

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Mutações no gene *STAT3* nas Leucemias de Linfócitos Grandes Granulares

Beatriz Bravo Peixoto

M

2021



Mutações no gene *STAT3* nas Leucemias de Linfócitos Grandes Granulares

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Medicina, submetida ao
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

Beatriz Bravo Peixoto

Aluna do 6º ano de Mestrado Integrado em Medicina

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

Orientadora

Professora Doutora Margarida Lima

Especialista em Imunohemoterapia, Assistente Graduada

Serviço de Hematologia Clínica, Centro Hospitalar Universitário do Porto

Professora Associada Convidada

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

Beatriz Bravo Peixoto

Beatriz Bravo Peixoto



Margarida Lima

Porto, 30 de Junho de 2021

*“As soon as you understand that you are here because of a lot of help,
then you also understand now is time to help others.
That is what this is all about.”*

Arnold S.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Margarida Lima, pela compreensão, paciência e apoio inestimáveis. Pela sua disponibilidade e dedicação, apesar dos contratempos, sem as quais a concretização deste trabalho não seria possível. Por me ter apresentado ao mundo da investigação e por ser uma referência de pessoa e de profissional que levarei comigo daqui em diante.

Ao Dr. João Rodrigues, que me recebeu no seu espaço e que, com paciência e atenção, me orientou no desconhecido do laboratório e permitiu a execução deste projeto.

A todos os profissionais do Serviço de Hematologia Clínica que me receberam e ajudaram.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e desde sempre.

Ao Miguel, por ser o meu porto seguro.

Resumo

Introdução: As leucemias de linfócitos grandes granulares (LGLL) são doenças linfoproliferativas crónicas, raras. Um dos achados mais característico destas doenças é a hiperativação do fator de transcrição *STAT3* (*Signal transducer and activator of transcription 3*), que se associa a mutações no gene correspondente. O tratamento atual das LGLL assenta na imunossupressão, no entanto este não é eficaz numa percentagem significativa de doentes. Um novo tratamento promissor pode passar pela terapia dirigida ao *STAT3*, portanto a caracterização da frequência destas mutações pode ser importante para a implementação de novas terapias.

Objetivos: Neste trabalho procuramos determinar a frequência das mutações mais comuns do *STAT3* (mutações D661Y e Y640F) em doentes com LGLL diagnosticados no Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário do Porto. Procurou-se também explorar as características clínicas e laboratoriais dos vários tipos de LGLL.

Metodologia: Foram selecionados 59 doentes com diferentes tipos de LGLL, nomeadamente com expansões monoclonais de linfócitos T α/β , de tipo CD8 e de tipo CD4, de linfócitos T γ/δ ou de células NK. Foram utilizadas amostras de sangue periférico para pesquisar as mutações D661Y e Y640F. O ADN obtido das amostras foi amplificado recorrendo à técnica Tetra Primer ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System - Polymerase Chain Reaction*), sendo que para tal foi necessário desenvolver e otimizar um novo protocolo.

Resultados: A população selecionada apresentava características clínicas e laboratoriais semelhantes às descritas na literatura, salientando-se a existência de citopenias e a associação com outras patologias, nomeadamente distúrbios autoimunes e outras neoplasias. A existência de vários subgrupos de LGLL permitiu destacar alguns achados específicos a cada subgrupo. No que respeita à pesquisa de mutações no *STAT3*, foi detetada a mutação D661Y em 2 casos; não foram casos com a mutação Y640F.

Conclusões: Este estudo teve os resultados clínicos esperados para as LGLL em geral e para cada um dos subtipos em particular. A frequência das mutações D661Y e Y640F do *STAT3* foi bastante inferior ao esperado, o que se pode dever a problemas de ordem técnica, pelo que o protocolo utilizado carece de otimização e validação adicional.

Palavras-chave: Leucemias de linfócitos grandes granulares; *STAT3*

Abstract

Introduction: Large Granular Lymphocyte Leukemias (LGLL) are rare, chronic, lymphoproliferative diseases. One of the most characteristic finding of these diseases is the hyperactivation of the *STAT3* (Signal transducer and activator of transcription 3) transcription factor, associated with mutations in the corresponding gene. Current LGLL treatment relies on immunosuppression, however it is not effective in a significant proportion of patients. A promising new treatment may be dependent on therapy directed to *STAT3*, therefore the characterization of the frequency of these mutations may be of importance for the implementation of new therapeutic approaches.

Objectives: We aim to determine the frequency of *STAT3*'s most common mutations (D661Y and Y640F) in patients diagnosed with LGLL in the Cytometry Laboratory of Clinical Hematology Department in Centro Hospitalar Universitário do Porto. We also seek out to explore the clinical and laboratorial characteristics of the several types of LGLL.

Methodology: Fifty-nine patients with different types of LGLL, namely with monoclonal expansions of CD8 and CD4 α/β T cells, γ/δ T cells or NK cells were selected. Peripheral blood samples were used to search for D661Y and Y640F mutations. The DNA obtained from the samples was amplified using Tetra Primer ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System - Polymerase Chain Reaction*). For this purpose, a new protocol had to be developed and optimized.

Results: The selected population exhibited similar clinical and laboratory characteristics to the ones described in the literature, with emphasis on the presence of cytopenias and the association with other pathologies, namely autoimmune disorders and other malignancies. The existence of multiple subgroups of LGLL allowed to highlight some specific findings to each subgroup. Regarding the search of *STAT3* mutations, the D661Y mutation was detected in 2 cases; no cases were detected with the Y640F mutation.

Conclusion: This study had the clinical results expected for the LGLL in general and each of the particular subgroups. The frequency of D661Y and Y640F mutations was much lower than expected, which may be due to technical issues, therefore the protocol used requires further optimization and validation.

Keywords: Large granular lymphocytic leukemia; *STAT3*

Lista de abreviaturas

ADN, Ácido desoxirribonucleico

ANA, Anticorpos anti-nucleares

ANCA, Anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos

ARMS-PCR, *Amplification refractory mutation system - Polymerase chain reaction*

CHUPorto, Centro Hospitalar Universitário do Porto

CMV, Citomegalovírus

DLPC, Doenças linfoproliferativas crónicas

DLPC-NK, doenças linfoproliferativas crónicas de células NK

EBV; Vírus Epstein-Barr

FR, Fator reumatoide

Hb, hemoglobina

IL-15, Interleucina 15

LGL, Linfócitos grandes granulares (*large granular lymphocytes*)

LGLL, Leucemias de linfócitos grandes granulares

LGLL-T, Leucemias de linfócitos grandes granulares T

PCR, Reação da polimerase em cadeia (*Polymerase chain reaction*)

PDGF, Fator de crescimento derivado das plaquetas (*Platelet-derived growth factor*)

SH2, *Src homology 2*

SIDA, Síndrome de imunodeficiência adquirida

STAT, Transdutores de sinal e ativadores da transcrição (*Signal transducers and activators of transcription*)

TCR, Recetor da célula T (*T cell receptor*)

VHB, Vírus da hepatite B

VHC, Vírus da hepatite C

VIH, Vírus da imunodeficiência humana

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Lista de abreviaturas.....	iv
Lista de tabelas	vi
Introdução.....	1
Material e Métodos	4
População e diagnóstico	4
Pesquisa de mutações no gene <i>STAT3</i>	5
Análise Estatística	6
Resultados.....	7
Discussão.....	11
Referências.....	vii
Contribuição dos autores.....	x
Conflito de interesses	x
Financiamento	x
Agradecimentos	x
Material suplementar	xi

Lista de tabelas

Tabela 1. Classificação das LGLL nos doentes avaliados (n=59)	7
Tabela 2. Valores hematológicos nos doentes com LGLL avaliados.....	8
Tabela 3. Resumo das patologias associadas nos doentes com LGLL avaliados	9
Tabela 4. Manifestações clínicas e serologias nos doentes com LGLL avaliados	10
Tabela 5. Detecção de mutações no gene <i>STAT3</i> nos doentes com LGLL avaliados	10
Tabela 6. Características da população e os achados mais frequentes dos 3 maiores estudos retrospectivos realizados em doentes com LGLL	11
Tabela 7. Frequências absolutas e relativas das mutações no <i>STAT3</i> , D661Y e Y640F em vários estudos publicados	13

Introdução

Os Linfócitos Grandes Granulares (LGL, *large granular lymphocytes*) são uma subpopulação morfológica distinta de linfócitos com tamanho médio (15-18 μ l) e com abundantes grânulos azurofílicos no citoplasma. A maioria dos LGL normais em circulação são células NK e os restantes são linfócitos T citotóxicos. O número absoluto de LGL em circulação no sangue periférico normal é em geral inferior a $0.3 \times 10^9/L$, mas diversos estímulos, como infeções víricas, podem causar expansões reativas e temporárias de LGL.

As Leucemias de Linfócitos Grandes Granulares (LGLL), cujo conceito foi estabelecido primeira vez em 1985 por Loughran e col.¹, caracterizam-se pela proliferação clonal de LGL. São doenças linfoproliferativas crônicas raras cuja incidência anual foi estimada entre 0.2 e 0.7 casos por milhão de habitantes.^{2,3} Ainda assim, parecem ser as neoplasias de células T mais comuns, correspondendo a cerca de 3% de todas as neoplasias linfóides.⁴ Atingem em geral indivíduos adultos, sem diferença significativa entre os dois géneros, sendo que cerca de 80% dos doentes têm mais de 50 anos.⁵⁻⁷

É possível dividir as LLGL em dois grupos principais, dependendo do tipo de LGL: aproximadamente 90% têm origem nos linfócitos T (LGLL-T), resultando da proliferação de células T citotóxicas; as restantes 10% têm origem nas células NK e são designadas doenças linfoproliferativas crônicas de células NK (DLPC-NK). Estas duas entidades são reconhecidas pela OMS e têm características clínicas e biológicas semelhantes.^{8,9}

Cerca de 2/3 dos doentes com LGLL encontram-se sintomáticos no momento do diagnóstico, e os principais sintomas são derivados de citopenias.^{5,6} A nível analítico, o achado mais frequente é a neutropenia, sendo que cerca de metade dos doentes tem contagens de neutrófilos inferiores a $1.5 \times 10^9/L$ e cerca de 20% têm neutropenia grave, com valores inferiores a $0.5 \times 10^9/L$.^{5,6} Devido à neutropenia que se verifica nesta proporção significativa de doentes, e portanto uma das manifestações mais típicas são as infeções bacterianas recorrentes.¹⁰ A anemia também é frequente, afetando cerca de 40% dos doentes, dos quais cerca de metade necessitam de suporte transfusional.^{7,11} Mais raramente ocorre trombocitopenia, descrita em 17-30% dos casos.⁵⁻⁷

Cerca de um 25% dos doentes apresentam esplenomegalia.⁵⁻⁷ Raramente são observadas hepatomegalia e adenopatias, devendo estas últimas alertar para a possibilidade de outra doença linfoproliferativa associada.^{10,11}

A presença de sintomas B também está descrita, mas a sua ocorrência é muito variável nos diferentes estudos, manifestando-se entre 7 a 63% dos doentes.^{5,7}

Há uma prevalência relativamente elevada de distúrbios autoimunes nos doentes com LGLL, sendo que é comum encontrar positividade para autoanticorpos, como fator reumatoide (FR) e anticorpos antinucleares (ANA). Entre 25 a 40% dos doentes têm diagnóstico concomitante de patologias autoimunes, sendo que a Artrite Reumatoide é a doença autoimune mais frequente.^{5-7, 12}

Apesar da sua evolução indolente, 10% dos doentes morrem, principalmente devido a infeções e complicações de sépsis, sendo a sobrevida média de 9-14 anos após diagnóstico.^{7,11}

A nível de clínica e evolução, as LGLL-T e as DLPC-NK são bastante semelhantes entre si.^{5,8,9} Alguns artigos descrevem ligeiras diferenças entre estas duas entidades, tais como uma maior associação das LGLL-T com Artrite Reumatoide,¹² esplenomegalia e anemia mais severa.⁸

O tratamento das LGLL baseia-se em imunossupressão com vista a diminuir a atividade e proliferação dos LGL.⁹⁻¹¹ O tratamento de primeira linha passa pela imunossupressão oral com metotrexato, ciclofosfamida ou ciclosporina, que induzem resposta em cerca de 50% dos doentes. No entanto, a taxa de resposta completa é inferior a 35% e as recidivas são frequentes.^{9,11} É possível que a existência de certas mutações no gene *STAT3* seja preditiva da resposta ao metotrexato¹⁰ ou ciclofosfamida.¹³ Há outras opções de tratamentos, no entanto o número de doentes submetidos é relativamente pequeno e, como tal, há pouca informação.⁹⁻¹¹ De uma forma geral os tratamentos disponíveis não são inteiramente satisfatórios, pelo que novos tratamentos continuam a ser investigados.

Relativamente à fisiopatologia da LGLL acredita-se que resultem de uma estimulação crónica do sistema imune, e tem sido descrita desregulação de várias moléculas e cascatas de sinalização. Estas incluem citocinas, como a interleucina 15 (IL-15), fatores de crescimento como o PDGF (*Platelet-derived growth factor*), moléculas envolvidas na apoptose (como o recetor Fas e o seu ligando, FasL) e moléculas que participam nas vias de sinalização intracelular (vias da Map-kinase, do Pi3k, e do Jak/Stat).¹⁴

O *STAT3* (*Signal transducer and activator of transcription type 3*) é um fator de transcrição que, em situações fisiológicas, é temporariamente ativado. Esta molécula faz parte da via de sinalização Jak/Stat, que promove a sobrevivência dos LGL, e evita a apoptose.^{9,11} A ativação persistente do

STAT3 é um achado recorrente nas LGLL, tendo sido descrita pela primeira vez em 2001.^{9,11} Esta ativação está relacionada com mutações com ganho de função, que geralmente ocorrem no exão 21 do gene *STAT3*, que codifica para o domínio SH2 (*Src homology 2*) do fator de transcrição, como é o caso das mutações D661Y e Y640F.

Conhecendo a fisiopatologia das LGLL, tem-se colocado a hipótese de utilizar terapia dirigida às várias moléculas que se encontram desreguladas nesta doença. Considerando a aparente importância do *STAT3* na evolução das LGLL, esta molécula pode vir a ser um possível alvo terapêutico.

Os objetivos deste trabalho são determinar a frequência das mutações D661Y e Y640F do *STAT3* em uma população de doentes com LGLL diagnosticados no Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar Universitário do Porto (CHUPorto). Também se irá caracterizar os dados clínicos e laboratoriais dos vários subgrupos de LGLL.

Material e Métodos

População e diagnóstico

O projeto subjacente a este estudo, apresentado em anexo e registado no CHUPorto com o nº 2020.133 (105-DEFI/107-CE), foi aprovado pela Comissão de Ética e pelo Gabinete de Investigação, tendo sido autorizado pelo Conselho de Administração do hospital.

Foram selecionados, por conveniência, doentes que foram diagnosticados com LGLL no Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do CHUPorto, para os quais existisse amostra excedentária disponível para a pesquisa de mutações no *STAT3*. Procurou-se selecionar doentes com diferentes subtipos e fenótipos de LGLL, nomeadamente com expansões de LGL-T α/β , de tipo CD8 e de tipo CD4, LGL-T γ/δ e células NK.

Os critérios de diagnóstico foram semelhantes aos descritos por Moignet e Lamy em 2018,¹¹ sendo obrigatória a identificação de uma expansão persistente (> 6 meses) de LGL e a demonstração de monoclonalidade. No caso dos linfócitos T, a clonalidade foi avaliada através do estudo genético dos rearranjos dos genes que codificam para o recetor da célula T (*T cell receptor*, TCR), e/ou através do estudo imunofenotípico das famílias de regiões variáveis das cadeias beta, gama e delta do TCR.^{15,16} No caso das células NK, a sua clonalidade foi determinada seguindo os critérios fenotípicos descritos por Lima e col. em 2004¹⁷ e, em 2015, por Bárcena e col.¹⁸

O subtipo de LGL foi confirmado através de imunofenotipagem, por citometria de fluxo, que permitiu a classificação dos linfócitos T quanto ao seu TCR (alfa/beta ou gama/delta) e quanto à sua expressão de CD4, e de CD8, e das células NK quanto à sua expressão de CD56.

Como controlo negativo para pesquisa da mutação no gene *STAT3*, foram analisadas amostras de adultos saudáveis, dadores de sangue. Foram incluídos 5 adultos saudáveis que compareceram no Serviço de Hematologia Clínica para dar sangue durante o período do estudo, e que concordaram em colher uma amostra de sangue no âmbito deste estudo.

A informação clínica dos doentes foi obtida através da consulta dos registos internos do Laboratório de Citometria. Relativamente aos doentes pertencentes ao CHUPorto (n=17), foi também consultado o processo clínico através do programa SClinic. Foram retiradas informações como género, data de nascimento, data do estudo, hospital de origem, tipo de LGLL, contagens celulares do hemograma, organomegalias (hepatomegalia, esplenomegalia e adenopatias), patologias associadas,

imunoglobulinas séricas, serologias para os vírus da hepatite B (VHB) e C (VHC), para o vírus da imunodeficiência humana (VIH), para o vírus de Epstein Barr (EBV) e para o citomegalovírus (CMV) e presença de autoanticorpos, como FR, ANA e anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos (ANCA).

Pesquisa de mutações no gene *STAT3*

O ADN foi extraído de amostras de sangue periférico colhidas em tubo com anticoagulante (EDTA-K3) através de extração automática, com recurso ao kit “EZ1 DNA Blood 200 µL Kit” e ao equipamento “EZ1 Advanced XL” (QIAGEN).

O ADN obtido foi amplificado através da técnica Tetra Primer ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System - Polymerase Chain Reaction*), segundo protocolo descrito por Jerez e col., para a pesquisa das mutações D661Y e Y640F do gene *STAT3*, adaptado.¹⁹

Os *Primers* utilizados foram os descritos pelos referidos autores.¹⁹

Para detetar a mutação D661Y foram usados os seguintes *primers* (5'-3'): *Forward Inner Primer* (alelo G), AAATCATCATGGGCTATAAGATCACGG; *Reverse Inner Primer* (alelo T), GGAGACACCAGGATATTGGTAGCGTA; *Forward Outer Primer*, CCTAGCTGTAGGTTCCATGATCTTTCCT; *Reverse Outer Primer*, AAAATTAAATGCCAGGAACATGGAAAAT. Os dois *Outer Primers* originam um segmento de 290pb; o alelo G de 182 pb; o alelo T de 161 pb.

Os *primers* utilizados para a pesquisa da mutação Y640F foram os seguintes: (5'-3'): *Forward Inner Primer* (alelo A), ACCCAGATCCAGTCCGTGGAACCTTA; *Reverse Inner Prime* (alelo T), ACATGTTGTTTCAGCTGCTGCTTTGAGA; *Forward Outer Primer*, AAAAAATGGGCAGTTTTCTCTGAGATGACC; *Reverse Outer Primer*, CCACTGGAGACACCAGGATATTGGTAGC. Os dois *Outer Primers* originam um segmento de 197 pb; o alelo A de 119 pb; o alelo T de 131 pb.

Para amplificação, que foi efetuada recorrendo a um termociclador automático, utilizou-se a enzima “Amplitaq Gold® DNA Polymerase” (Applied Biosystems) e respetivo kit.

Os reagentes utilizados e os ciclos de PCR estão descritos no Material suplementar, tabelas 1 e 2, respetivamente.

Por fim, para deteção dos produtos amplificados, utilizou-se um equipamento de eletroforese automática em *microchip* (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies).

Análise Estatística

Para gestão de todos os dados, foi criada uma base de dados em Excel. Para as variáveis qualitativas foram calculadas as frequências absolutas e relativas. Para as variáveis quantitativas foram calculadas medidas de tendência central – mediana – e medidas de dispersão – mínimo e máximo.

Resultados

Foram avaliados 59 doentes com LGLL estudados no CHUP entre 2019 e 2020, 32 do género masculino (54%) e 27 do género feminino (46%). Na data do estudo, os doentes tinham idades compreendidas entre os 9 e os 85 anos, com uma idade mediana de 66 anos. Em 13 casos (22%) a idade era inferior a 50 anos.

Relativamente ao subtipo de LGLL, em 43 (73%) havia expansão de LGL-T e em 15 (25%) havia expansão de células NK. Um caso (2%) tinha expansão simultânea de LGL-T e de células NK (Tabela 1). Dentro das LGLL-T, os LGL-T eram do tipo α/β CD8 (n=24), havendo também LGL-T de tipo α/β CD4 (n=7) e de tipo γ/δ (n=10). Um caso era apresentava expansão de LGL-T α/β duplamente negativa (CD4- CD8-) e um caso tinha expansão simultânea de LGL-T α/β CD8 e LGL-T γ/δ . Dentro das DLPC-NK, 9 (15%) eram CD56-/+fraco, i.e. apresentavam ausência de expressão de CD56 ou expressão muito fraca desta molécula de adesão em parte das células NK, e 6 (10%) eram CD56+. Um caso tinha expansão simultânea de LGL-T γ/δ e de células NK (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das LGLL nos doentes avaliados (n=59)

LGLL-T	43 (73%)
α/β + CD8+	24 (41%)
α/β + CD4+	7 (12%)
γ/δ +	10 (17%)
Outros*	2 (3%)
DLPC-NK	15 (25%)
CD56-/+fraco	9 (15%)
CD56+	6 (10%)
LGLL-T + DLPC-NK	1 (2%)

Abreviaturas: LGLL: Leucemia de linfócitos grandes granulares; DLPC-NK: doença linfoproliferativa crónica de células NK.

*Um caso de LGLL-T α/β CD4- CD8- e 1 caso de associação de LGLL-T α/β CD8 e LGLL-T γ/δ

Nas LGLL-T, a mediana da percentagem dos LGL-T clonais no total de leucócitos, quantificada por citometria de fluxo, era de 15.4%, variando entre 1.9% e 86.9% e sendo inferior a 5% em apenas 1 caso. Nas DLPC-NK, a percentagem de células NK fenotipicamente anormais no total dos leucócitos era de 21.6%, variando entre 4.7% e 57.8%, e sendo inferior a 5% em apenas 1 caso. Os valores absolutos correspondentes eram de 1019 LGL-T/mm³ (intervalo 83-22577/mm³) e de 1292 células NK/mm³ (intervalo 563-5565/mm³).

A nível analítico, a tabela 2 descreve os achados encontrados no hemograma, tanto em todos os doentes, como discriminados nos vários subtipos de LGLL. A neutropenia foi a citopenia mais frequente, sendo que 13 doentes (22%) tinham menos de 1500 neutrófilos/mm³ e 5 doentes (8%) tinham valores inferiores a 500 neutrófilos/mm³. Os valores mínimos e máximos de neutrófilos/mm³ foram 8 e 13740, respetivamente. Os dez doentes (17%) que apresentavam anemia tinham LGLL-T α/β CD8 ou DLPC-NK, sendo que o único doente com hemoglobina inferior a 8 g/dL tinha LGLL-T α/β CD8. A hemoglobina mediana foi 13.7 g/dL (intervalo 7.8-17.4). Nove doentes (15%) tinham trombocitopenia, sendo que a mediana de plaquetas foi $197 \times 10^9/L$ (intervalo 56-439). Por outro lado, 23 doentes (39%) apresentavam linfocitose superior a 4000 linfócitos/mm³. O valor mediano de linfócitos foi de 3145/mm³ com valores mínimos e máximos de 956 e 23268, respetivamente.

Tabela 2. Valores hematológicos nos doentes com LGLL avaliados

	LGLL (n=59)	LGLL-T α/β CD8 (n=24)	LGLL-T α/β CD4 (n=7)	LGLL-T γ/δ (n=10)	DLPC-NK (n=15)
Hemoglobina (g/dL)	13.7 (7.8-17.4)	13.9 (7.8-17.1)	14.0 (12.4-15.9)	14.2 (12.1-17.4)	13.2 (10.5-17.0)
Anemia	10 (17%)	6 (25%)	0	0	4 (27%)
Anemia grave	1 (2%)	1 (4%)	0	0	0
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	197 (56-439)	178 (56-414)	197 (118-260)	256 (73-439)	203 (122-391)
Trombocitopenia	9 (15%)	5 (21%)	1 (14%)	1 (10%)	2 (13%)
Neutrófilos (/mm ³)	2831 (8-13740)	2099 (66-13740)	3250 (2681-6507)	2507 (245-6986)	3186 (543-10310)
Neutropenia	13 (22%)	7 (29%)	0	2 (20%)	2 (13%)
Neutropenia grave	5 (8%)	3 (13%)	0	1 (10%)	0
Linfócitos (/mm ³)	3145 (956-23268)	2440 (1032-6608)	8615 (2818-23268)	2049 (1183-6068)	3914 (956-9275)
Linfocitose	23 (39%)	5 (21%)	6 (86%)	2 (20%)	7 (47%)

Abreviaturas: LGLL: Leucemia de linfócitos grandes granulares; DLPC-NK: doença linfoproliferativa crónica de células NK.

Anemia definida como Hemoglobina <12 g/dL; anemia grave como Hemoglobina <8g/dL; trombocitopenia definida como plaquetas <150 $\times 10^9/L$; neutropenia definida como neutrófilos <1500/mm³; neutropenia grave como neutrófilos <500/mm³ e linfocitose como linfócitos >4000/mm³.

A nível dos achados clínicos, só conseguimos obter informação sobre existência ou não de patologias associadas em 24 dos 59 doentes. Desses doentes, 21 (87.5%) tinham alguma patologia associada (Tabela 3). De salientar que, dentro do grupo de LGLL-T α/β CD8, 4 doentes tinham Artrite Reumatoide, 2 tinham neoplasia hematológica (um linfoma de células B do manto e um linfoma de

células B da zona marginal). Ainda neste grupo, um tinha infeção pelo VIH com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), um tinha osteomielite da mandíbula e um tinha aplasia medular e hemoglobinúria paroxística noturna. Nas LGL-T α/β CD4, um dos doentes tinha uma neoplasia hematológica (leucemia linfocítica crónica B). No grupo das LGL-T γ/δ , havia um doente esplenectomizado há mais de 30 anos por esferocitose hereditária, e transplantado hepático há cerca de 15 anos, encontrava-se atualmente sob imunossupressão. Outro doente, de 9 anos, apresentava imunodeficiência combinada grave e ataxia telangiectasia. Ainda neste grupo havia um doente com sarcoidose cutânea e um doente com fibrose pulmonar. Por fim, dentro das DLPC-NK, três doentes tinham neoplasias não-hematológicas (sarcoma de Kaposi; carcinomatose de tumor primário desconhecido; e antecedentes de neoplasia da bexiga), um tinha Lupus Eritematoso Sistémico, um tinha SIDA, um tinha hepatite C e um tinha uma insuficiência renal crónica de causa desconhecida. O doente que tinha simultaneamente proliferação de LGL-T γ/δ e células NK apresentava também Artrite Reumatoide.

Tabela 3. Resumo das patologias associadas nos doentes com LGL avaliados

Doença autoimune	6/24 (25%)
Artrite Reumatoide	5/24 (21%)
Neoplasia hematológica	3/24 (13%)
Neoplasia não hematológica	3/24 (13%)
Doença infecciosa	2/24 (8%)
Imunodeficiência	4/24 (17%)

Abreviaturas: LGL, Leucemia de linfócitos grandes granulares

Dentro da informação clínica a que tivemos acesso, conseguimos verificar que 23% dos doentes (5 em 22) apresentavam esplenomegalia, sendo que não considerámos o doente previamente esplenectomizado. Por outro lado, 18% (4 em 22) tinham adenopatias e 14% (3 em 21) apresentavam hepatomegalia (Tabela 4).

A nível das imunoglobulinas, dentro dos 11 doentes avaliados nesse âmbito, 2 (18%) tinham IgG ligeiramente elevada, e 1 (9%) tinha IgM ligeiramente elevada, que correspondia a uma gamapatia monoclonal de tipo IgM/Kappa (Tabela 4).

Dentro dos doentes que tinham realizado estudos serológicos para infeções víricas, verificámos que 23% (3 em 13) eram imunes para VHB, 8% (1 em 13) tinha hepatite C ativa e 13% (2 em 15) tinham infeção pelo VIH1 (Tabela 4).

No que respeita aos autoanticorpos, 67% (4 em 6) tinham FR positivo, 57% (4 em 7) tinham ANA positivos. Nos cinco doentes que foi avaliada a presença de ANCA, o resultado foi negativo (Tabela 4).

Tabela 4. Manifestações clínicas e serologias nos doentes com LGLL avaliados

Organomegalias	
Esplenomegalia	5/22 (23%)
Adenopatias	4/22 (18%)
Hepatomegalia	3/21 (14%)
Imunoglobulinas	
Hipergamaglobulinemia IgG	2/11 (18%)
Hipergamaglobulinemia IgM	1/11 (9%)
Serologias víricas	
VHB imune	3/13 (23%)
VHC +	1/13 (8%)
VIH1 +	2/15 (13%)
Autoanticorpos	
Fator Reumatoide +	4/6 (67%)
ANA +	4/7 (57%)
ANCA +	0/5 (0%)

Abreviaturas: VHB, Vírus Hepatite B; VHC, Vírus Hepatite C; VIH, Vírus da imunodeficiência humana; ANA, anticorpo antinucleares; ANCA, anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos

Por fim, analisando a presença das mutações Y640F e D661Y no gene *STAT3*, só foram encontrados dois doentes positivos para a mutação D661Y, um com LGLL-T α/β CD8 e outro com DLPC-NK (Tabela 5). Nestes casos, a % de LGL no total dos leucócitos era de 9.2% e 8.9%, respetivamente.

Tabela 5. Detecção de mutações no gene STAT3 nos doentes com LGLL avaliados

Mutação	LGLL	LGLL-T α/β CD8	LGLL-T α/β CD4	LGLL-T γ/δ	DLPC-NK
D661Y	2/59 (3%)	1/24 (4%)	0/7 (0%)	0/10 (0%)	1/15 (6%)
Y640F	0/59 (0%)	0/24 (0%)	0/7 (0%)	0/10 (0%)	0/15 (0%)

Abreviaturas: LGLL, Leucemia de linfócitos grandes granulares; DLPC-NK, doença linfoproliferativa crónica de células NK.

Discussão

As LGLL são doenças raras, pelo que existe alguma dificuldade em conseguir realizar estudos com um grande número de doentes.

Os doentes com LGLL avaliados neste estudo tinham características similares às descritas na literatura, resumidas na Tabela 6, onde se representam os achados clínicos e laboratoriais de três das maiores séries publicadas na última década.⁵⁻⁷

Tabela 6. Características da população e os achados mais frequentes dos 3 maiores estudos retrospectivos realizados em doentes com LGLL

	Bureau e col., 2010 ⁵	Sanikommu e col., 2017 ⁶	Dong e col., 2021 ⁷
N	229	204	319
Idade mediana ao diagnóstico (anos)	59	63	65
Idade inferior a 50 anos ao diagnóstico	52 (26%)	-	55 (17%)
Género masculino	104 (45%)	110 (54%)	170 (53%)
LGLL-T	201 (87%)	183 (90%)	295 (92%)
DLPC-NK	28 (13%)	21 (10%)	24 (7%)
Sintomáticos	186 (81%)	118 (53%)	-
Sintomas B	(7%)	-	200 (63%)
Esplenomegalia	55 (24%)	49 (24%)	91 (28%)
Hepatomegalia	(10%)	-	-
Adenopatias	(6%)	-	-
Neutropenia (<1.5 x 10 ⁹ /L)	135 (59%)	93 (46%)	131 (41%)
Neutropenia grave (<0.5 x 10 ⁹ /L)	56 (24%)	36 (17%)	54 (17%)
Anemia (Hb <11g/dL)	56 (24%)	79 (40%)	132 (41%) *
Anemia grave (Hb <8 g/dL)	15 (6%)	45 (22%)	60 (19%) **
Trombocitopenia	40 (17%)	59 (30%)	83 (26%)
Doença autoimunes	74 (32%)	51 (25%)	83 (26%)
Artrite Reumatoide	36 (16%)	31 (15%)	38 (12%)
Neoplasias hematológicas	20 (9%)	39 (19%)	59 (18%)
Neoplasias não hematológicas	10 (4%)	35 (17%)	66 (21%)

Abreviaturas: LGLL, Leucemias de Linfócitos Grandes Granulares; LGLL-T, LGLL de linfócitos T; DLPC-NK, Doenças Linfoproliferativas Crónicas de células NK; Hb, hemoglobina.

* Hb <12 g/dL; **Anemia com necessidade de transfusão, sem valor de Hb definido

O nível demográfico salienta-se uma idade mediana entre os 59 e os 65 anos e uma representação similar de ambos os géneros.

Verificámos neste estudo, tal como está descrito em estudos anteriores, que a citopenia mais frequente nas LGLL em geral é a neutropenia, seguida de anemia, sendo a trombocitopenia a citopenia menos frequente. As citopenias, particularmente a neutropenia, são particularmente

frequentes nas LGLL-T α/β CD8 (o subgrupo mais representado nas séries de LGLL publicadas) e nas DLPC-NK, ⁵⁻⁷ o mesmo acontecendo nas LGLL T γ/δ .¹⁶ Realça-se uma ausência (ou frequência muito baixa) de citopenias dentro do grupo das LGLL-T α/β CD4, o que vai de encontro ao que foi descrito em 2003.²⁰

Relativamente às manifestações clínicas, este estudo também confirmou a associação das LGLL com esplenomegalia; menos comum, é a presença de hepatomegalia e, sobretudo de adenopatias, que devem alertar para a possibilidade de outras neoplasias linfoides associadas ^{5-7,16,17,20}

A nível das patologias associadas, tal como está descrito, verificou-se a elevada incidência de doenças autoimunes, nomeadamente artrite reumatoide, especialmente nas LGLL-T α/β CD8.^{5-7,16,17} Confirmou-se também a associação das LGLL com neoplasias hematológicas e não-hematológicas. Realça-se que, dentro das LGLL-T α/β CD4, a única patologia associada foi uma neoplasia hematológica, não havendo neste subgrupo casos de doença autoimune. A ausência de doenças autoimunes neste subgrupo das LGLL também já tinha sido reportada em 2003.²⁰

A nível serológico, também se constatou uma elevada taxa de Fator Reumatoide e ANA positivos nas LGLL, descritos como frequentemente associados às LGLL. ⁵⁻⁷ No entanto, é possível que a frequência relativa destes autoanticorpos esteja sobrestimada neste estudo retrospectivo, pois o resultado da pesquisa de auto-anticorpos estava disponível em número muito escasso de doentes sendo possível que exista um viés, i.e., terem sido pedida estas análises apenas nos casos em que havia suspeita clínica de doença autoimune. Neste estudo também se levantou informação sobre o ANCA, com vista a perceber se este autoanticorpo também poderia estar implicado no contexto autoimune desta doença. No entanto, os cinco doentes avaliados nesse âmbito eram ANCA negativos. De facto, este autoanticorpo não se encontrava descrito em estudos prévios de LGLL, e, conforme estes resultados, não parece ser relevante.

A nível das mutações no *STAT3*, os estudos previamente publicados que descreveram a frequência e importância destas mutações no contexto das LGLL apresentaram resultados muito variáveis (Tabela 7). Esta variedade dos resultados depende de vários fatores, como os subtipos de LGLL avaliados e das técnicas utilizadas, entre outros. ^{11,21} As mutações pesquisadas neste estudo, Y640F e D661Y são as mais frequentes, correspondendo a 62-87% das mutações do *STAT3*, e ocorrendo em 11-29% e 2-23% dos casos, respetivamente (Tabela 7). De referir que a maioria das séries publicadas não inclui casos de LGLL-T α/β CD4 e de LGLL-T γ/δ , ^{19,21,22} que representam,

respetivamente, 12% e 17% dos casos avaliados na presente série, o que pode interferir com os resultados. De facto, de acordo com o descrito na literatura, as mutações do *STAT3* estão ausentes nas LGLL-T α/β CD4, ^{23,24} em que são recorrentes as mutações ativadoras do *STAT5* ²⁵ e os dados relativos às LGLL-T γ/δ são ainda muito escassos. ²⁴

Tabela 7. Frequências absolutas e relativas das mutações no STAT3, D661Y e Y640F em vários estudos publicados

	Koskela, 2012 ²¹	Jerez, 2012 ¹⁹	Fasan, 2013 ²²	Teramo, 2017 ²³	Sanikommu, 2018 ⁶	Muñoz-García, 2020 ²⁴
LGLL (n)	77	170	62	101	183	82*
<i>STAT3</i> mutado	31/77 (40%)	48 (28%)	43 (71%)	38 (38%)	66 (36%)	28 (34%)
D661Y	7/77 (9%)	19 (11%)	14 (23%)	9 (9%)	22 (12%)	2 (2%)
Y640F	13/77 (17%)	18 (11%)	18 (29%)	24 (24%)	32 (18%)	15 (18%)
LGLL-T α/β CD8 (n)	77	120	55	68	170	33
<i>STAT3</i> mutado	31 (40%)	33 (28%)	40 (73%)	38 (56%)	ND	12 (36%)
D661Y	7 (9%)	12 (10%)	13 (24%)	9 (13%)	ND	ND
Y640F	13 (17%)	14 (12%)	18 (33%)	24 (35%)	ND	ND
LGLL-T α/β CD4 (n)	0	0	0	33	13	14
<i>STAT3</i> mutado	NA	NA	NA	0 (0%)	ND	0 (0%)
D661Y	NA	NA	NA	0 (0%)	ND	0 (0%)
Y640F	NA	NA	NA	0 (0%)	ND	0 (0%)
LGLL-T γ/δ (n)	0	0	0	0	0	16
<i>STAT3</i> mutado	NA	NA	NA	NA	NA	7 (44%)
D661Y	NA	NA	NA	NA	NA	ND
Y640F	NA	NA	NA	NA	NA	ND
DLPC-NK (n)	0	50	7	0	16 (8%)	16
<i>STAT3</i> mutado	NA	15 (30%)	3 (43%)	NA	4 (33%)	6 (38%)
D661Y	NA	7 (14%)	1 (14%)	NA	ND	ND
Y640F	NA	4 (8%)	0 (0%)	NA	ND	ND

Abreviaturas: LGLL: Leucemia de linfócitos grandes granulares; DLPC-NK: doença linfoproliferativa crónica de células NK; NA, não aplicável; ND, não disponível.

* Três casos de outros tipos de LGLL

Apesar desta variabilidade, a prevalência das mutações D661Y e Y640F no *STAT3* na população estudada foi muito inferior ao esperado. Se as células mutadas perfizerem uma pequena percentagem das células totais da amostra, isso pode originar falsos negativos; no entanto, neste estudo, esta causa não é provável, pois a percentagem total de LGL nas duas amostras em que foi detetada a mutação D661Y era de aproximadamente 9%, sendo inferior a este valor em apenas 7 das restantes amostras avaliadas, em que a pesquisa da mutação foi negativa. De referir ainda que no artigo publicado por Jerez e col., que serviu de base para definir o protocolo técnico usado para a pesquisa das mutações D661Y e Y640F neste trabalho, é mencionado que a técnica usada (ARMS-PCR) permite a deteção destas mutações mesmo quando a frequência das LGL é inferior a 10%. ¹⁹ Há pois que excluir motivos técnicos que possam ter resultado em falsos negativos. Em primeiro

lugar, podem ter ocorrido erros na construção dos *primers* comercializados para a deteção das mutações. Este aspeto é especialmente relevante para a mutação Y640F, pois esta não teve qualquer caso positivo. Mandam as boas práticas que quando se procede à validação de um teste para utilização na prática clínica sejam testadas amostras controlo positivo e amostras controlo negativo, já que sem estas amostras é impossível garantir que os *primers* funcionam corretamente. A inexistência de controlos positivos comercializados, nomeadamente linhas celulares positivas para cada uma das mutações avaliadas, foi um dos obstáculos com que nos deparamos. Um aspeto positivo deste estudo é que se detetaram amostras que, como foram positivas para mutação D661Y, podem servir como controlo positivo desta mutação em futuros testes. Por outro lado, é possível que as condições de amplificação utilizadas careçam de otimização. Pode não ter sido selecionada a ideal proporção de cada *primer*, a correta concentração de cada reagente, ou a temperatura ideal para cada etapa. Pode, portanto, ter havido erros em várias fases, que tenham impossibilitado a deteção das mutações D661Y e/ou Y640F do *STAT3*. Em face dos resultados obtidos, a pesquisa destas mutações ainda não foi implementada na rotina do laboratório e o protocolo técnico está a ser reformulado.

Em suma, as LGLL são doenças raras e heterogéneas, pelo que é difícil conseguir um número elevado de doentes para caracterizar a doença. No entanto, este estudo veio a confirmar as características clínicas mais prevalentes nas LGLL. Um aspeto positivo deste estudo foi a representação dos vários grupos de LGLL, que permitiu caracterizar algumas peculiaridades de cada tipo, bem como levantar algumas questões. A nível das mutações *STAT3* não obtivemos os resultados esperados, tendo sido um aspeto penalizador a ausência de comercialização de controlos positivos para estas mutações. Desta forma, os resultados apresentados são preliminares e o protocolo técnico usado para a pesquisa das mutações D661Y e/ou Y640F do *STAT3* está ainda em fase de otimização.

Referências

- 1- Loughran TP Jr, Kadin ME, Starkebaum G, Abkowitz JL, Clark EA, Distech C, Lum LG, Slichter SJ. Leukemia of large granular lymphocytes: association with clonal chromosomal abnormalities and autoimmune neutropenia, thrombocytopenia, and hemolytic anemia. *Ann Intern Med.* 1985 Feb;102(2):169-75. doi: 10.7326/0003-4819-102-2-169. PMID: 3966754.
- 2- Shah MV, Hook CC, Call TG, Go RS. A population-based study of large granular lymphocyte leukemia. *Blood Cancer J.* 2016 Aug 5;6(8):e455. doi: 10.1038/bcj.2016.59. PMID: 27494824; PMCID: PMC5022177.
- 3- Dinmohamed AG, Brink M, Visser O, Jongen-Lavrencic M. Population-based analyses among 184 patients diagnosed with large granular lymphocyte leukemia in the Netherlands between 2001 and 2013. *Leukemia.* 2016 Jun;30(6):1449-51. doi: 10.1038/leu.2016.68. Epub 2016 Apr 8. PMID: 27055870.
- 4- Siebert JD, Mulvaney DA, Potter KL, Fishkin PA, Geoffroy FJ. Relative frequencies and sites of presentation of lymphoid neoplasms in a community hospital according to the revised European-American classification. *Am J Clin Pathol.* 1999 Mar;111(3):379-86. doi: 10.1093/ajcp/111.3.379. PMID: 10078114.
- 5- Bareau B, Rey J, Hamidou M, Donadieu J, Morcet J, Reman O, Schleinitz N, Tournilhac O, Roussel M, Fest T, Lamy T. Analysis of a French cohort of patients with large granular lymphocyte leukemia: a report on 229 cases. *Haematologica.* 2010 Sep;95(9):1534-41. doi: 10.3324/haematol.2009.018481. Epub 2010 Apr 7. PMID: 20378561; PMCID: PMC2930955.
- 6- Sanikommu SR, Clemente MJ, Chomczynski P, Afafe MG 2nd, Jerez A, Thota S, Patel B, Hirsch C, Nazha A, Desamito J, Lichtin A, Pohlman B, Sekeres MA, Radivoyevitch T, Maciejewski JP. Clinical features and treatment outcomes in large granular lymphocytic leukemia (LGL). *Leuk Lymphoma.* 2018 Feb;59(2):416-422. doi: 10.1080/10428194.2017.1339880. Epub 2017 Jun 20. PMID: 28633612.
- 7- Dong N, Castillo Tokumori F, Isenalumhe L, Zhang Y, Tandon A, Knepper TC, Mo Q, Shao H, Zhang L, Sokol L. Large granular lymphocytic leukemia - A retrospective study of 319 cases. *Am J Hematol.* 2021 Jul 1;96(7):772-780. doi: 10.1002/ajh.26183. Epub 2021 Apr 24. PMID: 33819354.
- 8- Neben MA, Morice WG, Tefferi A. Clinical features in T-cell vs. natural killer-cell variants of large granular lymphocyte leukemia. *Eur J Haematol.* 2003 Oct;71(4):263-5. doi: 10.1034/j.1600-0609.2003.00136.x. PMID: 12950235.
- 9- Lamy T, Moignet A, Loughran TP Jr. LGL leukemia: from pathogenesis to treatment. *Blood.* 2017 Mar 2;129(9):1082-1094. doi: 10.1182/blood-2016-08-692590. Epub 2017 Jan 23. PMID: 28115367.

- 10- Matutes E. Large granular lymphocytic leukemia. Current diagnostic and therapeutic approaches and novel treatment options. *Expert Rev Hematol*. 2017 Mar;10(3):251-258. doi: 10.1080/17474086.2017.1284585. Epub 2017 Jan 29. PMID: 28128670.
- 11- Moignet A, Lamy T. Latest Advances in the Diagnosis and Treatment of Large Granular Lymphocytic Leukemia. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2018 May 23;38:616-625. doi: 10.1200/EDBK_200689. PMID: 30231346.
- 12- Zhang R, Shah MV, Loughran TP Jr. The root of many evils: indolent large granular lymphocyte leukaemia and associated disorders. *Hematol Oncol*. 2010 Sep;28(3):105-17. doi: 10.1002/hon.917. PMID: 19645074; PMCID: PMC4377226.
- 13- Dürig J. Large Granular Lymphocyte Leukemia. Em: Hallek M, Eichhorst B, Catovsky D, editores. *Chronic Lymphocytic Leukemia* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 167–79. doi: 10.1007/978-3-030-11392-6_12. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-11392-6_12
- 14- Steinway SN, LeBlanc F, Loughran TP Jr. The pathogenesis and treatment of large granular lymphocyte leukemia. *Blood Rev*. 2014 May;28(3):87-94. doi: 10.1016/j.blre.2014.02.001. Epub 2014 Mar 7. PMID: 24679833; PMCID: PMC4155502.
- 15- Lima M, Almeida J, Santos AH, dos Anjos Teixeira M, Alguero MC, Queirós ML, Balanzategui A, Justiça B, Gonzalez M, San Miguel JF, Orfão 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 Nov;159(5):1861-8. doi: 10.1016/s0002-9440(10)63032-5. PMID: 11696446; PMCID: PMC1867049.
- 16- Sandberg Y, Almeida J, Gonzalez M, Lima M, Bárcena P, Szczepański T, van Gastel-Mol EJ, Wind H, Balanzategui A, van Dongen JJ, Miguel JF, Orfao A, Langerak AW. TCRgamma delta+ large granular lymphocyte leukemias reflect the spectrum of normal antigen-selected TCRgamma delta+ T-cells. *Leukemia*. 2006 Mar;20(3):505-13. doi: 10.1038/sj.leu.2404112. PMID: 16437145.
- 17- Lima M, Almeida J, Montero AG, Teixeira Mdos A, Queirós ML, Santos AH, Balanzategui A, Estevinho A, Alguero Mdel C, Barcena P, Fonseca S, Amorim ML, Cabeda JM, Pinho L, Gonzalez M, San Miguel J, Justiça B, Orfão A. Clinicobiological, immunophenotypic, and molecular characteristics of monoclonal CD56-/dim chronic natural killer cell large granular lymphocytosis. *Am J Pathol*. 2004 Oct;165(4):1117-27. doi: 10.1016/s0002-9440(10)63373-1. PMID: 15466379; PMCID: PMC1618630.
- 18- Bárcena P, Jara-Acevedo M, Tabernero MD, López A, Sánchez ML, García-Montero AC, Muñoz-García N, Vidriales MB, Paiva A, Lecomte Q, Lima M, Langerak AW, Böttcher S, van Dongen JJ, Orfao A, Almeida J. Phenotypic profile of expanded NK cells in chronic lymphoproliferative disorders: a surrogate marker for NK-cell clonality. *Oncotarget*. 2015 Dec 15;6(40):42938-51. doi: 10.18632/oncotarget.5480. PMID: 26556869; PMCID: PMC4767482.

- 19- Jerez A, Clemente MJ, Makishima H, Koskela H, Leblanc F, Peng Ng K, Olson T, Przychodzen B, Afable M, Gomez-Segui I, Guinta K, Durkin L, Hsi ED, McGraw K, Zhang D, Wlodarski MW, Porkka K, Sekeres MA, List A, Mustjoki S, Loughran TP, Maciejewski JP. STAT3 mutations unify the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2012 Oct 11;120(15):3048-57. doi: 10.1182/blood-2012-06-435297. Epub 2012 Aug 2. PMID: 22859607; PMCID: PMC3471515.
- 20- Lima M, Almeida J, Dos Anjos Teixeira M, Alguero Md Mdel C, Santos AH, Balanzategui A, Queirós ML, Bárcena P, Izarra A, Fonseca S, Bueno C, Justiça B, Gonzalez M, San Miguel JF, Orfao A. TCRalphabeta+/CD4+ large granular lymphocytosis: a new clonal T-cell lymphoproliferative disorder. *Am J Pathol*. 2003 Aug;163(2):763-71. doi: 10.1016/s0002-9440(10)63703-0. PMID: 12875995; PMCID: PMC1868208.
- 21- Koskela HL, Eldfors S, Ellonen P, van Adrichem AJ, Kuusanmäki H, Andersson EI, Lagström S, Clemente MJ, Olson T, Jalkanen SE, Majumder MM, Almusa H, Edgren H, Lepistö M, Mattila P, Guinta K, Koistinen P, Kuittinen T, Penttinen K, Parsons A, Knowles J, Saarela J, Wennerberg K, Kallioniemi O, Porkka K, Loughran TP Jr, Heckman CA, Maciejewski JP, Mustjoki S. Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2012 May 17;366(20):1905-13. doi: 10.1056/NEJMoa1114885. PMID: 22591296; PMCID: PMC3693860.
- 22- Fasan A, Kern W, Grossmann V, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. STAT3 mutations are highly specific for large granular lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2013 Jul;27(7):1598-600. doi: 10.1038/leu.2012.350. Epub 2012 Dec 4. PMID: 23207521.
- 23- Teramo A, Barilà G, Calabretto G, Ercolin C, Lamy T, Moignet A, Roussel M, Pastoret C, Leoncin M, Gattazzo C, Cabrelle A, Boscaro E, Teolato S, Pagnin E, Berno T, De March E, Facco M, Piazza F, Trentin L, Semenzato G, Zambello R. STAT3 mutation impacts biological and clinical features of T-LGL leukemia. *Oncotarget*. 2017 Jun 27;8(37):61876-61889. doi: 10.18632/oncotarget.18711. PMID: 28977911; PMCID: PMC5617471.
- 24- Muñoz-García N, Jara-Acevedo M, Caldas C, Bárcena P, López A, Puig N, Alcoceba M, Fernández P, Villamor N, Flores-Montero JA, Gómez K, Lemes MA, Hernández JC, Álvarez-Twose I, Guerra JL, González M, Orfao A, Almeida J. STAT3 and STAT5B Mutations in T/NK-Cell Chronic Lymphoproliferative Disorders of Large Granular Lymphocytes (LGL): Association with Disease Features. *Cancers (Basel)*. 2020 Nov 25;12(12):3508. doi: 10.3390/cancers12123508. PMID: 33255665; PMCID: PMC7760806.
- 25- Andersson EI, Tanahashi T, Sekiguchi N, Gasparini VR, Bortoluzzi S, Kawakami T, Matsuda K, Mitsui T, Eldfors S, Bortoluzzi S, Coppe A, Binatti A, Lagström S, Ellonen P, Fukushima N, Nishina S, Senoo N, Sakai H, Nakazawa H, Kwong YL, Loughran TP, Maciejewski JP, Mustjoki S, Ishida F. High incidence of activating STAT5B mutations in CD4-positive T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood*. 2016 Nov 17;128(20):2465-2468. doi: 10.1182/blood-2016-06-724856. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27697773; PMCID: PMC5114490.

Contribuição dos autores

Beatriz Peixoto reviu a literatura, elaborou, de forma supervisionada, o projeto de investigação subjacente a este trabalho, colaborou, de forma supervisionada, nos estudos de genética molecular, procedeu à recolha e tratamento dos dados clínicos e analíticos, e redigiu o artigo. João Rodrigues executou e efetuou a validação técnica dos estudos moleculares e colaborou na discussão dos resultados. Margarida Lima supervisionou a conceção e redação do projeto de investigação, foi responsável pela validação e interpretação dos estudos fenotípicos e moleculares e pela seleção dos casos, e reviu o artigo. Todos os autores contribuíram de forma relevante para a execução do estudo, interpretação e discussão dos resultados e aprovaram a versão final do artigo.

Conflito de interesses

Os autores declaram não ter conflito de interesses.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pelo Fórum Hematológico do Norte.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro Hospitalar Universitário do Porto pela autorização concedida para a realização do estudo e por ter facultado a utilização das instalações e dos equipamentos, e ao Fórum Hematológico do Norte, por ter financiado os reagentes. Agradecem também aos profissionais de saúde que contribuíram para o diagnóstico das LGLL no âmbito da rotina hospitalar, em particular aos médicos e técnicos do Laboratório de Citometria.

Material suplementar

Tabela suplementar 1. Reagentes utilizados para amplificação dos *primers* da mutação D661Y e Y640F. Volumes representados para uma reação com volume total de 50 µl.

Reagentes - <i>primers</i> D661Y		
Reagente	Volume (µl)	Concentração
Água	32.75	-
10x <i>buffer</i> II	5	1x
10mM mistura dNTPS	1	0.2mM
25 mM MgCl	4	2mM
10 µM <i>Primer</i> FO	1	0.2 µM
10 µM <i>Primer</i> RO	1	0.2 µM
10 µM <i>Primer</i> FI	2	0.4 µM
10 µM <i>Primer</i> RI	2	0.4 µM
5 U/µL Amplitaq Gold ®	0.25	1.25 U
ADN amostra	1*	-
Reagentes - <i>primers</i> Y640F		
Reagente	Volume (µl)	Concentração
Água	35.75	-
10x <i>buffer</i> Gold	5	1x
10mM mistura dNTPS	1	0.2 mM
25 mM MgCl	3	2 mM
10 µM <i>Primer</i> FO	1	0.2 µM
10 µM <i>Primer</i> RO	1	0.2 µM
10 µM <i>Primer</i> FI	1	0.2 µM
10 µM <i>Primer</i> RI	1	0.2 µM
5 U/µL Amplitaq Gold ®	0.25	1.25 U
ADN amostra	1*	-

*1 µl de amostra continha no mínimo 5ng de ADN.

FO, *forward outer*; RO, *reverse outer*; FI, *forward inner*; RI, *reverse inner*.

Tabela suplementar 2. Descrição do ciclo de PCR utilizado para amplificação de cada um dos *primers*.

Ciclo de PCR - <i>primers</i> D661Y			
Etapa		Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial		95	10 minutos
35 ciclos	Desnaturação	95	15 segundos
	<i>Annealing</i>	51	30 segundos
	Extensão	72	1 minutos
Extensão Final		72	5 minutos
<i>Hold</i>		4	-
Ciclo de PCR - <i>primers</i> Y640F			
Etapa		Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial		95	10 minutos
35 ciclos	Desnaturação	95	15 segundos
	<i>Annealing</i>	56	30 segundos
	Extensão	72	1 minutos
Extensão Final		72	5 minutos
<i>Hold</i>		4	-