativas NK.....	53
1.2.2.1.a) Doenças linfoproliferativas crónicas de linfócitos grandes granulares NK.....	53
1.2.2.2. Doenças linfoproliferativas T.....	53
1.2.2.2.a) Doenças linfoproliferativas crónicas de linfócitos grandes granulares T.....	54
1.2.2.2.b) Síndrome de Sezary.....	54
1.2.3. Outras aplicações dos estudos imunofenotípicos nas doenças linfoproliferativas T e NK.....	55
1.3. O PORQUÊ DESTE TRABALHO.....	57
2. OBJECTIVOS.....	59
3. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS.....	61
3.1. CRITÉRIOS FENOTÍPICOS PARA DETECÇÃO DE LINFÓCITOS T E DE CÉLULAS NK NEOPLÁSICAS: Perfil imunofenotípico e repertório de famílias de regiões variáveis das cadeias do TCR.....	64
3.1.1. Estudo imunofenotípico comparativo das células NK CD56 ⁺ e CD56 ⁺⁺ do sangue periférico e seu impacto para a compreensão da sua distribuição tecidual e suas propriedades funcionais.....	65
3.1.2. Os padrões de expressão “ex-vivo” de CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO e CD11a/HLA-DR identificam estadios de activação aguda/recente e crónica/tardia das células NK.....	66
3.1.3. Imunofenótipo e repertório de regiões variáveis da cadeia beta do receptor da célula T nos linfócitos T do sangue periférico de doentes com mononucleose infecciosa.....	67
3.1.4. Análise imunofenotípica do repertório de famílias de regiões variáveis da cadeia beta do receptor da célula T em 98 expansões persistentes de linfócitos grandes granulares T CD3 ⁺ /TCR ⁺ : Utilidade na avaliação da clonalidade e contributo para o esclarecimento da patogénese da doença.....	68
3.2. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E BIOLÓGICA DE DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS POUCO CONHECIDAS.....	69
3.2.1. Características clínico-biológicas, imunofenotípicas e moleculares das linfocitoses crónicas de linfócitos grandes granulares NK CD56 ^{-/+débil}	70
3.2.2. Linfocitose de linfócitos grandes granulares T TCR ⁺ /CD4 ⁺ : Uma nova doença linfoproliferativa T clonal.....	71
3.3. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS BEM ESTABELECIDAS.....	72
3.3.1. Utilidade dos estudos imunofenotípicos e de quantificação do ADN celular para o diagnóstico e caracterização do envolvimento do sangue periférico no Síndrome de Sezary CD4 ⁺	73
4. DISCUSSÃO.....	74
4.1. CRITÉRIOS FENOTÍPICOS PARA A DETECÇÃO DE CÉLULAS NK E DE LINFÓCITOS T NEOPLÁSICOS: Perfil imunofenotípico e repertório de famílias de regiões variáveis das cadeias do TCR.....	77
4.1.1. Perfil imunofenotípico das células NK e dos linfócitos T normais activados.....	77
4.1.2. Repertório de famílias de regiões variáveis do receptor da célula T nos linfócitos T.....	79
4.1.3. Avaliação simultânea do perfil imunofenotípico e do repertório de famílias de regiões variáveis do receptor da célula T nos linfócitos T.....	80
4.2. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E BIOLÓGICA DE DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS T E NK POUCO CONHECIDAS: Descrição de novas entidades.....	81

4.2.1. Doenças linfoproliferativas crônicas de linfócitos grandes granulares NK CD56 ^{-/+DÉBIL}	81
4.2.1.1. Frequência.....	81
4.2.1.2. Perfil imunofenotípico	82
4.2.1.3. Características clínico-biológicas	83
4.2.1.4. Reflexões sobre o comportamento clínico-biológico e a etiopatogenia da doença.....	84
4.2.1.4.a) Comportamento clínico-biológico	84
4.2.1.4.b) Etiopatogenia.....	88
4.2.2. Doenças linfoproliferativas crônicas de linfócitos grandes granulares T TCR ⁺ /CD4 ⁺	90
4.2.2.1. Frequência.....	90
4.2.2.2. Perfil imunofenotípico	91
4.2.2.3. Características clínico-biológicas	91
4.2.2.4. Reflexões sobre o comportamento clínico-biológico e a etiopatogenia da doença.....	92
4.2.2.4.a) Comportamento clínico-biológico	92
4.2.2.4.b) Etiopatogenia.....	95
4.3. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS BEM ESTABELECIDAS: Síndrome de Sezary.	99
4.3.1. Síndrome de Sezary.....	99
4.3.1.1. Perfil imunofenotípico	99
4.3.1.1.a) Utilidade dos estudos imunofenotípicos para o diagnóstico diferencial entre Síndrome de Sezary e eritrodermia reactiva.....	99
4.3.1.1.b) Utilidade dos estudos imunofenotípicos para o diagnóstico diferencial entre Síndrome de Sezary e eritrodermia associadas a outras neoplasias T.....	100
4.3.1.1.c) Utilidade dos estudos imunofenotípicos como indicador de prognóstico e de decisão terapêutica.....	101
4.3.1.1.d) Valor dos estudos imunofenotípicos na avaliação de resposta à terapêutica e na detecção de doença residual	101
4.3.1.2. Características biológicas.....	102
4.3.1.3. Reflexões sobre a etiopatogenia.....	102
5. CONCLUSÕES.....	106
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	110

1.INTRODUÇÃO

1.1. CONCEITO DE DOENÇA LINFOPROLIFERATIVA CRÓNICA

1.1.1. DEFINIÇÕES

As doenças linfoproliferativas crónicas (DLPC) compreendem um grupo heterogéneo de doenças que têm em comum uma expansão, geralmente monoclonal, de linfócitos B (LB), de linfócitos T (LT) ou de células citotóxicas naturais (células “Natural-Killer”, CNK).¹ A maioria das DLPC tem origem nos LB, enquanto as originadas nos LT e nas CNK são raras, representando menos de 10% de todas as DLPC.

De uma forma muito simplista, são usualmente designadas por leucemias – quando predomina a sua expressão no sangue periférico (SP) e/ou na medula óssea (MO) – ou por linfomas – quando predomina a infiltração de órgãos linfóides ou outros tecidos.

O termo “CRÓNICAS”, consagrado pelo uso, induz em erro, pois algumas DLP vulgarmente incluídas na designação de DLPC têm um comportamento clínico agressivo.²

De “LINFOPROLIFERATIVAS”, a maioria destas doenças tem pouco, pois o mecanismo envolvido na sua génese consiste fundamentalmente na inibição da apoptose e não numa proliferação celular descontrolada.

Todas elas apresentam, no entanto, uma característica comum: o fenótipo maturo da célula linfóide, independentemente das características morfológicas sugestivas de

“maturidade” ou de “imaturidade” e do curso clínico menos ou mais agressivo.

1.1.2. PRE (CONCEITOS)

Não é possível a abordagem das DLP sem um entendimento claro dos conceitos de clonalidade, neoplasia e malignidade pois, embora de uma forma geral exista um paralelismo entre eles – isto é, os processos neoplásicos são de uma forma geral monoclonais e potencialmente malignos, enquanto os processos reactivos são de uma forma geral policlonais e clinicamente benignos –, há casos em que as fronteiras se confundem.³

1.1.2.1. Clonalidade

Quando falamos de DLP é, quase implicitamente, assumido o conceito de (MONO) CLONALIDADE, isto é, a demonstração, por técnicas de biologia molecular, que os linfócitos expandidos têm origem numa célula comum e, portanto, partilham o mesmo tipo de rearranjo dos genes que codificam para o receptor da célula T (“T-Cell Receptor”, TCR) (no caso das DLP-T) ou para as imunoglobulinas (Igs) (no caso das DLP-B). No entanto, a noção de que expansões oligo e mesmo monoclonais podem surgir no decurso de uma resposta imune, sem que tal se revista de significado patológico,^{4,5} a existência de DLP de carácter policlonal ou oligoclonal, mas com comportamento clínico

¹ Montserrat E (1997): Chronic lymphoproliferative disorders. *Curr Opin Oncol* 9: 34-41

² Pellatt J e col (2002): A single-centre study of treatment outcomes and survival in 120 patients with peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol.* 81: 267-72

³ Toren A. e col (1996): The gray zone between malignant and reactive processes in lymphoproliferative diseases. *Acta Haematol.* 96:120-5

⁴ Puisieux I e col (1996): Related Restriction of the T-cell repertoire in tumor-infiltrating lymphocytes from nine patients with renal-cell carcinoma. Relevance of the CDR3 length analysis for the identification of in-situ clonal T-cell expansions *Int J Cancer* 66: 201-8

⁵ Fasso M e col (2000): T cell receptor (TCR)-mediated repertoire selection and loss of TCR β diversity during the initiation of a CD4 (+) T cell response in vivo. *J Exp Med.*192: 1719-30

maligno nomeadamente nos imunodeprimidos⁶ e o comportamento clínico benigno de algumas DLP documentadamente monoclonais,⁷ têm vindo a modificar a nossa perspectiva sobre conceitos sedimentados e entendidos como verdades absolutas, pelo menos para os clínicos: a de que uma resposta imune fisiológica se organiza sempre de uma forma policlonal e a de que uma expansão (mono) clonal é sempre maligna.

1.1.2.2. Neoplasia

O conceito de NEOPLASIA está intimamente ligado aos conceitos de autonomia e irreversibilidade; opõe-se, também quase implicitamente, ao conceito de processo REACTIVO em que, por definição, se assume a existência de uma causa plausível subjacente e a noção de reversibilidade. No entanto, os relatos de remissão espontânea de DLP,^{8,9} a resposta de determinadas DLP à antibioterapia^{10,11} (Machado S e col., 2003 - Art. 27) e a remissão de leucemias em resposta a factores de crescimento¹² (Xavier L e col., 2003 - Art. 29) obrigam-nos a reformular estes conceitos.

1.1.2.3. Malignidade

Já as noções de BENIGNIDADE e MALIGNIDADE são intrinsecamente clínicas e, mesmo estas, têm sofrido modificações ao

longo dos anos, na medida em que os diagnósticos são efectuados cada vez mais precocemente, na sequência de achados analíticos em estudos efectuados por rotina e na ausência, portanto, de manifestações clínicas. Desta forma, tem vindo a modificar-se, nos últimos anos, a nossa perspectiva sobre a incidência e a história natural das DLP.¹³

1.1.3. ORIGEM

As DLPC têm origem nos LT, nos LB ou nas CNK maduras, localizados na MO, no SP e nos órgãos linfóides secundários – gânglios linfáticos, baço e tecido linfóide associado às mucosas ou à pele.

Para entender alguns dos aspectos clínico-biológicos das DLP – nomeadamente, a relação entre o tipo de célula linfóide neoplásica, o (s) órgão (s) preferencialmente atingido (s) e os aspectos histológicos que as caracterizam – é necessário o conhecimento prévio dos mecanismos que regulam a migração e “homing” dos linfócitos – isto é, o seu tropismo para determinados órgãos ou tecidos – e a sua distribuição tecidular – ou seja, a sua apetência para se localizarem em áreas específicas do tecido linfóide –.

1.1.3.1. Migração

Sabe-se actualmente que a migração e “homing” dos linfócitos é um processo não aleatório que ocorre de uma forma pré-determinada,^{14,15,16} da qual depende o sucesso

⁶ Loren AW e col (2003): Post-transplant lymphoproliferative disorder: a review. Bone Marrow Transplant 31: 145-5

⁷ Lamy T e col (1999): Current concepts: large granular lymphocyte leukemia. Blood Rev 13: 230-40

⁸ Takeuchi M (1999): Spontaneous remission of large granular lymphocyte T cell leukemia. Leukemia 13: 313-4

⁹ Shichishima T e col (2000): T-prolymphocytic leukaemia with spontaneous remission. Br J Haematol 108: 397-9

¹⁰ Arima N e col (2003): Extragastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma showing the regression by Helicobacter pylori eradication therapy. Br J Haematol 120: 790-2

¹¹ Roggero E, et al (2000): Eradication of Borrelia burgdorferi infection in primary marginal zone B-cell lymphoma of the skin. Hum Pathol 31: 263-8

¹² Nimubona S e col (2002): Complete remission in hypoplastic acute myeloid leukemia induced by G-CSF without chemotherapy: report on three cases. Leukemia 16: 1871-3

¹³ Molica S e col (2001): What is changing in the natural history of chronic lymphocytic leukemia? Haematologica 86: 8-12

¹⁴ Mackay CR e col (1990): Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. J Exp Med 171: 801-17

¹⁵ Picker LJ e col (1994): Control of lymphocyte homing. Curr Opin Immunol 16: 394-406

¹⁶ Butcher EC e col (1996): Lymphocyte homing and homeostasis. Science 272: 60-6

da resposta imune: os LT ditos “naive” – que nunca tiveram contacto com o antígeno (Ag) – circulam através do SP, entre os órgãos linfóides secundários, como os gânglios linfáticos, o baço, as amígdalas e as placas de Peyer, onde entram através das vénulas pós-capilares, e onde contactam com o Ag no ambiente apropriado; quando a interacção com o Ag é produtiva, diferenciam-se em células “de memória” ou efectoras e adquirem a capacidade para aceder às mucosas e à pele onde serão mais úteis para garantir a vigilância imune. Sabe-se também que o “homing” preferencial dos linfócitos para este ou aquele órgão ou tecido depende da expressão de receptores de adesão e “homing” nos primeiros e dos respectivos ligandos nos segundos,^{17,18,19,20,21,22,23} bem como da produção de quimiocinas e expressão dos seus receptores.^{24,25,26,27}

As DLPC originadas nos linfócitos ganglionares ou esplénicos englobam-se dentro dos linfomas ganglionares ou esplénicos,

respectivamente, enquanto aquelas originadas nos linfócitos circulantes designam-se por leucemias. As DLPC originadas no tecido linfóide associado às mucosas (“Mucosae Associated Lymphoid Tissue”, MALT) e à pele (“Skin Associated Lymphoid Tissue”, SALT) têm características muito particulares relacionadas com as funções especializadas desempenhadas pelas células linfóides aí localizadas, submetidas à exposição antigénica contínua nestas superfícies de fronteira com o meio exterior.^{28,29,30,31} Em conjunto com outro tipo semelhante de linfomas com origem na zona marginal do tecido linfóide de outros órgãos ou tecidos, são genericamente designados por linfomas da zona marginal.³²

1.1.3.2. Distribuição tecidual

A distribuição dos diferentes tipos de linfócitos dentro dos órgãos ou tecidos linfóides também obedece a regras próprias. Esta apetência das células linfóides para ocuparem locais específicos dentro de uma estrutura linfóide organizada^{33,34,35,36} é fundamental para o estabelecimento de relações mais estreitas com outras células aí residentes. Por exemplo, ao nível da pele e mucosas, os linfócitos mantêm uma relação privilegiada com células

¹⁷ Berg EL e col (1991): The human peripheral lymph node vascular addressin is a ligand for LECAM-1, the peripheral lymph node homing receptor. *J Cell Biol* 114: 343-9

¹⁸ Berg EL e col (1991): The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med* 174: 1461-6

¹⁹ Picker LJ e col (1991): ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature* 349: 796-9

²⁰ Berlin C e col (1993): Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74: 185-5

²¹ Picker LJ e col (1994): Differential expression of lymphocyte homing receptors by human memory/effector T cells in pulmonary versus cutaneous immune effector sites. *Eur J Immunol* 24: 1269-77

²² Ainslie MP e col (2002): Characterisation of adhesion receptors mediating lymphocyte adhesion to bronchial endothelium provides evidence for a distinct lung homing pathway. *Thorax* 57: 1054-9

²³ Nolte MA e col (2002): The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors. *Immunology* 106: 299-307

²⁴ Baggiolini M e col (1998): Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392: 565-8

²⁵ Zlotnik A. e col (1999): Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol* 19: 1-47

²⁶ Morales J e col (1999): CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14470-5

²⁷ Soler D e col (2003): CCR4 versus CCR10 in human cutaneous TH lymphocyte trafficking. *Blood* 101: 1677-82

²⁸ Isaacson PG (1992): Extranodal lymphomas: the MALT concept. *Verh Dtsch Ges Pathol* 76: 14-23

²⁹ Ahmed S e col (2002): Low-grade B-cell bronchial associated lymphoid tissue (BALT) lymphoma. *Cancer Invest* 20: 1059-68

³⁰ Cohen DD e col (2002): Primary low-grade B-cell lymphoma of the urinary bladder: case report and literature review. *Can J Urol* 9: 1694-7

³¹ Servitje O e col (2002): Primary cutaneous marginal zone B cell lymphoma: a clinical, histopathological, immunophenotypic and molecular genetic study of 22 cases. *Br J Dermatol* 147: 1147-58

³² Maes B e col (2002): Marginal zone cell lymphoma-an update on recent advances. *Histopathology* 40: 117-26

³³ Winnock M e col (1995): Human liver-associated lymphocytes: an overview. *J Gastroenterol Hepatol.* 10 (Supl 1): S43-6

³⁴ Falini B e col (1989): Distribution of T cells bearing different forms of the T cell receptor gamma/delta in normal and pathological human tissues. *J Immunol* 143: 2480-8

³⁵ Shiohara T e col (2001): Gamma-delta T cells with emphasis on their functional role in the epidermis. *Chem Immunol* 79: 66-86

especializadas no transporte, processamento e apresentação de Ag, eventualmente também importantes na gênese de algumas DLP.
37,38,39,40,41

1.1.4. ETIOPATOGENIA

Os mecanismos etiopatogénicos das DLP estão ainda longe de ser bem compreendidos.

Os conceitos de SECUNDÁRIO e de IDIOPÁTICO têm uma relação muito directa com a nossa capacidade de diagnóstico e não são de todo sobreponíveis aos conceitos de reactivo ou de neoplásico. Sabe-se hoje que DLP consideradas durante muitos anos como idiopáticas têm na sua origem factores ambientais, nomeadamente infecções;⁴² por outro lado, conhecem-se actualmente as alterações cromossómicas e moleculares que estão na base de muitas DLP.⁴³

1.1.4.1. Infecções

São múltiplas as evidências de relação entre infecções e neoplasias linfóides.

1.1.4.1.a) Infecções víricas

As duas associações melhor documentadas entre INFECÇÃO VÍRICA e DLP-T ou -NK dizem respeito ao vírus da leucemia/linfoma de

células T do adulto tipo I (“Human T-Cell Leukemia Lymphoma Vírus” tipo I, HTLV-I)⁴⁴ e ao vírus de Epstein-Barr (“Epstein-Barr Vírus”, EBV).⁴⁵

A infecção pelo HTLV-I, implicada na etiopatogenia da leucemia/linfoma de células T do adulto, representa um modelo interessante de leucemogénese,^{46,47,48} em que as proteínas reguladoras codificadas pelo vírus, como a proteína p40^{tax}, parecem ter um papel importante. Por um lado, a p40^{tax} interage com a síntese de proteínas que modulam as funções celulares, como a interleucina (IL) 2 e o receptor da IL2,⁴⁹ conduzindo à proliferação autócrina dos LT CD4⁺ infectados pelo vírus durante o período de latência da doença, que pode ser de muitos anos; por outro, interfere com a reparação do ADN celular, do que resultam mutações somáticas que estão na origem da neoplasia.⁵⁰

O EBV tem sido associado a numerosas neoplasias, incluindo algumas DLP-T e NK.^{51,52,53} Na fase aguda da infecção – a mononucleose infecciosa – o vírus entra nas células, servindo-se entre outros, de receptores

³⁶ Hayday A. e col (2001): Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* 2: 997-1003

³⁷ Nickoloff BJ e col (1994): Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol Today* 15: 464-9

³⁸ Yokota K e col (1996): Cytokine-mediated communication between dendritic epidermal T cells and Langerhans cells. *In vitro studies using cell lines*. *J Immunol* 157: 1529-37

³⁹ Brandtzaeg P e col (1996): Immune functions and immunopathology of the mucosa of the upper respiratory pathways. *Acta Otolaryngol* 116: 149-59

⁴⁰ Hershberg RM e col (2000): Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol Today* 21: 123-8

⁴¹ Tango M e col (2000): The presence of specialized epithelial cells on the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in the mouse. *Arch Histol Cytol* 63: 81-9

⁴² Toren A. e col (1996): Infectious agents and environmental factors in lymphoid malignancies. *Blood Rev* 10: 89-94

⁴³ Seto M (2002): Molecular mechanisms of lymphomagenesis through transcriptional dysregulation by chromosome translocation. *Int J Hematol* 76 (Supl 1): 323-6

⁴⁴ Kuefler PR e col (1986): Adult T cell leukaemia/lymphoma. *Clin Haematol* 15: 695-726

⁴⁵ Cesarman E (2002): Epstein-Barr virus (EBV) and lymphomagenesis. *Front Biosci* 7: e58-65

⁴⁶ Murphy EL e col (1989): Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int J Cancer* 43: 250-3

⁴⁷ Mortreux F e col (2002): Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated oncogenesis in vivo. *Elect J Oncol* 1: 33-47

⁴⁸ Etoh K e col (1997): Persistent clonal proliferation of human T lymphotropic virus type I- infected cells in vivo. *Cancer Res* 57: 4862-7

⁴⁹ Yoshida M e col (2002): Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control *Annu Rev Immunol* 19: 475-96

⁵⁰ Miyake H e col (1999): Trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 enhances mutation frequency of the cellular genome. *Virology* 253: 155-61

⁵¹ Cohen JI (2003): Benign and malignant Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative diseases. *Semin Hematol* 40: 116-23

⁵² Weiss LM e col (1992): Detection and localization of Epstein-Barr viral genomes in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Blood* 79: 1789-951

⁵³ Oshimi K (1996): Lymphoproliferative disorders of natural killer cells. *Int J Hematol* 63: 279-90

do complemento (CR2 ou CD21) e replica-se; assim, tem tropismo acentuado para os LB e para as células epiteliais, embora infecte também outras células como os LT e as CNK. Na fase de latência, que ocorre preferencialmente nos LB, está envolvido na gênese do carcinoma nasofaríngeo, de alguns tipos específicos de DLP-B (linfoma de Burkitt), T ou NK (leucemia linfoma agressivo de CNK, linfoma NK angiocêntrico nasal e tipo nasal e linfoma T angioimunoblástico) e na doença de Hodgkin. Os mecanismos moleculares subjacentes à oncogênese são complexos e incluem a inibição da apoptose e a interacção dos genes víricos com outros genes como o p53.⁵⁴

A extensa investigação efectuada nos últimos anos, conduziu à descoberta de três novos vírus do grupo herpes (“Human Herpes Vírus”, HHV)⁵⁵ dos quais pelo menos um – o HHV-8^{56,57} – já foi implicado na gênese de neoplasias e outro – o HHV-6 – parece ser importante na interacção com o vírus da imunodeficiência humana (“Human Immunodeficiency Vírus”, HIV).⁵⁸

Para além do HTLV-I e do EBV, nenhum outro vírus foi até ao momento implicado na gênese de DLP-T e NK. No entanto, sabe-se que a relação entre alguns vírus e as neoplasias nem sempre é directa, podendo ser mediada muito provavelmente pela actividade muta-

génica e pela indução de amplificação de ADN de outros vírus. É o caso da relação entre o HIV, o HHV-8, o sarcoma de Kaposi e os linfomas B, da relação entre o citomegalovírus (CMV), o vírus polioma JC e as neoplasias do cólon,⁵⁹ e da relação entre o vírus herpes simplex (“Herpes Simplex Vírus”, HSV), o vírus do papiloma humano e neoplasias do colo uterino.⁶⁰

1.1.4.1.b) Infecções bacterianas

A associação melhor documentada entre INFECCÃO BACTERIANA e DLP é aquela que ocorre entre a infecção por *Helicobacter pylori* e os linfomas B associados à mucosa do tubo digestivo, em particular os linfomas gástricos.⁶¹ Mais recentemente, surgiram evidências de uma relação semelhante entre os linfomas B de zona marginal da pele e a infecção por *Borrelia burgdorferi*.^{62,63,64}

Existem muitos pontos comuns entre estes dois tipos de linfomas, nomeadamente a existência de um vasto espectro de DLP de carácter policlonal, oligoclonal ou monoclonal e de um (não menos vasto) espectro de quadros histológicos (desde aqueles que nada diferem das hiperplasias linfóides reactivas, passando por outros de diagnóstico diferencial difícil entre estas e linfoma, até outros com

⁵⁴ Chen W e col (1996): Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 and latent membrane protein independently transactivate p53 through induction of NF-kappaB activity. J Virol 70: 4849-53

⁵⁵ Agut H e col (1996): Novel human herpesviruses (human herpesviruses 6, 7 and 8). Clin Microbiol Infect 2: 159-67

⁵⁶ Geramijad P e col (2002): Kaposi's sarcoma and other manifestations of human herpesvirus 8. J Am Acad Dermatol 47: 641-55

⁵⁷ Hengge UR e col (2002): Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 2: pathogenesis, Castlemans disease, and pleural effusion lymphoma. Lancet Infect Dis 2: 344-52

⁵⁸ Berneman ZN e col (1998): Absence of a directly causative role for human herpesvirus 7 in human lymphoma and a review of human herpesvirus 6 in human malignancy. Ann Hematol 77: 275-8

⁵⁹ Harkins L e col (2002): Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. Lancet. 360:1557-63

⁶⁰ Hara Y e col (1997): Effect of herpes simplex virus on the DNA of human papillomavirus 18. J Med Virol 53:4-12

⁶¹ Seydel J e col (2003): Helicobacter pylori and carcinogenesis of gastric B-cell lymphomas. Int J Cancer.104: 646-9

⁶² Cerroni L e col (1997): Infection by Borrelia burgdorferi and cutaneous B-cell lymphoma. J Cutan Pathol 24: 457-61

⁶³ Goodlad JR e col (2000): Borrelia burgdorferi-associated cutaneous marginal zone lymphoma: a clinicopathological study of two cases illustrating the temporal progression of B. burgdorferi-associated B-cell proliferation in the skin. Histopathology 37: 501-8

⁶⁴ Slater DN (2001): Borrelia burgdorferi-associated primary cutaneous B-cell lymphoma. Histopathology 38: 73-7

características histológicas agressivas), alguns dos quais regridem após antibioterapia.^{65,66}

Nas DLP-T o modelo equivalente é muito provavelmente o chamado linfoma T intestinal associado a enteropatia. Não existindo documentação formal entre este tipo de linfoma e infecção, existe, no entanto uma relação muito estreita com quadros de enteropatia crónica.

1.1.4.2. (Super) antigénios

A relação entre a estimulação antigénica crónica e a génese de DLP tem a sua expressão máxima nos linfomas B de zona marginal, em particular naqueles com origem na pele e nas mucosas, pela proximidade deste tecido linfóide com as superfícies de fronteira com o mundo exterior. Neste modelo de linfomagénesis e por tudo o que atrás foi dito, são inúmeras as evidências de que na origem deste tipo de DLP esteja a inflamação crónica relacionada com a infecção ou com outro estímulo antigénico,⁶⁷ capaz de induzir a proliferação persistente das células linfóides, ocasionando mutações somáticas sucessivas^{68,69,70} e DLP com grande heterogeneidade intra-clonal.⁷¹

A propósito da estimulação crónica dos linfócitos induzida pela infecção, importa aqui

⁶⁵ Bayerdorffer E e col (1995): Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. *Lancet*. 345: 1591-4

⁶⁶ Roggero E, et al (2000): Eradication of *Borrelia burgdorferi* infection in primary marginal zone B-cell lymphoma of the skin. *Hum Pathol* 31: 263-8

⁶⁷ Hashimoto T e col (2001): Superantigens and autoantigens may be involved in the pathogenesis of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Int J Hematol* 74: 197-204

⁶⁸ Bahler DW e col (1997): Ongoing Ig gene hypermutation in salivary gland mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphomas. *Blood* 89: 3335-44

⁶⁹ Thiede C e col (1998): Ongoing somatic mutations and clonal expansions after cure of *Helicobacter pylori* infection in gastric mucosa-associated lymphoid tissue B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 16: 3822-31

⁷⁰ Aarts WM e col (1998): VH gene analysis of primary cutaneous B-cell lymphomas: evidence for ongoing somatic hypermutation and isotype switching. *Blood* 92: 3857-64

referir que os microorganismos são capazes de produzir substâncias capazes de estimular o sistema imune e de induzir imunossupressão no hospedeiro.^{72,73} Surgem assim as noções de MITOGÉNIO, como substância capaz de estimular, de uma forma policlonal, uma grande fracção de linfócitos^{74,75,76} (Arala-Chaves MP e col., 1988 - Art. 1; Lima M e col., 1992 - Art. 2; Lima M e col., 1993 - Art. 3) e SUPERANTIGÉNIO (SAg),^{77,78} como proteína capaz de estimular os LT, geralmente de tipo TCR $\alpha/\text{CD4}^+$, que têm em comum a expressão de um número restrito de famílias de regiões variáveis dos genes que codificam para as cadeias do TCR, mais frequentemente para a cadeia beta (TCR-V β), através da interacção com locais específicos destas cadeias e das moléculas da classe II do Complexo Maior de Histocompatibilidade ("Major Histocompatibility Complex", MHC), distintos dos locais de ligação ao Ag.^{79,80}

O protótipo dos SAg de origem bacteriana são as toxinas estafilocócicas e estreptocócicas, envolvidas em quadros sépticos, de toxicidade alimentar e de toxicodermia causados por estas

⁷¹ Kurosu K e col (1998): Low-grade pulmonary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma with or without intraclonal variation. *Am J Respir Crit Care Med*. 158: 1613-9

⁷² Arala-Chaves M e col (1992): V-region-related and -unrelated immunosuppression accompanying infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 5: 35-41

⁷³ Arala-Chaves MP (1992): Is prophylactic immunostimulation of the host against pathogenic microbial antigens an adequate strategy of immunoprotection? *Scand J Immunol* 35: 495-500

⁷⁴ Vilanova M e col (1996): Role of monocytes in the up-regulation of the early activation marker CD69 on B and T murine lymphocytes induced by microbial mitogens. *Scand J Immunol* 43: 155-63

⁷⁵ Ferreira P e col (1997): Purification, and biochemical and biological characterization of an immunosuppressive and lymphocyte mitogenic protein secreted by *Streptococcus sobrinus*. *Int Immunol* 9: 1735-43

⁷⁶ Tavares D e col (1993): Immunological activities of a *Candida albicans* protein, which plays an important role in the survival of the microorganism in the host. *Infect Immun* 61: 1881-8

⁷⁷ Llewelyn M e col (2002): Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect Dis* 2: 156-62

⁷⁸ Huber BT (1995): The role of superantigens in virus infection. *J Clin Immunol* 15: 22S-5S

⁷⁹ Hong SC e col (1996): Different superantigens interact with distinct sites in the V β domain of a single T cell receptor. *J Exp Med* 183: 1437-46

⁸⁰ Petersson K e col (2003): Staphylococcal enterotoxin h induces valpha-specific expansion of T cells. *J Immunol* 170: 4148-54

bactérias, relacionados com a libertação explosiva de citocinas e outros mediadores celulares, quer directamente pelos LT activados, quer indirectamente, por acção sobre outras células como os macrófagos.⁸¹

O exemplo clássico de SAg de origem vírica é o relacionado com a infecção pelo retrovírus exógeno do tumor mamário do rato (“Mouse Mammary Tumor Virus”, MMTV),⁸² capaz de infectar os LB e de induzir, à superfície dos mesmos, SAg capazes de estimular os LT.

A produção de SAg pode também estar relacionada com retrovírus endógenos que existem integrados no ADN genómico na forma de provírus.⁸³ No rato temos, entre outros, a forma endógena do MMTV; no Homem, o exemplo mais típico é provavelmente o retrovírus endógeno humano K (“Human Endogenous RetroVirus K”, HERV-K), também ele com material genético capaz de codificar para SAg.^{84, 85}

A tentativa de encontrar SAg relacionados com vírus linfotrópicos para as células humanas e envolvidos na génese de DLP foi bem sucedida para o EBV,⁸⁶ mas mal sucedida para o HTLV-I.⁸⁷

1.1.4.3. Alterações genéticas

As alterações cromossómicas têm um papel importante na etiopatogenia das DLP,⁸⁸ na medida em que podem condicionar a hiperexpressão ou sub-expressão de proteínas normais ou determinar a formação de novas proteínas resultantes da fusão de genes e que normalmente não existem nas células. Em qualquer um dos casos, as proteínas envolvidas têm geralmente importantes funções reguladoras da apoptose e/ou do ciclo celular.

A hiper-expressão de oncoproteínas resulta geralmente da translocação do gene responsável pela sua síntese para junto dos genes que codificam para a síntese das Igs ou do TCR, ficando sob acção do seu promotor; mais raramente, estão envolvidos outros genes.⁸⁹

No caso das DLP-B, são exemplos de hiper-expressão de oncoproteínas, a hiper-expressão de bcl1/ciclina D1 resultante da translocação t(11;14) nos linfomas B do manto,⁹⁰ a hiper-expressão de bcl2 resultante da translocação t(14;18) nos linfomas B foliculares,⁹¹ a hiper-expressão de bcl10 resultante da translocação t(1;14) nos linfomas B associados às mucosas⁹² e a hiper-expressão de bcl6 resultante de várias translocações nos linfomas B de grandes células.⁹³ Ainda no caso das DLP-B é exemplo de proteína de fusão a proteína API2/MALT1,

⁸¹ Alouf JE e col (2003): Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int J Med Microbiol* 292: 429-40

⁸² Maillard I e col (1996): A V beta 4-specific superantigen encoded by a new exogenous mouse mammary tumor virus. *Eur J Immunol* 26:1000-6

⁸³ Lower R e col (1996): The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5177-84

⁸⁴ Barbulescu M e col (1999): Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Current Biology* 9: 861-868

⁸⁵ Mayer J e col (2002): The human endogenous retrovirus family HERV/K (HML-3). *Genomics* 80: 331-43

⁸⁶ Sutkowski N e col (1996): An Epstein-Barr virus-associated superantigen. *J Exp Med* 184: 971-80

⁸⁷ Ohshima K e col (1996): Random suppression of T cells that bear specific T cell receptor V beta sequences in adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL) patients at each clinical stage: carrier, smoldering, chronic, and acute. *Am J Hematol* 52:1-7

⁸⁸ Seto M (2002): Molecular mechanisms of lymphomagenesis through transcriptional dysregulation by chromosome translocation. *Int J Hematol* 76 (Supl 1): 323-6

⁸⁹ Ueda C e col (2002): Non-immunoglobulin/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma: prognostic implications. *Leuk Lymphoma* 43:1375-81

⁹⁰ Au WY e col (2002): Cytogenetic analysis in mantle cell lymphoma: a review of 214 cases. *Leuk Lymphoma* 43: 783-91

⁹¹ Stamatopoulos K e col (2000): Molecular insights into the immunopathogenesis of follicular lymphoma. *Immunol Today* 21: 298-305

⁹² Dierlamm J e col (2000): Genetic abnormalities in marginal zone B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* 18: 1-13

⁹³ Kramer MH e col (1998): Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 92: 3152-62

resultante da translocação t(11;18) observada nos linfomas B associados às mucosas.⁹⁴

As alterações cromossômicas/moleculares associadas às DLP-T são menos conhecidas e muito complexas.⁹⁵ Apesar de tudo, foram descritas anomalias cromossômicas recorrentes associadas ao linfoma hepato-esplênico / – isocromossoma 7q –,⁹⁶ ao linfoma angioimunoblástico – trissomias 3 e 5 –,⁹⁷ ao linfoma T anaplástico – t(2;5) –⁹⁸ e ao linfoma T intestinal associado a enteropatia – ganhos de material genético ao nível do cromossoma 9q –.⁹⁹ As alterações cromossômicas encontradas nos linfomas T periféricos¹⁰⁰ – incluindo o SS¹⁰¹ – e nos linfomas NK¹⁰² são complexas e muito variadas. Em alguns casos são já conhecidos os genes e as oncoproteínas envolvidas, como por exemplo a proteína de fusão NPM/ALK num subgrupo de linfomas T anaplásticos,¹⁰³ mas, de uma forma geral, o conhecimento nesta área é incomparavelmente inferior ao existente nas DLP-B.

⁹⁴ Streubel B e col (2003): T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood* 101: 2335-9

⁹⁵ Willis TG e col (1999): Bcl-10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of Malt B-cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* 96: 35-45

⁹⁶ Wlodarska I e col (2002): Fluorescence in situ hybridization study of chromosome 7 aberrations in hepatosplenic T-cell lymphoma: isochromosome 7q as a common abnormality accumulating in forms with features of cytologic progression. *Genes Chromosomes Cancer* 33: 243-51

⁹⁷ Kaneko Y e col (1988): Characteristic karyotypic pattern in T-cell lymphoproliferative disorders with reactive "angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia-type" features. *Blood* 72: 413-21

⁹⁸ Sarris AH e col. (1996): Amplification of genomic DNA demonstrates the presence of the t(2;5) (p23;q35) in anaplastic large cell lymphoma, but not in other non-Hodgkin's lymphomas, Hodgkin's disease, or lymphomatoid papulosis. *Blood* 88: 1771-9

⁹⁹ Zettl A. e col (2002): Chromosomal gains at 9q characterize enteropathy-type T-cell lymphoma. *Am J Pathol* 161: 1635-45

¹⁰⁰ Lepretre S e col (2000): Chromosome abnormalities in peripheral T-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 117: 71-9

¹⁰¹ Mao X e col (2003): Molecular cytogenetic characterization of Sezary syndrome. *Genes Chromosomes. Cancer* 36: 250-60

¹⁰² Wong KF e col (1999): Cytogenetic abnormalities in natural killer cell lymphoma/leukaemia--is there a consistent pattern? *Leuk Lymphoma* 4: 241-50

¹⁰³ Simonitsch I e col (1996): NPM/ALK gene fusion transcripts identify a distinct subgroup of null type Ki-1 positive anaplastic large cell lymphomas. *Br J Haematol* 92: 866-71

1.1.4.4. Desregulação da apoptose e proliferação celular

As consequências últimas das alterações cromossômicas / moleculares que conferem vantagem à célula neoplásica são a inibição da apoptose, a indução da proliferação celular ou ambas.

1.1.4.4.a) Inibição da apoptose

Sabe-se hoje que na origem imediata de muitas DLP está a FALÊNCIA DOS MECANISMOS QUE REGULAM A MORTE PROGRAMADA das células linfóides, que, conseqüentemente, se "acumulam". Estes mecanismos são extremamente complexos e o bloqueio da apoptose, que pode ocorrer por vários motivos,¹⁰⁴ está geralmente subjacente à gênese de DLPC com comportamento clínico indolente.

A desregulação pós-transcricional de genes supressores da apoptose provoca a sua hiper-expressão em circunstâncias em que normalmente deviam estar reprimidos. O exemplo mais ilustrativo é a desregulação da expressão de bcl2 nos linfomas foliculares: as células B dos centros foliculares reprimem o gene bcl2, pelo que são susceptíveis de entrar em apoptose, mas os linfomas B foliculares hiper-exprimem esta proteína em consequência da translocação t(14;18), com conseqüente supressão da morte celular.¹⁰⁵ A hiper-expressão de bcl2 pode ocorrer em numerosas DLP em consequência de outros mecanismos (*Lima M e col., 1997 - Art. 8*).

¹⁰⁴ Rossi D e col (2003): Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica* 88: 212-8

¹⁰⁵ Korsmeyer SJ (1999): BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 59: 1693s-1700s

Proteínas de fusão resultantes de translocações cromossômicas associadas às DLP podem ter também importantes funções inibidoras da apoptose, como é o caso da proteína API2/MALT1 nos linfomas B associados às mucosas.¹⁰⁶

1.1.4.4.b) Indução da proliferação celular

Em algumas DLP existe um AUMENTO DA CAPACIDADE PROLIFERATIVA da célula linfóide neoplásica, como resultado da alteração da expressão de oncogenes com funções reguladoras do ciclo celular.¹⁰⁷ Quando tal acontece, as DLP têm geralmente um comportamento mais agressivo. É exemplo o linfoma B do manto cujas células entram em divisão por exprimirem ciclina D1, ao contrário das células B normais do manto folicular, que são mantidas fora do ciclo celular por repressão deste gene.

1.1.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

1.5.1.1. Manifestações neoplásicas

As manifestações mais óbvias das DLP, e também as mais amplamente conhecidas por causarem com mais frequência problemas clínicos, são as MANIFESTAÇÕES NEOPLÁSICAS, isto é, aquelas que resultam directamente da infiltração de órgãos ou de tecidos – adenomegalias, esplenomegalia e hepatomegalia – do SP – linfocitose – e da MO, com ocupação de espaço e consequente falência da hematopoiese normal – citopenias.

¹⁰⁶ Stoffel A e col (2001): The API2/MALT1 fusion product may lead to germinal center B cell lymphomas by suppression of apoptosis. *Hum Hered* 51: 1-7

¹⁰⁷ Sanchez-Beato M e col (2003): Cell cycle deregulation in Bcell lymphomas. *Blood* 101: 1220-35

1.5.1.2. Manifestações paraneoplásicas

Para além das manifestações neoplásicas, existem outras que, não resultando da infiltração directa dos órgãos e tecidos pelas células neoplásicas, têm relação com a sua actividade funcional e com a sua interacção com o meio envolvente: são as manifestações PARANEOPLÁSICAS.¹⁰⁸

As DLP-T e NK são particularmente ricas em manifestações paraneoplásicas, provavelmente pelas importantes funções imunoreguladoras destas células, com produção de uma vasta gama de citocinas e de outros mediadores celulares.

As manifestações paraneoplásicas, podem acompanhar o diagnóstico da neoplasia linfóide, precedê-lo ou suceder-lhe e, pela sua exuberância, podem, em alguns casos, desviar os olhares menos atentos e mascarar o diagnóstico ou impor diagnósticos diferenciais com outras patologias (Lima M e col., 2001 - Art. 14; Granjo E e col., 2002 - Art. 18; Lima M e col., 2002 - Art. 19; Granjo E e col., 2002 - Art. 20; Granjo E e col., 2002 - Art. 22; Lima M e col., 2003 - Art. 31). Consistem em fenómenos disimunitários, citopenias, artrite, vasculite,¹⁰⁹ eosinofilia e hiper-IgE,¹¹⁰ síndromes hemofagocíticas,¹¹¹ eritrocitose,¹¹² hipercalcemia,¹¹³ alterações endócrinas¹¹⁴ e manifestações cutâneas de natureza vária,¹¹⁵ entre outros.¹¹⁶

¹⁰⁸ Nador RG e col (2003): Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Associated Polymorphic Lymphoproliferative Disorders. *Am J Surg Pathol* 27: 293-302

¹⁰⁹ Hamidou MA e col (2001): Systemic antineutrophil cytoplasmic antibody vasculitis associated with lymphoid neoplasia. *Ann Rheum Dis* 60:293-5

¹¹⁰ Roufosse F e col (2000): Clonal Th2 lymphocytes in patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Br J Haematol* 109: 540-8

¹¹¹ Allory Y e col (2001): Bone marrow involvement in lymphomas with hemophagocytic syndrome at presentation: a clinicopathologic study of 11 patients in a Western institution. *Am J Surg Pathol* 25: 865-74

¹¹² Kurchan A e col (1991): T lymphoma of immature phenotype associated with polycythemia vera. *Medicina* 51: 151-4

¹¹³ Obagi S e col (1999): Hypercalcemia and parathyroid hormone related protein expression in cutaneous T-cell lymphoma. *Int J Dermatol* 38: 855-62

1.1.6. CLASSIFICAÇÕES

A classificação das DLP tem merecido muitas propostas ao longo dos anos.^{117, 118, 119, 120, 121}

A tendência actual caminha no sentido do diagnóstico integrado em que as manifestações clínicas e os resultados dos estudos citomorfológicos, histopatológicos, genéticos e fenotípicos se conjugam para definir entidades biologicamente distintas.

Este esforço inovador de abordagem multidisciplinar do estudo das DLP foi iniciado em 1994 pela classificação REAL¹¹⁹ (“Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasms”) e reforçado em 1999 pelas classificações da Organização Mundial de Saúde (OMS)¹²⁰ e, no caso específico dos linfomas cutâneos, da Organização Europeia para Investigação e Tratamento do Cancro¹²⁰ (“European Organization for Research and Treatment of Cancer”, EORTC). Estas classificações encontram-se resumidas na **Tabela 1**.

¹¹⁴ Dhodapkar MV e col (1994) T-cell large granular lymphocytic leukemia and pure red cell aplasia in a patient with type I autoimmune polyendocrinopathy: response to immunosuppressive therapy. Mayo Clin Proc 69: 1085-8

¹¹⁵ De Saint Paul G e col (2002): Cutaneous T-cell lymphoma, cutaneous hyperpigmentation and paraneoplastic pemphigus] Ann Dermatol Venereol 129: 896-900

¹¹⁶ Diez-Martin JL e col (1991): Unusual presentation of extranodal peripheral T-cell lymphomas with multiple paraneoplastic features. Cancer 68: 834-41

¹¹⁷ The non-Hodgkin's lymphoma classification project (1982) National cancer institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage Cancer 49: 2112-35

¹¹⁸ Sansfeld A.G et al (1983): Updated Kiel classification for lymphomas. Lancet 1: 292-3

¹¹⁹ Harris NL e col (1994): A revised european-american classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international lymphoma study group. Blood 84: 1361-92

¹²⁰ Harris N e col (1999): World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting –Airlie House, Virginia, November 1997. J Clin Oncol 17: 3835-49

¹²¹ Willemze R (1999): EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: the best guide to good clinical management. Am J Dermatopathol 21: 265-73

Tabela 1

Propostas actuais para a classificação das neoplasias de células T e NK maduras.

CLASSIFICAÇÃO REAL (1994)¹¹⁹
<ul style="list-style-type: none">Leucemia linfocítica crónica e prolinfocítica TLeucemias de linfócitos grandes granulares T/NKMicose fungóide / Síndrome de SezaryLinfomas de células T periféricas, não especificados<ul style="list-style-type: none">Categorias citológicas provisórias: células pequenas, médias e grandes ou grandes; linfopitelióide.Entidades provisórias:<ul style="list-style-type: none">Linfoma T hepato-esplénico gama-deltaLinfoma T subcutâneo “paniculite-like”Linfomas de células T periféricas, variantes específicas<ul style="list-style-type: none">Linfoma T angioimunoblásticoLinfoma angiocêntricoLinfoma T intestinal +/- enteropatiaLinfoma/leucemia de células T do adultoLinfoma anaplásico de células grandes CD30 (+) (T ou nulo)<ul style="list-style-type: none">Entidade provisória: Linfoma anaplásico de células grandes “Hodgkin-like”
CLASSIFICAÇÃO DA OMS (1999)¹²⁰
<ul style="list-style-type: none">Leucemia linfocítica crónica e prolinfocítica TLeucemias de linfócitos grandes granulares TMicose fungóide / Síndrome de SezaryLinfomas de células T periféricas, não especificadoLinfoma T hepato-esplénico gama-deltaLinfoma T subcutâneo “paniculite-like”Linfoma T angioimunoblásticoLinfoma extra-nodal T ou NK, tipo nasalLinfoma T intestinal, tipo enteropatiaLinfoma/leucemia de células T do adulto (HTLV+)Linfoma anaplásico de células grandes sistémicoLinfoma anaplásico de células grandes primitivo da peleLeucemia agressiva de células NK
CLASSIFICAÇÃO DA EORTC (Linfomas T cutâneos) (1999)¹²¹
Comportamento clínico indolente: <ul style="list-style-type: none">Micose fungóideVariantes de Micose Fungóide (Folicular, Reticulose pagetóide)Linfoma T cutâneo de células grandes CD30 (+) Comportamento clínico agressivo <ul style="list-style-type: none">Síndrome de SezaryLinfoma T cutâneo de células grandes CD30 (-) (imunoblástico e pleomórfico de células grandes) Entidades provisórias <ul style="list-style-type: none">Linfoma T cutâneo pleomórfico de células pequenasLinfoma T cutâneo “paniculite-like”

Apesar de, no seu conjunto, estas propostas terem dado um enorme contributo para a classificação das DLP, as DLP-T e NK são muito heterogéneas e a sua classificação continua a ser insatisfatória.^{122,123,124}

Entre as várias DLPC-T e NK, três grupos merecem uma descrição mais detalhada pelo facto de serem abordados em mais profundidade neste trabalho: nas neoplasias de CNK, as DLP de linfócitos grandes granulares (“Large Granular Lymphocytes”, LGL) NK; nas neoplasias T, as DLP de LGL-T e os linfomas T cutâneos, em particular o Síndrome de Sezary (SS).

1.1.6.1. Doenças linfoproliferativas NK

Foram descritos vários tipos de DLP-NK, com espectro clínico variável, desde formas indolentes até formas muito agressivas que conduzem à evolução inexorável para a morte, independentemente da atitude terapêutica.

As formas clinicamente agressivas predominam nos países asiáticos, associam-se à infecção por EBV e apresentam frequentemente envolvimento extra-ganglionar e síndrome hemofagocítica,^{125,126} embora também possam ocorrer de forma esporádica na Europa e nos Estados Unidos (*Lima M e col, 2001 - Art. 15*). Estas neoplasias têm sido divididas em dois grandes grupos – linfoma NK nasal e “tipo-nasal” – de acordo com a sua localização primária.

ria.^{127,128,129,130,131} Um tipo particularmente agressivo, com evolução fulminante, tem sido designado como “leucemia/linfoma agressivo de células NK”.¹³²

1.1.6.1.a) Doenças linfoproliferativas crónicas de linfócitos grandes granulares NK

As formas indolentes são usualmente designadas por linfocitoses crónicas de CNK ou por DLPC de LGL-NK. Tais denominações têm sido preferidas à designação de leucemias de LGL-NK pelo facto de ser muito difícil a demonstração de (mono) clonalidade e o seu diagnóstico diferencial com as linfocitoses NK associadas a numerosas condições patológicas,^{133,134,135,136,137} em que as CNK representam, presumivelmente, um esforço de resposta anti-tumoral ou anti-vírica, mediado pela sua actividade citotóxica e/ou pela libertação de mediadores solúveis.^{138,139} Assim, as séries de

¹²² Greer JP e col (2001): T cell and NK cell lymphoproliferative disorders. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*: 259-81.

¹²³ Kluin PM e col (2001): Peripheral T/NK-cell lymphoma: a report of the IXth Workshop of the European Association for Haematopathology. *Histopathology* 38: 250-70

¹²⁴ Santucci M e col (2003): Cytotoxic/natural killer cell cutaneous lymphomas. Report of EORTC Cutaneous Lymphoma Task Force Workshop *Cancer* 97: 610-27

¹²⁵ Oshimi K (1996): Lymphoproliferative disorders of natural killer cells. *Int. J. Hematol* 63: 279-90

¹²⁶ Jaffe ES e col (1996): Report of the workshop on nasal and related extranodal angiocentric T/Natural Killer cell lymphomas. Definitions, differential diagnosis and epidemiology *Am J Surg Pathol* 20: 103-11

¹²⁷ Saito T (1995): Primary nasopharyngeal lymphoma with CD3- and CD56+ phenotype. *Rinsho Ketsueki* 36: 12-7

¹²⁸ Chan JK e col (1997): Nonnasal lymphoma expressing the natural killer cell marker CD56: a clinicopathologic study of 49 cases of an uncommon aggressive neoplasm. *Blood* 89: 4501-13

¹²⁹ van Gorp J e col (1995): Nasal T-cell lymphoma: a clinicopathological and immunophenotypic analysis of 13 cases. *Histopathology* 27: 139-48

¹³⁰ Jaffe ES e col (1996): Report of the Workshop on Nasal and Related Extranodal Angiocentric T/Natural Killer Cell Lymphomas. Definitions, differential diagnosis, and epidemiology *Am J Surg Pathol* 20: 103-11

¹³¹ Harabuchi Y e col (1996): Nasal T-cell lymphoma causally associated with Epstein Barr virus: clinicopathologic, phenotypic and genotypic studies. *Cancer* 77: 2137-49

¹³² Imamura N e col (1990): Aggressive natural-killer cell leukaemia lymphoma: report of four cases and review of the literature. Possible existence of a new clinical entity originating from the third lineage of lymphoid cells. *Br J Haematol* 75: 49-59

¹³³ Okuno SH e col (1996): Spectrum of diseases associated with increased proportions or absolute numbers of peripheral blood natural killer cells. *Br J Haematol* 93: 810-2

¹³⁴ Vargas JA e col (1996): Natural killer cell proliferation and renal disease: a functional and phenotypic study. *Cytometry* 26: 125-30

¹³⁵ Dekoninck A. e col (2000): Natural killer (NK) cell leukaemia in a patient with a B cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Lab Haematol* 22: 115-7

¹³⁶ Kaito K e col (1990): Severe aplastic anemia associated with chronic natural killer cell lymphocytosis. *Int J Hematol* 72: 463-5

¹³⁷ Garcia-Sanz R e col (1996): Analysis of natural killer-associated antigens in peripheral blood and bone marrow of multiple myeloma patients and prognostic implications. *Br J Haematol* 93: 81-8

¹³⁸ Lanier LL (2000): The origin and functions of natural killer cells. *Clin. Immunol* 95: 14-18

¹³⁹ Miller JS (2002): Biology of natural killer cells in cancer and infection. *Cancer Invest* 20: 405-19

DLP de LGL-NK publicadas até à data incluem muito provavelmente casos policlonais e casos monoclonais, linfocitoses reactivas e outras leucémicas,^{140,141,142,143,144} e até mesmo casos de linfomas NK leucemizados com comportamento agressivo.^{145,146,147}

As manifestações clínicas associadas às DLPC de LGL-NK são muito pouco claras. Estudos prévios sugerem associação com citopenias, vasculite, febre de causa desconhecida e granulomas não caseosos da MO.^{148,149,150,151}

Desta forma, até agora as leucemias crónicas de LGL-NK não têm sido reconhecidas como uma entidade independente: na classificação REAL, elas são mencionadas em conjunto com as leucemias de LGL-T; na classificação da OMS, não constam.

1.1.6.2. Doenças linfoproliferativas T

Sob esta designação incluem-se várias neoplasias T, entre as quais as leucemias linfocítica e prolinfocítica T, as leucemias de LGL-T, os linfomas T periféricos ditos “não especificados” – incluindo aqueles de apresentação prima-

riamente cutânea, como a Míose Fungóide (MF) e o SS – e outros mais raras como os linfomas T subcutâneo “paniculite-like”, hepato-esplénico / , associado a enteropatia intestinal, de tipo angioimunoblástico e anaplásico, entre outros.

1.1.6.2.a) Doenças linfoproliferativas crónicas de linfócitos grandes granulares T

As DLPC de LGL-T são como o próprio nome indica expansões persistentes de LT com as características morfológicas que o próprio nome define (linfócitos grandes com grânulos azurófilos no citoplasma).

Estas DLPC têm sido classificadas como de natureza primária ou secundária – dependendo da identificação de uma condição associada – e de “policlonais” ou monoclonais – dependendo da demonstração de um marcador de (mono) clonalidade, assumindo, neste último caso, a designação de leucemias crónicas de LGL-T.^{152,153}

Crítérios que foram utilizados no passado para distinguir as proliferações reactivas das proliferações neoplásicas de LGL-T, tais como a magnitude da linfocitose e o seu carácter persistente, a presença de condições associadas e o seu comportamento clínico não podem ser utilizados. Isto porque as leucemias de LGL se associam frequentemente com outras patologias e porque as expansões reactivas (leia-se “não-monoclonais”) de LGL podem persistir por longos períodos de tempo.¹⁵⁴ Desta forma, o diagnóstico de uma leucemia crónica de LGL

¹⁴⁰ Tefferi A (1994): Chronic natural killer cell lymphocytosis: a descriptive clinical study. *Blood* 84: 2721-5

¹⁴¹ Tefferi A. e col (1996): Fever of unknown origin associated with chronic natural killer cell lymphocytosis. *Am J Hematol* 53:56

¹⁴² Jaffe ES (1996): Classification of natural killer (NK) cell and NK-like T cell malignancies. *Blood* 87: 1207-10

¹⁴³ Lamy T (1999): Current concepts: large granular lymphocyte leukemia. *Blood Rev* 13: 230-40

¹⁴⁴ Morice W e col (2001): Natural killer cells and the syndrome of chronic natural killer cell lymphocytosis. *Leuk Lymphoma* 41: 277-84

¹⁴⁵ Chan WC e col (1992): Large granular lymphocyte proliferation with the natural killer-cell phenotype. *Am J Clin Pathol* 97: 353-8

¹⁴⁶ Gelb AB e col (1994): Epstein-Barr virus-associated natural killer-large granular lymphocyte leukemia. *Hum Pathol* 25: 953-60

¹⁴⁷ Nichols GE e col (1994): Lymphoproliferative disorder of granular lymphocytes: nine cases including one with features of CD56 (NKH1)-positive aggressive natural killer cell lymphoma. *Mod Pathol* 7: 819-24

¹⁴⁸ Tefferi A (1994): Chronic natural killer cell lymphocytosis: a descriptive clinical study. *Blood* 84: 2721-5

¹⁴⁹ Tefferi A. e col (1996): Fever of unknown origin associated with chronic natural killer cell lymphocytosis. *Am J Hematol* 53:56

¹⁵⁰ Tefferi A (1996): Chronic natural killer cell lymphocytosis. *Leuk. Lymphoma* 20: 245-8

¹⁵¹ Sivakumaran M e col (1996): Clinical and laboratory characteristics of chronic natural killer cell lymphocytosis. *Blood* 87: 1659-60

¹⁵² Scott CS e col (1992): Classification of large granular lymphocyte (LGL) and NK-associated (NKA) disorders. *Blood Rev* 6:220-33

¹⁵³ Loughran TP Jr (1993): Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood* 82: 1-14

¹⁵⁴ Scott CS e col (1993): Transient and persistent expansions of large granular lymphocytes (LGL) and NK-associated (NKA) cells: the Yorkshire Leukemia Group study. *Br J Haematol* 83: 505-15

depende sempre, em última análise, da demonstração de um marcador fenotípico ou genotípico (molecular/cromossómico) de (mono) clonalidade.¹⁵⁵

A maioria das leucemias crónicas de LGL-T tem origem nos LT TCR⁺/CD8⁺ e as características clínico-biológicas das leucemias TCR⁺/CD8⁺ são actualmente bem conhecidas.^{156,157} Na maioria dos casos têm um comportamento clínico indolente, embora tenham sido descritos casos raros com evolução agressiva. Caracterizam-se geralmente por uma linfocitose moderada devida à expansão destes linfócitos, por vezes com esplenomegalia associada. Os doentes com leucemias de LGL TCR⁺/CD8⁺ apresentam frequentemente citopenias – geralmente neutropenia e, mais raramente anemia ou trombocitopenia – que, de uma forma geral, respondem favoravelmente à terapêutica imunossupressora (Coutinho J e col., 1998 – Art.11; Granjo E e col. 2002 – Art.18; Granjo E e col., 2002 – Art.22).^{158,159} São também frequentes as infecções e as alterações da imunidade humoral,¹⁶⁰ e existe associação com doenças autoimunes, em particular artrite reumatóide (Granjo E e col., 2002 – Art.22).^{161,162} Embora os

mecanismos envolvidos na gênese das citopenias associadas às DLP de LGL-T TCR⁺/CD8⁺ não sejam ainda completamente conhecidos, foi documentado o efeito supressor dos LGL-T TCR⁺/CD8⁺ sobre a granulopoiese¹⁶³ e existem evidências de uma alteração da via reguladora da apoptose mediada pela interacção do Fas com o ligando do Fas (FasL).^{164,165,166} Este último distúrbio parece contribuir para a gênese da neutropenia associada a estas doenças, através da promoção da apoptose nos neutrófilos¹⁶⁷ e dos fenómenos de autoimunidade observados nestes doentes.¹⁶⁸

Não são conhecidas as alterações moleculares / citogenéticas implicadas na gênese destas DLP, embora tenham sido descritas alterações cromossómicas em alguns casos de leucemias de LGL-T TCR⁺/CD8⁺.^{169,170}

Embora seja reconhecida a existência de outras DLPC de LGL-T que não as originadas em LT TCR⁺/CD8⁺, tais como casos com origem em LT TCR⁺/CD4⁺,^{171,172,173,174}

¹⁵⁵ Semenzato G e col (1997): The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. *Blood* 89: 256-60

¹⁵⁶ Loughran TP Jr (1993): Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood* 82: 1-14

¹⁵⁷ Lamy T (1999): Current concepts: large granular lymphocyte leukemia. *Blood Rev* 13: 230-40

¹⁵⁸ Hamidou MA e col (2000): Low-dose methotrexate for the treatment of patients with large granular lymphocyte leukemia associated with rheumatoid arthritis. *Am J Med* 108: 730-2

¹⁵⁹ Sood R e col (1998): Neutropenia associated with T-cell large granular lymphocyte leukemia: long-term response to cyclosporine therapy despite persistence of abnormal cells. *Blood* 91: 3372-8

¹⁶⁰ Gentile TC e col (1996): Humoral immune abnormalities in T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Leuk Lymphoma* 23: 365-70

¹⁶¹ Dhodapkar MV e col (1994): T-cell large granular lymphocytic leukemia and pure red cell aplasia in a patient with type I autoimmune polyendocrinopathy: response to immunosuppressive therapy. *Mayo Clin Proc* 69: 1085-8

¹⁶² Kouides PA e col (1995): Large granular lymphocyte leukemia presenting with both megakaryocytic thrombocytopenic purpura and pure red cell aplasia: clinical course and response to immunosuppressive therapy. *Am J Hematol* 49: 232-6

¹⁶³ Coakley G e col (2000): CD8⁺, CD57⁺ T cells from healthy elderly subjects suppress neutrophil development in vitro: implications for the neutropenia of Felty's and large granular lymphocyte syndromes. *Arthritis Rheum* 43: 834-43

¹⁶⁴ Lamy T e col (1998): Dysregulation of CD95/CD95 ligand-apoptotic pathway in CD3(+) large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 92: 4771-7

¹⁶⁵ Saitoh T e col (2000): Improvement of extrathymic T cell type of large granular lymphocyte (LGL) leukemia by cyclosporin A: the serum level of Fas ligand is a marker of LGL leukemia activity. *Eur J Haematol* 65: 272-5

¹⁶⁶ Liu JH e col (2002): Blockade of Fas-dependent apoptosis by soluble Fas in LGL leukemia. *Blood* 100: 1449-53

¹⁶⁷ Liu JH e col (2000): Chronic neutropenia mediated by fas ligand. *Blood* 95: 3219-22

¹⁶⁸ Suda T e col (1997): Why do defects in the Fas-Fas ligand system cause autoimmunity? *J Allergy Clin Immunol* 100: S97-101.

¹⁶⁹ Man C e col (2002): Deletion 6q as a recurrent chromosomal aberration in T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 139: 71-4

¹⁷⁰ Wong KF e col (2002): Chromosomal abnormalities in T-cell large granular lymphocyte leukaemia: report of two cases and review of the literature. *Br J Haematol* 116: 598-600

¹⁷¹ Richards SJ e col (1992): A distinct large granular lymphocytic (LGL)/NK-associated (NKa) abnormality characterized by membrane CD4 and CD8 coexpression. *Br J Haematol* 82: 494-501

¹⁷² de Toter D e col (1992): Heterogeneous immunophenotype of large granular lymphocyte expansions: differential expression of the CD8a and CD8b chains. *Blood* 80: 1765-73

¹⁷³ Sala P e col (1993): Persistent expansions of CD4⁺CD8⁺ peripheral blood T-cells. *Blood* 82: 1546-52

TCR⁺,^{175,176,177} ou ainda mais raramente em LT TCR⁺/CD4⁻/CD8^{-/+débil},¹⁷⁸ pouco ou nada se sabe sobre as suas características clínico-biológicas.

No que diz respeito às DLPC de LGL-T TCR⁺, foram descritos casos associados a infecções víricas¹⁷⁹ ou bacterianas intracelulares,¹⁸⁰ neutropenia,¹⁸¹ artrite reumatóide,^{182,183} e doenças autoimunes¹⁸⁴, sugerindo que as suas manifestações possam ser semelhantes às observadas nas DLPC de LGL-T TCR⁺/CD8⁺.

Poucas referências se encontravam na literatura sobre DLPC de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ até 1992, altura em que *Richards e col.*¹⁸⁵ descreveram um grupo de doentes com aumento de LGL-T com estas características. Desde aí só foram publicados mais alguns

casos, de forma isolada.^{186,187,188} De um total de 39 casos distribuídos pelas séries publicadas, menos de metade (15 casos) eram monoclonais, com base em estudos moleculares do rearranjo do TCR e as características clínico-biológicas deste tipo particular de DLPC continuam por esclarecer.

Assim, nas classificações mais recentes, as leucemias crónicas de LGL-T têm sido consideradas como uma entidade única, não sendo atribuído nenhum relevo à sua classificação conforme o tipo de célula linfóide envolvida (*ie.* LT⁺ vs. LT⁻ e LT⁺CD4⁺ vs. LT⁻CD8⁺).^{189,190}

1.1.6.2.b) Síndrome de Sezary

O SS é uma forma rara de linfoma cutâneo originalmente descrito pela coexistência de eritrodermia, adenopatias e mais de 10% de células “atípicas” – células de Sezary (CS) – no SP. Pode apresentar-se “de novo” ou surgir durante a evolução de lesões cutâneas de MF.

A forma de apresentação clínica é dominada pela eritrodermia que frequentemente se acompanha de prurido intenso e, por vezes, de febre, arrepios, perda de peso e sintomas gerais; são frequentes a formação de fissuras nas palmas das mãos e nas plantas dos pés, a alopecia, o ectropium, a distrofia das unhas e as adenopatias.

¹⁷⁴ Tonutti E e col (1994): Phenotypic heterogeneity of persistent expansions of CD4⁺ CD8⁺ T cells. *Clin Immunol Immunopathol* 73: 312-320

¹⁷⁵ Kondo H e col (2000): CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻, TCR alpha beta-, TCR gamma delta+ granular lymphocyte proliferative disorder without lymphocytosis and clinical symptoms. *Acta Haematol* 104: 54-6

¹⁷⁶ Saito T e col (2001): Granular lymphocytic leukemia derived from gamma delta T-cell expressing cytotoxic molecules. *Leuk Res* 25: 259-61

¹⁷⁷ Makishima H e col (2003): Lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with T-cell receptor gamma delta-positive phenotype: restricted usage of T-cell receptor gamma and delta subunit genes. *Eur J Haematol* 70: 212-8

¹⁷⁸ Koyasu S e col (1994): CD3+CD16+NK1.1+B220+ large granular lymphocytes arise from both alpha-beta TCR+CD4-CD8- and gamma-delta TCR+CD4-CD8- cells. *J Exp Med* 179: 1957-72

¹⁷⁹ Horiuchi T e col (1999): Clonal expansion of gammadelta-T lymphocytes in an HTLV-I carrier, associated with chronic neutropenia and rheumatoid arthritis. *Ann Hematol* 78: 101-4

¹⁸⁰ Airo P e col (2000): Characterization of gammadelta T cells expressing CD158b, a killer cell inhibitory receptor, in a patient with chronic CD4(+) lymphocytopenia and disseminated Mycobacterium intracellulare infection. *Clin Immunol* 96: 67-75

¹⁸¹ Scott CS e col (1994): Persistent clonal expansions of CD3+TCR gamma delta+ and CD3+TCR alpha beta+CD4-CD8- lymphocytes associated with neutropenia. *Leuk Lymphoma*. 14: 429-40

¹⁸² Kuipers JG e col (1993): [Syndrome of T gamma lymphoproliferation of Fc gamma RIII- positive lymphocytes in rheumatoid arthritis] *Immun Infekt* 21 (Supl 1): 13-5

¹⁸³ Hodges E e col (1995) Arthropathy, leucopenia and recurrent infection associated with a TcR gamma delta population. *Br J Rheumatol*. 34:978-83

¹⁸⁴ Stanworth SJ e col (1996): An unusual association of Felty syndrome and TCR gamma delta lymphocytosis. *J Clin Pathol* 49: 351-3

¹⁸⁵ Richards SJ e col (1992): A distinct large granular lymphocytic (LGL) / NK-associated (NKa) abnormality characterized by membrane CD4 and CD8 coexpression. *British Journal of Haematology* 82: 494-501

¹⁸⁶ Sala P e col (1993): Persistent expansions of CD4+CD8+ peripheral blood T-cells. *Blood* 82: 1546-52

¹⁸⁷ de Toter D e col (1992): Heterogeneous immunophenotype of large granular lymphocyte expansions: differential expression of the CD8a and CD8b chains. *Blood* 80: 1765-73

¹⁸⁸ Tonutti E e col (1994): Phenotypic heterogeneity of persistent expansions of CD4⁺ CD8⁺ T cells. *Clin Immunol Immunopathol* 73: 312-20

¹⁸⁹ Harris NL e col (1994): A Revised European-American classification of Lymphoid neoplasms: a proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 84: 1361-92

¹⁹⁰ Harris N e col (1999): World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting –Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 17: 3835-49

O diagnóstico histológico baseia-se na infiltração cutânea pelas CS, caracteristicamente LT CD4⁺ “atípicos” que se acumulam na derme, frequentemente com distribuição peri-vascular, e infiltram a epiderme (epidermotropismo). Aí, estas células formam os chamados “abscessos de Pautrier” – coleções intra-epidérmicas de LT neoplásicos aderentes aos prolongamentos das células dendríticas intra-epidérmicas apresentadoras de Ag (células de Langerhans) –, característica patognomónica destes linfomas T cutâneos.

Estudos prévios demonstraram que as CS expressam o Ag associado aos linfócitos da pele (“Cutaneous Lymphocyte Antigen”, CLA), que parece actuar como receptor de “homing” selectivo dos linfócitos para a pele.^{191,192} Por outro lado, foi também demonstrado que as CS têm uma afinidade particular para os queratinócitos¹⁹³ e que produzem fundamentalmente citocinas de tipo Th2, como a IL5 e a IL10.^{194,195} Estas características dos linfócitos neoplásicos podem explicar o tropismo cutâneo destes linfomas, o facto da MO ser geralmente poupada até fases avançadas da doença,¹⁹⁶ e algumas alterações imunológicas frequentes no SS como o aumento de IgE e a eosinofilia.

Embora a eritrodermia seja uma manifestação característica do SS, ela não é de forma alguma específica pois pode ocorrer noutras dermatites benignas – fotodermatites, reacções a drogas e psoríase –¹⁹⁷ ou malignas – outros linfomas e leucemias T –¹⁹⁸. Por isso, o diagnóstico diferencial entre SS e outras entidades não pode ser estabelecido com critérios exclusivamente clínicos. Os critérios histológicos e citológicos classicamente utilizados para o diagnóstico de SS também são falíveis. Por exemplo, a detecção de infiltração da pele pelas CS, é considerada indispensável para o diagnóstico, mas as características histológicas típicas nem sempre estão presentes.^{199,200,201} Por outro lado, também há dificuldades na detecção das CS no SP, já que estas nem sempre apresentam o aspecto cerebriforme com que foram descritas e muitas vezes confundem-se com os linfócitos activados presentes em processos reactivos; dificuldades acrescidas surgem quando é baixa a percentagem das CS no SP. Desta forma, o diagnóstico de SS continua a ser problemático, principalmente nas fases iniciais da doença.

¹⁹¹ Borowitz MJ e col (1993): Abnormalities of circulating T-cell subpopulations in patients with cutaneous T-cell lymphoma: cutaneous lymphocyte-associated antigen expression on T cells correlates with extent of disease. *Leukemia* 7: 859-63

¹⁹² Fuhlbrigge RC e col (1997): Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature* 389: 978-81

¹⁹³ Bagot M e col (1996): Interleukin-7 receptor expression in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol* 135: 572-5

¹⁹⁴ Dummer R e col (1996): Sezary syndrome T-cell clones display T-helper 2 cytokines and express the accessory factor-1 (interferon-gamma receptor beta-chain). *Blood* 88: 1383-9

¹⁹⁵ Suchin KR e col (2001): Increased interleukin 5 production in eosinophilic Sezary syndrome: regulation by interferon alfa and interleukin 12. *J Am Acad Dermatol* 44: 28-32

¹⁹⁶ Salhany KE e col (1989): Marrow involvement in cutaneous T-cell lymphoma. A clinicopathologic study of 60 cases *Am J Clin Pathol* 92: 747-54

¹⁹⁷ Rothe MJ e col (2000): Erythroderma. *Dermatol Clin* 18: 405-15

¹⁹⁸ Mallett RB e col (1995): Cutaneous infiltration in T-cell prolymphocytic leukaemia. *Br. J. Dermatol.* 132: 263-6

¹⁹⁹ Shapiro PE e col (1994): The histologic spectrum of mycosis fungoides/Sezary syndrome (cutaneous T-cell lymphoma). A review of 222 biopsies, including newly described patterns and the earliest pathologic changes. *Am J Surg Pathol* 18: 645-67

²⁰⁰ Trotter MJ e col (1997): Cutaneous histopathology of Sezary syndrome: a study of 41 cases with a proven circulating T-cell clone. *J Cutan Pathol* 24: 286-91

²⁰¹ Kohler S e col (1997): Histologic criteria for the diagnosis of erythrodermic mycosis fungoides and Sezary syndrome: a critical reappraisal. *J Cutan Pathol* 24: 292-7

1.2. CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS

Nos últimos anos, a citometria de fluxo (CF) substituiu progressivamente a microscopia de fluorescência, constituindo hoje o método preferido para a identificação, caracterização e quantificação de células neoplásicas em DLP.^{202, 203}

A utilização cada vez mais alargada da CF prende-se com vantagens únicas desta tecnologia: a sua simplicidade, rapidez e capacidade de análise de um grande número de células num curto espaço de tempo; a possibilidade de avaliar a expressão antigénica de uma forma qualitativa e quantitativa; a possibilidade de uma avaliação multiparamétrica, enriquecida pelo número crescente de anticorpos monoclonais (AcMo) e de fluorocromos disponíveis.²⁰⁴

Do ponto de vista de diagnóstico, os estudos imunofenotípicos (IF) são utilizados fundamentalmente para a identificação das células linfóides neoplásicas e para a sua caracterização, esta última com interesse demonstrado na classificação das DLP.²⁰⁵ Mais recentemente, a sua utilidade tem sido alargada a outras áreas de interesse clínico que incluem o estadiamento da doença, a avaliação do prognóstico, a monitorização da doença residual

após tratamento²⁰⁶ e a selecção dos doentes para tratamentos específicos.^{207, 208}

1.2.1. IDENTIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CÉLULAS LINFÓIDES NEOPLÁSICAS

O primeiro passo para identificar uma célula linfóide neoplásica numa determinada amostra é, em princípio, a afirmação do seu carácter (mono) clonal. Isto pode ser efectuado fundamentalmente de duas formas: 1) através da demonstração directa do carácter clonal da doença, por técnicas convencionais de citogenética – anomalias cromossómicas numéricas ou estruturais – ou de biologia molecular – estudos do rearranjo dos genes que codificam para as cadeias das Igs ou do TCR (INDICADORES CLONO-GENOTÍPICOS) e/ou 2) de uma forma indirecta, pela demonstração da existência de imunofenótipos (IF) aberrantes nos linfócitos neoplásicos que estão, de forma sistemática, ausentes no linfócitos normais, por métodos imunofenotípicos como a CF.

1.2.1.1. Conceitos de imunofenótipo aberrante, indicador clono-fenotípico e perfil clono-fenotípico

O conceito de IMUNOFENÓTIPO ABERRANTE tem implícito o pressuposto de que as características IF das células linfóides

²⁰² Jennings CD e col (1997): Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 90: 2863-92

²⁰³ Stetler-Stevenson M e col (2001): Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol* 238: 2111-23

²⁰⁴ Roederer M e col (1997): 8Color, 10-Parameter Flow Cytometry to Elucidate Complex Leukocyte Heterogeneity. *Cytometry* 29: 328-39

²⁰⁵ Matutes E (1995): Contribution of immunophenotype in the diagnosis and classification of haemopoietic malignancies. *J Clin Pathol* 48: 194-7

²⁰⁶ Rawstron AC e col (2001): Quantification of minimal residual disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood* 98: 29-35

²⁰⁷ Foran JM e col (2000): European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma and small B-cell lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol* 18: 317-24

²⁰⁸ Foran JM e col (2001): Loss of CD20 expression following treatment with rituximab (chimeric monoclonal anti-CD20): a retrospective cohort analysis. *Br J Haematol* 114: 881-3

leucémicas reflectem o estado maturativo da célula linfóide que esteve na origem da DLP. Assim, no caso das DLPC, o conceito de "IF aberrante" é estabelecido por comparação com o denominado "IF normal" das células B, T ou NK maduras, em estadio equivalente de diferenciação.

Acrescem aqui algumas dificuldades que resultam do facto do sistema imune ser um sistema dinâmico e das células linfóides sofrerem modificações fenotípicas que se relacionam com a activação celular, a migração para os tecidos, etc. Desta forma, o conceito de "IF normal" tem íntima relação com múltiplos factores, entre os quais a localização tecidular e o estado de activação e de diferenciação da célula são especialmente importantes.

Diríamos, então, que o conceito de "IF aberrante" deve ser estabelecido em relação às células linfóides normais, do mesmo tipo, no mesmo estadio maturativo, com idêntica localização tecidular e no estadio de activação correspondente. Por este motivo, a identificação IF da célula linfóide neoplásica acaba por ser um processo complexo.

As "aberrações IF" não se limitam à ausência de expressão de um Ag que "deveria" ser expresso, ou, vice-versa; podem consistir apenas na diminuição/aumento da sua intensidade de expressão ou ainda na modificação do seu padrão de expressão (por exemplo, a expressão de HLA-DR nos LT maduros é considerada normal no contexto de activação celular, mas, neste caso, é sempre heterogénea, ao contrário do que acontece noutras células como os LB; uma expressão homogénea de

HLA-DR nos LT maduros é, pois, sempre aberrante).

Por outro lado, nem sempre é possível excluir que uma população de linfócitos considerada "clonal" com base no seu IF, possa apenas representar uma expansão de uma população minoritária de linfócitos normais, cujo IF é apenas "diferente do mais frequente" (por exemplo, foi durante muito tempo considerada aberrante a co-expressão de CD4 e CD8 em LT maduros, mas sabe-se actualmente que estas populações minoritárias existem no SP normal sem significado de imaturidade).

Finalmente, um IF dito "normal" não permite excluir em absoluto a possibilidade de uma expansão clonal. Tudo depende da representação da célula neoplásica na amostra tecidular, da metodologia, da qualidade e tipo dos AcMo utilizados no estudo, e, porque não, da perícia do observador e do seu conhecimento do perfil IF normal.

Existem algumas "aberrações IF" que, pelo facto de nunca serem observadas nas células linfóides normais em estadio de maturação e com localização equivalente, são indicadores fortes de (mono) clonalidade (por exemplo, expressão de CD10 nos LB maduros do SP). E diz-se com a localização equivalente porque o mesmo critério pode não ser válido para outro órgão ou tecido (por exemplo, a expressão de CD10 é normal nos LB maduros dos centros foliculares dos gânglios linfáticos).

Define-se, portanto, INDICADOR CLONO-FENOTÍPICO como aquela alteração ou "aberração" fenotípica capaz de poder ser usada como "indicador" de (mono) clonalidade.

A noção de PERFIL CLONO-FENOTÍPICO exige uma abordagem bem mais complexa do IF da célula linfóide, só possível pela análise multiparamétrica, isto é, pela possibilidade de analisar, na mesma célula, múltiplos parâmetros, como o tamanho e a complexidade interna celular – traduzidos pela dispersão frontal (“Forward light scatter”, FSC) e lateral (“Sideward light scatter”, SSC) da luz, respectivamente – e expressão de vários Ag, com recurso a AcMo de especificidades distintas e conjugados com diferentes fluorocromos.

Esta é, antes de mais, uma abordagem pela imagem, multi-dimensional, que resulta da representação gráfica simultânea de dois ou mais dos parâmetros avaliados. Complexa por natureza e extremamente dependente da perícia e da experiência prévia do observador, ela permite, no entanto abordar a célula como um todo, e aumenta enormemente a capacidade de identificar “IF aberrantes”, sugestivos ou indicativos de (mono) clonalidade.

1.2.1.2. O equivalente normal do linfócito neoplásico

A maioria dos trabalhos publicados sobre o IF dos linfócitos normais limita a abordagem à quantificação das diferentes populações linfocitárias no SP, na MO e, com muito menos frequência, nos diferentes tecidos e órgãos linfóides.^{209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218}

²⁰⁹ Self. e col (1986): Lymphocyte subsets in lymph node hyperplasias and B cell neoplasms as determined by fluorocinated antibodies and flow cytometry. *Ann N Y Acad Sci* 468: 195-210

²¹⁰ Clark e col (1986): Lymphocyte subsets in normal bone marrow. *Blood* 67:1600-6

²¹¹ Plum e col (1986): Phenotyping of mononuclear cells from tonsils and corresponding biopsies using a cytofluorimeter. *Acta Otolaryngol* 101: 129-134

²¹² Sugiyama e col (1987): Subsets of tonsillar lymphocytes and activated cells in each subset analyzed by two-color flow cytometry. *Acta Otolaryngol* 104: 342-50

Surpreendentemente (ou não), estes estudos foram realizados, na sua maioria, no final da década de 80 e início da década de 90, coincidente com a altura em que a CF começou a ser utilizada nos laboratórios clínicos.

Passariam quase 10 anos antes que se renovasse o interesse sobre o IF da célula linfóide normal, talvez porque a evolução tecnológica o obrigasse, ou talvez porque finalmente se tomasse consciência de que compreender a célula linfóide neoplásica sem entender a célula linfóide normal é, no mínimo, uma tarefa árdua. Assim, só recentemente se voltaram a publicar estudos sobre o IF das células linfóides normais e dos seus precursores.

1.2.1.3. Perfil imunofenotípico das células NK e dos linfócitos T maduros

Actualmente pensa-se que as CNK se desenvolvem na MO a partir de um precursor com capacidade de diferenciação T, NK ou dendrítica^{219, 220} e que as CNK podem ainda ter origem em células precursoras do fígado fetal ou em precursores tímicos.^{221, 222, 223}

²¹³ Reichert e col (1991): Lymphocyte subset reference ranges in adult caucasians. *Clin Immunol Immunopathol* 60: 190-208

²¹⁴ Caldwell e col (1991): Precursors in normal pediatric bone marrow. *Am J Clin Pathol* 95: 816-23

²¹⁵ Denney e col (1992): Lymphocyte subsets in healthy children during the first 5 years of life. *JAMA* 267: 1484-8

²¹⁶ Kotylo e col (1993): Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. *Am J Clin Pathol* 100: 111-15

²¹⁷ Bryan e col (1993): Clinical utility of a lymph node normal range obtained by flow cytometry. *Ann N Y Acad Sci* 677: 404-6

²¹⁸ Stewart & Stewert (1993): Immunological monitoring utilizing novel probes. *Ann N Y Acad Sci* 677: 94-112

²¹⁹ Lotzova E e col (1993): Human natural killer cell development from bone marrow progenitors: analysis of phenotype, cytotoxicity and growth. *Nat. Immun* 12: 209-17

²²⁰ Spits H e col (1998): Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. *Immunol Rev* 165:75-86

²²¹ Jaleco AC e col (1997): Fetal liver contains committed NK-cell progenitors but is not a site for development of CD34+ cells into T-cells. *J Immunol* 159: 694-702

²²² Carayol G e col (1998): NK cells differentiated from bone marrow, cord blood and peripheral blood stem cells exhibit similar phenotype and functions *Eur J Immunol* 28: 1991-2002

²²³ Sato T e col (1999): NK cell colony formation from human fetal thymocytes. *Exp Hematol* 27: 726-33

Estudos efectuados “*in vitro*” conduziram a um modelo de diferenciação das CNK baseado na expressão de algumas moléculas, com reconhecimento de 3 estadios maturativos distintos: células pré-NK (CD161⁺/CD56⁻/CD16⁻/CD94⁻), CNK imaturas (CD161⁺/CD56⁺/CD16⁻/CD94⁻) e CNK maduras ou diferenciadas (CD161⁺/CD56⁺/CD16⁺/CD94⁺).^{224, 225}

As CNK maduras têm o aspecto morfológico de LGL e, do ponto de vista IF expressam tipicamente CD56, na ausência de CD3 e de TCR de membrana. Sabe-se, desde há vários anos, que no SP existem duas populações de CNK, que se distinguem com base na expressão de CD56 e de CD16: as CNK CD56⁺/CD16⁻, que constituem a maioria (> 90%) das CNK circulantes, e as CNK CD56⁺⁺/CD16^{-/+}, que são minoritárias no SP.^{226, 227, 228}

Sabe-se actualmente que a formação de conjugados entre as CNK e as células alvo é condição necessária mas não suficiente para a actividade citotóxica eficaz. Esta depende do balanço entre sinais mediados por receptores de morte celular (“Killer Receptors”, KR) da família das Igs (“Killer Immunoglobulin-like Receptors”, KIR) – por exemplo, o CD158, o NKB1, o NKp30, o NKp44 e o NKp46 – ou das lectinas (“Killer Lectin-type Receptors”, KLR) – por exemplo, o CD94 e o CD161 –

^{229, 230 231} Estes receptores inibem e activam as CNK, de uma forma dependente (CD94, CD158, NKB1) ou independente (CD161) da interacção com as moléculas da classe I do MHC.

O perfil IF dos LT maduros normais do SP caracteriza-se pela ausência de expressão da enzima TdT e de CD1, pela expressão de várias moléculas pan-T – CD7, CD5, CD2 e CD3, este último em estreita associação com o TCR (ou) – e, na maioria dos linfócitos, pela expressão diferencial de CD4 ou CD8. Reconhece-se ainda que a interacção produtiva entre os LT e o Ag depende da existência de um “2º sinal” – para além daquele que deriva da interacção entre o Ag, o TCR, e as moléculas do MHC – mediado pela interacção de moléculas com funções co-estimuladoras^{232, 233} – CD27 e CD28 – ou inibidoras²³⁴ – CD152 – com os seus ligandos – CD70 (ligando do CD27), CD80 e CD86 (ligandos do CD28 e do CD152) – expressos nas células apresentadoras de Ag.

1.2.1.4. Modificações fenotípicas resultantes da activação e diferenciação celular terminal

Foram até ao momento descritas muitas modificações fenotípicas nos LT e nas CNK após activação, na maioria dos casos através de estudos em modelos animais, ou, nos humanos, em estudos efectuados “*in vitro*”, em doentes

²²⁴ Bennet LM e col (1996): Definition of a natural killer NKR-P1A+/CD56-/CD16- functionally immature human NK cell subset that differentiates *in vitro* in the presence of IL12. J Exp Med 184: 1845-56

²²⁵ Spits H e col (1995): Development of human T and natural killer cells. Blood 85: 2654-70

²²⁶ Sedlmayr P e col (1996): Differential phenotypic properties of human peripheral blood CD56dim and CD56bright natural killer cell subpopulations. Int. Arch. Allergy Immunol 110: 308-13

²²⁷ Cooper MA e col (2001): Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. Blood 9: 3146-51

²²⁸ Jacobs R e col (2001). CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. Eur J Immunol 31: 3121-7

²²⁹ Moretta A e col (2001): Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. Annu Rev Immunol 19:197-223

²³⁰ Moretta L e col (2002): Human natural killer cells: their origin, receptors and function. Eur J Immunol 32: 1205-11

²³¹ Augugliaro R e col (2003): Selective cross-talk among natural cytotoxicity receptors in human natural killer cells. Eur J Immunol 33: 1235-41

²³² Lenschow e col (1996): CD28/B7 system of T cell costimulation. Annu Rev Immunol 14: 233-58

²³³ Kobata T e col. (1994): CD27 is a signal-transducing molecule involved in CD45RA+ naive T cell costimulation. J Immunol 153: 5422-5432

²³⁴ Krummel MF e col. (1995): CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. J Exp Med 182: 459-65

com infecções víricas ou, mais recentemente, com a utilização de tetrâmeros de moléculas de HLA.

Estes estudos descrevem a regulação da expressão de moléculas já expressas nos linfócitos não estimulados, a expressão “*de novo*” de outras moléculas e a existência de estados precoces e tardios de activação dos LT.

235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247

Desta forma, é amplamente conhecido que o CD69 se exprime muito precocemente e de forma transitória logo após a activação dos LT e que outras alterações surgem menos precocemente, podendo ou não persistir no tempo; por exemplo, o aumento de expressão de HLA-DR, CD38, CD2 e CD11a e a diminuição de expressão de CD28. Finalmente, algumas moléculas são tipicamente expressas

apenas em fases tardias de activação, como o CD57.

A informação sobre o perfil IF dos LT e das CNK adquire ainda mais complexidade quando, a cada dia que passa, se descobrem novos receptores celulares ou se faz luz sobre a sua função. Particularmente relevantes nesta área são os receptores de quimiocinas, que têm uma importância cada vez mais reconhecida nos fenómenos de migração e de “homing” dos linfócitos.^{248, 249}

Assim, a expressão de CCR7, CD26, CD27, CD28, CD29, CD45RA, CD45RB, CD45RO e CD57 na membrana, bem como de perforina e granzimas intra-celulares são variáveis e parecem, no seu conjunto, definir diferentes estádios de diferenciação e de activação celular, relacionados com a existência ou não de contacto prévio dos LT com o Ag e com a maior ou menor capacidade para exercerem funções reguladoras ou efectoras: os LT “naive”, os LT “de memória”, e os LT “efectores” por excelência. Assim, hoje conhece-se que os LT “naive” são CCR7⁺/CD45RA^{+forte}/CD45RO⁻, que os LT “de memória” são CCR7⁺/CD45RA⁻/CD45RO^{+forte}, e que a perda de expressão de CD45RA e ganho de CD45RO ocorre durante a transição dos LT “naive” para LT “de memória”, passando por um estadio intermédio CD45RA^{+débil}/CD45RO^{+débil}; sabe-se ainda que os LT “de memória” podem readquirir CD45RA na membrana e perder a expressão de CCR7, convertendo-se em células

235 Warren HS e col (1991): Loss of activation-induced CD45RO with maintenance of CD45RA expression during prolonged culture of T cells and NK cells. *Immunology* 74: 78-85

236 Andersson EC e col (1994) Changes in cell adhesion molecule expression on T cells associated with systemic virus infection. *J Immunol* 152: 1237-45

237 Kestens L e col (1994): Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4⁺ CD45RO⁺ T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* 95: 436-41

238 Nielsen e col (1994): Expression of type-3 complement receptor on activated CD8⁺ T cells facilitates homing to inflammatory sites. *J Immunol* 153: 2021-8

239 Roth MD (1994): Interleukin 2 induces the expression of CD45RO and the memory phenotype by CD45RA⁺ peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 179: 857-64

240 d'Angeac e col (1994): CD57⁺ T lymphocytes are derived from CD57⁻ precursors by differentiation occurring in late immune responses. *Eur J Immunol* 24: 1503-11

241 Labalette M e col (1994): CD8 lymphocytosis in primary cytomegalovirus (CMV) infection of allograft recipients: expansion of an uncommon CD8⁺CD57⁻ subset and its progressive replacement by CD8⁺CD57⁺ T cells. *Clin Exp Immunol* 95: 465-71

242 Ito e col (1995): Changes of adhesion molecule (LFA-1, ICAM-1) expression on memory T cells activated with cytomegalovirus antigen. *Cell Immunol* 160: 8-13

243 Christensen JP e col (1995): Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) as an early and sensitive marker for virus-induced T cell activation. *Clin Exp Immunol* 102: 268-73

244 Amlot e col (1996): Activation antigen expression on human T cells. I. Analysis by two-colour flow cytometry of umbilical cord blood, adult blood and lymphoid tissue. *Clin Exp Immunol* 105: 176-82

245 Caruso A. e col (1997): Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* 27: 71-6

246 Vallejo AN e col (1999): Modulation of CD28 expression: distinct regulatory pathways during activation and replicative senescence. *J Immunol* 162: 6572-9

247 Trimble LA e col (2000): CD3zeta and CD28 down-modulation on CD8 T cells during viral infection. *Blood* 96: 1021-9

248 Feng L. (2000): Role of chemokines in inflammation and immunoregulation. *Immunol Res* 21: 203-210

249 Fukada K e col (2002): Functional expression of the chemokine receptor CCR5 on virus epitope-specific memory and effector CD8⁺ T cells. *J Immunol* 168: 2225-32

efectoras com um fenótipo CCR7⁻/CD45RA⁺/CD45RO⁻.^{250,251} A complexidade de todo este processo é ainda maior, quando dentro de cada população, se descrevem subpopulações que se diferenciam com base na expressão distinta de uma ou mais moléculas, aparentemente com um significado funcional; são exemplos, a descrição de várias populações de LT “de memória” com base na expressão de CD43,²⁵² e CD45RB.²⁵³

A expressão de CD26, molécula de superfície com actividade proteolítica – dipeptidil-peptidase IV – que serve de receptor para a adenosina desaminase e está provavelmente envolvida quer na activação quer na migração dos LT, aumenta também na fase de LT “de memória”.^{254,255}

Moléculas como o CD28 e o CD27, receptores co-estimuladores dos LT envolvidos na activação do LT “naive” e na geração de linfócitos “de memória” e “efectores” após contacto com o Ag,^{256,257} ajudam a identificar subpopulações de LT em estadios de maturação diferentes e com propriedades funcionais distintas. Vários estudos, muitos deles utilizando como modelo infecções víricas, conduziram a uma proposta de diferenciação

dos LT CCR7⁺ que, começando com fenótipo CD28⁺/CD27⁺ e passando por um estadio intermédio CD28⁻/CD27⁺, sofrem maturação até ao fenótipo de diferenciação terminal que se caracteriza pela ausência de expressão de ambos os receptores em células CCR7⁻.^{258,259,260,261,262,263}

A conjugação de toda esta informação sugere a existência de duas populações de LT que tomaram contacto prévio com o Ag, distintas do ponto de vista fenotípico e funcional.^{264,265,266}

- Os LT “de memória”, predominantemente do tipo CD45RA⁻/CD45RO⁺/CCR7⁺ que expressam CD95/Fas, apresentam forte expressão de CD11a, CD18, CD29, CD49d, e CD49e, são capazes de produzir, não só IL2, como também interferão (“Interferon”, IFN- γ , factor de necrose tumoral (“Tumor Necrosis Factor -”, TNF- α) e/ou IL4, são desprovidos de actividade citotóxica sem estimulação prévia, e contêm as células que dão origem aos LT “efectores”;

²⁵⁰ Hamann D e col (1996): Heterogeneity of the human CD4⁺ T-cell population: two distinct CD4⁺ T-cell subsets characterized by coexpression of CD45RA and CD45RO isoforms. *Blood* 88: 3513-21

²⁵¹ Sallusto F e col (1999): Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401: 708-12

²⁵² Ohara T e col (2002): Memory functions and death proneness in three CD4⁺CD45RO⁺ human T cell subsets. *J Immunol* 169: 39-48

²⁵³ Horgan KJ e col (1994): CD45RB expression defines two interconvertible subsets of human CD4⁺ T cells with memory function. *Eur J Immunol* 24: 1240-3

²⁵⁴ Falcioni F e col (1996): Influence of CD26 and integrins on the antigen sensitivity of human memory T cells. *Hum Immunol* 50: 79-90

²⁵⁵ Fan H e col (2003): Dipeptidyl peptidase IV/CD26 in T cell activation, cytokine secretion and immunoglobulin production. *Adv Exp Med Biol* 524: 165-74

²⁵⁶ Hendriks e col (2000) CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nature Immunol* 1: 433-9

²⁵⁷ Arens R e col (2001): Constitutive CD27/CD70 interaction induces expansion of effector-type T cells and results in IFN γ -mediated B cell depletion. *Immunity* 15: 801-12

²⁵⁸ Posnett e col (1999): Differentiation of human CD8 T cells: implications for in vivo persistence of CD8⁺ CD28⁻ cytotoxic effector clones. *Int Immunol* 11: 229-41

²⁵⁹ Hamann e col (1999): Evidence that human CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻ cells are induced by antigen and evolve through extensive rounds of division. *Int Immunol* 11: 1027-33

²⁶⁰ Roos MT e col (2000): Changes in the composition of circulating CD8⁺ T cell subsets during acute Epstein-Barr and human immunodeficiency virus infections in humans. *J Infect Dis* 182: 451-8

²⁶¹ De Rosa e col (2001): 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nature Med* 7: 245-8

²⁶² Globerson e col (2000): Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today* 21: 515-21

²⁶³ Victor Appay e col (2002): Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature Medicine* 8: 379-85

²⁶⁴ Hamann, D e col (1997). Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 186: 1407-18.

²⁶⁵ Hoflich e col (1998): CD45RA (bright) / CD11a (bright) CD8⁺ T cells: effector T cells. *Int Immunol* 10: 1837-45

²⁶⁶ Sallusto F e col (1999): Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401: 708-12

- Os LT “efectores” que se caracterizam pela expressão de CD45RA e pela ausência de expressão de CD27, CD28 e CCR7 e que são fortemente positivos para CD11a, CD11b, CD18, e CD49d; estas células não expressam CD62L nem produzem IL2 ou IL4, mas produzem grande quantidade de IFN- e TNF- , expressam quantidades elevadas de FasL, granzima e perforina e têm capacidade citotóxica sem estimulação prévia “*in vitro*”.

1.2.1.5. Indicadores e perfis clono-fenotípicos nas doenças linfoproliferativas crônicas T e NK

A identificação IF dos LB neoplásicos tem sido baseada em dois pressupostos: 1) os LB policlonais exprimem cadeias leves ou das Igs em proporções relativamente estáveis, enquanto 2) os LB monoclonais expressam um único tipo de cadeias leves (ou).^{267,268} Desta forma, a infiltração de um órgão ou tecido por uma população monoclonal de LB traduz-se, em princípio, numa alteração da razão entre LB⁺ e LB⁻.

Embora a utilidade desta estratégia para o “screening” de monoclonalidade B tenha sido comprovada pela sua utilização generalizada ao longo dos anos, ela tem limitações: 1) a sua sensibilidade é relativamente pequena, pois depende da proporção de LB monoclonais e de LB residuais normais presentes na amostra; 2) estudos recentes mostram que em 5% dos doentes com DLPC-B, pode ser encontrado mais de um clone de LB neoplásicos no mesmo

indivíduo,²⁶⁹ e em alguns destes pacientes com DLPC-B biclonal a razão / pode ser normal pelo facto de um clone expressar cadeias leves e, o outro, cadeias leves . Nós próprios tivemos oportunidade de constatar a existência simultânea de mais de uma DLPC no mesmo indivíduo, incluindo, vários casos de associação de duas DLPC-B ou de duas DLPC-T, ou ainda de coexistência de DLPC-T e de DLPC-B, alguns dos quais foram apresentados ou publicados (Lima M e col., 1996 – Art. 8; Alves R e col., 1998 – Art. 10; Lima M e col., 2001 – Art. 14; Lima M e col., 2003 – Art. 25).

Estas observações apontam para a necessidade de critérios IF mais específicos do que a identificação de uma razão / alterada.

Nos últimos anos, muitos grupos demonstraram que os linfócitos B neoplásicos expressam moléculas que habitualmente não são expressas pelos linfócitos normais em estadio maturativo e de activação correspondente, definindo perfis fenotípicos considerados, por isso, como sendo aberrantes.²⁷⁰

A demonstração do carácter clonal de uma DLPC-T exige uma metodologia mais subtil, pois, na ausência de um indicador clono-fenotípico semelhante às cadeias leves e das Igs nos LB, a evidência de diferenças IF entre os LT neoplásicos e os LT normais assume particular importância. Assim, entre os critérios IF que têm sido descritos como de valor para o

²⁶⁷ Geary W e col (1993): Quantitative criteria for clonality in the diagnosis of B-cell non-Hodgkin's lymphoma by flow cytometry. *Mod Pathol* 6: 155-61

²⁶⁸ Orfao A. e col (1999): Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of haematological malignancies: current status and future directions. *Clinical Chemistry* 45: 1708-17

²⁶⁹ Sanchez ML e col (2003): Incidence and Clinico-biologic characteristics of leukemic B-cell lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone. *Blood* (em impressão).

²⁷⁰ Sanchez ML e col (2002): Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B-chronic lymphoproliferative disorders: Basis for the design of specific 4-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia* 16: 1460-9

diagnóstico de suspeita de (mono) clonalidade T e de identificação dos LT neoplásicos nas DLPC-T incluem-se: 1) deleção de uma ou mais moléculas pan-T; 2) expressão de uma molécula ou uma combinação de duas ou mais moléculas habitualmente não expressas pelos LT maduros e por isso designadas como aberrantes; 3) expressão discordante de CD3 e TCR na membrana e 4) co-expressão de CD4 e CD8 e/ou a ausência de expressão de ambas as moléculas numa proporção importante de LT. Tais critérios, embora de utilidade na prática clínica diária, são falíveis, pois um "defeito IF" claro tem sido encontrado apenas em 60-70% das DLPC-T. Perante esta situação, a identificação de rearranjo clonal dos genes que codificam para as diferentes cadeias do TCR utilizando a técnica de "Southern-blot" continua a ser o método de referência para diagnóstico de (mono) clonalidade T.

Em doentes que apresentam expansões de CNK, a demonstração de (mono) clonalidade constitui ainda hoje um autêntico desafio. De facto, enquanto nas DLPC-T esta pode ser investigada através de estudos do rearranjo dos genes que codificam para o TCR, não existem estudos moleculares equivalentes para as CNK; na melhor das hipóteses, estes encontram-se limitados aos estudos de ADN ligados ao cromossoma X ou de demonstração de integração clonal de sequências genómicas de origem vírica, nem sempre aplicáveis e geralmente não disponíveis para aplicação clínica imediata.^{271,272} Por outro lado, os estudos

citogenéticos são de utilidade limitada, já que a obtenção de metáfases para análise cromossómica é difícil e quase inexistentes as anomalias cromossómicas recorrentes descritas até à data nas neoplasias de CNK. Desta forma, se é urgente definir os critérios IF para identificar LT monoclonais, é emergente a sua definição para as CNK, de forma semelhante ao que tem acontecido noutras doenças hematológicas.^{273,274,275,276}

1.2.1.6. O repertório de famílias de regiões variáveis do receptor da célula T como indicador clono-fenotípico T

Tal como sucede com os LT maduros normais, os LT neoplásicos da maioria dos indivíduos que têm DLPC-T expressam na sua membrana e em associação com CD3, as cadeias alfa () e beta () (TCR) ou, mais raramente, as cadeias gama () e delta () do TCR (TCR).

Existem basicamente dois métodos para a caracterização deste repertório: 1) As técnicas de biologia molecular, através da utilização de sondas específicas²⁷⁷ e 2) a CF, através da utilização de um painel de AcMo específicos.²⁷⁸

Os motivos que determinam a caracterização do repertório T são habitualmente diferentes para o Imunologista e para o

²⁷¹ Nash R e col (1993): Clonal studies of CD3- lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood* 81: 2363-8

²⁷² Kelly A. e col (1994): Clonality of CD3 negative large granular lymphocyte proliferations determined by PCR based X-inactivation studies. *J Clin Pathol* 47: 399-404

²⁷³ Macedo A. e col (1995): Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann Hematol* 70: 189-94

²⁷⁴ Griesinger F e col (1999): Leukaemia-associated immunophenotypes (LAIP) are observed in 90% of adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia: detection in remission marrow predicts outcome. *Br J Haematol* 105: 241-55

²⁷⁵ Bahia DM e col (2001): Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and its clinical significance. *Haematologica* 86: 801-6

²⁷⁶ Ciudad J e col (2002): Detection of abnormalities in B-cell differentiation pattern is a useful tool to predict relapse in precursor-B-ALL. *Br J Haematol* 104: 695-705

²⁷⁷ Hu H, Queiro MR e col (1993): Expression of T-cell receptor alpha and beta variable genes in normal and malignant human T cells. *Br J Haematol* 84: 39-48

²⁷⁸ McCoy P (2001): T-cell receptor analysis by flow cytometry. *Cytometry* 44: 369

Hematologista. Para o Imunologista, o estudo do repertório T representa uma forma de avaliação indirecta da resposta imune na sua vertente fisiológica e patológica e, neste contexto, a maioria dos estudos clínicos realizados são relativos a infecções e doenças autoimunes. Para o Hematologista, é um meio para confirmar ou excluir (mono) clonalidade T, fundamentado na ideia de que a expansão preferencial de uma família (ou de número restrito de famílias) de regiões variáveis das cadeias α , β , ou γ do TCR dá uma indicação preciosa acerca do carácter clonal de uma linfocitose T, sobretudo naqueles casos em que não há "aberração fenotípica" evidente e quando os estudos de biologia molecular não estão disponíveis ou não vão proporcionar resultados de forma imediata.

No que respeita à investigação de (mono) clonalidade de DLP-T, muitos dos estudos efectuados – alguns dos quais validaram a importância do estudo do repertório do TCR para confirmar (mono) clonalidade e outros dos quais questionaram o seu valor – são contrários pelo pequeno número de doentes incluídos, utilização de um painel limitado de AcMo, ou mesmo pela metodologia, pela forma de abordagem e/ou de interpretação dos resultados. ^{279, 280, 281, 282, 283}

²⁷⁹ Jack AS e col (1990): Cutaneous T-cell lymphoma cells employ a restricted range of T-cell antigen receptor variable region genes *Am J Pathol* 136: 17-21

²⁸⁰ Poppema S e col (1991): Restricted V gene usage in T-cell lymphomas as detected by anti-T-cell receptor variable region reagents *Am J Pathol* 138: 1479-84

²⁸¹ McHenry PM e col (1994): Assessment of an anti-T-cell receptor variable region antibody panel in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol* 130: 595-8

²⁸² Clark DM e col (1986): Antibodies to T cell antigen receptor beta chain families detect monoclonal T cell proliferation. *Lancet*. 2: 835-7

²⁸³ Russell-Jones R (1999): T-cell receptor gene analysis in the diagnosis of Sezary syndrome. *J Am Acad Dermatol* 41: 254-9

A interpretação dos resultados do estudo do repertório T em doentes com suspeita de DLPC-T exige, antes de mais, o conhecimento do repertório T "normal" que se sabe depende de vários factores, incluindo a origem étnica, a idade, o órgão linfóide e a subpopulação de LT (CD4⁺ versus CD8⁺). ^{284, 285} Expansões de uma ou mais famílias podem ser encontradas em indivíduos saudáveis, sobretudo em idades avançadas, e são mais frequentes nos LT CD8 e em associação com determinadas doenças, sobretudo de natureza infecciosa, tumoral ou autoimune; frequentemente têm um carácter oligoclonal. ^{286, 287, 288, 289, 290} A sua génese não é conhecida, sendo, no entanto, possível admitir que resultem de estimulação antigénica contínua e/ou repetida.

1.2.2. CONTRIBUIÇÃO DOS ESTUDOS IMUNOFENOTÍPICOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS T E NK

A caracterização IF das DLPC-B foi já alvo de numerosos estudos, sendo hoje universalmente aceite que existem perfis IF característicos associados aos diferentes tipos de DLPC-B. ^{291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299}

²⁸⁴ Van den Beemd R e col (2000): Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls. *Cytometry* 40: 336-45

²⁸⁵ Posnett DN (1995): Environmental and genetic factors shape the human T-cell receptor repertoire. *Ann N Y Acad Sci* 7: 756:71-80

²⁸⁶ LeMaoult J e col (2000): Age-related dysregulation in CD8 T cell homeostasis: kinetics of a diversity loss. *J Immunol* 165: 2367-73

²⁸⁷ Khan N e col (2002): Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol* 169: 1984-92

²⁸⁸ Posnett DN e col (1994): Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy". *J Exp Med* 179: 609-18

²⁸⁹ Direskeneli H e col (1999): Oligoclonal T cell expansions in patients with Behcet's disease. *Clin Exp Immunol* 117: 166-70

²⁹⁰ Shimomura T e col (1996): Oligoclonal accumulation of T cells in peripheral blood from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 95: 732-7

²⁹¹ Matutes E (1994): The immunological profile of Bcell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 8: 1640-5

²⁹² Matutes E e col (1994): The immunophenotype of hairy-cell leukemia (HCL) – Proposal for a scoring system to distinguish HCL from Bcell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Leuk Lymphoma* 14: 57-61

No que respeita às DLPC-T e NK, o conhecimento actual é, no mínimo, mais limitado.

1.2.2.1. Doenças linfoproliferativas NK

Num estudo em que se pretendia avaliar a origem das diferentes neoplasias NK, verificou-se que, na maioria dos casos, as CNK neoplásicas apresentavam um IF maturo que se caracterizava pela expressão de CD16, CD56 e CD94; desta forma foi sugerido que a maioria das neoplasias NK tenha origem em CNK diferenciadas, independentemente das suas características morfológicas de células maduras ou de células blásticas e da sua menor ou maior agressividade clínica.³⁰⁰

Sabe-se actualmente que no grupo dos linfomas NK nasal e tipo nasal, as CNK neoplásicas apresentam um perfil IF de membrana CD2⁺, CD3⁺, CD56⁺, expressam com frequência a cadeia épsilon do CD3 no citoplasma, não rearranjam os genes que codificam para o TCR,^{301,302} têm anomalias cromossómicas recorrentes e com relativa

frequência estão associadas a infecção das células neoplásicas pelo EBV.^{303,304}

1.2.2.1.a) Doenças linfoproliferativas crónicas de linfócitos grandes granulares NK

Pouco ou nada se conhece sobre o perfil IF que define as leucemias crónicas de LGL-NK e que as distingue das proliferações reactivas de CNK.^{305,306}

1.2.2.2. Doenças linfoproliferativas T

O perfil IF da célula linfóide neoplásica está já relativamente bem caracterizado em algumas entidades, como, por exemplo, a leucemia linfocítica/prolinfocítica crónica T,³⁰⁷ a leucemia linfoma de células T do adulto³⁰⁸ e o linfoma T⁺ hepato-esplénico.³⁰⁹ Noutras, como no linfoma T angioimunoblástico, é reconhecida a complexidade imunofenotípica resultante da heterogeneidade intra-tumoral.^{310,311,312,313}

²⁹³ Orfao A. e col (1988): Clinical and immunological findings in large B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Immunol Immunopathol* 46: 177-85

²⁹⁴ Cornfield DB e col (2000): Follicular lymphoma can be distinguished from benign follicular hyperplasia by flow cytometry using simultaneous staining of cytoplasmic bcl-2 and cell surface CD20. *Am J Clin Pathol* 114: 258-63

²⁹⁵ Marotta G e col (2000): Expression of the CD11c antigen in B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 37: 145-9

²⁹⁶ Bellido M e col (2001): Flow cytometry using the monoclonal antibody CD10-PE/Cy5 is a useful tool to identify follicular lymphoma cells. *Eur J Haematol* 66: 100-6

²⁹⁷ Ahmad E e col (2002): Clinical utility of CD23 and FMC7 antigen coexistent expression in B-cell lymphoproliferative disorder subclassification. *Cytometry* 50: 1-7

²⁹⁸ Braylan RC e col (2001): Optimal number of reagents required to evaluate hematology lymphoid neoplasias: Results of an International Consensus Meeting. *Cytometry* 46: 23-7

²⁹⁹ Sanchez ML e col (2002): Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders: Basis for the design of specific 4-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia* 16: 1460-9

³⁰⁰ Mori KL e col (2001): Differentiation stages of natural killer cell lineage lymphoproliferative disorders based on phenotypic analysis. *Br J Haematol* 115: 225-8

³⁰¹ Ohno T e col (1995): Frequent expression of CD3 epsilon in CD3 (Leu 4)-negative nasal T-cell lymphomas. *Leukemia* 9: 44-52

³⁰² Chan JK e col (1996): Clarification of CD3 immunoreactivity in nasal T/natural killer cell lymphomas: the neoplastic cells are often CD3 epsilon+. *Blood* 87: 839-41

³⁰³ Wong KF (1999): Cytogenetic abnormalities in natural killer cell lymphoma/leukaemia--is there a consistent pattern? *Leuk Lymphoma* 34: 241-50

³⁰⁴ Siu LL (2000): Consistent patterns of allelic loss in natural killer cell lymphoma. *Am J Pathol* 157: 1803-9

³⁰⁵ Harris NL e col (1994): A revised european-american classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 84: 1361-92

³⁰⁶ Harris N e col (1999): World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting -Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 17: 3835-49

³⁰⁷ Matutes E (1998): T-cell Prolymphocytic Leukemia. *Cancer Control* 5: 19-24

³⁰⁸ Dahmouh L e col (2002): Adult T-cell leukemia/lymphoma: a cytopathologic, immunocytochemical, and flow cytometric study. *Cancer* 96: 110-6

³⁰⁹ Weidmann E (2000): Hepatosplenic T cell lymphoma. A review on 45 cases since the first report describing the disease as a distinct lymphoma entity in 1990. *Leukemia* 14: 991-7

³¹⁰ Attygalle A. e col (2002): Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood* 99: 627-33

³¹¹ Lee SS e col (2003): Angioimmunoblastic T cell lymphoma is derived from mature T-helper cells with varying expression and loss of detectable CD4. *Int J Cancer* 103: 12-20

³¹² Willenbrock K e col (2001): Analysis of T-cell subpopulations in T-cell non-Hodgkin's lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia type by single target gene amplification of T cell receptor-beta gene rearrangements. *Am J Pathol* 158: 1851-7

³¹³ Smith JL e col (2000): Frequent T and B cell oligoclonal in histologically and immunophenotypically characterized angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Am J Pathol* 156: 661-9

1.2.2.2.a) Doenças linfoproliferativas crônicas de linfócitos grandes granulares T

No grupo das DLPC de LGL-T, as leucemias de LGL-T TCR⁺/CD8⁺ foram caracterizadas como expansões de LT TCR⁺/CD8⁺ efectores de tipo citotóxico – CD45RA⁺/CD28⁻/CD27⁻/CD94⁺ – com expressão variável de CD57.^{314, 315, 316, 317} São, no entanto, quase completamente desconhecidas as características IF das leucemias de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ e TCR⁺. No que respeita às DLPC-T TCR⁺/CD4⁺, foi previamente descrito que os LGL TCR⁺/CD4⁺ co-expressam frequentemente CD8 e moléculas associadas às células NK (“Natural-Killer associated”, NKa) – como o CD56 e o CD57 – na membrana.^{318, 319, 320, 321} No entanto, e tal como também dissemos anteriormente, as séries publicadas incluíam expansões policlonais, oligoclonais e monoclonais destas células sem que fosse avaliada a existência de diferenças IF entre os diferentes grupos. Desta forma, não se encontra caracterizado o perfil clono-fenotípico associado às leucemias de LGL-T TCR⁺/CD4⁺.

³¹⁴ Melenhorst JJ e col (2001): Large granular lymphocyte leukemia is characterized by a clonal T-cell receptor rearrangement in both memory and effector CD8+ lymphocyte populations. *Br J Haematol* 112: 189-94

³¹⁵ Bigouret V e col (2003): Monoclonal T-cell expansions in asymptomatic individuals and in patients with large granular leukemia consist of cytotoxic effector T cells expressing the activating CD94-NKG2C/E and NKD2D killer cell receptor. *Blood* 101: 3198-204

³¹⁶ Melenhorst JJ e col (2003): T-cell large granular lymphocyte leukemia is characterized by massive TCRBV-restricted clonal CD8 expansion and a generalized overexpression of the effector cell marker CD57. *Hematol J* 4: 18-25

³¹⁷ Morice WG e col (2003): Demonstration of aberrant T-cell and natural killer-cell antigen expression in all cases of granular lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 120: 1026-36

³¹⁸ Richards SJ e col (1992): A distinct large granular lymphocytic (LGL) / NK-associated (NKa) abnormality characterized by membrane CD4 and CD8 coexpression. *Br J Haematol* 82: 494-501

³¹⁹ Sala P e col (1993): Persistent expansions of CD4+CD8+ peripheral blood T-cells. *Blood* 82: 1546-52

³²⁰ de Tótero D e col (1992): Heterogeneous immunophenotype of large granular lymphocyte expansions: differential expression of the CD8a and CD8b chains. *Blood* 80: 1765-73

³²¹ Tonutti E e col (1994): Phenotypic heterogeneity of persistent expansions of CD4+ CD8+ T cells. *Clin Immunol Immunopathol* 73: 312-20

1.2.2.2.b) Síndrome de Sezary

Estudos previamente publicados evidenciaram que, na maioria dos casos de SS, a célula linfóide neoplásica é TCR⁺/CD4⁺ e apresenta alterações da expressão de algumas moléculas como o CD7, CD3 e CD26.^{322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331} No entanto, desconhece-se o valor real destas alterações como indicadores clono-fenotípicos, isto é, a sua sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da doença.

A noção geral de que era urgente actualizar os critérios de diagnóstico de SS levou a que a Sociedade Internacional de Linfomas Cutâneos tivesse proposto em 2002 um novo algoritmo que inclui:³³² 1) número absoluto de CS igual ou superior a 1000/mm³; 2) razão CD4/CD8 igual ou superior a 10 e/ou a perda aberrante de um ou mais Ag associados aos LT, detectada por CF; 3) linfocitose com alterações

³²² Kuchnio M e col (1994): Flow cytometric detection of neoplastic T cells in patients with mycosis fungoides based on levels of T-cell receptor expression. *Am J Clin Pathol* 102: 856-60

³²³ Harmon CB e col (1996): Detection of circulating T cells with CD4+CD7-immunophenotype in patients with benign and malignant lymphoproliferative dermatoses. *J Am Acad Dermatol* 35: 404-10

³²⁴ Bogen SA e col (1996): Immunophenotypic identification of Sezary cells in peripheral blood. *Am J Clin Pathol* 106: 739-48

³²⁵ Dummer R e col (1999): Genotypic, phenotypic and functional analysis of CD4+CD7+ and CD4+CD7- T lymphocyte subsets in Sezary syndrome. *Arch Dermatol Res* 291: 307-11

³²⁶ Scala E e col (1999): Skewed expression of activation, differentiation and homing-related antigens in circulating cells from patients with cutaneous T cell lymphoma associated with CD7- T helper lymphocytes expansion. *J Invest Dermatol* 113: 622-7

³²⁷ Edelman J e col (2000): Diminished CD3 expression is useful for detecting and enumerating Sezary cells. *Am J Clin Pathol* 114: 467-77

³²⁸ Rappl G e col (2001): CD4 (+) CD7 (-) T cells compose the dominant T-cell clone in the peripheral blood of patients with Sezary syndrome. *J Am Acad Dermatol* 44: 456-61

³²⁹ Vonderheid EC e col (2001): Variable CD7 expression on T cells in the leukemic phase of cutaneous T cell lymphoma (Sezary syndrome). *J Invest Dermatol* 117: 654-62

³³⁰ Jones D e col (2001): Absence of CD26 expression is a useful marker for diagnosis of T-cell lymphoma in peripheral blood. *Am J Clin Pathol* 115: 885-92

³³¹ Bernengo MG e col (2001): The relevance of the CD4+ CD26- subset in the identification of circulating Sezary cells. *Br J Dermatol* 144: 125-35

³³² Vonderheid EC e col (2002): Update on erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: report of the International Society for Cutaneous Lymphomas. *J Am Acad Dermatol* 46: 95-106

moleculares ou cromossômicas que documentem monoclonalidade T.

Embora este algoritmo represente um avanço sobre propostas prévias,^{333,334} continua a falhar pela ausência de definição clara de qual é (ou quais são) os critérios IF exactos que devem ser utilizados para identificar as CS. Por isso são ainda muitos os que defendem que a (mono) clonalidade destas células deve ser confirmada por estudos moleculares,³³⁵ esquecendo que estes também têm limitações importantes que podem comprometer a sua utilização para o diagnóstico de rotina.^{336,337,338}

Desta forma, é urgente definir os critérios IF que devem ser utilizados na prática clínica diária para identificação das CS.

1.2.3. OUTRAS APLICAÇÕES DOS ESTUDOS IMUNOFENOTÍPICOS NAS DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS T E NK

Embora o termo “avaliação de doença residual mínima” tenha sido originalmente utilizado para referir a identificação de células hematopoiéticas neoplásicas residuais após terapêutica, hoje a AVALIAÇÃO DE DOENÇA MÍNIMA pode ser aplicada de uma forma mais abrangente, para referir a pesquisa de um pequeno número de células neoplásicas no SP, MO, órgãos e tecidos linfóides, ou líquidos

biológicos, com objetivos de diagnóstico ou estadiamento da doença.^{339,340,341,342}

No caso particular das DLPC-B, a determinação da razão / , embora frequentemente utilizada com este propósito, tem uma sensibilidade relativamente limitada – 10^{-2} a 10^{-3} – e dependente da presença de LB normais na amostra.^{343,344} Pode ser obtida informação adicional através da identificação de fenótipos aberrantes, estratégia que aumenta a sensibilidade, permitindo identificar um LB neoplásico entre cada 10^4 a 10^5 células.³⁴⁵ A quase ausência de definição dos perfis IF normais e aberrantes dos LT e das CNK tem constituído um obstáculo para a aplicação sistemática deste tipo de estudos de CF à pesquisa de doença mínima nas DLPC-T e NK.

Nos últimos anos, o estudo IF das células linfóides de origem neoplásica tem também sido utilizado para AVALIAÇÃO DO PROGNÓSTICO. Como exemplo, a expressão de moléculas associadas à proliferação celular evidenciou ser importante na avaliação do prognóstico das

³³³ Willemze R e col (1983): Diagnostic criteria in Sezary's syndrome: a multiparameter study of peripheral blood lymphocytes in 32 patients with erythroderma. *J Invest Dermatol* 81: 392-7

³³⁴ Bogen SA e col (1996): Immunophenotypic identification of Sezary cells in peripheral blood. *Am J Clin Pathol* 106: 739-48

³³⁵ Russell-Jones R e col (1999): T-cell receptor gene analysis in the diagnosis of Sezary syndrome. *J Am Acad Dermatol* 41: 254-9

³³⁶ Muche JM e col (1999): Demonstration of frequent occurrence of clonal T cells in the peripheral blood but not in the skin of patients with small plaque parapsoriasis. *Blood* 94: 1409-17

³³⁷ Fraser-Andrews EA e col (2000): Detection of a peripheral blood T cell clone is an independent prognostic marker in mycosis fungoides. *J Invest Dermatol* 114: 117-21

³³⁸ Delfau-Larue MH e col (2000): Diagnostic value of dominant T-cell clones in peripheral blood in 363 patients presenting consecutively with a clinical suspicion of cutaneous lymphoma. *Blood* 96: 2987-92

³³⁹ Lucio P e col (2001): BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-1 Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation. *Leukemia* 15: 1185-92

³⁴⁰ Wells DA e col (1998): Occult B cell malignancies can be detected by three-color flow cytometry in patients with cytopenias. *Leukemia* 12: 2015-23

³⁴¹ Subira D e col (2002): Flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid samples and its usefulness in routine clinical practice. *Am. J Clin Pathol* 117: 952-8

³⁴² Cabezudo E e col (1997): Analysis of residual disease in chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry. *Leukemia* 11: 1909-14

³⁴³ Di Giuseppe JA e col (1998): Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias. *Sem Oncol* 25: 6-10

³⁴⁴ Ocqueteau M e col (1996): Detection of monoclonality in bone marrow plasma cells by flow cytometry: limitations for minimal residual disease detection. *Br J Haematol* 93: 251-2

³⁴⁵ Sanchez ML e col (2002): Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B-chronic lymphoproliferative disorders: Basis for the design of specific 4-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia* 16: 1460-9

DLPC.^{346,347,348} De uma forma semelhante, a avaliação da expressão de integrinas beta nos LB neoplásicos parece correlacionar-se com o potencial metastático destas células.³⁴⁹

Actualmente, a disponibilidade de terapêuticas baseadas na utilização de AcMo específicos para Ag de membrana, conjugados ou não com toxinas,³⁵⁰ abriu uma nova porta para as aplicações potenciais dos estudos IF por CF nas DLPC: a SELECCÃO DE DOENTES PARA TERAPÊUTICAS IMUNOMODULADORAS. Por exemplo, estudos recentes nesta área demonstraram que a resposta das DLP-B à terapêutica com anti-CD20 se correlaciona com a intensidade de expressão deste Ag de membrana.^{351,352} Para o caso das DLP-T será necessário avaliar se a expressão de CD25 e CD52 se correlaciona com a resposta à terapêutica com AcMo específicos para estas moléculas.³⁵³

³⁴⁶ Domingo-Domenech E e col (2002): CD38 expression in Bchronic lymphocytic leukemia: association with clinical presentation and outcome in 155 patients. *Haematologica* 87: 1021-7

³⁴⁷ Czader M e col (1995): DNA image cytometry and the expression of proliferative markers (proliferating cell nuclear antigen and Ki67) in non-Hodgkin's lymphomas. *Mod Pathol* 8: 51-8

³⁴⁸ Winter JN e col (1996): Prognostic implications of ploidy and proliferative activity in the diffuse, aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 88: 3919-25

³⁴⁹ Terol MJ e col (1999): Expression of beta-integrin adhesion molecules in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with clinical and evolutive features. *J Clin Oncol* 17: 1869-75

³⁵⁰ Nemecek ER (2002): Antibody -based therapy of human leukemia. *Curr Opin Hematol* 9: 316-321

³⁵¹ Foran JM e col (2000): European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma and small B-cell lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol* 18: 317-24

³⁵² Foran JM e col (2001): Loss of CD20 expression following treatment with rituximab (chimaeric monoclonal anti-CD20): a retrospective cohort analysis. *Br J Haematol* 114: 881-3

³⁵³ Dearden CE e col (2002): Alemtuzumab in T-cell malignancies. *Med Oncol* 19: 27S-32S

1.3. O PORQUÊ DESTE TRABALHO

Apesar de toda a informação actualmente disponível na literatura sobre os LT e as CNK normais e sobre as DLP-T e NK, continuam a existir importantes lacunas no diagnóstico, classificação e compreensão do comportamento clínico e biológico destas doenças.

A dificuldade mais óbvia ao diagnóstico é a inexistência de uma definição clara de critérios fenotípicos sensíveis para o diagnóstico de (mono) clonalidade que possam ser aplicados de forma sistemática na rotina como método de “screening” perante a suspeita de uma DLPC-T ou NK e que permitam identificar os LT e as CNK neoplásicas e distingui-las das células normais.

A inexistência de um marcador de clonalidade idêntico às cadeias leves (k) e () das Igs e a complexidade relativamente superior dos LT e das CNK devida à existência de múltiplas populações com perfis fenotípicos distintos a que correspondem propriedades funcionais diferentes, constituem o primeiro obstáculo ao estudo destas doenças. No entanto, os avanços dos últimos anos nos conhecimentos dos LT e das CNK normais e de outras hemopatias malignas como as DLPC-B, juntamente com o desenvolvimento técnico e tecnológico e a disponibilidade de novos reagentes, em especial aqueles dirigidos à identificação do repertório de distintos membros das famílias de regiões variáveis das cadeias (), (), () e () do TCR, aplicáveis ao estudo dos LT e das CNK neoplásicas, abrem novas perspectivas no conhecimento das DLPC-T e NK. Especial-

mente importante seria poder demonstrar que, tal como sucede nas DLPC-B, os LT e as CNK neoplásicas, para além de serem (mono) clonais e, no primeiro caso, expressarem uma única versão de TCR-V /V ou TCR-V /V , apresentam também, de forma sistemática, fenótipos aberrantes.

Precisamente, o facto de ainda não terem sido caracterizados os perfis fenotípicos aberrantes associados à grande maioria das DLPC-T e NK, tem sido um obstáculo importante para alcançar uma classificação mais adequada destas doenças. Isto porque a detecção de IF aberrantes, não só constitui uma arma fundamental para distinguir as células linfóides neoplásicas dos linfócitos normais residuais, como também pode dar informação fundamental acerca da biologia da célula tumoral, na medida em que a expressão aberrante de proteínas na membrana das células é o reflexo das alterações genéticas subjacentes e condiciona a forma como elas se relacionam com o meio envolvente.³⁵⁴ Por sua vez, estes aspectos condicionam também o comportamento e as manifestações clínicas da doença. Assim, só através de um diagnóstico e classificação adequados das DLPC-T e NK podemos compreender melhor as suas manifestações clínicas e biológicas e a sua etiopatogenia.

Acrescem as dificuldades relacionadas com a falta de um sistema de classificação que permita abordar estas DLP de uma maneira

³⁵⁴ Orfao A. e col (1999): Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of haematological malignancies: current status and future directions. *Clinical Chemistry* 45: 1708-17

global e abrangente. Hoje, nas classificações REAL e da OMS, enumeram-se uma série de entidades com significado clínico e biológico distinto, enquanto que na classificação da EORTC, ainda que se utilize uma abordagem semelhante, a perspectiva é mais clínica e os linfomas cutâneos são separados em dois grupos, de acordo com a maior ou menor agressividade clínica.

Urge pois, aprofundar o conhecimento das DLPC-T e NK para tentar dar resposta a quatro

aspectos distintos: 1) definir os critérios IF de (mono) clonalidade dos LT e das CNK; 2) caracterizar os IF aberrantes e os perfis funcionais dos LT e das CNK associados aos diferentes tipos de DLPC-T e NK; 3) caracterizar o comportamento clínico e biológico de algumas DLPC-T e NK praticamente desconhecidas; e 4) reformular os conceitos subjacentes às classificações destas doenças.

2. OBJETIVOS

OBJECTIVOS

Este trabalho tem como **OBJECTIVO GERAL** aprofundar o conhecimento das DLPC-T e NK maduras, utilizando uma abordagem baseada na avaliação da utilidade dos estudos imunofenotípicos para confirmação de suspeita de (mono) clonalidade e para identificação de células linfóides neoplásicas e na caracterização multiparamétrica detalhada de três modelos de DLPC-T ou NK.

Assim, foram propostos os seguintes

OBJECTIVOS CONCRETOS:

1. Estabelecer as bases para a definição de critérios clono-fenotípicos úteis para o diagnóstico de expansões (mono) clonais de linfócitos T e de células NK e para a identificação de linfócitos T e de células NK neoplásicas, caracterizando de forma detalhada o imunofenótipo dos linfócitos T e das células NK normais do sangue periférico, em situação de repouso e de activação e estudando o valor da análise do repertório de famílias de regiões variáveis das cadeias do TCR para a avaliação de (mono) clonalidade T.
2. Definir as características fenotípicas e funcionais de DLPC-T e NK pouco conhecidas, tomando como modelos as DLPC de linfócitos grandes granulares NK CD56^{-/+débil} e as DLPC de linfócitos grandes granulares T TCR^{+/CD4+} e aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos implicados nas suas manifestações clínico-biológicas e na sua etiopatogenia.
3. Aprofundar o conhecimento acerca da base biológica da homogeneidade / heterogeneidade de subtipos concretos de DLPC-T e NK, tomando como modelo o estudo de uma entidade bem definida do ponto de vista clínico e histológico, como é o caso do Síndrome de Sezary.

3. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

MATERIAL, MÉTODOS E RESULTADOS

Nesta secção descrevem-se os indivíduos, o material e os métodos utilizados, bem como os resultados obtidos em relação com cada um dos objectivos definidos, através da inclusão de artigos publicados como consequência do trabalho efectuado.

Cada um dos artigos referidos está precedido por um breve resumo em português, de forma a facilitar uma revisão rápida do seu conteúdo.

Os artigos incluídos nesta secção são:

- Em relação ao objectivo de estabelecer as bases para a definição de critérios clono-fenotípicos úteis para o diagnóstico de expansões (mono) clonais de linfócitos T e de células NK e para a identificação de linfócitos T e de células NK neoplásicas (objectivo 1):

Immunophenotypic characterization of normal blood CD56^{lo} versus CD56^{high} NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties

Lima M, Teixeira MA, Queirós ML, Leite M, Santos AH, Justiça B, Órfão A.

Blood Cells Mol. Dis. 2001; 27:731-43.

RESUMO-Art17-PDF / ARTIGO-Art17-PDF

The "ex vivo" patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR expression identify acute/early and chronic/late NK-cell activation states.

Lima M, Almeida J, Teixeira MA, Queirós ML, Justiça B, Órfão A.

Blood Cells Mol. Dis. 2002; 28:181-90.

RESUMO-Art21-PDF / ARTIGO-Art21-PDF

Immunophenotype and TCR-V repertoire of peripheral blood T-cells in acute infectious mononucleosis.

Lima M, Teixeira MA, Queirós ML, Santos AH, Gonçalves C, Correia J, Farinha F, Mendonça F, Neves Soares JM, Almeida J, Órfão A, Justiça B.

Blood Cells Mol. Dis. 2003; 30: 1-12.

RESUMO-Art28-PDF / ARTIGO-Art28-PDF

Immunophenotypic analysis of the TCR-Vbeta repertoire in 98 persistent expansions of CD3(+)/TCR-alpha(+)/large granular lymphocytes: Utility in assessing clonality and insights into the pathogenesis of the disease.

Lima M, Almeida J, Santos AH, Teixeira MA, Algueró MC, Queirós ML, Balanzategui A, Justiça B, Gonzalez M, San-Miguel J, Órfão A.

Am. J. Pathol. 2001; 159: 1861-8

RESUMO-Art16-PDF / ARTIGO-Art16-PDF

- Em relação ao objectivo de definir as características fenotípicas e funcionais dos LT e das CNK em DLPC-T e NK pouco conhecidas e de aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos implicados nas manifestações clínico-biológicas e na etiopatogenia destas doenças (objectivo 2):

Clinico - biological, immunophenotypic and molecular characteristics of CD56^{-/+dim} chronic NK-cell large granular lymphocytosis.

Lima M, Almeida J, Teixeira MA, Queirós ML, Santos AH, Balanzategui A, Estevinho A, Algueró MC, Barcena P, Fonseca S, Amorim ML, Cabeda JM, Pinho L, Gonzalez M, San Miguel J, Justiça B, Orfão A.
Am. J. Pathol. 2003 (submetido para publicação).

RESUMO-Art33-PDF / ARTIGO-Art33-PDF

TCR⁺/CD4⁺ large granular lymphocytosis: a new clonal T-cell lymphoproliferative disorder.

Lima M, Almeida J, Teixeira MA, Algueró MC, Santos AH, Balanzategui A, Queirós ML, Barcena P, Izarra A, Fonseca S, Bueno C, Justiça B, Gonzalez M, San Miguel J Orfão A.
Am. J. Pathol., 2003 (em impressão).

RESUMO-Art31-PDF / ARTIGO-Art31-PDF

- Em relação ao objectivo de aprofundar o conhecimento da base biológica da homogeneidade/heterogeneidade de subtipos de DLPC-T e NK bem definidos (objectivo 3):

Utility of flow cytometry immunophenotyping and DNA ploidy studies for the diagnosis and characterization of blood involvement in Sezary Syndrome.

Lima M, Almeida J, Teixeira MA, Queirós ML, Santos AH, Fonseca S, Balanzategui A, Justiça B, Orfão A.

Haematologica, 2003 (em impressão).

RESUMO-Art30-PDF / ARTIGO-Art30-PDF

**3.1. CRITÉRIOS FENOTÍPICOS PARA DETECÇÃO DE LINFÓCITOS T E DE CÉLULAS NK
NEOPLÁSICAS: PERFIL IMUNOFENOTÍPICO E REPERTÓRIO DE FAMÍLIAS DE REGIÕES VARIÁVEIS
DAS CADEIAS DO TCR**

3.1.1. ESTUDO IMUNOFENOTÍPICO COMPARATIVO DAS CÉLULAS NK CD56⁺ E CD56⁺⁺ DO SANGUE PERIFÉRICO E SEU IMPACTO PARA A COMPREENSÃO DA SUA DISTRIBUIÇÃO TECIDULAR E SUAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS.

No presente trabalho comparamos as células NK CD56^{+débil} e CD56^{+forte} do sangue periférico num grupo de indivíduos adultos saudáveis. Os resultados obtidos mostraram que as células NK CD56^{+forte} têm um tamanho e uma complexidade interna superiores aos das células NK CD56^{+débil} e expressam níveis superiores de CD25, CD122, HLA-DR e CD45RO e inferiores de CD45RA, sugerindo que, ao contrário da maioria das células NK CD56^{+débil}, estas células correspondem a um subtipo particular de células NK activadas. A maior intensidade de expressão de moléculas co-estimulatórias como o CD2 e o CD7 pode explicar a maior capacidade das células NK CD56^{+débil} para responderem a estímulos.

Por outro lado, a maior intensidade de expressão de CD56 e de outras moléculas de adesão como CD2, CD11c, CD44, e CD62L nas células NK CD56^{+forte} em comparação com as células NK CD56^{+débil} suportam a maior capacidade das primeiras para migrar do sangue para os tecidos, onde predominam, da

mesma forma que podem potenciar a sua interacção com as células-alvo.

Também interessante, é o facto destas duas populações de células NK terem um perfil diferente de expressão de receptores de morte celular, o que pode ser determinante para os requisitos de activação. Nomeadamente, a expressão débil ou ausente de CD16 nas células NK CD56^{+forte} pode explicar a menor capacidade destas células para exercerem funções de citotoxicidade dependente de anticorpos. Por outro lado, a ausência de expressão de receptores de morte celular da família das imunoglobulinas – CD158a e NKB1 – e a maior intensidade de expressão de receptores de morte celular da família das lectinas – CD94 – nas células NK CD56^{+forte} pode determinar diferentes interacções com as moléculas da classe I do Complexo Maior de Histocompatibilidade.

3.1.2. OS PADRÕES DE EXPRESSÃO “EX-VIVO” DE CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO E CD11a/HLA-DR IDENTIFICAM ESTÁDIOS DE ACTIVACÃO AGUDA/RECENTE E CRÓNICA/TARDIA DAS CÉLULAS NK.

Com o objectivo de estudar a sequência de modificações imunofenotípicas relacionadas com as fases precoce e tardia de activação das células NK, analisamos por citometria de fluxo o imunofenótipo das células NK do sangue periférico de 12 indivíduos adultos saudáveis e comparámo-lo com o imunofenótipo das células NK do sangue periférico de 15 doentes com infecções víricas agudas e 15 doentes com infecções crónicas ou tumores.

Embora exista uma grande variabilidade inter-individual, as células NK CD56⁺ presentes no sangue periférico de indivíduos saudáveis, expressam de forma variável e débil CD2 (CD2^{-/+débil}), têm uma intensidade forte e homogénea de expressão de CD7 (CD7^{+forte,hom}), e são HLA-DR⁻, CD11b⁺, CD38⁺, CD11a^{+forte}, CD45RA^{+forte}, CD45RO⁻, enquanto a expressão de CD11c e CD57 é variável e heterogénea.

As células NK recentemente activadas, representadas aqui pelas células NK de doentes com infecção vírica aguda, têm um padrão de expressão de CD2/CD7 semelhante ao das células NK não activadas, mas apresentam um aumento de expressão de CD11a, CD38 e

HLA-DR, e uma diminuição de expressão de CD11b e CD45RA, acompanhada em alguns casos de co-expressão de CD45RO; para além disso, estas células NK são tipicamente CD11c^{+het}/CD57^{-/+débil,hét}.

As células NK em fase tardia de activação celular, representadas pelas células NK de doentes com tumores e infecções crónicas, expressam CD2 com intensidade forte e homogénea e CD7 com intensidade débil e heterogénea (CD2^{+forte,hom}/CD7^{-/+débil,hét}) e apresentam diminuição de expressão de CD38 e CD11b; por outro lado, estas células NK são CD57^{+forte,hom}/CD11c^{-/+} e, na maioria dos casos, já reverteram ao fenótipo original CD45RA⁺/CD45RO⁻/HLA-DR⁻.

Em resumo, mostramos que os padrões de expressão de CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, e CD11a/HLA-DR podem ser úteis para definir perfis IF associados às fases precoce e tardia de activação celular das células NK em modelos 'in vivo'.

3.1.3. IMUNOFENÓTIPO E REPERTÓRIO DE REGIÕES VARIÁVEIS DA CADEIA BETA DO RECEPTOR DA CÉLULA T NOS LINFÓCITOS T DO SANGUE PERIFÉRICO DE DOENTES COM MONONUCLEOSE INFECCIOSA.

Apesar de terem sido publicados estudos sobre as modificações fenotípicas que ocorrem após activação dos linfócitos T, continuam por estabelecer as características imunofenotípicas específicas dos linfócitos T activados e a frequência com que ocorrem expansões de um número restrito de famílias de regiões variáveis das cadeias do TCR (TCR-V) "*in vivo*", durante as infecções víricas agudas.

Neste trabalho, descrevemos o imunofenótipo e o repertório TCR-V dos linfócitos T do sangue periférico de 28 doentes com mononucleose infecciosa aguda. Os estudos imunofenotípicos foram efectuados por citometria de fluxo, utilizando técnicas de imunofluorescência directa e combinações triplas ou quádruplas de anticorpos monoclonais específicos para um grande painel de moléculas associadas aos linfócitos T e às células NK, relacionadas com a activação e/ou adesão celular e anticorpos monoclonais específicos para diferentes famílias TCR-V, -V e -V.

Praticamente todos os doentes (27/28) apresentavam uma expansão massiva de linfócitos T CD8⁺/TCR⁺, a maioria dos quais (> 90%) tinha um imunofenótipo compatível com activação celular recente: CD2^{+forte}, CD7^{+débil}, CD11a^{+forte}, CD38^{+forte}, HLA-DR^{+forte}, CD28^{/+débil}, CD45RO^{+forte}, CD45RA^{-/+débil}, CD11b^{/+débil}, CD11c^{+débil}, CD16⁻, CD56⁻, CD57⁻, CD62L⁻, CD94⁻, CD158a⁻, CD161⁻ e NKb1⁻.

Para além disso, a intensidade de expressão de CD3 e CD5 estava ligeiramente diminuída e só uma pequena fracção dos linfócitos T TCR⁺/CD4⁺, expressava antigénios de activação tardia (CD57). Foram também observados valores aumentados de linfócitos T TCR⁺/CD4⁺, de linfócitos T TCR⁺ e de células NK em 17, 16 e 13 dos 28 casos estudados, respectivamente. O perfil de activação dos linfócitos T TCR⁺/CD4⁺ e dos linfócitos T TCR⁺ era semelhante ao descrito para os TCR⁺/CD8⁺, mas menos pronunciado, excepto para uma maior intensidade de expressão de CD5 e CD28 e uma ausência de expressão de CD11c nos linfócitos T TCR⁺/CD4⁺ e para níveis superiores de expressão de CD94 e CD161 nos linfócitos T TCR⁺. Para além disso, foram encontradas pequenas expansões de uma ou mais famílias TCR-V em 12 de 14 casos, representando em média 12 ± 7% dos linfócitos T TCR⁺/CD8⁺ ou dos linfócitos T TCR⁺/CD4⁺, enquanto a distribuição do repertório TCR-V/V, testada em apenas 2 indivíduos com expansão dos linfócitos T TCR⁺, foi semelhante à observada no grupo controlo.

Em resumo, os resultados aqui apresentados evidenciam uma activação extensa dos linfócitos T durante as infecções víricas agudas e estabelecem os perfis imunofenotípicos associados a esta condição.

3.1.4. ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DO REPERTÓRIO DE FAMÍLIAS DE REGIÕES VARIÁVEIS DA CADEIA BETA DO RECEPTOR DA CÉLULA T EM 98 EXPANSÕES PERSISTENTES DE LINFÓCITOS GRANULARES T CD3⁺/TCRab⁺: UTILIDADE NA AVALIAÇÃO DA CLONALIDADE E CONTRIBUTO PARA O ESCLARECIMENTO DA PATOGÊNESE DA DOENÇA.

O estudo do repertório TCR-V em pacientes com doenças linfoproliferativas crônicas (DLPC) de linfócitos grandes granulares T⁺ mostrou que estas compreendem um espectro vasto e contínuo de expansões persistentes de carácter policlonal, oligoclonal, ou monoclonal, que diferem no tipo e número de famílias TCR-V expandidas, bem como na magnitude das expansões encontradas.

De uma forma geral, foi demonstrada utilização preferencial de uma ou mais famílias em 96% dos casos: uma família em 71% e duas ou mais famílias em 23% dos casos. Nos casos monoclonais era maior a magnitude da maior expansão encontrada em cada indivíduo ($74 \pm 19\%$, por comparação com valores de $24 \pm 14\%$ para os casos não monoclonais), tal como era maior a fracção de linfócitos grandes granulares que apresentava um repertório TCR-V restrito ($86 \pm 16\%$ e $42 \pm 23\%$, respectivamente); pelo contrário, a fracção de casos com mais de uma expansão era maior no último grupo (7% vs. 48%, respectivamente).

Os resultados observados nos casos oligoclonais foram intermédios entre os obtidos nos casos policlonais e os obtidos nos casos monoclonais; a sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de monoclonalidade quando se consideraram como monoclonais os casos com uma expansão superior a 40% foram de 93% e 80%, respectivamente.

Estes resultados foram semelhantes para o grupo das DLPC de linfócitos grandes granulares T TCR⁺/CD4⁺ e para o grupo das DLPC de linfócitos grandes granulares T TCR⁺/CD8⁺, mas no caso das DLPC de linfócitos grandes granulares TCR⁺/CD8⁺ o tipo de famílias TCR-V expandidas mimetizava a frequência com que estas estavam representadas no sangue periférico normal, enquanto no caso das DLPC de linfócitos grandes granulares T TCR⁺/CD4⁺ havia uma expansão preferencial de um número restrito de famílias TCR-V .

3.2. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E BIOLÓGICA DE DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS POUCO CONHECIDAS

3.2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS, IMUNOFENOTÍPICAS E MOLECULARES DAS LINFOCIToses CRÓNICAS DE LINFÓCITOS GRANDES GRANULARES NK CD56^{-/+débil}

As doenças linfoproliferativas crónicas (DLPC) de células NK (DLPC-NK) incluem um grupo heterogéneo de doentes com expansões persistentes de células NK maduras no sangue periférico, tipicamente CD56⁺, na ausência de marcadores de clonalidade. Neste estudo, reportamos as características clínicas, hematológicas, imunofenotípicas, serológicas e moleculares de uma série de 26 doentes com linfocitose crónica de linfócitos grandes granulares NK, cujas células NK eram CD56⁻, ou expressavam níveis muito baixos de CD56 (células NK CD56^{-/+débil}), no contexto de um fenótipo maturo aberrante relacionado com activação celular.

Tal como as células NK CD56⁺ normais, as células NK CD56^{-/+débil} destes doentes eram granzima B⁺, CD3⁻, TCR α/β ⁻, CD5⁻, CD28⁻, CD11a^{+forte}, CD45RA^{+forte}, CD122⁺ e CD25⁻ e tinham uma expressão variável e heterogénea de CD8 e CD57. No entanto, estas células NK tinham outras características imunofenotípicas pouco habituais. Para além de serem CD56^{-/+débil}/CD11b^{-/+débil}, elas eram CD7^{-/+débil} (heterogéneo), CD2⁺ (homogéneo), CD11c^{+forte} (homogéneo) e CD38^{-/+débil} (heterogéneo). Para

além disso expressavam de forma heterogénea HLA-DR e eram CD45RO^{-/+débil}. No que diz respeito à expressão de receptores de morte celular, as células NK CD56^{-/+débil} apresentavam uma expressão forte e homogénea de CD94 e fraca e heterogénea de CD161, enquanto a expressão de CD158a e NKB1 era variável. Do ponto de vista funcional, as células NK CD56^{-/+débil} mostraram um padrão Th1 típico de produção de citocinas (IFN-⁺, TNF-⁺, IL4⁻, IL10⁻, IL13⁻).

Do ponto de vista clínico, estes doentes tinham habitualmente um curso indolente, tendo sido observada progressão da linfocitose em um caso. Apesar disso, as linfocitoses crónicas de linfócitos grandes granulares NK CD56^{-/+débil} associavam-se com frequência a citopenias, bem como a doenças neoplásicas e/ou infecções víricas.

Em resumo, descrevemos um grupo único e homogéneo de linfocitoses crónicas de células NK, com um perfil IF aberrante CD56^{-/+débil}/CD11b^{-/+débil} associado a activação celular, cujas manifestações clínicas mais relevantes se relacionam com citopenias, infecções e neoplasias associadas.

3.2.2. LINFOCITOSE DE LINFÓCITOS GRANDES GRANULARES T TCR⁺/CD4⁺: UMA NOVA DOENÇA LINFOPROLIFERATIVA T CLONAL

A leucemia de linfócitos grandes granulares T CD8⁺ é uma doença bem conhecida; em contraste, as expansões monoclonais de linfócitos grandes granulares T CD4⁺ só esporadicamente foram descritas na literatura.

Neste trabalho, investigamos durante um período de 56 meses a incidência das expansões monoclonais de linfócitos grandes granulares T CD4⁺ numa população de 2.2 milhões de habitantes e analisamos o imunofenótipo e o padrão de produção de citocinas numa série de 34 casos consecutivos.

Tal como as leucemias de linfócitos grandes granulares T CD8⁺, as leucemias de linfócitos grandes granulares T CD4⁺ são doenças com um curso clínico indolente; no entanto, ao contrário do que acontece no primeiro caso, os doentes com as leucemias de linfócitos grandes granulares T CD4⁺ não apresentam citopenias nem doenças autoimunes e têm com frequência outras neoplasias associadas, que usualmente determinam o curso clínico da doença. Os linfócitos grandes granulares T CD4⁺ monoclonais expressam TCR^β, níveis variáveis de CD8 (CD8^{-/+débil}) e apresentam um fenótipo de célula T citotóxica activada: granzima B⁺,

CD56⁺, CD57⁺, CD11b^{+/-}, CD2^{+forte}, CD7^{-/+débil}, CD11a^{+forte}, CD28⁻ CD62L⁻ e HLA-DR⁺. Para além disso, exibem um padrão de produção de citocinas de tipo Th1 (IFN-⁺⁺, TNF-⁺⁺, IL2^{+/+}, IL4⁻, IL10⁻, IL13⁻). A análise imunofenotípica do repertório de famílias de regiões variáveis da cadeia beta do TCR revelou grandes expansões, com representação de um número restrito de famílias de regiões variáveis da cadeia beta do TCR.

Estes resultados sugerem que as expansões monoclonais de linfócitos grandes granulares T TCR^β⁺/CD4⁺/NKα⁺/CD8^{-/+débil} representam um subgrupo de doenças linfoproliferativas crónicas de linfócitos grandes granulares monoclonais, diferentes das leucemias de linfócitos grandes granulares T CD8⁺ e das leucemias de linfócitos grandes granulares NK. Serão necessários estudos de seguimento mais prolongado para determinar o significado exacto destas doenças linfoproliferativas crónicas de linfócitos grandes granulares T (mono) clonais.

3.3. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS BEM ESTABELECIDAS

3.3.1. ÚTILIDADE DOS ESTUDOS IMUNOFENOTÍPICOS E DE QUANTIFICAÇÃO DO ADN CELULAR PARA O DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO SANGUE PERIFÉRICO NO SÍNDROME DE SEZARY CD4⁺.

Introdução e Objectivos: Os critérios exactos para identificação das células de Sezary no sangue periférico estão ainda pouco definidos.

Desenho e Métodos: Analisamos por citometria de fluxo o imunofenótipo e o conteúdo celular de ADN dos linfócitos T numa série de 18 casos consecutivos de Síndrome de Sezary, comparando-os com 21 indivíduos normais e 10 doentes com eritrodermia reactiva e correlacionando-os com os estudos morfológicos e moleculares.

Resultados: Foram detectados linfócitos T CD3⁺/TCR⁺/CD4⁺ com imunofenótipo aberrante em todos os doentes com Síndrome de Sezary mas em nenhum dos doentes com eritrodermia reactiva. Em alguns casos, co-existiam células de Sezary pequenas diplóides, ou menos frequentemente hipoplóides, com células de Sezary grandes, quase tetraplóides. As aberrações imunofenotípicas mais frequentes consistiram em uma diminuição de expressão de CD3/TCR (94%), CD4 (94%), CD7 (100%) e/ou CD2 (83%). Para além disso, as células de Sezary eram CD28⁺ e CD5⁺ e não

expressavam antigénios associados às células NK (NKa). Foi frequente a heterogeneidade fenotípica e foram frequentemente observadas modificações do perfil imunofenotípico das células de Sezary ao longo do tempo. Ao contrário do observado nos doentes com eritrodermia reactiva, a análise do repertório de famílias de regiões variáveis do TCR revelou uma expansão TCR-V em todos os casos de Síndrome de Sezary.

Interpretação e Conclusões: A presença de linfócitos T CD4⁺/CD28⁺/CD5⁺/NKa que expressam níveis anormalmente baixos de CD3, TCR, CD4, CD7 e/ou CD2 pode suportar o diagnóstico de Síndrome de Sezary em doentes com eritrodermia. Será necessário efectuar o estudo de uma série maior de doentes com Síndrome de Sezary com o objectivo de detectar padrões imunofenotípicos menos frequentes, de estabelecer a utilização preferencial de uma ou mais famílias TCR-V e de investigar a especificidade destas aberrações imunofenotípicas para o diagnóstico de Síndrome de Sezary.

DISCUSSÃO

Ao contrário do que se pensou durante muitos anos, em que o termo “neoplasia de células T ou NK” era quase sinónimo de doença clinicamente agressiva, sabe-se actualmente que muitas DLP-T e -NK apresentam um comportamento clínico indolente. Deve-se este avanço do conhecimento à capacidade actual para detectar muitos processos linfoproliferativos destas células que antes não eram diagnosticados ou que o eram apenas em fases tardias e avançadas da doença, já que algumas DLP-T e NK com comportamento clínico indolente podem assumir, ao fim de um período variável de tempo, um comportamento clínico agressivo, exigindo intervenção terapêutica. Este é um dos motivos pelos quais a identificação das DLPC-T e NK assume especial relevância, mesmo perante a ausência de manifestações clínicas à data do diagnóstico. Outro dos motivos pelos quais é importante o seu diagnóstico diferencial com processos reactivos relaciona-se com o facto das manifestações associadas às DLPC-T e -NK poderem assumir uma vertente fundamentalmente paraneoplásica; desta forma, só a correcta identificação de processos linfoproliferativos subjacentes a alguns quadros clínicos pouco esclarecidos pode permitir desenvolver a médio prazo as estratégias terapêuticas mais adequadas.

O primeiro passo na identificação de DLPC-T e NK consiste na demonstração da natureza clonal da população de CNK ou de LT expandidos. Uma vez confirmada a monoclonalidade da DLP, o interesse centra-se na sua classificação, com o objectivo último de compreender o seu comportamento clínico-biológico, prever a sua evolução e definir o tipo de atitude – observação ou intervenção terapêutica – que deve ser tomada.

Ainda que hoje disponhamos de métodos de estudo de clonalidade T e NK baseados em técnicas moleculares ou citogenéticas, com relativa frequência estas não são aplicáveis ou concludentes, ou não estão disponíveis de forma imediata.

Nas últimas décadas temos assistido à publicação de um número cada vez maior de trabalhos em que se mostra que, de forma quase universal, as células B neoplásicas expressam fenótipos aberrantes.³⁵⁵ Estas alterações fenotípicas no padrão de expressão de proteínas celulares nas células tumorais são habitualmente o reflexo das alterações genéticas subjacentes, de tal forma que doentes com alterações genéticas idênticas mostram fenótipos aberrantes semelhantes nas suas células neoplásicas.^{356,357,358} Ao contrário do que tem sido descrito nas DLP-B, a informação disponível sobre a incidência e tipo de aberrações fenotípicas nas DLP-T e NK, assim como a sua utilidade para distinguir entre processos reactivos e neoplásicos de LT e CNK maduras e classificá-los, é escassa. Esta diferença tem uma relação muito próxima com a menor incidência das DLP-T e NK e a maior heterogeneidade

³⁵⁵ Sanchez ML e col (2002): Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia* 16: 1460-9

³⁵⁶ Orfao A e col (1999): The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-RARalpha gene rearrangements. *Haematologica* 84: 405-12

³⁵⁷ De Zen L e col (2000): Quantitative multiparametric immunophenotyping in acute lymphoblastic leukemia: correlation with specific genotype. I. ETV6/AML1 ALLs identification. *Leukemia* 14: 1225-31

³⁵⁸ Tabernero MD e col (2001): Adult precursor B-ALL with BCR/ABL gene rearrangements displays a unique immunophenotype based on the pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression. *Leukemia* 15: 406-14

dos LT e das CNK normais. Acresce ainda o menor interesse clínico despertado pelas doenças com comportamento clínico indolente, em relação àquelas que requerem uma intervenção terapêutica imediata.

Neste trabalho, o nosso primeiro objectivo consistiu em estabelecer as bases para a detecção imunofenotípica de expansões (mono) clonais de LT e de CNK neoplásicas e a sua distinção de processos reactivos.

Numa segunda fase, o nosso interesse centrou-se na caracterização fenotípica, funcional, clínica e biológica de subtipos concretos de DLPC-T e NK que, ainda que referidos ocasionalmente na literatura, eram quase desconhecidos até à data e no aprofundar dos conhecimentos sobre as características fenotípicas e biológicas de outras DLPC-T e NK cujas manifestações clínicas e histopatológicas eram já bem conhecidas.

Tais objectivos, tiveram sempre em mente um objectivo final que serviu de fio condutor a este trabalho: o de contribuir para aprofundar os conhecimentos dos mecanismos envolvidos na etiopatogenia e no comportamento clínico das DLPC-T e NK.

4.1. CRITÉRIOS FENOTÍPICOS PARA A DETECÇÃO DE CÉLULAS NK E DE LINFÓCITOS T NEOPLÁSICOS: PERFIL IMUNOFENOTÍPICO E REPERTÓRIO DE FAMÍLIAS DE REGIÕES VARIÁVEIS DAS CADEIAS DO TCR

O estudo fenotípico dos LT e das CNK normais, assim como a análise do repertório de famílias de regiões variáveis do TCR dos LT normais e das suas alterações em resposta à activação celular, em comparação com os estudos dos perfis imunofenotípicos dos LT e das CNK de indivíduos com expansões monoclonais ou não monoclonais (policlonais e oligoclonais) das mesmas células constituíram, neste trabalho, um pilar fundamental para definir critérios imunofenotípicos úteis para estabelecer (mono) clonalidade e identificar LT e CNK neoplásicas.

4.1.1. PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DAS CÉLULAS NK E DOS LINFÓCITOS T NORMAIS ACTIVADOS

O estudo fenotípico exaustivo das subpopulações de CNK – CD56⁺ e CD56⁺⁺ – e de LT TCR⁺ – CD4⁺ e CD8⁺ – no SP de indivíduos saudáveis e das alterações que estas células sofrem em resposta à activação celular (*Lima M e col., 2001-Art.17; Lima M e col., 2002-Art.21; Lima M e col. 2003-Art.28*) em conjunto com outros estudos que foram entretanto publicados,^{359,360,361} permitiram-nos, não só compreender melhor a fisiopatologia das CNK e dos LT, como estabelecer critérios IF de (mono) clonalidade, criando as bases para identificar e poder caracterizar especificamente as CNK e os LT neoplásicos.

No pressuposto de que a identificação de perfis clono-fenotípicos das CNK e dos LT deve ter como termo comparativo o perfil IF das células linfóides normais, de tipo idêntico, no mesmo estadio maturativo, com a localização

tecidual e no estadio de activação correspondentes, identificamos modelos que permitissem estabelecer a sequência das modificações IF que ocorrem, de uma forma paulatina no tempo, após activação das CNK e dos LT maduros do SP.

Assim, com base na caracterização fenotípica das CNK CD56⁺ e CD56⁺⁺ do SP, no estudo das alterações IF das CNK CD56⁺ que preferencialmente expandem em condições em que é pressuposto existir activação das CNK “*in vivo*”, tal como nas infecções víricas agudas, nas infecções crónicas e nas neoplasias e na informação disponível na literatura sobre este assunto, criamos um MODELO DINÂMICO das alterações fenotípicas que ocorrem após activação das CNK, definindo uma FASE PRECOCE (estímulo agudo) e uma FASE TARDIA (estímulo crónico) de activação celular (*Lima M e col., 2001 - Art.17; Lima M e col., 2002 - Art.21*).

De uma forma muito sumária, podemos dizer que algumas modificações fenotípicas, tais como a expressão de HLA-DR e de CD45RO, o aumento de expressão de CD11a, CD11c e CD38 e a diminuição de expressão de CD11b, CD45RA e CD57 são alterações relativamente PRECOCES após activação das CNK,

³⁵⁹ Sedlmayr P e col (1996): Differential phenotypic properties of human peripheral blood CD56dim and CD56bright natural killer cell subpopulations. *Int Arch Allergy Immunol* 110: 308–13

³⁶⁰ Cooper MA e col (2001): Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. *Blood* 97: 3146–51

³⁶¹ Jacobs R e col (2001): CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 31: 3121–7

algumas das quais regridem (como a expressão de HLA-DR e a co-expressão de CD45RO), outras das quais tendem a acentuar-se (como a diminuição de CD11b), e outras ainda sofrem modificações opostas (como é o caso do CD38, cuja expressão, depois de um aumento transitório, diminui; do CD57 que, diminuindo numa fase inicial, vai aumentar numa fase tardia; e do CD11c que tem o comportamento oposto). Nesta fase precoce de activação, a expressão de CD7 não sofre grandes modificações e as alterações de expressão de CD2 consistem sobretudo num aumento da fracção de CNK que expressam esta molécula.

Numa fase mais TARDIA do processo de activação celular, em que as CNK já expressam de forma débil CD11b e CD38, e em que na maioria dos casos já diminuiu significativamente a expressão de HLA-DR e de CD45RO na membrana, é evidente como a expressão de CD2 se torna homogénea, ao mesmo tempo que diminui e se torna heterogénea a expressão de CD7. Neste estadió de activação tardia, encontramos fundamentalmente CNK que expressam CD57 com intensidade relativamente forte e homogénea, e que mostram co-expressão variável, débil e heterogénea de CD11c.

Da mesma forma, criamos um MODELO DINÂMICO das modificações que presumivelmente ocorrem, de uma forma sequencial no tempo, no fenótipo dos LT, após a activação, definindo uma FASE PRECOCE (estímulo agudo) e uma FASE TARDIA (estímulo crónico) de activação celular (*Lima M e col. 2003-Art.28*).

Curiosamente, as modificações fenotípicas que ocorrem nos LT TCR⁺/CD8⁺ são muito

semelhantes às que ocorrem nos LT TCR⁺/CD4⁺; por sua vez, são também muito semelhantes às que descrevemos nas CNK, pondo uma vez mais em evidência o que estas células têm em comum do ponto de vista da sua ontogenia e das suas características funcionais.

Pode ser argumentado que a sequência que propomos carece de demonstração formal. Que seria, obviamente, interessante efectuar estudos seriados no tempo no mesmo indivíduo, a diferentes tempos após a intercorrência infecciosa, ou ainda obter informação complementar com o estudo IF sequencial dos LT e das CNK após estimulação “in vitro”.

Existem, apesar de tudo, alguns argumentos fortes a favor de que os modelos que propomos correspondem, de facto, às alterações que ocorrem “in vivo”: 1) As alterações fenotípicas das CNK são muito semelhantes às encontradas nos LT, sendo interessante constatar que, num e noutro caso, ocorre aumento de expressão de CD2 e diminuição de expressão de CD7 e que o aumento de expressão de HLA-DR, CD38 e CD45RO, bem como a expressão débil e heterogénea de CD11c acontecem em fases relativamente precoces de activação; da mesma forma que a expressão de CD57, ocorre em fases tardias; 2) as alterações propostas estão de acordo com os dados publicados na literatura, baseados em estudos de activação celular “in vitro”; 3) o estudo do IF dos LT de 31 doentes com mononucleose infecciosa separados em grupos conforme o tempo decorrido após o início da sintomatologia (< 1 semana, 2-3 semanas e 4-10 semanas), apoia inteiramente o modelo sugerido para os LT (resultados não apresentados).

Por outro lado, os modelos propostos têm sido validados pela aplicação clínica diária, ao longo de pelo menos três anos, tendo ao longo deste tempo demonstrado uma grande utilidade na interpretação de resultados obtidos no estudo de produtos biológicos potencialmente patológicos e contribuído para a identificação, caracterização e, acima de tudo, compreensão da biologia da célula linfóide neoplásica. O testemunho deste último aspecto é dado pelo facto do conhecimento do perfil fenotípico das CNK e dos LT normais e das alterações consequentes à activação celular subjacentes aos modelos propostos, nos terem permitido identificar numerosos casos de DLP-T e NK, entre os quais os dois tipos particulares de DLPC de LGL que descrevemos e que discutiremos mais adiante neste trabalho.

4.1.2. REPERTÓRIO DE FAMÍLIAS DE REGIÕES VARIÁVEIS DO RECEPTOR DA CÉLULA T NOS LINFÓCITOS T

O conhecimento do repertório TCR-V dos LT do SP de indivíduos normais e da forma como ele se distribui nos LT TCR⁺/CD4⁺ e nos LT TCR⁺/CD8⁺ (Lima M e col. 2001 – Art.16) e os estudos que realizamos sobre o repertório TCR-V em doentes com expansões persistentes de LGL-T (Lima M e col. 2001 – Art.16) foram de importância fundamental para a interpretação dos estudos do repertório TCR-V em DLP-T. No trabalho em que procedemos ao estudo do repertório TCR-V nos LT TCR⁺/CD8⁺ ou TCR⁺/CD4⁺ de doentes com aumento persistente de LGL-T TCR⁺/CD8⁺ ou TCR⁺/CD4⁺ no SP, respectivamente, verificamos que estas compreendiam um espectro

vasto e contínuo de expansões de carácter policlonal, oligoclonal, ou monoclonal, que diferiam no tipo e número de famílias TCR-V expandidas, bem como na magnitude das expansões encontradas, sendo possível prever o carácter monoclonal com base na magnitude da expansão TCR-V .

De uma forma geral, este e outros estudos que efectuamos e que serão abordados de forma mais detalhada no decorrer deste trabalho, mostraram que nas expansões não monoclonais de LT, o repertório TCR-V tem uma distribuição semelhante ao do repertório TCR-V dos LT TCR⁺ do SP normal ou apresenta pequenas expansões de uma, ou frequentemente mais de uma, família TCR-V que raramente excedem 40% do compartimento celular analisado, ao contrário do que acontece nas expansões monoclonais.

Considerando que uma expansão de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ ou TCR⁺/CD8^{forte} é monoclonal sempre que a expansão identificada excede 40% dos TCR⁺/CD4⁺ ou TCR⁺/CD8^{forte}, obtivemos uma sensibilidade de 93% e um valor preditivo de 89%, para o diagnóstico de monoclonalidade, com uma especificidade e um valor preditivo positivo de 80 e 87%, respectivamente. Aumentando o limite para 60%, tanto a especificidade como o valor preditivo positivo aumentaram para 100%, à custa de uma menor especificidade (81%) e valor preditivo negativo (78%).

Já o estudo equivalente para os LT⁺, isto é o estudo das famílias de regiões variáveis das cadeias α e β do TCR por CF, se mostrou, segundo a nossa experiência, de utilidade mais limitada para o diagnóstico de mono-

clonalidade das expansões de LT TCR⁺ (resultados não apresentados). Deve-se esta limitação ao facto da maioria dos LT TCR⁺ do SP de indivíduos adultos expressarem quase exclusivamente (> 90%) as famílias V 2 / V 9, presentes também numa proporção importante de DLPC-T TCR⁺.

4.1.3. AVALIAÇÃO SIMULTÂNEA DO PERFIL IMUNOFENOTÍPICO E DO REPERTÓRIO DE FAMÍLIAS DE REGIÕES VARIÁVEIS DO RECEPTOR DA CÉLULA T NOS LINFÓCITOS T

A utilização simultânea de AcMo específicos para famílias TCR-V concretas e de AcMo específicos para outros Ag celulares aumenta de forma notória a capacidade de identificar expansões (mono) clonais de LT neoplásicos. Assim, hoje sabemos que quando o perfil clono-fenotípico do LT neoplásico é conhecido, esta estratégia permite identificar a família TCR-V expressa pelos LT neoplásicos mesmo quando a sua representação é muito escassa. Por outro lado, uma vez identificada a família TCR-V expressa pelos LT neoplásicos, a mesma estratégia permite efectuar estudos de reavaliação após terapêutica ou de pesquisa de doença mínima, com recurso a um número restrito de AcMo.

Finalmente, perante um repertório T com distribuição anormal, esta forma de abordagem permite caracterizar os LT que expressam as famílias TCR-V expandidas e ajuizar sobre a sua clonalidade, perfil IF e características funcionais.

Esta estratégia, optimizada pela disponibilidade recente de reagentes comercializados que combinam em duas fluorescências AcMo espe-

cíficos para três famílias TCR-V,³⁶² tem revelado grande utilidade no estudo de casos individuais de doentes com DLP-T, como o demonstram alguns trabalhos que apresentamos ou publicamos (*Granjo E e col. 2002 – Art.18; Granjo E e col, 2002 – Art.22*).

³⁶² van den Beemd R e col (2000): Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls. *Cytometry* 40: 336-45

4.2. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E BIOLÓGICA DE DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS T E NK POUCO CONHECIDAS: DESCRIÇÃO DE NOVAS ENTIDADES.

Tal como tivemos oportunidade de dizer anteriormente, é conhecida desde há longa data a existência de expansões monoclonais de origem T e NK. Enquanto as leucemias de LGL-T têm geralmente origem nos LT TCR⁺/CD8⁺, nas linfocitoses clonais NK as células neoplásicas são habitualmente CD56⁺. No entanto, nos últimos anos têm sido referidos na literatura, de forma esporádica, doentes com expansões monoclonais de LGL-T TCR⁺/CD4⁺, e, mais raramente, de CNK CD56^{-/+débil}. Trata-se de publicações de casos individuais ou de pequenas séries que com frequência incluem casos monoclonais e casos com características pouco definidas. Desta forma, não se conheciam em profundidade até à data as características biológicas das expansões monoclonais de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ e de LGL-NK CD56^{-/+débil} e as manifestações clínicas a elas associadas, tendo sido este um dos objectivos primordiais deste trabalho.

4.2.1. DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS DE LINFÓCITOS GRANDES GRANULARES NK CD56^{-/+DÉBIL}

4.2.1.1. Frequência

Dado que as DLPC de LGL-NK CD56^{-/+débil} correspondem a uma fracção apreciável dos casos de DLPC de LGL-NK estudados por nós entre 1997 e 2003, é de estranhar que, até ao momento, esta entidade não tenha sido descrita, embora casos semelhantes possam ser encontrados na literatura, usualmente referidos como curiosidades,^{363,364,365} incluídos nas séries

previamente publicadas,³⁶⁶ ou utilizados para estabelecer linhas celulares.³⁶⁷

Vários motivos poderão explicar esta discrepância. Por um lado, os critérios IF habitualmente utilizados para definir uma DLPC-NK são muito simplistas – *i.e.*, expansões persistentes de linfócitos CD3⁻ que expressam CD16 e/ou CD56⁻, sem que se investigue em detalhe o perfil IF das CNK expandidas. Assim, é altamente provável que as séries de doentes com DLPC-NK previamente publicadas incluam casos CD56^{-/+débil} sem que estes tenham sido identificados. Por outra parte, os estudos aqui apresentados foram realizados em centros de referência, para onde são provavelmente enviados preferencialmente os casos com características IF pouco comuns. Por este motivo, é possível que a frequência das

³⁶³ Orange JS e col (2001): Decreased natural killer (NK) cell function in chronic NK cell lymphocytosis associated with decreased surface expression of CD11b. Clin Immunol 99: 53-64

³⁶⁴ Manteiga R e col (2000): CD3⁻ large granular lymphocytic leukemia with clonal rearrangement of the α and β genes of the Tcell receptor. Haematologica 85: 879-80

³⁶⁵ Adachi A e col (2002): Hypersensitivity to mosquito bites in association with chronic Epstein-Barr virus infection and natural killer (NK) leukaemia/lymphoma with expansion of NK cells expressing a low level of CD56. Br J Dermatol 147: 1036-7

³⁶⁶ Mori KL e col (2001): Differentiation stages of natural killer cell lineage lymphoproliferative disorders based on phenotypic analysis. Br J Haematol 115: 225-8

³⁶⁷ Scott-Algara D e col (2001): Establishment of long-term cell lines from 2 patients with large granular lymphocyte lymphocytosis displaying an unusual phenotype. Nouv Rev Fr Hematol 33: 237-43

DLP de LGL-NK CD56^{-/+débil} esteja parcialmente sobrestimada na série de doentes que apresentamos.

4.2.1.2. Perfil imunofenotípico

Para além de uma expressão deficiente de CD56, as LGL-NK CD56^{-/+débil} mostraram outras características IF pouco habituais, se comparadas com as CNK CD56⁺ do SP normal e que podem, por isso, ser consideradas como “aberrações fenotípicas” (Lima M e col., 2001 - Art. 17). São exemplos, o aumento de expressão de CD2, CD11c, CD94 e HLA-DR e a diminuição acentuada da expressão de CD7, CD11b e, mais raramente, de CD16 e/ou CD38. No entanto, algumas destas características fenotípicas, de carácter aparentemente aberrante, tal como a expressão de HLA-DR, a co-expressão de CD45RA e CD45RO e o aumento de expressão de CD11c, reproduzem, de facto, as modificações fenotípicas que ocorrem em fases precoces de activação das CNK; do mesmo modo, outras, tal como a expressão aumentada e muito homogénea de CD2 e a expressão diminuída e heterogénea de CD7, CD11b e CD38, são tipicamente observadas apenas em situações de estimulação persistente destas células (Lima M e col., 2002 - Art. 21).

Existem, para além disso, duas alterações muito óbvias: a deficiência de CD11b é muito mais pronunciada do que o usualmente observado em situações de estimulação crónica / tardia e a expressão de CD11c é claramente superior e mais homogénea do que é habitualmente observado em ambas as situações de estimulação das CNK.

No seu conjunto, estas alterações sugerem que as CNK destes indivíduos foram ou estão a

ser sujeitas a um estímulo, mas que o seu padrão maturativo é anormal.

Uma observação curiosa da análise do IF das CNK CD56^{-/+débil} é o facto de as duas moléculas em que estas CNK apresentam uma deficiência mais evidente – o CD11b e o CD56 – serem ambas moléculas de adesão e, ao contrário de outras moléculas de adesão em que estas CNK não são deficientes (CD11a e CD11c), serem, também ambas, glicoproteínas (Gp).^{368, 369}

A diminuição de expressão de CD57, também observada nas CNK CD56^{-/+débil}, pode ter relação com a diminuição destas Gp, já que o CD57 é um trissacarídeo sulfatado expresso nas Gp por acção de uma enzima com actividade de glucoroniltransferase, que transfere estes trissacarídeos para os resíduos de ácido siálico de diferentes Gp de membrana.³⁷⁰ A própria molécula do CD56 apresenta resíduos de ácido siálico e pode, pois, expressar epítopes do CD57.

A coexistência destas alterações nas mesmas células define, provavelmente, pelo seu assincronismo, um perfil fenotípico aberrante associado a uma neoplasia. Como veremos mais adiante, as características IF aberrantes apresentadas por estas CNK podem ser de uma importância fundamental para compreender o comportamento clínico-biológico e a etiopatogenia da doença.

³⁶⁸ Lanier LL e col (1991): Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56) J Immunol 146: 4421-6

³⁶⁹ Corbi AL e col (1988): The human leukocyte adhesion glycoprotein Mac-1 (complement receptor type 3, CD11b) alpha subunit. Cloning, primary structure, and relation to the integrins, von Willebrand factor and factor B. J Biol Chem 263: 12403-11

³⁷⁰ Terayama K e col (1997): Cloning and functional expression of a novel glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the carbohydrate epitope HNK-1. Proc Natl Acad Sci USA 94: 6093-8

4.2.1.3. Características clínico-biológicas

Os dados clínicos dos doentes estudados tornam muito claros os seguintes aspectos: 1) Esta DLP tem uma expressão quase exclusivamente leucémica, praticamente sem infiltração de órgãos ou tecidos (quase inexistência de organomegalias); 2) há uma forte associação com doenças víricas; 3) é frequente a existência de outras neoplasias; 4) tal como nas leucemias de LGL-T TCR⁺/CD8⁺, é muito clara a associação com citopenias de causa presumivelmente imune ou desconhecida; 5) da mesma forma, é comum a disgamaglobulinemia, mais frequentemente hipergamaglobulinemia, bem como a presença de auto-anticorpos séricos, nomeadamente de actividade de factor reumatóide sem que, no entanto, se observe uma associação evidente com artrite reumatóide; 6) uma fracção importante dos doentes tem história prévia de esplenectomia; 7) a maioria dos problemas clínicos resulta das citopenias e/ou de patologias associadas e são geralmente estas que condicionam o curso clínico; 8) estes doentes não apresentam manifestações clínicas que foram previamente associadas às linfocitoses crónicas de CNK, tais como febre de causa desconhecida e vasculite.

As alterações da imunidade humoral, traduzidas pela hipergamaglobulinemia, por vezes com desequilíbrio da razão IgG/IgM e pela detecção de auto-anticorpos circulantes, podem ter uma relação directa com a actividade funcional das CNK, já que alterações deste tipo foram previamente descritas em associação com linfocitoses crónicas de CNK e DLPC de

LGL em geral;³⁷¹ provavelmente estas alterações estão relacionadas com a produção pelas CNK de citocinas e outros mediadores celulares capazes de estimular os LB, incrementando a sua proliferação e a síntese de Igs.^{372,373}

Curiosamente, ao contrário do que é habitual observar nas DLPC com comportamento indolente e com uma massa tumoral reduzida (manifestada, neste caso por uma linfocitose moderada e pela ausência de organomegalias), uma fracção importante dos doentes com leucemia de LGL-NK CD56^{-/+débil} apresentava níveis séricos aumentados de β_2 -microglobulina e de desidrogenase láctica (DHL).

No que se refere às citopenias encontradas numa proporção importante destes doentes, merece menção o facto de estas poderem ter um vasto espectro de apresentação, desde citopenias crónicas moderadas e não problemáticas do ponto de vista clínico até citopenias severas que põem em risco a vida, passando por episódios de anemia, neutropenia ou trombocitopenia mais ou menos profundas, com evolução auto-limitada e recuperação espontânea ou em resposta ao tratamento com imunossuppressores.

Em relação à evolução clínica, há que ter em atenção a possibilidade destas DLP evoluírem, ao fim de um período variável de tempo para DLP mais agressivas. O facto de um dos doentes por nós observados (curiosamente um dos que tem um período de seguimento mais

³⁷¹ Bassan R e col (1989): Autoimmunity and B-cell dysfunction in chronic proliferative disorders of large granular lymphocytes/natural killer cells. *Cancer* 63: 90-5

³⁷² Procopio ADG e col (1985): Non-cytotoxic functions of natural killer cells: Large granular lymphocytes produce a B-cell growth factor (BCGF). *J. Immunol* 135: 3264-71

³⁷³ Yuan D e col (1994): Interactions between B lymphocytes and NK cells. *FASEB J* 8: 1012-8

longo) apresentar actualmente evidência de progressão da linfocitose e de terem sido descritos casos de linfocitoses NK com comportamento indolente que, ao fim de um período variável de tempo, evoluíram para DLP mais agressivas apoiam esta hipótese.^{374,375,376} Em alguns destes casos foram detectadas anomalias cromossómicas adicionais à data de transformação da doença, sugerindo que o curso clínico maligno dependeu de um evento oncogénico adicional,³⁷⁷ e noutros casos, da reactivação de uma doença vírica.³⁷⁸ Só o tempo poderá testar esta hipótese, ao permitir um seguimento mais prolongado destes doentes.

Tendo em consideração os nossos resultados, estas expansões de LGL-NK CD56^{-/+dim}, aberrantes mas clinicamente benignas, devem ser encaradas como doenças com evolução clínica incerta e potencialmente maligna.

4.2.1.4. Reflexões sobre o comportamento clínico-biológico e a etiopatogenia da doença.

Os resultados obtidos – perfil IF aberrante mas sugestivo de activação das CNK, deficiência profunda de Gp envolvidas na adesão celular e citotoxicidade, associação com infecções víricas e/ou tumores – levam-nos à formulação de algumas HIPÓTESES para explicar as manifestações clínico-biológicas e a etiopatogenia destas DLPC de LGL-NK CD56^{-/+débil}.

³⁷⁴ De Lord C e col (1998): Aggressive NK cell lymphoma preceded by a ten-year history of neutropenia associated with large granular lymphocyte lymphocytosis. *Leuk Lymphoma* 31: 417-21

³⁷⁵ Matsubara A. e col (1994): Acute transformation of chronic large granular lymphocyte leukemia into an aggressive form associated with preferential organ involvement. *Acta Haematol* 91: 206-10

³⁷⁶ Ohno T e col (1988): Fulminant clonal expansion of large granular lymphocytes. Characterization of their morphology, phenotype, genotype, and function *Cancer* 62: 1918-27

³⁷⁷ Ohno Y e col (1989): Acute transformation of chronic large granular lymphocyte leukemia associated with additional chromosome abnormality. *Cancer* 64: 63-7

³⁷⁸ Tagawa S e col (1992): Transformation of large granular lymphocytic leukemia during the course of a reactivated human herpesvirus-6 infection. *Leukemia* 6: 465-9

4.2.1.4.a) Comportamento clínico-biológico

Expressão leucémica

O CD56, é uma molécula da superfamília das Igs, expressa em células do sistema nervoso, nas CNK e em subpopulações de LT citotóxicos.^{379,380} Ao nível do sistema nervoso, participa na adesão homofílica e heterofílica indispensável ao desenvolvimento neuronal.³⁸¹ Também é expresso numa grande variedade de tumores não hematológicos^{382,383,384} e hematológicos,^{385,386} incluindo alguns linfomas e leucemias T³⁸⁷ (*Lima M e col., 2003 – Art. 26*) e parece ter um papel importante na biologia das células tumorais.³⁸⁸ Por exemplo, a expressão forte de CD56 é uma característica típica dos plasmócitos do mieloma múltiplo, que infiltram a MO^{389,390,391} (*Lima M e col., 2000 - Art.13*) e a ausência

³⁷⁹ Lanier LL e col (1989): Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 69: 2233-8

³⁸⁰ Hercend T e col (1985): Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J Clin Invest* 75: 932-43

³⁸¹ Rutishauser U e col (1983): Neural cell adhesion molecule mediates initial interactions between spinal cord neurons and muscle cells in culture. *J Cell Biol* 97: 145-52

³⁸² Mechtersheimer G e col (1992): Expression of the natural killer (NK) cell-associated antigen CD56 (Leu-19), which is identical to the 140kDa isoform of N-CAM, in neural and skeletal muscle cells and tumors derived therefrom. *Ann N Y Acad Sci.* 650: 311-6

³⁸³ Miettinen M e col (1993): Neural cell adhesion molecule distribution in soft tissue tumors. *Hum Pathol* 24: 62-6

³⁸⁴ Pasini F e col (1995): Detection at diagnosis of tumor cells in bone marrow aspirates of patients with small-cell lung cancer (SCLC) and clinical correlations. *Ann Oncol* 6: 86-8

³⁸⁵ Raspadori D e col (2002): CD56 and PGP expression in acute myeloid leukemia: impact on clinical outcome. *Haematologica* 87: 1135-40

³⁸⁶ Petrella T (2002): 'Agranular CD4+ CD56+ hematodermic neoplasm' (blastic NK-cell lymphoma) originates from a population of CD56+ precursor cells related to plasmacytoid monocytes. *Am. J Surg Pathol* 26: 852-62

³⁸⁷ Cooke CB e col (1996): Hepatosplenic T-cell lymphoma: a distinct clinicopathologic entity of cytotoxic gamma delta T-cell origin. *Blood* 88: 4265-74

³⁸⁸ Zeromski J e col (2001): Significance of cell adhesion molecules, CD56/NCAM in particular, in human tumor growth and spreading. *Folia Histochem Cytobiol* 39(Suppl 2): 36-7

³⁸⁹ Garcia-Sanz R e col (1996): Analysis of natural killer-associated antigens in peripheral blood and bone marrow of multiple myeloma patients and prognostic implications. *Br J Haematol* 93: 81-8

³⁹⁰ Ocqueteau M e col (1998): Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol* 152: 1655-65

³⁹¹ Almeida J e col (1999): Immunophenotypic and DNA content characteristics of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Pathol Biol* 47: 119-27

de expressão de CD56 correlaciona-se com a leucemização dos plasmócitos malignos.^{392,393}

O CD57, tal como o CD56, é expresso em células do sistema nervoso, em células tumorais, nas CNK e em subpopulações de LT e parece ter funções na adesão entre as células, mediada por interações de tipo hemofílico (CD57/CD57) ou hemofílico (CD57/L-selectina).^{394,395,396,397}

Finalmente, também o CD11b parece desempenhar importantes funções de adesão entre as células e entre as células e a matriz extra-celular através da interação com os seus ligandos: CD54, CD102, fibrinogénio e C3bi.^{398,399,400,401}

Desta forma, a expressão deficiente de CD11b, CD56 e CD57 pode explicar, pelo menos em parte, a linfocitose e a tendência das CNK CD56^{-/+débil} para circularem no SP, com infiltração mínima de outros órgãos e tecidos.

Uma explicação alternativa (ou cumulativa) para a linfocitose, seria a existência de um bloqueio da apoptose das CNK resultante da progressão anormal destas CNK no processo de activação/diferenciação que usualmente ocorre após estimulação e cujo desfecho é a morte das células senescentes. A deficiência de CD57 pode de alguma forma estar envolvida neste processo, dado que estudos previamente publicados demonstraram que o CD57 é expresso numa fase tardia de activação dos LT e que os LT CD8⁺/CD57⁺ são células apoptóticas,^{402,403,404} da mesma forma que nós demonstramos que a estimulação crónica das CNK em indivíduos com neoplasias se associa à hiper-expressão de CD57 e outros autores verificaram que estas CNK são apoptóticas.⁴⁰⁵

A fracção de doentes com DLPC de LGL-NK CD56^{-/+débil} que tinham história de esplenectomia prévia é provavelmente superior à esperada se a associação fosse meramente casual. Embora não existam estudos publicados sobre o papel do baço na remoção de CNK, é possível que – de forma semelhante ao observado com os neutrófilos⁴⁰⁶ e com os eritrócitos⁴⁰⁷ – este órgão tenha um papel relevante na remoção das CNK senescentes; esta ideia é ainda apoiada pelos relatos de linfocitoses de LGL-T e NK em indivíduos

³⁹² Pellat-Deceunynck C e col (1998): The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma. *Leukemia* 12: 1977-82

³⁹³ Sahara N e col (2002): Clinicopathological and prognostic characteristics of CD56-negative multiple myeloma. *Br J Haematol* 117: 882-5

³⁹⁴ Koros AM e col (2002): "Natural killer" (NK) cell antigens CD56, CD57 and others are expressed on breast and lung tumor cells as well as sea urchin coelomocytes. *J Biol Regul Homeost Agents* 16: 173-5

³⁹⁵ Abo T e col (1982): Characterization of HNK-1+ (Leu-7) human lymphocytes. I. Two distinct phenotypes of human NK cells with different cytotoxic capability. *J Immunol* 129: 1752-7

³⁹⁶ Griffith LS e col (1992): L2/HNK-1 carbohydrate and protein-protein interactions mediate the homophilic binding of the neural adhesion molecule P0. *Neurosci Res* 33: 639-48

³⁹⁷ Needham LK, e col (1993): The HNK-1 reactive sulfoglu-curonyl glycolipids are ligands for L-selectin and P-selectin but not E-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1359-63

³⁹⁸ Sanchez-Madrid e col (1983): A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule. *J Exp Med* 158: 1785-803

³⁹⁹ Allavena P e col (1991): Molecules and structures involved in the adhesion of natural killer cells to vascular endothelium. *J Exp Med* 173: 439-48

⁴⁰⁰ Ross GD e col (1993): CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin Exp Immunol* 92: 181-4

⁴⁰¹ Ross GD (2000): Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein. *Crit Rev Immunol* 20: 197-222

⁴⁰² d'Angeac AD e col (1994): CD57+ T lymphocytes are derived from CD57-precursors by differentiation occurring in late immune responses. *Eur J Immunol* 24: 1503-11

⁴⁰³ Lewis DE e col (1994): Anergy and apoptosis in CD8+ T cells from HIV-infected persons. *J Immunol* 153: 412-20

⁴⁰⁴ Brenchley JM e col (2003): Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* 101: 2711-20

⁴⁰⁵ Bauernhofer T e col (2003): Preferential apoptosis of CD56dim natural killer cell subset in patients with cancer. *Eur J Immunol* 33: 119-24

⁴⁰⁶ Shi J e col (1996): Apoptosis of neutrophils and their elimination by Kupffer cells in rat liver. *Hepatology* 24: 1256-63

⁴⁰⁷ Bennett GD e col (1981): Homeostatic removal of senescent murine erythrocytes by splenic macrophages. *Exp Hematol* 9: 297-307

esplenectomizados;^{408, 409, 410} de referir, a este propósito que, embora na maioria dos casos previamente publicadas não tenha sido efectuado um estudo IF detalhado das CNK dos indivíduos esplenectomizados, a nossa experiência indica que, tal como as CNK do SP de indivíduos saudáveis, as CNK destes indivíduos expressam CD56 (*Granjo E e col., 1999 - Art.12; Granjo E e col., 2002 - Art.23*).

Desta forma, e embora não tenhamos efectuado o estudo IF das CNK pré-esplenectomia em nenhum dos casos incluídos na série de doentes com DLPC de LGL-NK CD56^{-/+débil} que apresentamos, é provável que as CNK CD56^{-/+débil} já existissem antes da esplenectomia e que o estado de asplenia tenha favorecido a sua circulação, em consequência do distúrbio induzido no “homing” dos linfócitos, ou, alternativamente, na eliminação de linfócitos senescentes ou anormais.

Associação com outras neoplasias

A deficiência destas Gp – CD11b, CD56 e CD57 – também pode condicionar disfunção das CNK, com diminuição da sua actividade citotóxica, o que poderia contribuir para explicar a grande incidência de outras neoplasias nestes indivíduos.⁴¹¹ Salienta-se, a este respeito, o papel do CD56 na adesão das CNK às células-alvo e na indução da sua apoptose^{412, 413}

⁴⁰⁸ Kelemen E e col (1986): Permanent large granular lymphocytosis in the blood of splenectomized individuals without concomitant increase of in vitro natural killer cell cytotoxicity. *Clin Exp Immunol* 63: 696-702

⁴⁰⁹ Airo P e col (1988): Lymphocytosis of large granular lymphocytes in splenectomized subjects. *Boll Ist Sieroter Milan* 67: 290-4

⁴¹⁰ Garcia-Suarez J e col (1995): Persistent lymphocytosis of natural killer cells in autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP) patients after splenectomy. *Br. J. Haematol* 89: 653-5

⁴¹¹ Kornbluth J e col (1985): Human natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes require cell surface carbohydrate determinants for lytic function. *Cell Immunol* 95: 276-87

⁴¹² Lanier LL e col (1991): Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol* 146: 4421-6

e a intervenção do CD11b no processo de lise celular.^{414, 415, 416, 417, 418}

Embora não tivéssemos oportunidade de estudar a actividade citotóxica das CNK CD56^{-/+débil}, a produção de citocinas tipo Th1 pelas CNK de alguns doentes com DLPC-NK CD56⁺ era diminuída por comparação com a observada nas DLPC-NK CD56⁺ (**Anexo 1, Figura 1**). Por outro lado, em um caso previamente descrito na literatura de linfocitose crónica de CNK deficientes em CD11b (provavelmente idêntico aos casos aqui descritos) foi documentada também actividade citotóxica deficiente.⁴¹⁹

Associação com citopenias

O mecanismo exacto que justifica a associação de citopenias às DLPC de LGL-NK CD56^{-/+débil} não é conhecido. A possibilidade delas resultarem da infiltração leucémica da MO é improvável dado que as citopenias são frequentemente selectivas e a sua severidade não se correlaciona com a gravidade da infiltração medular, que é geralmente mínima (embora os estudos por CF documentem geralmente a presença de CNK CD56^{-/+débil} na MO, a infiltração medular não é frequentemente detectável na biópsia óssea). Por outro lado, é clara a existência de critérios clínicos e

⁴¹³ Takasaki S e col (2000): CD56 directly interacts in the process of NCAM-positive target cell killing by NK cells. *Cell Biol Int* 24: 101-82

⁴¹⁴ Klein E e col (1990): Contribution of CR3, CD11b/CD18 to cytolysis by human NK cells. *Mol Immunol* 27: 1343-1347

⁴¹⁵ Ross GD e col (1993): CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin Exp Immunol* 92: 181-184

⁴¹⁶ Xia Y e col (1999): The beta-glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. *J Immunol* 162: 2281-90

⁴¹⁷ Timonen T e col (1990): Participation of CD11a-c/CD18, CD2 and RGD-binding receptors in endogenous and interleukin-2-stimulated NK activity of CD3-negative large granular lymphocytes. *Int J Cancer* 46: 1035-40

⁴¹⁸ Di Renzo L e col (1991): The function of human NK cells is enhanced by beta-glucan, a ligand of CR3 (CD11b/CD18). *Eur J Immunol* 21: 1755-8

⁴¹⁹ Orange JS e col (2001): Decreased natural killer (NK) cell function in chronic NK cell lymphocytosis associated with decreased surface expression of CD11b. *Clin Immunol* 99: 53-64

laboratoriais de hemólise na maioria dos doentes e, quer a anemia quer a trombocitopenia respondem ao tratamento com corticóides, Igs endovenosas em alta dose e/ou esplenectomia. Parece óbvio, portanto, que as citopenias resultam de uma destruição periférica dos eritrócitos, neutrófilos e/ou plaquetas, e para explicar esta destruição temos vários mecanismos alternativos possíveis, que incluiriam a autoimunidade mediada por anticorpos, a deficiência de glicoproteínas de membrana e o efeito citotóxico directo mediado pelas CNK, entre outros.

Autoimunidade mediada por anticorpos

O facto de termos detectado um aumento das Igs associadas aos eritrócitos, neutrófilos e plaquetas de doentes que apresentavam anemia, neutropenia ou trombocitopenia poderia sugerir que as citopenias sejam mediadas por auto-anticorpos. Esta foi, de facto, a hipótese colocada por muitos autores para explicar as citopenias associadas às DLPC de LGL-T TCR⁺/CD8⁺. No entanto, o verdadeiro significado deste achado não é conhecido, já que só os doentes com citopenias foram analisados para a presença de Igs associadas às células e esta pode ser apenas consequência da hipergamaglobulinemia.⁴²⁰ Tal raciocínio é também válido para a presença de outros auto-anticorpos detectada nestes pacientes, tais como anticorpos anti-nucleares e factor reumatóide, sem significado clínico aparente.

Deficiência de glicoproteínas de membrana

Uma hipótese atractiva, embora especulativa, seria que as citopenias resultassem da

mesma deficiência que atinge as CNK: a deficiência de Gp de membrana e dos resíduos de ácido siálico e oligossacarídeos que se lhes associam. É conhecido desde há longa data que a perda dos resíduos de ácido siálico nas membranas dos eritrócitos é um sinal de senescência, bem como é também conhecida a importância destas moléculas na prevenção da remoção dos eritrócitos senescentes pelos macrófagos esplénicos,^{421, 422, 423, 424, 425} funcionando como ligandos para receptores tipo lectina (denominados sialoadesinas) que reconhecem selectivamente sialo-glicoproteínas.^{426, 427}

Efeito citotóxico directo mediado pelas CNK

Outra hipótese para explicar as citopenias, seria a da existência de um efeito citotóxico mediado pelas CNK. De acordo com esta possibilidade está o facto de, tal como nesta série de doentes, estarem descritos na literatura casos de anemia hemolítica com prova de “Coombs” directa negativa associados a DLP de LGL-NK⁴²⁸ e de ter sido demonstrado um efeito citotóxico das CNK sobre os eritrócitos em um caso previamente publicado.⁴²⁹ Também de acordo com esta hipótese está o facto da

⁴²¹ Aminoff D e col (1978): Cell surface carbohydrate recognition and the viability of erythrocytes in circulation. *Prog Clin Biol Res* 23: 569-81

⁴²² Aminoff D e col (1977): Role of sialic acid in survival of erythrocytes in the circulation: interaction of neuraminidase-treated and untreated erythrocytes with spleen and liver at the cellular level. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 1521-4

⁴²³ Biondi C (2002): Senescent erythrocytes: factors affecting the aging of red blood cells. *Immunol Invest* 31: 41-50

⁴²⁴ Bratosin D e col (1998): Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 80: 173-95

⁴²⁵ Varki A (1997): Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J* 11: 248-55

⁴²⁶ Hartnell A. e col (2001): Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations. *Blood* 97: 288-96

⁴²⁷ Crocker PR (1991): Purification and properties of sialoadhesin, a sialic acid-binding receptor of murine tissue macrophages. *EMBO J* 10: 1661-9

⁴²⁸ Dunphy CH e col (1995): Natural killer cell lymphoproliferative disorder of granular lymphocytes presenting as hemolytic anemia: case report and review of the literature. *Clin Immunol Immunopathol* 76: 37-43

⁴²⁹ Gilsanz F e col (1996): Hemolytic anemia in chronic large granular lymphocytic leukemia of natural killer cells: cytotoxicity of natural killer cells against autologous red cells is associated with hemolysis. *Transfusion* 36: 463-6

⁴²⁰ Bassan R e col (1989): Autoimmunity and B-cell dysfunction in chronic proliferative disorders of large granular lymphocytes/natural killer cells. *Cancer* 63: 90-5

anemia associada a DLPC-NK usualmente responder à ciclosporina A,⁴³⁰ que, para além de suprimir a activação dos LT, inibe a síntese de perforina.⁴³¹ Curiosamente, existem alguns trabalhos que indicam que a glicoforina A, uma Gp expressa na membrana das células eritróides com um alto conteúdo de oligossacarídeos e de resíduos de ácido siálico, protege os eritrócitos do efeito citotóxico mediado pelas CNK, sendo este efeito protector dependente de N-oligosacarídeos⁴³² e da sua interacção entre estes e receptores de morte celular com funções inibitórias, tais como o NKG2-A, expressos pelas CNK.⁴³³ Outra alternativa é o aumento da apoptose dos neutrófilos, mediada pelo FasL solúvel, tal como foi sugerido para as DLP de LGL-T TCR⁺/CD8⁺.^{434,435}

Ficariam, no entanto, no ar algumas questões: Qual é o motivo que condiciona a estimulação exuberante destas CNK? Qual é a causa potencial para a deficiência das Gp de membrana? Existirá alguma relação entre ambos?

4.2.1.4.b) Etiopatogenia

Infecções víricas e neoplasias

O facto das CNK CD56^{-/+débil} terem um perfil IF que documenta activação celular, torna pertinente a hipótese de na origem destas DLP estar uma infecção vírica.

Nos países asiáticos está bem documentado o papel da infecção por EBV na linfocitose crónica de CNK associada à hipersensibilidade às picadas de mosquito,^{436,437} das quais pelo menos um caso foi descrito como não expressando CD56.⁴³⁸ No entanto, as diferenças epidemiológicas sugerem um mecanismo etio-patogénico diferente para as DLPC de LGL-NK que ocorrem na Europa e nos Estados Unidos. A tentativa de documentar infecção por outros vírus do grupo herpes, também não forneceu resultados positivos, embora na série de doentes que apresentamos, como noutras séries de DLPC de LGL,^{439,440,441} os estudos serológicos fornecessem evidência de infecção passada – mas não de infecção recente ou persistente – por vários vírus deste grupo. Entre os vírus que investigamos salientamos o HHV-6 – que foi já implicado na génese de alguns casos de DLP-T e NK.^{442,443} É evidente que poderia ser sempre argumentado que o estímulo que originou a expansão de CNK não tem obrigatoriamente que persistir no tempo, uma vez esta adquira o carácter de neoplasia e se torne autónoma.

⁴³⁰ Bible KC e col (1996): Cyclosporine A alleviates severe anaemia associated with refractory large granular lymphocytic leukaemia and chronic natural killer cell lymphocytosis. *Br J Haematol* 93: 406-8

⁴³¹ Ambach A e col (2001): Perforin granule release from cytotoxic lymphocytes ex vivo is inhibited by ciclosporin but not by methotrexate. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14: 249-60.

⁴³² el Ouagari K e col (1995): Glycophorin A protects K562 cells from natural killer cell attack. Role of oligosaccharides. *J Biol Chem* 270: 26970-5

⁴³³ Sol MA e col (1999): N-linked oligosaccharides can protect target cells from the lysis mediated by NK cells but not by cytotoxic T lymphocytes: role of NKG2-A. *Tissue Antigens*. 54: 113-21

⁴³⁴ Oshimi Y e col (1996): Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J Immunol* 157:2909-15

⁴³⁵ Liu JH e col (2000): Chronic neutropenia mediated by fas ligand. *Blood* 95: 3219-22

⁴³⁶ Satoh M e col (2002): Hypersensitivity to mosquito bites with natural killer cell lymphocytosis: the possible implication of Epstein-Barr virus reactivation. *Eur J Dermatol* 12: 381-4

⁴³⁷ Ohshima S e col (2002): A possible mechanism of NK cell-lineage granular lymphocyte proliferative disorder (NK-GLPD) in a patient with chronic active Epstein-Barr virus infection (CAEBV) and severe hypersensitivity to mosquito bites (SHMB). *Intern Med* 41: 651-6

⁴³⁸ Adachi A. e col (2002): Hypersensitivity to mosquito bites in association with chronic Epstein-Barr virus infection and natural killer (NK) leukaemia/lymphoma with expansion of NK cells expressing a low level of CD56. *Br. J. Dermatol* 147:1036-7

⁴³⁹ Loughran TP Jr e col (1993): Failure to detect Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood mononuclear cells of most patients with large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 81: 2723-7

⁴⁴⁰ Pellenz M e col (1996): Detection of Epstein-Barr virus by PCR analyses in lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Leuk Lymphoma* 23: 371-4

⁴⁴¹ Loughran TP Jr e col (1997): Absence of human herpes virus 8 DNA sequences in large granular lymphocyte (LGL) leukemia. *Leuk Lymphoma* 26: 177-80

⁴⁴² Lin WC e col (1999): Post transplant CD8+ gammadelta T-cell lymphoma associated with human herpes virus-6 infection. *Leuk Lymphoma* 33: 377-84

Uma hipótese alternativa e suportada pelo facto de ratinhos transgénicos para o gene “tax” do HTLV-I desenvolverem DLP de LGL-NK,^{444,445} seria a de uma infecção por retrovírus. Apesar de terem sido descritos na literatura alguns casos de associação entre DLPC de LGL e infecção por HTLV ou HIV,^{446,447} dos quais pelo menos um caso apresentava deficiência de CD56,⁴⁴⁸ nunca foi demonstrada associação preferencial entre a infecção por estes vírus e as DLP de LGL-T ou NK.^{449,450} Apesar disso, um estudo realizado em indivíduos seropositivos para o HIV, descreveu uma diminuição de CNK CD56⁺/CD16⁺ e um aumento CNK CD56^{-/+débil}, que frequentemente também expressavam de forma débil CD16 e tinham actividade citotóxica deficiente.⁴⁵¹ Curiosamente também, alguns autores observaram que o soro dos doentes com estas DLP apresentava frequentemente reactividade cruzada com a proteína p21 da cápsula dos vírus HTLV-I/II,^{452,453} sugerindo que pudesse estar

envolvido outro retrovírus. Esforços para esclarecer esta possibilidade, avaliando a existência de infecção por vírus do linfoma/leucemia T dos primatas ou por retrovírus da leucemia bovina, também não foram bem sucedidos.⁴⁵⁴

Independentemente dos estudos efectuados até ao momento nunca terem documentado associação entre DLP de LGL-NK com nenhuma infecção vírica em particular, parece-nos significativo que tenha sido detectada infecção vírica por HIV, HTLV-I ou por vírus da hepatite C (“Hepatitis C Virus”, HCV) em 46% dos doentes com DLPC de LGL-NK CD56^{-/+débil} em que foi efectuado um estudo virulógico (serológico e molecular) detalhado e que, para além disso, dois outros doentes tivessem história prévia de lesões cutâneas de tipo herpético. De salientar ainda que 5 dos 28 doentes incluídos nesta série eram indivíduos de risco (toxicodependentes ou com história prévia de transfusão de sangue).

A existência de uma infecção vírica poderia explicar porque é que a linfocitose e as citopenias destes doentes evoluem com alguma frequência de uma forma flutuante, com períodos críticos e outros de doença mais estável, que poderiam ter relação com flutuações da viremia.

De um ponto de vista estritamente teórico, temos diferentes possibilidades para explicar a deficiência profunda de G_p nas CNK CD56^{-/+débil}. Uma hipótese seria a existência de alterações ao nível dos genes que codificam

⁴⁴³ Tagawa S e col (1992): Transformation of large granular lymphocytic leukemia during the course of a reactivated human herpesvirus-6 infection. *Leukemia* 6: 465-9

⁴⁴⁴ Portis T e col (2001): Analysis of p53 inactivation in a human T-cell leukemia virus type 1 Tax transgenic mouse model. *J Virol* 75: 2185-93

⁴⁴⁵ Grossman WJ e col (1997): Cytokine expression and tumorigenicity of large granular lymphocytic leukemia cells from mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Blood* 90: 783-94

⁴⁴⁶ Loughran TP Jr e col (1992): Detection of human T-cell leukemia/lymphoma virus, type II, in a patient with large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 80: 1116-9

⁴⁴⁷ Martin MP e col (1993): Large granular lymphocytosis in a patient infected with HTLV-II. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9: 715-9

⁴⁴⁸ Ghali V e col (1990): Expansion of large granular lymphocytes (natural killer cells) with limited antigen expression (CD2+, CD3-, CD4-, CD8-, CD16+, NKH-1-) in a human immunodeficiency virus-positive homosexual man. *Cancer* 65: 2243-7

⁴⁴⁹ Loughran TP Jr e col (1994): Prototypical HTLV-I/II infection is rare in LGL leukemia. *Leuk Res* 18: 423-9

⁴⁵⁰ Pawson R e col (1997): The human T-cell lymphotropic viruses types I/II are not involved in T prolymphocytic leukemia and large granular lymphocytic leukemia. *Leukemia* 11: 1305-11

⁴⁵¹ Hu PF e col (1995): Natural killer cell immunodeficiency in HIV disease is manifest by profoundly decreased numbers of CD16+CD56+ cells and expansion of a population of CD16dimCD56- cells with low lytic activity. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovir* 10: 331-40

⁴⁵² Loughran TP Jr e col (1997): Seroreactivity to an envelope protein of human T-cell leukemia/lymphoma virus in patients with CD3- (natural killer) lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood* 90: 1977-81

⁴⁵³ Loughran TP Jr e col (1998): Epitope mapping of HTLV envelope seroreactivity in LGL leukaemia. *Br J Haematol* 101: 318-24

para a sua síntese; uma possibilidade alternativa – e eventualmente a mais provável atendendo a que há deficiência de pelo menos duas Gp de membrana (CD11b e CD56) – seria que esta deficiência resultasse de alterações na ancoragem das Gp à membrana das células, das vias metabólicas de glicosilação (por acção de glicosil-transferases) e/ou da sua degradação a nível lisosomal, por acção de glicosidasas.

No que diz respeito à ancoragem das Gp à membrana das células, sabe-se actualmente que ela se faz frequentemente através de ligações que envolvem resíduos de glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Entre as moléculas ligadas ao GPI nas CNK, salienta-se o CD56 e o CD16, mas não o CD11b.⁴⁵⁵ Sabe-se, no entanto, que o CD11b mantém uma relação física e funcional muito estreita com as Gp de membrana ligadas ao GPI, funcionando como transdutor de sinal nos processos de adesão e desgranulação durante as funções de fagocitose e de citotoxicidade.^{456, 457, 458, 459} Se a deficiência destas Gp de membrana tiver relação com alterações nas âncoras GPI, é possível supor que, de forma semelhante ao que acontece na Hemoglobinúria Paroxística Nocturna – doença que se caracteriza pela hemólise intravascular e pela existência de citopenias^{460, 461, 462, 463} e que pode

manifestar-se após infecções víricas^{464, 465, 466} – possa haver um aumento da susceptibilidade das células destes doentes, em particular os eritrócitos, à lise pelo complemento.^{467, 468}

Modelo hipotético para a etiopatogénese das doenças linfoproliferativas crónicas de linfócitos grandes granulares NK CD56^{+/+débil}

Com base nos resultados apresentados e nas hipóteses levantadas, as DLPC de LGL-NK CD56^{+/+débil} terão provavelmente origem em expansões crónicas de CNK CD56⁺ activadas por acção de uma infecção vírica, que sofrem transformação clonal e perdem a expressão de Gp de membrana como o CD56 e o CD11b; ao mesmo tempo que maturam deficientemente, estas células acumulam-se e tornam-se disfuncionais.

4.2.2. DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS DE LINFÓCITOS GRANDES GRANULARES TCR⁺/CD4⁺

4.2.2.1. Frequência

Com base nos estudos efectuados, em que as expansões monoclonais de LGL TCR⁺/CD4⁺ corresponderam a 2% do total de DLPC estudadas, estimamos em que a sua incidência

⁴⁵⁴ Perzova RN e col (2000): Lack of BLV and PTLV DNA sequences in the majority of patients with large granular lymphocyte leukaemia. *Br J Haematol* 109: 64-70

⁴⁵⁵ Darby C e col (1990): Monocyte/macrophage Fc gamma RIII, unlike Fc gamma RIII on neutrophils, is not a phosphatidylinositol-linked protein. *Blood* 75: 2396-400

⁴⁵⁶ Stockinger H e col (1997): Interaction of GPI-anchored cell surface proteins and complement receptor type 3. *Exp Clin Immunogenet* 14: 5-10

⁴⁵⁷ Todd RF e col (1997): Beta 2 (CD11/CD18) integrins can serve as signaling partners for other leukocyte receptors. *J Lab Clin Med* 129: 492-8

⁴⁵⁸ Petty HR e col (1997): Ectodomain interactions of leukocyte integrins and pro-inflammatory GPI-linked membrane proteins. *J Pharm Biomed Anal* 15: 1405-16

⁴⁵⁹ Ross GD (2000): Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein. *Crit Rev Immunol* 20: 197-222

⁴⁶⁰ Nishimura J e col (1999): Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An acquired genetic disease. *Am J Hematol* 62: 175-82.

⁴⁶¹ Bessler M e col (1994): Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO J* 13: 110-7

⁴⁶² Schubert J e col (1990): The PIG-anchoring defect in NK lymphocytes of PNH patients. *Blood*. 76: 1181-7

⁴⁶³ Tomita M e col (1999): Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biochim Biophys Acta* 1455: 269-86.

⁴⁶⁴ Bunch C e col (1972): Paroxysmal cold hemoglobinuria following measles immunization. *Arch Dis Child* 47: 299-300

⁴⁶⁵ Uezima A e col (1974): [A case of paroxysmal cold hemoglobinuria developing after varicella infection (author's transl)]. *Rinsho Ketsueki* 15: 533-40

⁴⁶⁶ Vogel SJ e col (1979): Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria associated with infectious mononucleosis. *Blood* 54: 351-3

⁴⁶⁷ Brooimans RA e col (1992): Relative roles of decay-accelerating factor, membrane cofactor protein, and CD59 in the protection of human endothelial cells against complement-mediated lysis. *Eur J Immunol* 22: 3135-40

⁴⁶⁸ Navenot JM e col (1996): Expression of glycosyl-phosphatidylinositol-linked glycoproteins in blood cells from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients: a flow cytometry study using CD55, CD58 and CD59 monoclonal antibodies. *Leuk Lymphoma* 21: 143-51

seja de 1 a 2 novos casos / ano / milhão de habitantes.

4.2.2.2. Perfil imunofenotípico

Neste trabalho demonstramos que as expansões monoclonais de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ têm um perfil fenotípico único e muito característico das células com funções citotóxicas. Assim, estas células mostram expressão de CD56 e CD57 na membrana e de granzima B intracelular, em conjunto com co-expressão de CD8 na maioria dos casos (CD56⁺/CD57⁺/granzima B⁺/CD8^{-/+débil}), na ausência de expressão de outras moléculas NKα (CD11c⁻, CD16⁻, CD94⁻, CD158a⁻, CD161⁻, NKB1), à excepção de CD11b, cuja expressão é variável. Merece ainda destaque que estas células tenham, de forma constante, um padrão de expressão de citocinas de tipo Th1 (IFN- γ e TNF- α , associados ou não à produção de IL2).

Em simultâneo, é muito claro que estas células têm um fenótipo muito sugestivo de activação celular – aumento de expressão de CD2, CD11a e HLA-DR, diminuição de expressão de CD7 e ausência de expressão de CD28 e CD62L. A própria co-expressão de CD8 pode ser tomada como um indicador de activação dos LT CD4, já que foi previamente observado que os LT CD4 estimulados em cultura adquirem expressão débil de CD8 na membrana.^{469,470} Quando comparado com o perfil fenotípico dos LT TCR⁺/CD4⁺ recentemente activados durante infecções víricas agudas (Lima M e col., 2003 – Art. 28), estes linfócitos distinguem-se pela ausência de CD28,

uma menor expressão de HLA-DR e a co-expressão de CD45RA e CD45RO ou um predomínio de expressão de CD45RA numa fracção importante dos casos.

4.2.2.3. Características clínico-biológicas

O estudo efectuado evidenciou claramente que, tal como as leucemias de LGL-T TCR⁺/CD8⁺, as leucemias de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ têm um curso clínico indolente. O curso clínico indolente comum às DLP de LGL está de acordo com o baixo índice mitótico e o conteúdo diplóide de ADN, ao contrário do que acontece noutras DLP-T com comportamento clínico mais agressivo; da mesma forma, e ao contrário do que acontece na maioria das DLP-B (Lima M e col., 1997 – Art.7; Lima M e col., 1997 – Art.8), os LGL-T TCR⁺/CD4⁺, tal como LGL-T TCR⁺/CD8⁺ (Lima M e col., 1997 – Art.9) não apresentam hiper-expressão de proteínas inibidoras da apoptose, como o bcl2.

A análise dos dados clínicos e hematológicos dos doentes com expansões monoclonais de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ estabelece, antes de mais, uma diferença muito clara entre estas neoplasias e aquelas de LT TCR⁺/CD8⁺. De facto, ao contrário do que acontece nestas últimas, não encontramos nenhuma associação entre as leucemias de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ com citopenias. Pelo contrário, um número significativo destes doentes apresentava valores aumentados de hemoglobina e poliglobulia que num caso era suficientemente importante para merecer, por si só, ser investigada para afastar a possibilidade de diagnóstico de policitemia rubra vera (Lima M e col., 2001 – Art. 14).

⁴⁶⁹ Paliard X. e col (1988): Interleukin-4 mediates CD8 induction on human CD4⁺ T-cell clones. Nature 335: 642-4

⁴⁷⁰ Rabinowitz e col (1995): The appearance of the CD4⁺CD8⁺ phenotype on activated T cells: possible role of antigen transfer. Hum Immunol 55: 1-10

Da mesma forma nenhum destes doentes tinha evidência clínica de artrite nem foi detectada actividade de factor reumatóide no soro, ao contrário do que tem sido descrito nas leucemias de LGL-T TCR $^{+}/CD8^{+}$.^{471,472}

A característica clínica mais notória das leucemias de LGL-T TCR $^{+}/CD4^{+}$ e, de facto, a única causadora de problemas clínicos, é a grande incidência de outras neoplasias associadas.

Apesar de terem sido esporadicamente descritos na literatura casos de associação de linfocitoses de LGL-T TCR $^{+}/CD4^{+}$ em doentes com tumores,^{473,474} tanto quanto é do nosso conhecimento, nunca se suspeitou, e muito menos se documentou, a associação preferencial entre este tipo de leucemias e outras neoplasias. Os resultados aqui apresentados, não apenas o fazem, como mostram que o tumor nem sempre está diagnosticado na data de detecção da linfocitose T (sendo esta frequentemente detectada em análises de rotina), podendo manifestar-se meses ou anos depois. Desta forma fica demonstrada a necessidade de uma vigilância periódica, orientada para a detecção precoce de neoplasias, mesmo quando não há nenhuma evidência clínica de doença e a linfocitose permanece estável.

Dado que a DLP “*per se*” não determina manifestações clínicas, a presença de sinais,

sintomas ou dados laboratoriais de doença, como sendo, adenomegalias e/ou esplenomegalia, níveis aumentados de DHL e/ou 2-microglobulina nunca deve ser directamente atribuída à DLPC-T de LGL-T TCR $^{+}/CD4^{+}$; pelo contrário, deve ser o sinal de alerta para desencadear o processo de investigação da possível presença de outra neoplasia.

4.2.2.4. Reflexões sobre o comportamento clínico-biológico e a etiopatogenia da doença

4.2.2.4.a) Comportamento clínico-biológico

Associação com outras neoplasias

O motivo pelo qual estas expansões de LGL-T TCR $^{+}/CD4^{+}/CD8^{-/+débil}/NKa^{+}$ se associam a tumores não é conhecido. Serão os LGL-T TCR $^{+}/CD4^{+}/CD8^{-/+débil}/NKa^{+}$ destes pacientes LT activados que proliferam num esforço para controlar o crescimento de tumores? Apoiam esta hipótese: 1) O facto do perfil IF dos LGL-T TCR $^{+}/CD4^{+}$ monoclonais ser sobreponível ao de células que foram estimuladas por contacto prévio com o Ag (ou que continuam a tê-lo de uma forma persistente), e que se encontram numa fase terminal correspondente a uma “célula efectora”; 2) a sua capacidade para produzirem grande quantidade de citocinas de tipo Th1 quando estimuladas “in vitro” (em particular de IFN- γ , uma citocina envolvida na resposta anti-tumoral); 3) a existência de casos esporádicos de leucemias de LGL-T TCR $^{+}/CD4^{+}$ em que foi demonstrada actividade citotóxica destas células⁴⁷⁵ e 4) a semelhança entre estas células leucémicas e as de um subtipo particular de LT, vulgarmente conhecido como LT/NK (“NKT

⁴⁷¹ Loughran TP Jr (1993): Clonal diseases of large granular lymphocytes. Blood 82: 1-14

⁴⁷² Lamy T (1999): Current concepts: large granular lymphocyte leukemia. Blood Rev 13: 230-40

⁴⁷³ Claudepierre P e col (1998): Unusual CD3+ CD4+ large granular lymphocyte expansion associated with a solid tumor. J Rheumatol 25: 1434-6

⁴⁷⁴ Airo P e col (1995): Monoclonal expansion of large granular lymphocytes with a CD4+ CD8+dim+/- phenotype associated with hairy-cell leukemia. Haematologica 80: 146-9

cells”), com características IF e funcionais peculiares, descritas no Homem e em vários modelos experimentais, incluindo o ratinho^{476, 477, 478, 479} onde correspondem aos LT NK1.1⁺.^{480, 481, 482}

Em relação a este último aspecto, deve dizer-se que os LT/NK têm um fenótipo CD3⁺/TCR⁺/CD4⁺ ou CD4⁻/CD8⁻ e expressam uma forma invariante da cadeia alfa do TCR (TCR V alfa 24-J alfa Q nos humanos e V alfa 14-J alfa 18 no ratinho) em associação com um repertório TCR-V restrito.^{483, 484, 485, 486, 487} Também foi demonstrado que estas células têm características de células activadas / “de memória”, capazes de uma resposta de tipo Th1 ou Th2 dependendo das condições experimentais,^{488, 489, 490, 491} que podem reconhecer

Ag em associação com CD1d^{492, 493, 494} e responder a SA^g^{495, 496, 497} e que estão envolvidas na prevenção de doenças autoimunes e na resposta anti-tumoral.^{498, 499, 500}

Significado biológico das diferenças entre o repertório TCR-V e os perfis IF das LGL-T TCR⁺/CD4⁺ não monoclonais e monoclonais

As expansões não monoclonais aqui descritas têm muito provavelmente origem nos LT CD4⁺/NKa⁺ previamente referidos na literatura, que aumentam em associação com neoplasias,^{501, 502} infecções,⁵⁰³ doenças autoimunes⁵⁰⁴ e no pós-transplante.⁵⁰⁵ De acordo com a informação disponível na literatura, quando detectados ao nível do SP expressam

⁴⁷⁵ Yasukawa M e col (1995): Monoclonal proliferation of CD4+ large granular lymphocytes with cytolytic activity. Br J Haematol 91: 419-20
⁴⁷⁶ Taniguchi M e col (2000): Recognition and function of Valpha14 NKT cells. Semin Immunol 12: 543-50
⁴⁷⁷ Davodeau F e col (1997): Close phenotypic and functional similarities between human and murine alphabeta T cells expressing invariant TCR alpha-chains. J Immunol 158: 5603-11
⁴⁷⁸ Lantz O e col (1994): An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. J Exp Med 180: 1097-106
⁴⁷⁹ Lee PT e col (2002): Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. J Exp Med 195: 637-41
⁴⁸⁰ Bendelac A (1995): Mouse NK1+ T cells. Curr Opin Immunol 7: 367-74
⁴⁸¹ MacDonald HR (1995): NK1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells: new clues to their origin, specificity, and function. J Exp Med 182: 633-8.
⁴⁸² Vicari AP e col (1996): Mouse NK1.1+ T cells: a new family of T cells. Immunol Today 17: 71-6
⁴⁸³ Ohteki T e col (1996): Stringent V beta requirement for the development of NK1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells in mouse liver. J Exp Med 183: 1277-82
⁴⁸⁴ Brooks EG e col (1993): Human T-cell receptor (TCR) alpha/beta + CD4-CD8- T cells express oligoclonal TCRs, share junctional motifs across TCR V beta-gene families, and phenotypically resemble memory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 11787-91
⁴⁸⁵ Porcelli S e col (1993): Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. J Exp Med 178: 1-16.
⁴⁸⁶ Masuda K e col (1997): Phenotypes and invariant alpha beta TCR expression of peripheral V alpha 14+ NK T cells. J Immunol. 158: 2076-82
⁴⁸⁷ Ronet C e col (2001): Role of the complementarity-determining region 3 (CDR3) of the TCR-beta chains associated with the V alpha 14 semi-invariant TCR alpha-chain in the selection of CD4+ NK T Cells. J Immunol 166: 1755-62
⁴⁸⁸ Yoshimoto T e col (1995): Role of NK1.1+ T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. Science 270: 1845-7
⁴⁸⁹ Bendelac A. e col (1996): Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells. J Exp Med 184: 1285-93

⁴⁹⁰ Chen H e col (1997): Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1. J Immunol 159: 2240-9
⁴⁹¹ Sugie T e col (1996): NK1+ CD4- CD8- alphabeta T cells in the peritoneal cavity: specific T cell receptor-mediated cytotoxicity and selective IFN-gamma production against B cell leukemia and myeloma cells. J Immunol 157: 3925-35
⁴⁹² Bendelac A e col (1997): Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. Annu Rev Immunol 15: 535-62
⁴⁹³ Couedel C e col (1998): Diverse CD1d-restricted reactivity patterns of human T cells bearing "invariant" AV24BV11 TCR. Eur J Immunol 28:4391-7
⁴⁹⁴ Galli G e col (2003): CD1d-restricted Help To B Cells By Human Invariant Natural Killer T Lymphocytes. J Exp Med 197: 1051-7
⁴⁹⁵ Yagi J e col (1999): Identification of a new type of invariant V alpha 14+ T cells and responsiveness to a superantigen, Yersinia pseudotuberculosis-derived mitogen. J Immunol 163: 3083-91
⁴⁹⁶ Dobashi H e col (1999): Activation of mouse liver natural killer cells and NK1.1(+) T cells by bacterial superantigen-primed Kupffer cells. Hepatology 30: 430-6
⁴⁹⁷ Ami K e col (2002): Activation of human T cells with NK cell markers by staphylococcal enterotoxin A via IL-12 but not via IL-18. Clin Exp Immunol 128: 453-9
⁴⁹⁸ Tamada K e col (1997): Immunosuppressive activity of cloned natural killer (NK1.1+) T cells established from murine tumor-infiltrating lymphocytes. J Immunol 158: 4846-54
⁴⁹⁹ Takeda K e col (1996): Liver NK1.1+ CD4+ alpha beta T cells activated by IL-12 as a major effector in inhibition of experimental tumor metastasis. J Immunol 156: 3366-73
⁵⁰⁰ Emoto M e col (1997): TCR-mediated target cell lysis by CD4+NK1+ liver T lymphocytes. Int Immunol 9: 563-71
⁵⁰¹ Velardi A. e col (1985): Expression of NK-lineage markers on peripheral blood lymphocytes with T-helper (Leu3+/T4+) phenotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 65: 149-55
⁵⁰² Van den Hove LE e col (1998): Peripheral blood lymphocyte subset shifts in patients with untreated hematological tumors: evidence for systemic activation of the T cell compartment. Leuk Res 22: 175-84
⁵⁰³ Legac E e col (1992): CD4+CD7-CD57+ T cells: a new T-lymphocyte subset expanded during human immunodeficiency virus infection. Blood 79: 1746-53
⁵⁰⁴ Imberti L e col (1997): Oligoclonal CD4+ CD57+ T-cell expansions contribute to the imbalanced T-cell receptor repertoire of rheumatoid arthritis patients. Blood 89: 2822-32

predominantemente o IF CD4⁺/CD57⁺/CD45RO⁺, enquanto ao nível dos órgãos ou tecidos, e à excepção dos gânglios linfáticos,^{506, 507} predomina o fenótipo CD4⁺/CD56⁺.^{508, 509, 510} Também de acordo com os resultados publicados, os LT CD4⁺/NKA⁺ produzem fundamentalmente citocinas de tipo Th1, em particular TNF- e IFN-^{511, 512, 513, 514, 515, 516} (embora em determinadas condições experimentais sejam capazes de uma resposta Th2⁵¹⁷), têm actividade citotóxica⁵¹⁸ e baixa capacidade proliferativa,^{519, 520} e não são tão eficientes como os LT CD4⁺/NKA⁻ para

estimular os LB^{521, 522, 523} e apresentam um repertório TCR-V restrito.^{524, 525, 526}

Algumas das diferenças IF observadas entre as expansões policlonais e oligoclonais de LGL-T TCR⁺/CD4⁺/CD8^{-/+débil}/NKA⁺ e as expansões monoclonais equivalentes, incluindo o predomínio de expressão de CD57 e CD45RO e a expressão débil de CD28 em parte das células no primeiro caso e o predomínio de expressão de CD56 e CD45RA no segundo caso (**Anexo 1, Tabelas 1 a 4 e Figura 2**) podem ser compreendidas à luz dos conhecimentos actuais sobre as modificações IF que ocorrem nos LT após o contacto com o Ag e durante a sua diferenciação em LT “de memória” e em célula “efectora”. Tudo parece indicar que as expansões policlonais ou oligoclonais TCR⁺/CD4⁺/CD8^{-/+débil}/NKA⁺ observadas em associação com patologias várias correspondem a um estadio mais próximo do LT “de memória” e que as expansões monoclonais destes linfócitos correspondem ao um estadio mais terminal de diferenciação, mais próximo, por isso, da célula T “efectora” (pouco representada no SP dos indivíduos normais e nos indivíduos com expansões policlonais ou oligoclonais associadas a várias patologias).

⁵⁰⁵ Legendre CM e col (1989): CD4⁺/Leu-7⁺ large granular lymphocytes in long-term renal allograft recipients. A subset of atypical T cells. *Transplantation* 47: 964-71

⁵⁰⁶ Bowen MB e col (1991): Germinal center T cells are distinct helper-inducer T cells. *Hum Immunol* 31: 67-75

⁵⁰⁷ Chan WC (1999): Cellular origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma: immunophenotypic and molecular studies. *Semin Hematol* 36: 242-52

⁵⁰⁸ Barnaba V e col (1994): Selective expansion of cytotoxic T lymphocytes with a CD4⁺/CD56⁺ surface phenotype and a T helper type 1 profile of cytokine secretion in the liver of patients chronically infected with Hepatitis B virus. *J Immunol* 152: 3074-87

⁵⁰⁹ Bacheloni A. e col (1995): Homing of CD4⁺/CD56⁺ T lymphocytes into kidney allografts during tubular necrosis or rejection. *Clin Transplant* 9: 433-7

⁵¹⁰ Barnaba V e col (1990): Phenotypic and functional characterization of cloned T-lymphocytes from cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Riv Neurol* 60: 183-5

⁵¹¹ Barnaba V e col (1994): Selective expansion of cytotoxic T lymphocytes with a CD4⁺/CD56⁺ surface phenotype and a T helper type 1 profile of cytokine secretion in the liver of patients chronically infected with Hepatitis B virus. *J Immunol* 152: 3074-87

⁵¹² Benvenuto R e col (1991): Enhanced production of interferon-gamma by T lymphocytes cloned from rejected kidney grafts. *Transplantation* 51: 887-90

⁵¹³ Benvenuto R e col (1992): Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma synthesis by cerebrospinal fluid-derived T cell clones in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 650: 341-6

⁵¹⁴ Van den Hove LE e col (1997): Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 109: 501-9

⁵¹⁵ Van den Hove LE e col (1998): CD57⁺/CD28⁻ T cells in untreated hemato-oncological patients are expanded and display a Th1-type cytokine secretion profile, ex vivo cytolytic activity and enhanced tendency to apoptosis. *Leukemia* 12: 1573-82

⁵¹⁶ Hebib C e col (1998): Pattern of cytokine expression in circulation CD57⁺ T cells from long-term renal allograft recipients. *Transpl Immunol* 6: 39-47

⁵¹⁷ Brinkmann V e col (1997): Massive production of Th2 cytokines by human CD4⁺ effector T cells transiently expressing the natural killer cell marker CD57/HNK1. *Immunology* 91: 541-7

⁵¹⁸ Van den Hove LE, e col (1998): CD57⁺/CD28⁻ T cells in untreated hemato-oncological patients are expanded and display a Th1-type cytokine secretion profile, ex vivo cytolytic activity and enhanced tendency to apoptosis. *Leukemia* 12: 1573-82

⁵¹⁹ Legendre CM e col (1989): CD4⁺/Leu-7⁺ large granular lymphocytes in long-term renal allograft recipients. A subset of atypical T cells. *Transplantation* 47: 964-71

⁵²⁰ Barrou B e col (1992): Amplification of a circulating CD4⁺/CD7⁻ T lymphocytes subset in kidney transplantation. *Presse Med* 21: 1989-90

⁵²¹ Bouzahzah F e col (1995): Human germinal center CD4⁺/CD57⁺ T cells act differently on B cells than do classical T-helper cells. *Dev Immunol* 4: 189-97

⁵²² Andersson E e col (1995): CD4⁺/CD57⁺ T cells derived from peripheral blood do not support immunoglobulin production by B cells. *Cell Immunol* 16: 245-53

⁵²³ Andersson E e col (1996): Immunoglobulin production induced by CD57⁺ GC-derived helper T cells in vitro requires addition of exogenous IL-2. *Cell Immunol* 169: 166-73

⁵²⁴ Imberti L e col (1997): Oligoclonal CD4⁺ CD57⁺ T-cell expansions contribute to the imbalanced T-cell receptor repertoire of rheumatoid arthritis patients. *Blood* 89: 2822-32

⁵²⁵ Quiros-Roldan E e col (1996): The T-cell receptor repertoires expressed by CD4⁺ and CD4⁻ large granular lymphocytes derived from the same patients suggest the persistent action of an immune-mediated selection process. *Blood* 88: 2133-43

Documentam esta hipótese, entre outros (**Anexo 1, Tabelas 1 a 4 e Figura 2**: 1) as características compatíveis com activação prévia evidenciadas pelo fenótipo $CD2^{+forte,hom}$, $CD7^{-/+débil,het}$, $CD11a^{+,forte,hom}$, $HLA-DR^{-/+débil,het}$ em ambas as circunstâncias; 2) o predomínio de expressão de CD45RO nas expansões não monoclonais, em oposição ao predomínio de expressão de CD45RA nas expansões monoclonais (lembra-se que a reconversão do fenótipo $CD45RO^{+}/CD45RA^{-}$ em $CD45RO^{-}/CD45RA^{+}$ ocorre na fase terminal de diferenciação do LT, passando por uma fase intermédia de co-expressão destas duas moléculas);⁵²⁷ 3) a expressão débil de CD28 em parte das células nas expansões não monoclonais, em oposição à ausência de expressão de CD28 nas expansões monoclonais (recorda-se que a perda de expressão de CD28 é um processo que ocorre durante a reconversão dos LT $CD45RO^{+}/CD45RA^{-}$ em $CD45RO^{-}/CD45RA^{+}$).

Acrescenta-se ainda a ausência de expressão de CD62L e de CD27 em 7 casos de expansões monoclonais de LGL-T $TCR^{+}/CD4^{+}/CD8^{-/+débil}/NKa^{+}$ entretanto estudadas e cujos resultados, por serem preliminares, não foram apresentados aqui.

Também não é difícil apoiar a hipótese de que a perda de CD57 e a aquisição de CD56 seja um fenómeno que ocorre naturalmente durante a conversão do LT “de memória” em LT “efector”: 1) Trata-se de uma evolução lógica já que as CNK, efectoras por excelência,

expressam CD56 e esta molécula parece ser de importância fundamental para a migração tecidual e interacção com as células alvo; 2) as expansões de LT $CD4^{+}/NKa^{+}$ detectadas ao nível tecidual expressam com mais frequência CD56 do que as detectadas no SP^{528, 529, 530, 531} e 3) as células T citotóxicas induzidas “in vitro” por acção de IFN- γ , IL-2 e anti-CD3 expressam CD56.⁵³²

4.2.2.4.b) Etiopatogenia

Infecções víricas, superantígenos e neoplasias

A série aqui apresentada demonstra claramente que, nas DLPC monoclonais de LGL $TCR^{+}/CD4^{+}$, existe expansão preferencial de linfócitos que expressam um número muito restrito de famílias TCR-V : TCR-V 2.1 (12%), TCR-V 3.1 (6%), TCR-V 13.1 (35%) e TCR-V 17.1 (6%). A comparação destes resultados com os obtidos no estudo do repertório dos LT $TCR^{+}/CD4^{+}$ do SP de indivíduos saudáveis mostra que existe uma expansão preferencial apenas dos LT que expressam a família TCR-V 13.1, já que a frequência com que as restantes três famílias se expandem se aproxima da representação que elas têm nos LT $CD4^{+}$ normais.

Estes resultados exigem alguma reflexão. Se é verdade que os LGL-T $TCR^{+}/CD4^{+}$ são

⁵²⁶ Quiros-Roldan E e col (1997): T-cell receptor repertoire in a $CD4^{+} CD57^{+}$ population. *Sangre* 42: 399-400

⁵²⁷ Hamann D e col (1996): Heterogeneity of the human $CD4^{+}$ T-cell population: two distinct $CD4^{+}$ T-cell subsets characterized by coexpression of CD45RA and CD45RO isoforms. *Blood* 88: 3513-21

⁵²⁸ Benvenuto R e col (1991): Enhanced production of interferon-gamma by T lymphocytes cloned from rejected kidney grafts. *Transplantation* 51: 887-90

⁵²⁹ Bachetoni A, e col (1995): Homing of $CD4^{+}CD56^{+}$ T lymphocytes into kidney allografts during tubular necrosis or rejection. *Clin Transplant* 9: 433-7

⁵³⁰ Barnaba V e col (1990): Phenotypic and functional characterization of cloned T-lymphocytes from cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Riv Neurol* 60: 183-5

⁵³¹ Vergelli M e col (1996): A novel population of $CD4^{+}CD56^{+}$ myelin-reactive T cells lyses target cells expressing CD56/neural cell adhesion molecule. *J Immunol* 157: 679-88

células que proliferam num esforço de defesa anti-tumoral, como se explica a expressão preferencial de um número tão restrito de TCR-V, sobretudo quando associadas a um largo espectro de neoplasias?

A expressão preferencial de uma (ou de um número restrito) de famílias TCR-V nas DLPC-T de LGL-TCR⁺/CD4⁺, por comparação ao que se passa nas DLPC de TCR⁺/CD8⁺, leva-nos ao mundo dos Ag e dos SAg.

Já em 1996, ao analisar o repertório TCR-V dos primeiros doentes com DLPC-T de LGL que tivemos a oportunidade de estudar, colocamos a hipótese de, na base da expansão persistente destes linfócitos estar um SAg (Lima M., 1996 – Art. 5, mas os primeiros resultados obtidos foram desanimadores. Pela sua maior frequência, esses primeiros casos correspondiam a expansões de LGL-T TCR⁺/CD8⁺ e seria necessário esperar 6 anos para repensar sobre esta hipótese.

A estimulação preferencial dos LT CD4⁺ por SAg não acontece por acaso. Os primeiros SAg descritos – e quase todos os que se lhes sucederam – actuavam especificamente sobre os LT CD4⁺ e rapidamente se entendeu porquê, quando se descobriu que os SAg actuavam por interacção com as moléculas da classe II do MHC.

Serão as DLPC de LGL-TCR⁺/CD8⁺ mediadas pela estimulação crónica das células por Ag e as DLPC de TCR⁺/CD4⁺ por SAg? E qual é a origem desse SAg?

Embora os primeiros SAg descritos fossem de origem bacteriana, conhecem-se hoje numerosas substâncias com propriedades idênticas codificadas por vírus, em particular por retrovírus.

O facto de os chamados “antígenos minor” do MHC (“Minor Lymphocyte Stimulating” – MIs) serem SAg codificados por provírus semelhantes ao MMTV e constitucionalmente integrados no genoma,⁵³³ reforça a importância das moléculas com propriedades de SAg na fisiologia normal do sistema imune. Curiosamente, os SAg induzidos nos LB de ratinho após infecção pelo MMTV também são capazes de estimular LT humanos que expressam um número restrito de TCR-V, sugerindo uma forte conservação da estrutura destas proteínas.⁵³⁴

E como se explica o grande número de neoplasias, frequentemente mais do que uma, nestes doentes? Haverá um factor predisponente nestes indivíduos para a ocorrência de neoplasias? Uma infecção vírica com potencial oncogénico poderia explicar simultaneamente a grande incidência de tumores e a activação dos LT? E se existir uma infecção vírica subjacente, será o papel do vírus directo ou indirecto?

Existem no ratinho dois modelos que relacionam neoplasias não hematológicas e leucemias/linfomas com expansões de LT, e em ambos estão implicados retrovírus endógenos com capacidade de produzir SAg: 1) No caso dos tumores não hematológicos, temos o

⁵³² Hoyle C e col (1998): Expansion of Philadelphia chromosome-negative CD3(+)/CD56(+) cytotoxic cells from chronic myeloid leukemia patients: in

vitro and in vivo efficacy in severe combined immunodeficiency disease mice Blood 92: 3318-27

⁵³³ Frankel WN (1989): Linkage of MIs genes to endogenous mammary tumor viruses of inbred mice. Nature 349: 256-8

retrovírus MMTV responsável pelos tumores mamários do ratinho, capaz de induzir a expressão de SAg nos LB, sendo esta uma condição necessária para a sua replicação e patogenicidade;^{535,536,537,538,539} neste caso, e em consequência da expressão de SAg nos LB, é induzida uma resposta T exuberante, restrita aos LT que expressam TCR-V 14; 2) no caso das DLP-B, e ainda no ratinho, temos o exemplo dos ratinhos SJL/J, que desenvolvem linfomas B à medida que envelhecem; sabe-se que os LB neoplásicos expressam SAg codificados por provírus MMTV endógenos (Mtv-29), capazes de estimular os LT CD4⁺ que expressam a respectiva família TCR-V ^{540,541,542,543} 3) sabe-se ainda que vírus MMTV mutantes e outros muito semelhantes ao MMTV, como vírus leucemogénico tipo B, causam linfomas T no ratinho, dependendo o processo de linfomagenese da expressão de SAg.^{544,545,546}

No ser humano também há evidências de que os retrovirus endógenos possam estar implicados em doenças do foro autoimune⁵⁴⁷ e neoplasias: 1) No que se refere às neoplasias não hematológicas, sabe-se, por exemplo, que as células de tumores mamários (mas não o tecido mamário normal) expressam no seu genoma sequências muito semelhantes às do MMTV;^{548,549} 2) relativamente às neoplasias hematológicas, foi recentemente descrita a expressão de retrovirus endógenos nas DLP cutâneas CD30⁺ (lembre-se que nestas DLP as células grandes tumorais CD30⁺ representam geralmente uma fracção minoritária do tumor, existindo um infiltrado exuberante de LT CD4⁺).⁵⁵⁰

Por vezes, a expressão de SAg codificados por retrovirus endógenos depende da infecção por outros vírus, geralmente por vírus do grupo Herpes.^{551,552} Foi descoberto recentemente que o SAg atribuído ao EBV, curiosamente capaz de estimular os LT CD4⁺ que exprimem TCR-V 13 (lembro que esta é a família preferencialmente expandida no caso das expansões monoclonais que acabamos de descrever) é um SAg do HERV-K18, cuja transcrição pode ser

⁵³⁴ Labrecque N e col (1993): Human T cells respond to mouse mammary tumor virus-encoded superantigen: V beta restriction and conserved evolutionary features. *J Exp Med* 177: 1735-43

⁵³⁵ Bramblett D e col (1997): Mouse mammary tumor virus: a virus that exploits the immune system. *Leukemia* 11 (Supl 3): 183-6

⁵³⁶ Reuss FU e col (1998): Mouse mammary tumor virus superantigen expression in B cells is regulated by a central enhancer within the pol gene *J Virol* 72: 6073-82

⁵³⁷ Golovkina TV e col (1998): B and T cells are required for mouse mammary tumor virus spread within the mammary gland. *J Immunol* 161: 2375-82

⁵³⁸ Ignatowicz L e col (1994): Identification of two V beta 7-specific viral superantigens. *J Immunol*. 152: 65-71

⁵³⁹ Luther SA e col (1996): Immune response to mouse mammary tumour virus. *Curr Opin Immunol* 8: 498-502

⁵⁴⁰ Tsiagbe VK e col (1993): Linkage of superantigen-like stimulation of syngeneic T cells in a mouse model of follicular center B cell lymphoma to transcription of endogenous mammary tumor virus. *EMBO J* 12: 2313-20

⁵⁴¹ Tsiagbe VK e col (1993): Syngeneic response to SJL follicular center B cell lymphoma (reticular cell sarcoma) cells is primarily in V beta 16+ CD4+ T cells. *J Immunol* 150: 5519-28

⁵⁴² Zhang DJ e col (1997): The Mtv29 gene encoding endogenous lymphoma superantigen in SJL mice, mapped to proximal chromosome 6. *Immunogenetics* 46: 163-6

⁵⁴³ Sen N e col (2001): META-controlled env-initiated transcripts encoding superantigens of murine Mtv29 and Mtv7 and their possible role in B cell lymphomagenesis. *J Immunol* 166: 5422-9

⁵⁴⁴ Yanagawa S e col (1993): Mouse mammary tumor virus with rearranged long terminal repeats causes murine lymphomas. *J Virol* 67: 112-8

⁵⁴⁵ Yanagawa S e col (2000): Identification of Notch1 as a frequent target for provirus insertional mutagenesis in T-cell lymphomas induced by leukemogenic mutants of mouse mammary tumor virus. *J Virol* 74: 9786-91

⁵⁴⁶ Mustafa F (2003): Type B leukemogenic virus (TBLV) is a variant of mouse mammary tumor virus (MMTV) that causes T-cell lymphomas in mice. *J Virol* 77: 3866-70

⁵⁴⁷ Perl A e col (2003): Role of endogenous retroviruses in autoimmune diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 29: 123-43

⁵⁴⁸ Wang Y e col (2001): Detection of MMTV-like LTR and LTR-env gene sequences in human breast cancer. *Int J Oncol* 18: 1041-4

⁵⁴⁹ Stewart AFR (2002): Identification of Human Homologs of the Mouse Mammary Tumor Virus Receptor. *Arch Virol* 127: 577-581

⁵⁵⁰ Kempf W e col (2003): Endogenous retroviral elements, but not exogenous retroviruses, are detected in CD30-positive lymphoproliferative disorders of the skin. *Carcinogenesis* 24: 301-6

⁵⁵¹ Sułkowski N e col (1996): The interplay of herpesviruses in AIDS: superantigen sharing. *Trends Microbiol* 4: 89-91

⁵⁵² Kwun HJ e col (2002): Transactivation of the human endogenous retrovirus K long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 immediate early protein O. *Virus Res* 86: 93-100

activada pelo EBV quando este se insere em zonas específicas do genoma.^{553,554}

Será que a expansão de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ está relacionada com a infecção por EBV ou por outro vírus do grupo Herpes? O facto de elas estarem associadas fundamentalmente a tumores não hematológicos ou DLP-B pode argumentar a favor desta hipótese já que o EBV, no seu estado de latência, infecta sobretudo os LB e a maioria das neoplasias linfóides associadas ao EBV são neoplasia de células B.

Modelo hipotético para a etiopatogénese das doenças linfoproliferativas crónicas de linfócitos grandes granulares T TCR⁺/CD4⁺

Com base nos resultados apresentados e nas hipóteses levantadas, as DLPC de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ monoclonais terão provavelmente origem em expansões crónicas de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ desencadeadas por SAg associados a tumores, provavelmente na dependência de infecções víricas, que sofrem transformação clonal, ao mesmo tempo que se acumulam, modificam as suas características fenotípicas e maturam em células efectoras.

⁵⁵³ Sutkowski N e col (1996): An Epstein-Barr virus-associated superantigen. J Exp Med 184: 71-80

⁵⁵⁴ Sutkowski N e col (2001): Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. Immunity 15: 579-89

4.3. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS BEM ESTABELECIDAS: SÍNDROME DE SEZARY.

O Síndrome de Sezary constitui muito provavelmente, dentro das DLPC-T, a entidade melhor definida do ponto de vista clínico e histopatológico. Apesar disso, são ainda grandes as lacunas no que respeita aos critérios fenotípicos que devem apoiar o diagnóstico. Por esse motivo, escolhemos o Síndrome de Sezary como modelo de DLPC-T bem estabelecida, em que o objectivo foi definir o perfil imunofenotípico da célula neoplásica e aprofundar os conhecimentos sobre os fundamentos biológicos de uma maior ou menor diversidade de comportamento clínico.

4.3.1. SÍNDROME DE SEZARY

4.3.1.1. Perfil imunofenotípico

O estudo de doentes com SS mostrou que as alterações IF mais frequentemente observadas nas CS CD4⁺ presentes no SP são a diminuição ou mesmo ausência de expressão de CD3, TCR α , CD4, CD2 e/ou CD7, definindo o perfil fenotípico CD3/TCR α -débil, CD4⁺-débil, CD2^{-/+débil}, CD5⁺, CD7^{-/+débil}, CD28⁺, NK α ⁻. Anomalias IF semelhantes foram detectadas nos LT CD4⁺ extraídos da pele, de gânglios linfáticos ou outros órgãos e tecidos de alguns destes doentes (resultados não apresentados), sugerindo que os mesmos critérios diagnósticos podem ser aplicados ao estudo de outros produtos biológicos.

Embora a série de doentes aqui apresentada não tenha incluído alguns perfis IF raros que têm sido descritos no SS, este estudo indica que as CS são parecidas entre si do ponto de vista IF e que o perfil IF descrito é, de longe, o mais frequente. Por outro lado, algumas das aberrações IF raras descritas no SS, não são mais do que o extremo das alterações aqui mencionadas; referimo-nos, por exemplo, aos casos em

que se observa ausência de expressão de CD3 na membrana.^{555,556}

4.3.1.1.a) Utilidade dos estudos imunofenotípicos para o diagnóstico diferencial entre Síndrome de Sezary e eritrodermia reactiva

Apesar do facto de qualquer uma das aberrações IF referidas ser encontrada numa proporção importante dos doentes com SS, nenhuma delas é suficientemente específica e sensível para ser utilizada como indicador clono-fenotípico único para diagnóstico de SS. Como exemplo, a diminuição de expressão de CD7, apesar de muito comum nas CS, também caracteriza um tipo particular de LT CD4⁺/CD45RO⁺ presente no SP normal e que está aumentado em doentes com várias patologias, incluindo dermatoses benignas e malignas, correspondendo a LT previamente estimuladas, ditos “de memória”.^{557,558,559,560,561}

⁵⁵⁵ Sano S e col (1998): Immunological study on CD3 defective cutaneous T cell lymphoma cells from a patient with Sezary syndrome. Clin Exp Immunol 113: 190-7

⁵⁵⁶ Tokura Y e col (2000): Nonerythrodermic, leukemic variant of cutaneous T-cell lymphoma with indolent clinical course: Th2-type tumor cells lacking T-cell receptor/CD3 expression and coinfiltrating tumoricidal CD8 T cells. J Am Acad Dermatol 43: 946-54

⁵⁵⁷ Reinhold U e col (1993): CD7⁻ T cells represent a subset of normal human blood lymphocytes. J Immunol 150: 2081-9

⁵⁵⁸ Harmon CB e col (1996): Detection of circulating T cells with CD4⁺CD7⁻ immunophenotype in patients with benign and malignant lymphoproliferative dermatoses. J Am Acad Dermatol 135: 404-10

⁵⁵⁹ Reinhold U e col (1997): CD4⁺ CD7⁻ T cells: a separate subpopulation of memory T cells? J Clin Immunol 17: 265-71

Desta forma, surgem dificuldades práticas em distinguir estes LT das CS que, tal como os primeiros, são CD45RO⁺/CD45RA⁻, ou, com menor frequência, co-expressam CD45RA e CD45RO.⁵⁶² Por outro lado, apesar de não ter sido encontrada diminuição de expressão de CD3 nos LT CD4⁺ de nenhum dos pacientes com dermatite reactiva incluídos nesta série, esta alteração foi descrita noutras situações associadas a estimulação dos LT.^{563,564} O mesmo se aplica a outras alterações, nomeadamente no que respeita à expressão de CLA.⁵⁶⁵

Assim, é indispensável a análise combinada da expressão de várias moléculas (*i.e.*, do perfil clono-fenotípico) para estabelecer o diagnóstico de suspeita de SS. Por exemplo, a combinação de CD4, CD2 e CD7 mostrou ter um interesse muito especial, dado que o perfil observado nas CS (CD4⁺/CD2^{-/+débil}/CD7^{-/+débil}) é tipicamente distinto do observado nos LT CD4⁺ ditos células de “memória” (CD4⁺/CD2^{+forte}/CD7^{-/+débil}). Da mesma forma, apesar da expressão diminuída de CD3/TCR e de CD4 serem também características muito comuns nas CS, quando estes Ag são testados individualmente surgem dificuldades de interpretação: esta

alteração tem um valor limitado para detecção das CS se a diminuição de intensidade de expressão é ligeira e/ou a fracção de LT CD4⁺ residuais normais é muito pequena. Uma forma de ultrapassar este obstáculo é a marcação combinada para CD3, TCR, CD4 e CD8: por um lado é mais fácil separar as CS CD4^{+débil}/CD3^{-/+débil}/TCR^{-/+débil} dos LT CD4⁺/CD3⁺/TCR⁺ residuais normais; por outro lado, é obtida informação adicional já que, ao contrário do que se passa com os LT normais, as CS CD4⁺ têm geralmente uma intensidade de expressão de CD3 inferior à dos LT CD8⁺.

Finalmente, a positividade das CS para CD28 e a ausência de moléculas NKa permitem distinguir as CS dos LT/NKa⁺ presentes na mesma amostra.

4.3.1.1.b) Utilidade dos estudos imunofenotípicos para o diagnóstico diferencial entre Síndrome de Sezary e eritrodermia associadas a outras neoplasias T

Para além da questão relativa ao diagnóstico diferencial entre SS e eritrodermia reactiva, que não parece ser problemático com a utilização combinada dos critérios IF aqui mencionados, há ainda que considerar o diagnóstico diferencial com eritrodermias associadas a outras leucemias e linfomas T, entre eles, outros linfomas T periféricos e as leucemias linfocítica e prolinfocítica T (*Lima M e col., 1994 - Art. 4*).^{566,567,568} O diagnóstico diferencial com esta última não oferece de uma forma geral problemas, já que o seu perfil IF foi previamente caracterizado em

⁵⁶⁰ Abken H e col (2000): Accumulation of CD4+CD7- T cells in inflammatory skin lesions: evidence for preferential adhesion to vascular endothelial cells. Clin Exp Immunol 121: 94-9

⁵⁶¹ Ohara T e col (2002): Memory functions and death proneness in three CD4+CD45RO+ human T cell subsets. J Immunol 169: 39-48

⁵⁶² Karenko L e col (2001): Chromosomally clonal T cells in the skin, blood, or lymph nodes of two Sezary syndrome patients express CD45RA, CD45RO, CDw150, and interleukin-4, but no interleukin-2 or interferon-gamma. J Invest Dermatol 116: 188-93

⁵⁶³ Geertsma MF e col (1999): Decreased expression of zeta molecules by T lymphocytes is correlated with disease progression in human immunodeficiency virus-infected persons. J Infect Dis 180: 649-58

⁵⁶⁴ Dworacki G e col (2001): Decreased zeta chain expression and apoptosis in CD3+ peripheral blood T lymphocytes of patients with melanoma. Clin. Cancer Res 7: 947s-57s.

⁵⁶⁵ Santamaria Babi LF e col (1995): Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. J Exp Med 181: 1935-40

⁵⁶⁶ Beltran Fernandez L (2002): [Cutaneous erythematous rash as first manifestation of T-cell prolymphocytic lymphatic leukaemia] An Med Interna 19: 126-9

⁵⁶⁷ Serra A. e col (1998): Cutaneous involvement as the first manifestation in a case of T-cell prolymphocytic leukaemia. Acta Derm Venereol 78: 198-200

⁵⁶⁸ Mallett RB e col (1995): Cutaneous infiltration in T-cell prolymphocytic leukaemia. Br J Dermatol 132: 263-6

detalhe e é claramente distinto do observado nos doentes com SS;⁵⁶⁹ entre outros, salienta-se a expressão anormalmente forte de CD7. Já o diagnóstico diferencial com outros linfomas T poderá ser mais difícil, pois está descrita (e nós próprios temos observado) expressão deficiente de CD3 e de CD7 noutros linfomas T, o mesmo se aplicando a outras características fenotípicas aberrantes previamente descritas na literatura, como a diminuição / ausência de expressão de CD26.^{570,571} Desta forma, é de importância fundamental a realização de estudos adicionais que permitam determinar a especificidade do perfil IF aqui descrito para o diagnóstico SS e seu diagnóstico diferencial com outros linfomas T.

4.3.1.1.c) Utilidade dos estudos imunofenotípicos como indicador de prognóstico e de decisão terapêutica

Apesar do CD25 ser irrelevante para distinguir as CS dos LT CD4⁺ normais residuais, a variabilidade de expressão deste Ag nas CS sugere que a avaliação da expressão deste Ag possa ter interesse na selecção de doentes para tratamento com AcMo anti-CD25;^{572,573} o mesmo se aplica a outros Ag não avaliados neste estudo, como o CD52.⁵⁷⁴

Por outro lado, a diversidade intra-tumoral pode influenciar a resposta à terapêutica tal como tivemos já a oportunidade de verificar em

um caso de SS, cujas CS grandes responderam preferencialmente à resposta ao tratamento com 2-deoxicoformicina (*Granjo E e col., 2002 - Art. 24*).

O aumento de expressão de Ag associados a activação celular e a funções de citotoxicidade nos LT CD8⁺ e, em menor extensão, nos LT CD4⁺ normais residuais foi previamente descrito no SP⁵⁷⁵ e na pele⁵⁷⁶ de doentes com linfomas T cutâneos e reflecte muito provavelmente uma resposta anti-tumoral, a nível local e sistémico. Será necessário alargar este estudo para avaliar se esta resposta tem tradução clínica, isto é, se aqueles doentes em que a resposta anti-tumoral é mais evidente correspondem àqueles com evolução clínica mais favorável.

4.3.1.1.d) Valor dos estudos imunofenotípicos na avaliação de resposta à terapêutica e na detecção de doença residual

Os perfis IF aberrantes descritos abrem as portas à nossa capacidade de monitorização da resposta da doença à terapêutica e de detecção de doença residual. Impõem-se as limitações resultantes da possibilidade de existirem alterações IF nas CS ao longo do tempo. Por outro lado, e até que seja identificada a família TCR-V preferencialmente expandida no SS, o estudo combinado do IF e do repertório TCR-V pouco acrescenta ao estudo IF “*per se*”, no que respeita à identificação de populações minoritárias de CS.

⁵⁶⁹ Matutes E e col (1991): Clinical and laboratory features of 78 cases of T-prolymphocytic leukemia. *Blood* 78: 3269-74

⁵⁷⁰ Jones D e col (2001): Absence of CD26 expression is a useful marker for diagnosis of T-cell lymphoma in peripheral blood. *Am J Clin Pathol* 115: 885-92

⁵⁷¹ Jamal S, e col (2001): Immunophenotypic analysis of peripheral T-cell neoplasms. A multiparameter flow cytometric approach *Am J Clin Pathol* 116: 512-26

⁵⁷² LeMaistre CF e col (1998): Phase I trial of a ligand fusion-protein (DAB389IL-2) in lymphomas expressing the receptor for interleukin-2. *Blood* 91: 399-405

⁵⁷³ Foss FM (2000): DAB (389) IL-2 (ONTAK): a novel fusion toxin therapy for lymphoma. *Clin Lymphoma* 1: 110-6

⁵⁷⁴ Lundin J e col (2003): Phase II study of alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody, Campath-1H) in patients with advanced mycosis fungoides/Sezary syndrome. *Blood* 101: 4267-72.

⁵⁷⁵ Asadullah K e col (1997): Enhanced expression of T-cell activation and natural killer cell antigens indicates systemic anti-tumor response in early primary cutaneous T-cell lymphoma. *J. Invest. Dermatol.* 108: 743-7

⁵⁷⁶ Bagot M e col (1998): Isolation of tumor-specific cytotoxic CD4⁺ and CD4⁺CD8^{dim} T-cell clones infiltrating a cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 91: 4331-41

Ainda no que respeita ao tratamento, o facto de terapêuticas imunomoduladoras que começam a ser testadas em doentes com linfomas T cutâneos terem na sua base a utilização de citocinas para potenciar esta resposta anti-tumoral,^{577,578} fazem-nos prever a utilidade da caracterização do perfil IF e funcional dos LT residuais normais para monitorizar o efeito terapêutico.

4.3.1.2. Características biológicas

Apesar das semelhanças fenotípicas encontradas entre os diferentes doentes com SS, é curiosa a diversidade IF ao nível intra-tumoral detectada em cada caso individual, manifestada pela presença de CS de tamanhos e com conteúdos diferentes de ADN e de sub-populações de células com diferentes níveis de expressão de CD7 e CD2. O estudo específico da quantidade de ADN nas CS mostrou que a presença de CS grandes informa sobre a existência de um conteúdo hiperplóide, frequentemente tetraplóide, de ADN.

Apesar desta heterogeneidade intra-tumoral, o estudo do rearranjo dos genes que codificam para o TCR evidenciou monoclonalidade em todos os casos, sugerindo que a heterogeneidade intra-tumoral é também uma heterogeneidade intra-clonal.

O facto da proporção de pacientes com CS grandes ser maior entre os doentes com história de eritrodermia mais prolongada e das CS sofrerem alterações IF ao longo da evolução da doença, apoia a noção de que esta heterogeneidade seja o resultado de mutações somáticas

⁵⁷⁷ Zaki MH e col (2002): Synergistic enhancement of cell-mediated immunity by interleukin-12 plus interleukin-2: basis for therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 118: 366-71

que ocorrem ao longo do tempo. Estes resultados estão de acordo com estudos recentes que apontam para a existência de uma grande instabilidade cromossômica em doentes com SS⁵⁷⁹ e com os relatos de transformação de linfomas T cutâneos em doenças com características histológicas e clínicas mais agressivas.^{580 581 582 583}

4.3.1.3. Reflexões sobre a etiopatogenia

A etiopatogenia dos linfomas cutâneos tipo MF e SS é desconhecida. A inespecificidade das lesões cutâneas na fase inicial da doença, em que a maioria dos LT que infiltram a pele são “reactivos” (*i.e.*, acompanhantes dos LT neoplásicos, que podem representar uma fracção mínima do infiltrado linfóide cutâneo), faz com que estes linfomas cutâneos sejam frequentemente confundidos com dermatites crónicas linfocíticas “inespecíficas”, criando grandes dificuldades no seu diagnóstico.^{584,585}

Infecções bacterianas, superantigénios e neoplasias

Alguns autores têm considerado a possibilidade de que na génese dos linfomas T cutâneos tipo MF e SS possa estar uma estimulação crónica dos LT CD4⁺ por SAg produzidos por bactérias que colonizam a pele

⁵⁷⁸ Rook AH e col (2001): The role for interleukin-12 therapy of cutaneous T cell lymphoma. *Ann N Y Acad Sci* 941: 177-84

⁵⁷⁹ Mao X e col (2003): Molecular cytogenetic characterization of Sezary syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 36: 250-60

⁵⁸⁰ Wolfe JT e col (1995): Large-cell transformation following detection of minimal residual disease in cutaneous T-cell lymphoma: molecular and in situ analysis of a single neoplastic T-cell clone expressing the identical T-cell receptor. *J Clin Oncol* 13: 1751-7

⁵⁸¹ Diamandidou E e col (1998): Transformation of mycosis fungoides / Sezary syndrome: clinical characteristics and prognosis. *Blood* 92: 1150-59

⁵⁸² Li G e col (1998): Overexpression of p53 protein in cutaneous T cell lymphoma: relationship to large cell transformation and disease progression. *J. Invest. Dermatol* 110: 767-70

⁵⁸³ So CC e col (2000): Large cell transformation of Sezary syndrome. A conventional and molecular cytogenetic study *Am J Clin Pathol* 113: 792-7

⁵⁸⁴ Zackheim HS e col (2002): Mycosis fungoides: the great imitator. *J Am Acad Dermatol* 47: 914-8

⁵⁸⁵ Dadej K (2001): The value of clonality in the diagnosis and follow-up of patients with cutaneous T-cell infiltrates. *Diagn Mol Pathol* 10: 78-88

durante os quadros inflamatórios cutâneos, em particular pelo *Staphylococcus aureus*.⁵⁸⁶

Os trabalhos publicados até à data relativos ao estudo do repertório TCR-V nas CS são escassos e mostram resultados discordantes entre si.^{587,588,589,590,591} Estas discrepâncias podem estar relacionadas com a utilização de critérios diferentes para a selecção de doentes (SS vs. linfomas cutâneos em geral), com o estudo de distintas amostras biológicas (sangue vs. pele), com o recurso a abordagens técnicas diferentes (imunofenotípicas vs. moleculares; tipo de famílias TCR-V testadas) e com a variabilidade dos métodos de análise (análise do repertório nos LT totais vs. análise selectiva nos LT CD4⁺ e/ou CD8⁺).

Outro factor importante que deve ser considerado na interpretação dos resultados diz respeito à existência de expansões no próprio compartimento T normal, que podem ser erradamente atribuídas às CS, sobretudo quando os LT reactivos predominam sobre os neoplásicos ou quando são utilizados métodos muito sensíveis, mas sem especificidade para a célula neoplásica, como a PCR. De facto, foram descritas expansões TCR-V em dermatites

reactivas⁵⁹² e a própria resposta anti-tumoral mediada por linfócitos T citotóxicos tem um repertório TCR-V restrito.⁵⁹³ Desta forma, os estudos IF por CF oferecem uma vantagem importante: a possibilidade de conjugar a informação do repertório TCR-V com a informação do IF e, portanto, avaliar se a expansão detectada corresponde ao componente tumoral ou à resposta imune anti-tumoral.

Tanto quanto é do nosso conhecimento, o único estudo em que foi analisado o repertório TCR-V por estudos IF e moleculares em um grupo relativamente uniforme de doentes com SS sugeriu a utilização de um número restrito de famílias TCR-V (V 5, V 6, V 8, V 13, e V 18) pelas CS.⁵⁹⁴ Urgia pois confirmá-lo, alargando-o a um maior número de doentes.

O facto de neste trabalho não ter sido possível identificar a família TCR-V expandida em 78% dos casos de SS estudados, utilizando um painel de AcMo que detecta cerca de 60% do repertório TCR-V dos LT CD4⁺ do SP normal, sugere que as CS expressem preferencialmente uma ou mais famílias que não estejam representadas nesse painel.

A hipótese de uma utilização preferencial de uma família (ou de um número restrito de famílias) também é apoiada pelo facto de, em 3 dos 4 casos em que a família expandida foi identificada (17% do total dos casos estudados) ter sido detectada a família TCR-V 13.6,

⁵⁸⁶ Leung DY e col (1995): The role of superantigens in skin disease. *J Invest Dermatol* 105: 37S-42S

⁵⁸⁷ Longley J e col (1995): Malignant and normal T cells show random use of T-cell receptor alpha chain variable regions in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *J. Invest. Dermatol* 105: 62-4

⁵⁸⁸ Finn DT e col (1996): Correlation between clonotypic T-cell receptor beta chain variable region (TCR-V beta) gene expression and aberrant T-cell antigen expression in cutaneous T-cell lymphoma. *J Cutan Pathol* 23: 306-11

⁵⁸⁹ Potoczna N e col (1996): T-cell receptor beta variable region (V beta) usage in cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) in comparison to normal and eczematous skin. *J Cutan Pathol* 23: 298-305

⁵⁹⁰ Thor Straten P e col (1998): T-cell receptor variable region genes in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol* 138: 3-12

⁵⁹¹ Schwab C e col (2002): The use of anti-T-cell receptor-Vbeta antibodies for the estimation of treatment success and phenotypic characterization of clonal T-cell populations in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Haematol* 118: 1019-26

⁵⁹² Neuber K e col (1996): Preferential expression of T-cell receptor V beta-chains in atopic eczema. *Acta Derm Venereol* 76: 214-8

⁵⁹³ Bagot M e col (1998): Isolation of tumor-specific cytotoxic CD4⁺ and CD4⁺CD8^{dim+} T-cell clones infiltrating a cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 91: 4331-41

⁵⁹⁴ Gorochov G e col (1995): Expression of V beta gene segments by Sezary cells. *J. Invest Dermatol* 105: 56-61

habitualmente expressa em menos de 2% dos LT CD4⁺ do SP normal.

Desta forma, este estudo fornece, pela primeira vez, resultados consistentes que poderiam apoiar a hipótese discutida desde há longa data de que os linfomas T cutâneos, em particular a MF e o SS, sejam doenças mediadas por SAg de origem bacteriana, nomeadamente os relacionados com o *Staphylococcus aureus*.⁵⁹⁵

São vários os argumentos que apoiam esta hipótese: 1) O *Staphylococcus aureus* isolado da pele de doentes com dermatite atópica produz toxinas com actividade de SAg e a aplicação destas toxinas sobre a pele são induz dermatites inespecíficas com expansão de LT que expressam um número restrito de famílias do repertório TCR-V⁵⁹⁶ 2) tem sido isolado *Staphylococcus aureus* da pele ou sangue de doentes com MF e SS e a antibioterapia melhora as manifestações cutâneas da doença,^{597,598} embora o facto da colonização cutânea por esta bactéria ser mais frequente nas fases avançadas da doença tenha levantado a possibilidade de ela ser secundária à perda da integridade da barreira cutânea; 3) foi demonstrado que as CS têm a capacidade de responder “in vitro” a SAg⁵⁹⁹ e 4) a estimulação dos LT com a

enterotoxina estafilocócica induz a expressão de CLA.⁶⁰⁰

Cabe também aqui muito provavelmente um papel especial às células apresentadoras de Ag cutâneas, as células de Langherans e os queratinócitos, com as quais as CS mantêm relações estreitas de proximidade física e funcional. Sabe-se que as células de Langherans, como células apresentadoras de Ag especializadas, expressam CD1b e CD1c e podem, portanto, apresentar Ag bacterianos não peptídicos (lípidos ou glicolípidos) aos LT.^{601,602,603,604} Por outro lado, os queratinócitos, células especializadas da camada exterior da epiderme, também são capazes de produzir uma grande variedade de citocinas e de expressar Ag da classe II do MHC durante os processos inflamatórios, funcionando, nestas circunstâncias, como células apresentadoras de Ag.^{605,606}

Curiosamente, foi demonstrado que, quer as células de Langherans, quer os queratinócitos activados, podem funcionar como células apresentadoras de SAg de origem estafilocócica^{607,608} e que SAg estafilocócicos induzem

⁵⁹⁵ Leung DY e col (1995): The role of superantigens in skin disease. *J Invest Dermatol* 105:375-425

⁵⁹⁶ Skov L e col (2000): Application of Staphylococcal enterotoxin B on normal and atopic skin induces up-regulation of T cells by a superantigen-mediated mechanism. *Allergy Clin Immunol* 105: 820-6

⁵⁹⁷ Tokura Y e col (1995): Cutaneous colonization with staphylococci influences the disease activity of Sezary syndrome: a potential role for bacterial superantigens. *Br J Dermatol* 133: 6-12

⁵⁹⁸ Jackow CM e col (1997): Association of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma, superantigen-positive *Staphylococcus aureus*, and oligoclonal T-cell receptor V beta gene expansion. *Blood* 89: 32-40

⁵⁹⁹ Sano S e col (1998): Immunological study on CD3 defective cutaneous T cell lymphoma cells from a patient with Sezary syndrome. *Clin Exp Immunol* 113: 190-7

⁶⁰⁰ Leung DY e col (1995): Bacterial superantigens induce T cell expression of the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen, via stimulation of interleukin 12 production. *J Exp Med* 181: 747-53

⁶⁰¹ Ulanova M e col (1999): Participation of CD1 molecules in the presentation of bacterial protein antigens in humans. *Scand J Immunol* 50: 387-93

⁶⁰² De Libero G e col (2001): Immunity to glycolipid antigens in microbial infections. *J Biol Regul Homeost Agents* 15: 249-56

⁶⁰³ Ulrichs T (2000): CD1 proteins: targets of T cell recognition in innate and adaptive immunity. *Rev Immunogenet.* 2: 416-32

⁶⁰⁴ Matsuda JL e col (2001): Presentation of self and microbial lipids by CD1 molecules. *Curr Opin Immunol* 13: 19-25

⁶⁰⁵ Cooper KD (1992): Skin-infiltrating lymphocytes in normal and disordered skin: activation signals and functional roles in psoriasis and mycosis fungoides-type cutaneous T cell lymphoma. *J Dermatol* 19: 731-7

⁶⁰⁶ Nickoloff BJ e col (1994): Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol Today* 15: 464-9

⁶⁰⁷ Tokura Y e col (1994): Superantigenic staphylococcal exotoxins induce T-cell proliferation in the presence of Langerhans cells or class II-bearing keratinocytes and stimulate keratinocytes to produce T-cell-activating cytokines. *J Invest Dermatol* 102: 31-8

⁶⁰⁸ Travers JB e col (2001): The keratinocyte as a target for staphylococcal bacterial toxins. *J Invest Dermatol Symp Proc* 6: 225-30

maturação e migração das células dendríticas de uma forma dependente dos LT.⁶⁰⁹

Modelo hipotético para a etiopatogénese do Síndrome de Sezary

Os resultados apresentados e a informação disponível na literatura, favorecem a hipótese de que os linfomas cutâneos tipo MF e SS possam ter na sua origem a estimulação crónica dos LT CD4⁺ por um SAg bacteriano, nomeadamente de origem estafilocócica e que neste processo esteja envolvida a interacção estreita dos LT com as células cutâneas apresentadoras de Ag.

⁶⁰⁹ Muraille E e col (2002): T cell-dependent maturation of dendritic cells in response to bacterial superantigens. J Immunol 168: 4352-60

5. CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Nesta secção expomos de forma sumária as conclusões mais relevantes deste trabalho.

No que se refere aos critérios fenotípicos para a detecção de linfócitos T e de células NK neoplásicas:

.- Em relação aos fenótipos das células NK do sangue periférico de adultos saudáveis:

1.- As células NK CD56⁺ e as células NK CD56⁺⁺ normais do sangue periférico mostram características fenotípicas estáveis mas distintas. Estas diferenças fenotípicas sugerem que as células CD56⁺⁺ possam corresponder a uma subpopulação de células NK previamente activadas, com um padrão distinto de reconhecimento de moléculas do MHC e diferentes requisitos para proliferar e activar as suas funções citotóxicas; para além disso, essas diferenças poderiam também contribuir a explicar a sua maior capacidade de emigrar para diferentes tecidos.

.- Em relação aos fenótipos das células T e NK do sangue periférico em estadios de activação aguda/precoce e crónica/tardia:

2.- Os padrões de expressão das moléculas CD2, CD7, CD57, CD11c, CD38, CD11b, CD45RA, CD45RO, CD11a e HLA-DR permitem definir perfis fenotípicos associados com a activação aguda/precoce e crónica/tardia de células NK “*in vivo*”, diferentes entre eles e distintos, por sua vez, dos fenótipos das células NK normais do sangue periférico de adultos saudáveis. No seu conjunto, estes padrões constituem a base para poder distinguir

células NK normais e activadas das células NK neoplásicas.

3.- Os linfócitos T de indivíduos adultos com infecção aguda mononucleósica mostram perfis fenotípicos diferentes dos linfócitos T normais, sofrendo modificações fenotípicas parecidas com as das células NK activadas de indivíduos com infecções agudas. Estas alterações fenotípicas são muito evidentes nos linfócitos T TCR⁺/CD8⁺ e, ainda que em menor medida, são observadas também nos linfócitos T TCR⁺/CD4⁺ e TCR⁺.

.- Em relação à utilidade da análise do repertório de famílias de regiões variáveis da cadeia do TCR na identificação de expansões (mono) clonais de LGL T TCR⁺:

4.- Os indivíduos com infecção aguda mononucleósica mostram pequenas expansões de uma ou mais famílias TCR-V dentro dos linfócitos T TCR⁺/CD8⁺, dos linfócitos T TCR⁺/CD4⁺ ou de ambos; no entanto estas expansões nunca chegam a representar uma proporção significativa de cada uma destas populações.

5.- A análise imunofenotípica por citometria de fluxo do repertório de famílias de regiões variáveis da cadeia do TCR é de grande utilidade no diagnóstico de (mono) clonalidade T das expansões persistentes de LGL-T TCR⁺. Assim, expansões de uma única família TCR-V que representem mais de 60% do conjunto dos LT TCR⁺/CD4⁺ ou dos LT

TCR⁺/CD8⁺ podem ser consideradas como altamente sugestivas de monoclonalidade, enquanto que aquelas com expansões inferiores a 40% são com grande probabilidade policlonais/ oligoclonais, dependendo de confirmação molecular; naqueles casos em que as expansões oscilam entre 40% e 60% do total dos LT TCR⁺/CD4⁺ ou dos LT TCR⁺/CD8⁺, é necessária a confirmação da expressão nas células expandidas de fenótipos aberrantes ou da existência de reordenamentos clonais dos genes do TCR para estabelecer um diagnóstico de (mono) clonalidade T.

No que se refere à caracterização clínica e biológica de expansões de LGL-T e -NK com fenótipos aberrantes, pouco conhecidas:

6.- Embora praticamente desconhecidas até à data, as expansões de LGL tanto NK CD56^{-/+débil} como T CD4⁺/TCR⁺ são relativamente frequentes. Enquanto que as primeiras representam cerca de 20% de todas as expansões de LGL-NK, a incidência das expansões de LGL CD4⁺/TCR⁺ é de cerca de 1,7 casos novos por milhão de habitantes e ano.

.- Em relação às expansões de LGL-NK CD56^{-/+débil}:

7.- As LGL-NK CD56^{-/+débil} têm um perfil imunofenotípico muito sugestivo da existência de uma extensa activação celular subjacente, mas aberrante, com uma deficiência profunda na expressão de glicoproteínas de membrana envolvidas na adesão / migração celular das células NK e na sua interacção com as células-alvo. Do ponto de vista clínico, as DLPC de LGL-NK CD56^{-/+débil} mostram um curso indo-

lente, mas que se associa a citopenias, infecções víricas e outras neoplasias, que frequentemente determinam os problemas clínicos e a evolução e que poderão contribuir para entender a etiopatogenia destas doenças.

.- Em relação às expansões monoclonais de LGL-T TCR⁺/CD4⁺:

8.- As expansões monoclonais de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ apresentam um perfil imunofenotípico que sugere activação celular prévia e diferenciação terminal em célula efectora de tipo citotóxico, com produção preferencial de citocinas de tipo Th1. Para além disso mostram uma utilização restrita de famílias TCRV, que poderá estar relacionada com a hipótese de estas DLPC terem a sua origem na estimulação dos linfócitos T TCR⁺ por um superantigénio.

Clinicamente, as DLPC de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ têm um curso benigno, habitualmente determinado pela presença de outras neoplasias associadas, cujas primeiras manifestações podem preceder, ser concomitantes ou suceder ao diagnóstico da DLPC-T; ao contrário das leucemias LGL-T TCR⁺/CD8⁺, não se associam a citopenias e fenómenos de autoimunidade.

No que diz respeito ao Síndrome de Sezary como modelo de doença linfoproliferativa T com características clínicas e histopatológicas bem definidas:

9.- A presença de células T CD4⁺/CD28⁺/CD5⁺/NKa⁻ com expressão anormalmente baixa do complexo CD3/TCR e das moléculas CD7 e/ou CD2 em doentes com eritro-

dermia, constitui uma característica altamente sugestiva de Síndrome de Sezary. A expansão preferencial de uma ou mais famílias TCR-V – não identificadas pelo painel de AcMo utilizado neste estudo – sugere que na origem do Síndrome de Sezary possa estar a estimulação crónica dos linfócitos T CD4⁺ cutâneos por um superantigénio.

10.- No Síndrome de Sezary existe uma grande heterogeneidade fenotípica a nível intratumoral, manifestada pela presença de duas ou

mais populações de células linfóides neoplásicas que diferem no seu tamanho/complexidade interna, perfil fenotípico e/ou conteúdo de ADN; esta heterogeneidade intraclonal provavelmente devida à grande instabilidade genética das células de Sezary, contribui para explicar as modificações fenotípicas que ocorrem durante a evolução da doença e o seu comportamento clínico.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

PERSPECTIVAS FUTURAS

O trabalho aqui apresentado abre novas perspectivas de investigação na área das DLPC-T e NK que ultrapassam largamente os domínios da Imunologia e da Hematologia, para envolver áreas relacionadas como a Bioquímica, a Biologia Celular e a Virologia.

No que diz respeito à DEFINIÇÃO DE CRITÉRIOS IMUNOFENOTÍPICOS DE (MONO) CLONALIDADE T E NK, os modelos propostos para a sequência de modificações fenotípicas dos linfócitos T e das células NK após activação, como modelos genéricos que são, têm vantagens e desvantagens, algumas falhas e algumas zonas cinzentas que urge colorir com estudos mais dirigidos que permitam clarificar a expressão de algumas moléculas/receptores celulares a diferentes tempos e em diferentes subpopulações celulares. Conscientes de que os estudos “in vitro” enfermam sempre de alguns inconvenientes, temos a este respeito, previsto efectuar, a curto prazo e em colaboração com o Laboratório de Citogenética do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, a estimulação “in vitro” das CNK com citocinas de importância reconhecida na activação destas células, tais como a IL2, a IL12 e a IL15,^{610,611} com estudo fenotípico e funcional a diferentes tempos.

Por outro lado, temos a plena consciência de que, a nível da CONTRIBUIÇÃO PARA O ESCLARECIMENTO DA ETIOPATOGENIA DAS DLPC-T E NK, até à data pouco mais foi possível do que explorar os raciocínios lógicos que se impunham perante os resultados obtidos,

⁶¹⁰ Ortaldo JR e col (1984): Effects of natural and recombinant IL2 on regulation of IFN production and natural killer activity: lack of involvement of the Tac antigen for these immunoregulatory effects. J Immunol 133: 779-83

fazendo algumas reflexões que consideramos pertinentes. São essas as limitações de um trabalho que, por opção, se quis conjugar com a vertente clínica. Urge, pois, num futuro próximo, esclarecer os mecanismos moleculares subjacentes à deficiência de glicoproteínas de membrana nas DLPC de LGL-NK CD56^{-/+débil} e do papel de superantígenos de origem vírica ou bacteriana na génese das DLPC de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ e do Síndrome de Sezary, respectivamente. O prosseguir do trabalho de investigação nesta área exigirá, pois, um trabalho multidisciplinar que se deseja realizar num futuro imediato.

No que respeita às DLPC de LGL-NK CD56^{-/+débil}, o estudo funcional das células NK destes doentes fornecerá um contributo importante para documentar a importância destas moléculas nas funções efectoras das células NK. Poderá ainda, em conjunto com o doseamento sérico de mediadores envolvidos na apoptose e na actividade citotóxica, como a granzima B, o Fas e o FasL, que já foi também iniciado, contribuir para o esclarecimento da génese das citopenias. Com o mesmo objectivo, temos previsto efectuar o estudo da expressão de proteínas ligadas ao GPI nos leucócitos, eritrócitos e plaquetas do sangue periférico de doentes com DLPC de LGL-NK CD56^{-/+débil}.

⁶¹¹ Puzanov I e col (1996): IL-15 can substitute for the bone marrow microenvironment in the differentiation of natural killer cells. J. Immunol. 157: 4282-5

Os resultados preliminares já obtidos parecem ser promissores, já que o estudo dos leucócitos de sangue periférico de um dos doentes apresentados nesta série, com anemia hemolítica e neutropenia severas, revelou um fenótipo semelhante ao encontrado na Hemoglobinúria Paroxística Nocturna. Foi também iniciado o estudo da expressão de receptores de quimiocinas nas células NK CD56^{-/+débil}, já que a expressão aberrante destes receptores pode contribuir para uma migração anómala destas células NK para os tecidos, mas ainda não dispomos de resultados conclusivos.

A análise molecular do gene que codifica para o CD56 está também neste momento em curso – estudo de colaboração com a Unidade de Biologia Molecular do Hospital Geral de Santo António – e já existem alguns resultados preliminares obtidos por técnicas de PCR, com amplificação da maioria dos exões, que não evidenciaram até ao momento alterações. Para excluir a possibilidade de uma mutação pontual está a ser efectuada a sequenciação deste gene nas células NK CD56^{-/+débil}, da qual ainda não existem resultados. A abordagem não será provavelmente simples dado que o gene que codifica para o CD56 é complexo, que existem várias isoformas de CD56 resultantes de “splicing” alternativo^{612,613,614} e que as células NK e os LT expressam uma isoforma com 140 kDa que sofre modificações pós-translação.⁶¹⁵

Em relação à etiopatogénese das DLPC de LGL-T TCR⁺/CD4⁺, o passo seguinte será investigar a integração do material genético do EBV (ou de outros vírus do grupo Herpes) nas células destes doentes; não nos linfócitos T leucémicos que constituem a vasta maioria dos linfócitos do sangue periférico, mas nas outras células tumorais: os linfócitos B neoplásicos ou as células de tumores não hematológicos.

No caso do SÍNDROME DE SEZARY, será indispensável alargar o estudo a um maior número de doentes, de forma a identificar fenótipos mais raros, estabelecer os critérios para diagnóstico diferencial com outras DLPC-T que cursam com eritrodermia e clarificar qual a (s) família (s) de regiões variáveis do TCR preferencialmente expandidas.

Finalmente, esperamos que os conhecimentos adquiridos durante o período de tempo em que decorreu este trabalho venham a contribuir para a construção de um NOVO SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO DAS DLPC-T E NK que se pretende compreensivo do ponto de vista biológico e funcional do ponto de vista clínico. Nessa nova classificação ter-se-há em consideração o fenótipo, as características funcionais e tropismo tecidual da célula neoplásica e as relações de proximidade física e funcional que esta estabelece com outras células, assumindo-se que estes são determinantes fundamentais das manifestações e do comportamento clínico-biológico das DLP-T e NK.

⁶¹² Cunningham BA e col (1987): Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236: 799-806

⁶¹³ Hemperly JJ e col (1990): Characterization of cDNA clones defining variant forms of human neural cell adhesion molecule N-CAM. *J Mol Neurosci* 2: 71-8

⁶¹⁴ Barton CH e col (1988): Complete sequence and in vitro expression of a tissue-specific phosphatidylinositol-linked N-CAM isoform from skeletal muscle. *Development* 104: 165-73

⁶¹⁵ Lanier LL e col (1991): Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol* 146: 4421-6

PENSAMENTO

O primeiro sinal de que começamos a saber algo sobre determinado assunto é a tomada de consciência da nossa ignorância.

Margarida Lima

Abril 2003

ANEXO 1. TABELAS E FIGURAS

Neste anexo apresentam-se resultados não incluídos em capítulos anteriores e que consideramos ser de apoio à discussão e interpretação global deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Estudo do repertório TCR-V em doentes com expansões de LGL-T TCR ⁺ /CD4 ⁺ POLICLONAIS E OLIGOCLONAIS	----116
Tabela 2 Estudo comparativo da magnitude da expansão TCR-V e do número de LT TCR ⁺ /CD4 ⁺ com características IF de LGL (definidas pela ausência de expressão de CD28 e pela expressão de antigénios NKα) em doentes com expansões de LGL-T TCR ⁺ /CD4 ⁺ MONOCLONAIS e em doentes com expansões POLICLONAIS E OLIGOCLONAIS das mesmas células	---117
Tabela 3 Estudo comparativo da expressão de CD28, CD45RA, CD45RO, CD56 e CD57 nos LGL-T TCR ⁺ /CD4 ⁺ em doentes com expansões de LGL-T TCR ⁺ /CD4 ⁺ MONOCLONAIS e em doentes com expansões POLICLONAIS E OLIGOCLONAIS das mesmas células	----118
Tabela 4 Sensibilidade e especificidade dos perfis IF de expressão de CD56/CD57 e CD45RO/CD45RA para o diagnóstico de (MONO) CLONALIDADE nas expansões de LGL-T TCR ⁺ /CD4 ⁺	----119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Produção de TNF- e IFN- pelas CNK de SP de doentes com DLPC de LGL-NK CD56 ^{-/4débil} , em comparação com a observada nas CNK de SP de doentes com DLPC de LGL-NK CD56 ⁺	----120
Figura 2 Estudo comparativo do perfil IF dos LGL-T TCR ⁺ /CD4 ⁺ MONOCLONAIS e POLICLONAIS / OLIGOCLONAIS para os antigénios CD45RA, CD45RO, CD56 e CD57.	----121

ANEXO 1 / Tabela 1

Estudo do repertório TCR-V em doentes com expansões de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ POLICLONAIS E OLIGOCLONAIS.

Nº DE DOENTE	REARRANJO MOLECULAR DO GENE TCR-	TOTAL DAS EXPANSÕES	EXPANSÕES TCR-V	
			EXPANSÃO MAJOR	EXPANSÕES MINOR
1	Oligoclonal	12.9%	V 13.1 (12.9%)	
2	Oligoclonal	17.9%	V 12.2 (17.9%)	
3	Policlonal	21.9%	V 6.7 (21.9%)	
4	Policlonal	22.7%	V ni (22.7%)	
5	Policlonal	22.8%	V ni (15.1%)	V 8.1+8.2 (7.7%)
6	Policlonal	27.2%	V ni (27.2%)	
7	Oligoclonal	37.5%	V ni (37.5%)	
8	Oligoclonal	40.6%	V ni (40.6%)	
9	Oligoclonal	42.7%	V 3.1 (24.8%)	V 11.1 (17.9%)
10	Policlonal	43.2%	V ni (43.2%)	
11	Oligoclonal	57.9%	V ni (57.9%)	
12	Oligoclonal	66.0%	V 2.1 (54.1%)	V 17.1 (11.9%)

Resultados expressos em percentagem dos LT TCR⁺/CD4⁺.

NOTAS:

(*) Estudos efectuados por "Southern blot" e/ou PCR.

(**) Entende-se por expansão TCR-V "major" a maior expansão encontrada em cada caso individual e por expansões "minor" as restantes.

ABREVIATURAS:

ni: não identificada; LGL: linfócitos grandes granulares; LT: linfócitos T; TCR: receptor da célula T; TCR- : gene que codifica para a cadeia beta do TCR; TCR-V : repertório de famílias de regiões variáveis da cadeia beta do TCR; PCR: "polymerase chain reaction", reacção em cadeia da polimerase do ADN.

ANEXO 1 / Tabela 2

Estudo comparativo da magnitude da expansão TCR-V β e do número de LT TCR β ⁺/CD4⁺ com características IF de LGL (definidas pela ausência de expressão de CD28 e pela expressão de antígenos NKa) em doentes com expansões de LGL-T TCR β ⁺/CD4⁺ MONOCLONAIS e em doentes com expansões POLICLONAIS E OLIGOCLONAIS das mesmas células.

	CASOS POLICLONAIS E OLIGOCLONAIS (N=12)	CASOS MONOCLONAIS (N=20)
% Expansão TCR-V	30 ± 16 (25)	75 ± 21 (83)
% TCR β ⁺ /CD4 ⁺ CD28 ⁻	41 ± 18 (34)	79 ± 20 (86)
% LT TCR β ⁺ /CD4 ⁺ NKa ⁺ (LGL)	37 ± 14 (34)	77 ± 20 (86)
LT TCR β ⁺ /CD4 ⁺ NKa ⁺ x 10 ⁶ /l	533 ± 372 (468)	4764 ± 3780 (3650)

Resultados expressos em percentagem de células que expressam os antígenos indicados no total dos LT TCR β ⁺/CD4⁺ (média ± 1 desvio padrão; mediana entre parentesis) e número absoluto de LT TCR β ⁺/CD4⁺ que expressam antígenos NKa.

ABREVIATURAS:

IF: imunofenotípicas; LT: linfócitos T; NKa: antígenos associados às células NK; TCR: receptor da célula T; TCR-V β : família de regiões variáveis da cadeia beta do TCR.

ANEXO 1 / Tabela 3

Estudo comparativo da expressão de CD28, CD45RA, CD45RO, CD56 e CD57 nos LGL-T TCR⁺/CD4⁺ em doentes com expansões de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ MONOCLONAIS e em doentes com expansões POLICLONAIS E OLIGOCLONAIS das mesmas células.

			CASOS POLICLONAIS OU OLIGOCLONAIS (N=12)	CASOS MONOCLONAIS (N=20)
CD28	% das LGL	% CD28 ⁻	84 ± 14 (88)	97 ± 7 (100)
		% CD28 ^{+débil, het}	16 ± 14 (12)	3 ± 7 (0)
	% de casos	CD28 ^{-/+débil}	7 / 12 (58%)	1 / 20 (5%)
CD57 / CD56	% das LGL	% CD57 ⁺	98 ± 10 (100)	92 ± 17 (98)
		% CD56 ⁺	30 ± 23 (29)	89 ± 17 (100)
	% de casos	CD57 ⁺ / CD56 ^{-/+débil}	12 / 12 (100%)	2 / 20 (10%)
		CD57 ^{-/+débil} / CD56 ⁺	0 / 12 (0%)	16 / 20 (80%)
CD45RO / CD45RA	% LGL	% CD45RO ⁺	86 ± 9 (88)	84 ± 25 (94)
		% CD45RA ⁺	39 ± 27 (34)	68 ± 34 (84)
	% de casos	CD45RO ⁺ / CD45RA ^{-/+débil}	9 / 12 (75%)	5 / 20 (25%)
		CD45RO ^{-/+débil} / CD45RA ⁺	0 / 12 (0%)	12 / 20 (60%)
		CD45RO ⁺ / CD45RA ⁺	3 / 12 (25%)	12 / 20 (60%)
		CD45RO ^{-/+débil} / CD45RA ⁺	0 / 12 (0%)	3 / 20 (15%)

Resultados expressos em percentagem de LGL TCR⁺/CD4⁺ que expressam os antigénios indicados (média ± 1 desvio padrão; mediana a negro, entre parentesis) e em número e percentagem de casos com os perfis IF descritos.

ABREVIATURAS:

IF: imunofenotípicos; LGL: linfócitos grandes granulares; LT: linfócitos T; TCR: receptor da célula T.

ANEXO 1 / Tabela 4

Sensibilidade e especificidade dos perfis IF de expressão de CD56/CD57 e CD45RO/CD45RA para o diagnóstico de (MONO) CLONALIDADE nas expansões de LGL-T TCR⁺/CD4⁺

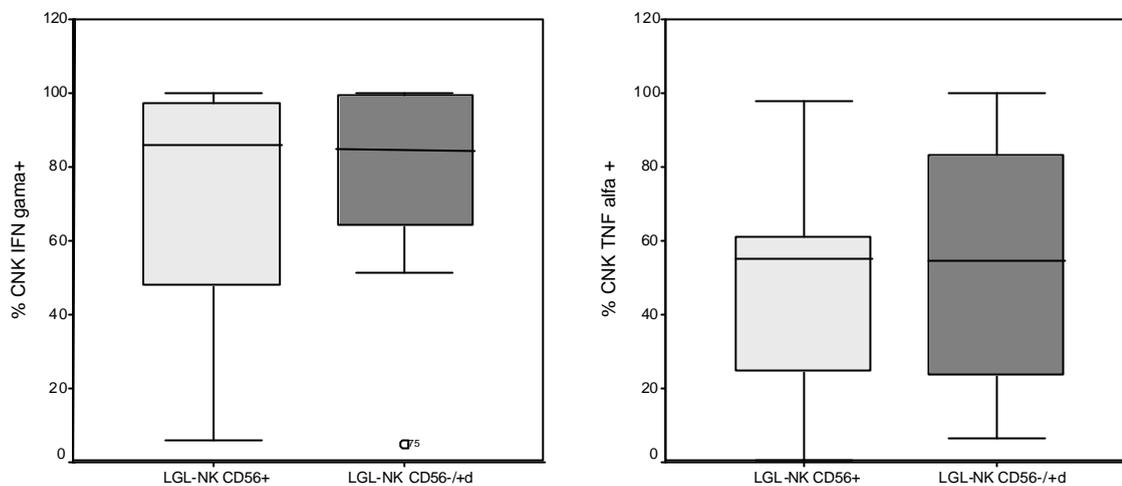
	PERFIL IMUNOFENOTÍPICO	
	CD57 ⁺ /CD56 ⁺	CD45RO ⁺ /CD45RA ⁺
	OU CD57 ^{-/+DÉBIL} / CD56 ⁺	OU CD45RO ^{-/+DÉBIL} / CD45RA ⁺
Valor preditivo positivo	100%	80%
Valor preditivo negativo	86%	53%
Sensibilidade	90%	60%
Especificidade	100%	75%

ABREVIATURAS:

IF: imunofenotípicos; LGL: linfócitos grandes granulares; TCR: receptor da célula T

ANEXO 1 / Figura 1

Produção de TNF- α e IFN- γ pelas CNK de SP de doentes com DLPC de LGL-NK CD56^{-/+débil}, em comparação com a observada nas CNK de SP de doentes com DLPC de LGL-NK CD56⁺.



ABREVIATURAS:

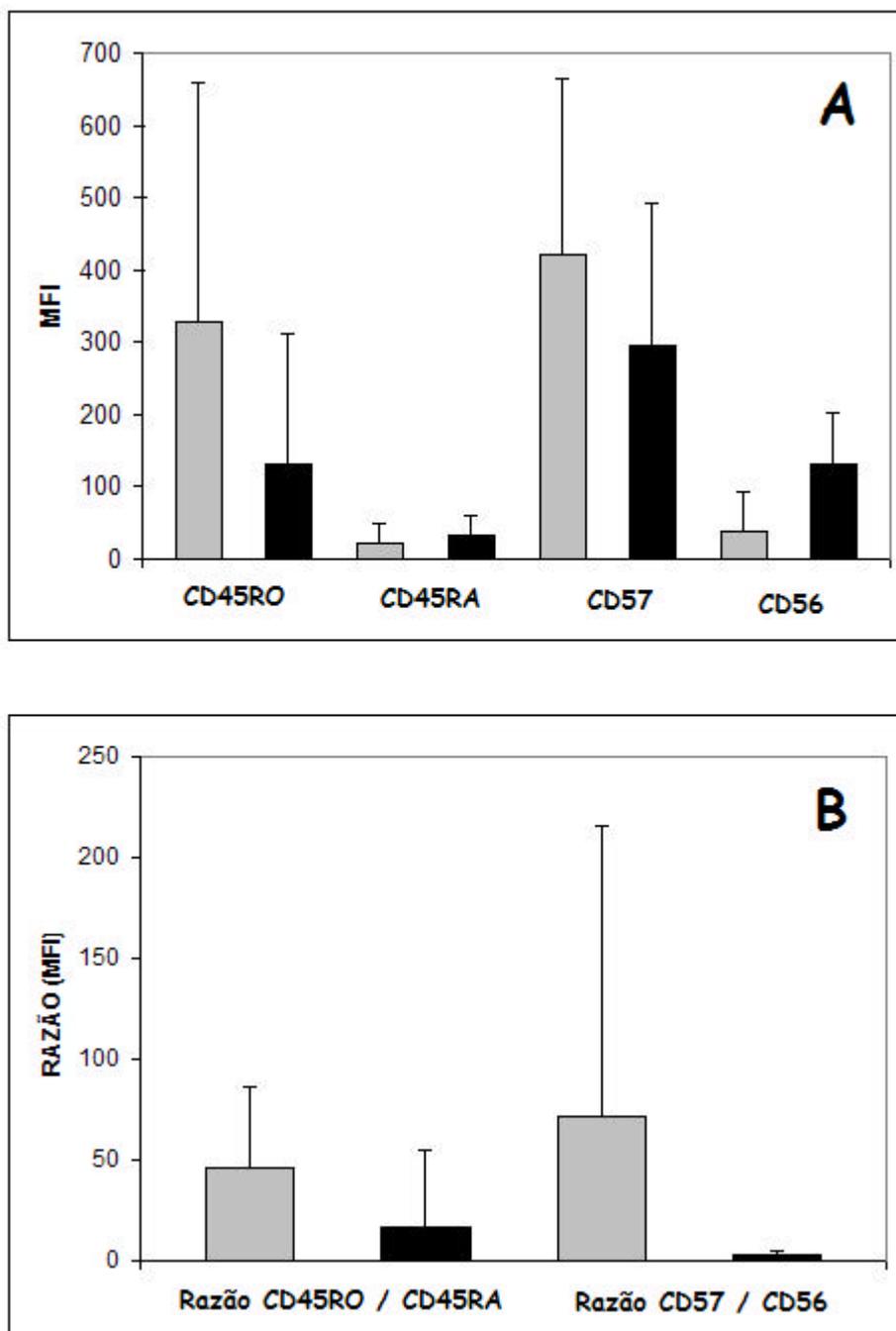
CNK: células NK; DLPC: doença linfoproliferativa crónica; IFN: interferão; SP: sangue periférico; TNF: factor de necrose tumoral.

NOTAS:

Para este estudo comparativo foram considerados os resultados da análise de 11 casos de DLPC de LGL-NK CD56⁺ e de 11 casos de DLPC de LGL-NK CD56^{-/+débil}.

ANEXO 1 / Figura 2

Estudo comparativo da intensidade média de expressão de CD45RA, CD45RO, CD56 e CD57 (gráfico A) e da razão entre as intensidades médias de expressão de CD45RO/CD45RA e de CD57/CD56 observadas em cada caso individual (gráfico B) nas expansões de LGL-T TCR⁺/CD4⁺ MONOCLONAIS (barras pretas, n = 20) e POLICLONAIS/OLIGOCLONAIS (barras cinzentas, n = 12).



ABREVIATURAS:

LGL: linfócitos grandes granulares; MFI: intensidade média de fluorescência.

ANEXO 2. PUBLICAÇÕES RELEVANTES RELACIONADAS COM O TRABALHO

- Art1. Arala-Chaves MP, Ribeiro A, Vilanova M, Santarém M, Lima M. Correlation between B cell mitogenicity and immunosuppressor effects of a protein released by porcine monocytes infected with African Swine Fever Virus. *Am. J. Vet. Res.* 1988; 49:1955-61.
RESUMO-Art1-PDF
- Art2. Lima M, Bandeira A, Portnoi D, Ribeiro A, Arala-Chaves MP. Protective effect of a T cell dependent immunosuppressive / B cell mitogenic protein (F3'EP-Si / p90) produced by the *S. intermedius*. *Infect. Immun.* 1992; 60: 3571-8.
RESUMO-Art2-PDF ARTIGO-Art2-PDF
- Art3. Lima M, Portnoi D, Bandeira A, Arala-Chaves MP. Peripheral lymphoid hyperplasia and central lymphoid depletion in mice treated with a bacterial protein (F3'EP-Si / p90). *Scand. J. Immunol.* 1993; 37:605-14.
RESUMO-Art3-PDF ARTIGO-Art3-PDF
- Art4. Lima M, Coutinho J, Orfão A, Macedo AL, San Miguel J, Justiça B. Chronic polymphocytoid leukaemia with an unusual immature immunophenotype. *J. Clin. Pathol.* 1994; 47: 461-3.
RESUMO-Art4-PDF ARTIGO-Art4-PDF
- Art5. Lima M. T-cell large granular lymphocytes / natural killer associated lymphoproliferative disorders: a superantigen-driven disease in humans? *Revista Sociedade Portuguesa de Imunologia* 1996; 3:37-46.
RESUMO-Art5-PDF ARTIGO-Art5-PDF
- Art6. Lima M, Rodrigues M, Porto B, Teixeira MA, Coutinho J, Ribeiro P, Malheiro MI, Justiça B. Cytogenetic findings in a patient presenting simultaneously with chronic lymphocytic leukemia and acute myeloblastic leukemia *Cancer Gen. Cytog.* 1996; 81:1-3.
RESUMO-Art6-PDF ARTIGO-Art6-PDF
- Art7. Lima M, Queirós ML, Ribeiro dos Santos AH, Teixeira MA, Gonçalves C, Xavier L, Canelhas A, Justiça B. BCL-2 oncoprotein (p26) on normal and neoplastic lymphoid cells: a flow cytometric study based on dual staining for surface antigens and intracellular p26 using the Fix and PermR fixation and permeation kit. *Lab. Hematol.* 1997; 3:225-33.
RESUMO-Art7-PDF ARTIGO-Art7-PDF
- Art8. M. Lima, Teixeira MA, Queirós ML, Ribeiro dos Santos AH, Justiça B. BCL-2 oncoprotein (p26) in splenic lymphoma with villous lymphocytes: a comparative study with other chronic B-cell disorders. *Am. J. Hematol.* 1997; 56: 22-5.
RESUMO-Art8-PDF ARTIGO-Art8-PDF
- Art9. Lima M, Teixeira MA, Ribeiro dos Santos AH, Queirós ML, Justiça B. Decreased expression of bcl2 (p26) in CD8(+,^{bright}) lymphocytes from patients with lymphoproliferative disorders of CD3(+) large granular lymphocytes. *Hematol. Oncol.* 1997; 15:81-91.
RESUMO-Art9-PDF
- Art10. Alves R, Mota F, Lima M, Silvestre F, Silva E. CD3(+), CD8(+) cutaneous T-cell lymphoma, mycosis fungoides type, associated to CD19(+), CD5(+) B-cell lymphoproliferative disorder, B-CLL type. *Skin Cancer* 1998; 13:83-9.
RESUMO-Art10-PDF

- Art11. Coutinho J, Lima M, Teixeira MA, Cabeda JM, Leite F, Justiça B. Pure red cell aplasia associated to clonal CD8(+) lymphocytosis: dependence on cyclosporine A therapy. *Acta Haematol.* 1998; 100:207-10.
RESUMO-Art11-PDF ARTIGO-Art11-PDF
- Art12. Granjo E, Moreira I, Santos-Silva A, Rebelo I, Nóvoa A, Ribeiro L, Fraga M, Lima M, Quintanilha A, Candeias J. Lymphocyte populations in hereditary spherocytosis pre and post splenectomy and under oxidative stress. *Molecular Biology of Hematopoiesis* 6, ed. Abraham et al, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 1999, 346-52.
RESUMO-Art12-PDF
- Art13. Lima M, Teixeira MA, Fonseca S, Gonçalves C, Guerra M, Queirós ML, Santos, AH, Coutinho J, Pinho L, Marques L, Cunha M, Ribeiro P, Xavier L, Vieira H, Pinto P, Justiça B. Immunophenotypic aberrations, DNA content, and cell cycle analysis of plasma cell in patients with myeloma and monoclonal gammopathies. *Blood Cells Mol. Dis.* 2000; 26:634-45.
RESUMO-Art13-PDF ARTIGO-Art13-PDF
- Art14. Lima M, Gonçalves C, Marques L, Martin C, Teixeira MA, Queirós ML, Santos AH, Balanzategui A, Garcia-Sanz A, Pinto-Ribeiro AC, Justiça B and Orfao A. Association of CD4⁺/CD56⁺/CD57⁺/CD8^{+dim} large granular lymphocytic leukemia, splenic B-cell lymphoma with circulating villous lymphocytes, and idiopathic erythrocytosis. *Ann. Hematol.* 2001; 80: 685-90.
RESUMO-Art14-PDF ARTIGO-Art14-PDF
- Art15. Lima M, Gonçalves C, Teixeira MA, França M, Canelhas A, Pina R, Lopes V, Queirós ML, Fonseca S, Santos AH, Corbillon L, Pinto Ribeiro P, Justiça B. Aggressive Natural-Killer cell lymphoma presenting with skin lesions, breast nodule, suprarenal masses and life-threatening pericardial and pleural effusions. *Leuk. Lymphoma* 2001; 42:1385-91.
RESUMO-Art15-PDF
- Art16. Lima M, Almeida A, Santos AH, Teixeira MA, Algueró ML, Queirós ML, Balanzategui A, Justiça B, Gonzalez M, San-Miguel J, Órfão A. Immunophenotypic analysis of the TCR-Vbeta repertoire in 98 persistent expansions of CD3(+)/TCR-alpha-beta(+) large granular lymphocytes: Utility in assessing clonality and insights into the pathogenesis of the disease. *Am. J. Pathol.* 2001; 159: 1861-8.
RESUMO-Art16-PDF ARTIGO-Art16-PDF
- Art17. Lima M, Teixeira MA, Queirós ML, Leite M, Santos AH, Justiça B, Órfão A. Immunophenotypic characterization of normal blood CD56^{+lo} versus CD56^{+high} NK-cell subsets and its impact of the understanding of their tissue distribution and functional properties. *Blood Cells Mol. Dis.* 2001; 27:731-43.
RESUMO-Art17-PDF ARTIGO-Art17-PDF
- Art18. Granjo E, Lima M, Lopes JM, Fernandes J, Antunes I, Rocha S, Magalhães C, Teixeira MA, Candeias J, Ribeiro M. Response to cyclosporin A in a patient with disseminated granuloma annulare associated to CD4(+) CD8(+) large granular lymphocytic leukemia. *Arch. Dermatol.* 2002; 138:274-6.
RESUMO-Art18-PDF ARTIGO-Art18-PDF
- Art19. Lima M, Coutinho J, Bernardo L, Teixeira MA, Casais C, Canelhas A, Queirós ML, Órfão A, Justiça B. Philadelphia-positive T-cell acute lymphoblastic leukemia with polymyositis, migratory polyarthritis and hypercalcemia following a chronic myeloid leukemia. *Ann. Hematol.* 2002; 81:174-7.
RESUMO-Art19-PDF ARTIGO-Art19-PDF

- Art20. Granjo E, Lima M, Lopes JM, Fonseca E, Dória S, Orfão A, Rocha S, Ying S, Barata LT, Miranda M, Cross NCP, Bain BJ. Chronic Eosinophilic Leukaemia Presenting with Erythroderma, Mild Eosinophilia and Hyper-IgE: Clinical, Immunological and Cytogenetic Features and Therapeutic Approach (a case report). *Acta Haematol.* 2002; 107:108-12.
RESUMO-Art20-PDF ARTIGO-Art20-PDF
- Art21. Lima M, Almeida J, Teixeira MA, Queirós ML, Justiça B, Orfão A: The "ex vivo" Patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR Expression Identify Acute/Early and Chronic/Late NK-Cell Activation States. *Blood Cells Mol. Dis.* 2002; 28:181-90.
RESUMO-Art21-PDF ARTIGO-Art21-PDF
- Art22. Granjo E, Lima M, Correia T, Lisboa C, Magalhães C, Cunha N, Teixeira MA, Queirós ML, Candeias J, Matutes E. CD8⁺/V 5.1⁺ Large Granular Lymphocytic Leukemia associated with autoimmune cytopenias, rheumatoid arthritis and vascular mammary skin lesions: successful response to 2-deoxycofomycin. *Hematol. Oncol.* 2002; 20:1-8.
RESUMO-Art22-PDF ARTIGO-Art22-PDF
- Art23. Granjo E, Lima M, Fraga M, Santos F, Magalhães C, Queirós ML, Moreira I, Rocha S, Santos Silva A, Rebelo I, Quintanilha A, Ribeiro ML, Candeias J, Orfão A. Abnormal NK-cell lymphocytosis detected post-splenectomy: association to repeated infections, relapsing neutropenia and persistent polyclonal B-cell proliferation. *Int. J. Hematol.* 2002; 75:484-8.
RESUMO-Art23-PDF ARTIGO-Art23-PDF
- Art24. Granjo E, Lima M, Lopes JM, Cunha N, Teixeira MA, Santos F, Candeias J, Resende C, Santos AH, Balanzategui A, Orfão A, Matutes E. Intracлонаl diversity in a Sezary Syndrome with a differential response to 2-deoxicoformycin of the two lymphoma cell populations. *Br. J. Haematol.* 2002; 119: 629-33.
RESUMO-Art24-PDF ARTIGO-Art24-PDF
- Art25. Lima M, Pinto P, Teixeira MA, Canelhas A, Mota A, Cabeda JM, Silva C, Queirós ML, Fonseca S, Santos AH, Brochado P, Justiça B. Guess what: Chronic 13q14.3⁺/CD5⁻/CD23⁺ lymphocytic leukemia in blood and t(11;14)(q13;q32)⁺/CD5⁺/CD23⁻ mantle cell lymphoma in lymph nodes! *Cytometry (Clinical Cytometry)* 2003; 51B: 1-4.
RESUMO-Art25-PDF ARTIGO-Art25-PDF
- Art26. Lima M, Canelhas A, Santos C, Teixeira MA, Coutinho J, Alves R, Queirós ML, Fonseca S, Santos AH, Gonçalves V, Massa A, Justiça B. Non-cytotoxic gamma delta peripheral T-cell lymphoma affecting the mandibular and parotidal lymph nodes and the skin. *Leuk. Lymphoma* 2003; 44:525-9.
RESUMO-Art26-PDF ARTIGO-Art26-PDF
- Art27. Machado S, Alves R, Lima M, Silvestre F, Cunha M, Massa A. Large B-cell lymphoma of the skin arising on a background of polyclonal B-cell hyperplasia. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2003; 17:104-5 (Carta ao Editor)
RESUMO-Art27-PDF ARTIGO-Art27-PDF
- Art28. Lima M Teixeira MA, Queirós ML, Santos AH, Gonçalves C, Correia J, Farinha F, Mendonça F, Neves Soares JM, Almeida J, Orfão A, Justiça B. Immunophenotype and TCR-V repertoire of peripheral blood T-cells in acute infectious mononucleosis. *Blood Cells Mol. Dis.* 2003; 30: 1-12.
RESUMO-Art28-PDF ARTIGO-Art28-PDF

- Art29. Xavier L, Cunha M, Gonçalves C, Teixeira MA, Coutinho J, Ribeiro P, Lima M. Hematological remission and long-term hematological control of acute myeloblastic leukemia induced and supported by granulocyte-colony stimulating factor therapy. *Leuk. Lymphoma* 2003 (em impressão).
RESUMO-Art29-PDF ARTIGO-Art29-PDF
- Art30. Lima M, Almeida J, Teixeira MA, Queirós ML, Santos AH, Fonseca S, Balanzategui A, Justiça B, Orfão A. Utility of flow cytometry immunophenotyping and DNA ploidy studies for the diagnosis and characterization of peripheral blood involvement in Sezary Syndrome. *Haematologica* 2003 (em impressão).
RESUMO-Art30-PDF ARTIGO-Art30-PDF
- Art31. Lima M, Almeida J, Teixeira MA, Alguero MC, Santos AH, Balanzategui A, Queirós ML, Bárcena P, Izarra A, Fonseca S, Bueno C, Justiça B, Gonzalez M, San Miguel J, Orfão A. TCR⁺/CD4⁺ large granular lymphocytosis: a new clonal T-cell lymphoproliferative disorder. *Am. J. Pathol.* 2003 (em impressão).
RESUMO-Art31-PDF ARTIGO-Art31-PDF
- Art32. Lima M, Velho G, Alves R, Cunha M, Teixeira MA, Canelhas A, Almeida J, Sachse F, Queirós ML, Santos AH, Fonseca S, Gonçalves V, Massa A, Orfão A, Justiça B. Atopic dermatitis-like non-erythrodermic leukemic variant of CD3^{-/+dim} CD4⁺ cutaneous T-cell lymphoma preceded by cutaneous papular xanthomatosis. *Leuk. Lymphoma* 2003 (em impressão).
RESUMO-Art32-PDF ARTIGO-Art32-PDF
- Art33. Lima M, Almeida J, Teixeira MA, Queirós ML, Santos AH, Balanzategui A, Estevinho A, Alguero MC, Barcena P, Fonseca S, Amorim ML, Cabeda JM, Pinho L, Gonzalez M, San Miguel J, Justiça B, Orfão A. Clinico-biological, immunophenotypic and molecular characteristics of CD56^{-/+dim} chronic NK-cell large granular lymphocytosis. *Am. J. Pathol.* 2003 (submetido para publicação).
RESUMO-Art33-PDF ARTIGO-Art33-PDF