

ESTUDO COMPARATIVO DOS MECANISMOS
QUE REGULAM A MIGRAÇÃO E O TROPISMO
TECIDULAR DOS LINFÓCITOS T NORMAIS
E DOS LINFÓCITOS T NEOPLÁSICOS

João Miguel Ferreira Moura Alves

Dissertação de Doutoramento em Ciências Biomédicas

2009

**Estudo comparativo dos mecanismos que regulam a
migração e o tropismo tecidual dos linfócitos T normais
e dos linfócitos T neoplásicos**

João Miguel Ferreira Moura Alves

Dissertação de doutoramento em Ciências Biomédicas

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Universidade do Porto

2009

JOÃO MIGUEL FERREIRA MOURA ALVES

**ESTUDO COMPARATIVO DOS MECANISMOS QUE REGULAM A
MIGRAÇÃO E O TROPISMO TECIDULAR DOS LINFÓCITOS T
NORMAIS E DOS LINFÓCITOS T NEOPLÁSICOS**

Dissertação de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Doutora Margarida Maria de Carvalho Lima

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

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

Co-orientador – Doutora Paula Maria das Neves Ferreira da Silva

Categoria – Professora Associada de Imunologia.

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

“A natureza é extremamente simples, se a conseguirmos encarar de modo apropriado...”

“É mais fácil desintegrar um átomo do que um preconceito.”

Albert Einstein

Agradecimentos

Durante todo o tempo em que decorreu o trabalho aqui apresentado, e mesmo antes de este ter início, foram muitos os que contribuíram para que chegasse a bom porto. São tantas as pessoas a quem me apraz agradecer, que o terei de fazer sumariamente.

Começo por agradecer às minhas orientadoras, a Professora Doutora Margarida Lima e a Professora Doutora Paula Ferreira, pela Hematologia e pela Imunologia, pelo muito que me ensinaram durante estes anos, por me contagiarem com o seu entusiasmo e a sua energia que me foi moldando o interesse e abrindo horizontes. Estendo este agradecimento ao Professor Doutor Rui Appelberg, que fez parte da comissão de acompanhamento a este trabalho, e que, pela análise crítica dos resultados, muito contribuiu para o seu sucesso.

A todo o Serviço de Hematologia do Hospital de Santo António e, de uma forma especial, ao seu laboratório de Citometria de Fluxo, um grande obrigado, pela especial paciência e camaradagem, em todos os momentos deste percurso.

Gostaria de salientar o especial envolvimento de alguns colegas que comigo deram alguns passos importantes, nomeadamente:

- À Dra. Sónia Fonseca e ao Doutor Elísio Costa pela ajuda nas culturas celulares e pelo companheirismo.
- À Dra. Ana Helena Santos e à Dra. Maria dos Anjos Teixeira pela crítica construtiva e pelo ombro amigo.
- Ao Dr. João Rodrigues pela ajuda em todos os domínios deste trabalho, pela capacidade crítica e pela amizade.
- Ao Professor Doutor José Manuel Cabeda, pela crítica construtiva e pela ajuda nos estudos moleculares.
- À Dra. Carla pela ajuda no levantamento da informação clínica dos doentes e pela simpatia.

A todos os meus colegas do Instituto Abel Salazar, em especial ao Dr. Pedro Madureira, pelo apoio, pela crítica construtiva e simplesmente por me aturarem, são curtas as palavras de agradecimento.

A todos os clínicos que contribuíram com o envio de amostras e com o diagnóstico dos doentes e aos próprios doentes e dadores de sangue que fizeram parte deste projecto, o meu sincero agradecimento.

Ao Hospital de Santo António e aos vários hospitais envolvidos neste estudo, obrigado por o permitirem.

Al Doctor Alberto Orfao, à la Dra. Mariluz García e à la Dr. Maria Jara del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, muchas gracias por la ayuda con el “sorting” celular e la purificación de DNA.

Ao Dr. Artur Paiva e ao Dr. José Mário Morgado, do Centro de Histocompatibilidade do Centro, muito obrigado pela ajuda no “sorting” celular.

A todos os estagiários e internos que passaram pelo Laboratório de Citometria, muito obrigado pelo que aprendi convosco.

Às empresas Enzifarma e Izasa, o meu agradecimento por patrocinarem as minhas deslocações a congressos e aos Dr. Alexandre Salvador e Dr. Bruno Garganta um agradecimento especial pela ajuda na resolução de vários problemas e pela sua amizade.

Foram muitos os Professores que me marcaram durante o meu percurso académico, durante o curso de Licenciatura e depois deste, e a todos agradeço pelo muito que me ensinaram durante todos estes anos, quer a nível profissional, quer a nível humano. De todos, gostaria de salientar, de uma forma especial, dois Professores que me marcaram muito, não só pela sua capacidade de motivação científica, mas especialmente pela sua amizade e pela ajuda que me disponibilizaram ao longo destes anos. Por tudo o exposto, ao Professor Doutor Pedro Moradas Ferreira e ao Professor Doutor Carlos Corrêa, o meu mais sincero agradecimento.

Aos meus colegas e a todos os funcionários da Escola Superior de Enfermagem do Instituto Politécnico de Viana do Castelo, o meu agradecimento, pela disponibilidade que demonstraram e pelo tempo que me libertaram para que me pudesse dedicar a este projecto. Um especial agradecimento aos Professores Rui Teixeira e Ermelinda Jaques, por toda a ajuda prestada e, mais importante, pela sua amizade.

A todos os meus amigos, por serem isso mesmo.

A todos os meus familiares, pela ajuda, sempre que esta foi solicitada, pela compreensão, mesmo quando me encontrava sobre stress e pela amizade, mesmo quando o meu mau humor sugeriria outro comportamento, muito obrigado.

Au grand guitariste Michel Sadanovsky, pour la traduction du résumé de ce travail.

Por fim, e em especial, aos meus pais, João Novais Alves e Maria Augusta Moura Alves, e à minha esposa Marta Gonçalves, a quem dedico esta tese, por tudo.

São sempre curtas as palavras que expressam o afecto e o carinho por aqueles de quem gostamos mais.

Financiamento

O trabalho aqui apresentado foi financiado por bolsas de projecto atribuídas por:

- Associação Portuguesa Contra a Leucemia
- Fórum Hematológico do Norte.

No desenvolvimento deste trabalho fui financiado por bolsas pessoais de:

- Novartis / Grupo Hemato-Oncológico Português
- Fórum Hematológico do Norte
- Fundação para a Ciência e a Tecnologia (BOLSA SFRH/BD/34471/2007)

Índice Geral

Agradecimentos.....	vii
Índice Geral	xi
Resumo.....	xiii
Summary	xvii
Résumé.....	xxi
Abreviaturas.....	xxv
Prologo	xxvii
Capítulo 1	1
1. Introdução.....	3
1.1 A resposta imunológica	3
1.2 Doenças linfoproliferativas T	11
1.3 Desenho da tese	20
1.4 Bibliografia.....	22
Capítulo 2	29
2. Estudo do processo de migração de linfócitos T normais	35
3.1 Introdução	35
3.2 Material e métodos.....	37
3.3 Resultados	41
3.4 Discussão.....	51
3.5 Bibliografia.....	56
Capítulo 3	61
3. Expressão de receptores de quimiocinas em neoplasias de linfócitos T maduros	65
4.1 Introdução	65
4.2 Material e métodos.....	67
4.3 Resultados	70
4.4 Discussão.....	75
4.5 Bibliografia.....	78
Capítulo 4	83
4. Discussão, conclusões e perspectivas futuras.....	85
4.1 Discussão.....	85
4.2 Conclusão geral	96
4.3 Perspectivas futuras.....	97
4.4 Bibliografia.....	100

Resumo

A maior dificuldade que se apresenta à compreensão da evolução clínica das doenças linfoproliferativas T (DLP-T) provém da nossa incapacidade em compreender claramente a sua origem e os mecanismos fisiopatológicos que estão na base do seu comportamento biológico e das suas manifestações clínicas. A proximidade de fenótipo entre os linfócitos T (LT) normais e os LT neoplásicos, juntamente com o facto de no sangue periférico (SP) existir uma mistura de populações de LT em diferentes estadios de activação/diferenciação, torna o diagnóstico das DLP-T difícil, sendo ainda mais complexo o correcto estadiamento da doença.

A migração das células do sistema imune em geral e dos LT em particular é regulada pela interacção entre quimiocinas e seus receptores, bem como por moléculas de adesão, prevendo-se que o mesmo ocorra nas DLP-T. Em última instância poderemos, a partir da compreensão do tropismo celular dos LT malignos, retirar ilações sobre a doença, as suas manifestações clínicas e o seu prognóstico.

Com o intuito de melhor compreender o comportamento clínico das DLP-T, procedemos ao estudo das subpopulações circulantes de LT normais, bem como à caracterização das alterações fenotípicas que ocorrem, nos LT, durante o processo de activação, quer *in vitro*, quer *ex vivo*. Recorremos também à avaliação da expressão de receptores de quimiocinas (RQ) à superfície dos LT normais e patológicos, numa tentativa de compreender o tropismo dessas células, bem como o atingimento de órgãos por parte das DLP-T.

De entre os LT circulantes identificamos e caracterizamos duas populações maioritárias, com base na sua expressão de CD27 e CD28, a CD27⁺CD28⁺ e a CD27⁻CD28⁻. Mostramos que a população CD27⁺CD28⁺ pode ser subdividida em duas: uma subpopulação de LT CD27⁺⁺CD28⁺, que corresponde a células naïve, e uma subpopulação de LT CD27⁺CD28⁺⁺, que apresenta um fenótipo claro de activação, nunca tendo sido, até à data, identificada como tal. Mostramos que os LT CD27⁺CD28⁺⁺ apresentam baixos níveis de expressão de CD62L e de CCR7, sendo os únicos a expressar CCR4 e CCR6, e secretando grandes quantidades de citocinas tipo Th1 (IL-2, IFN-γ e TNF-α), principalmente IL-2, após estimulação *in vitro*.

Quantificamos a percentagem dos LT CD27⁺CD28⁺⁺ circulantes em indivíduos normais, desde recém-nascidos até aos 85 anos de idade, concluindo que esta,

inexistente no sangue de cordão umbilical de recém-nascidos, aumenta consideravelmente até estabilizar entre os 20-40% e mantendo-se ao longo da vida. De seguida, procedemos ao estudo do reportório *TCR-V β* nos vários estadios de activação dos LT, concluindo que não havia qualquer restrição clonal nos LT CD27⁺CD28⁺⁺, o que sugere que estes linfócitos não são células de memória, segundo a sua definição habitualmente aceite.

Comprovamos ainda que os LT CD27⁺CD28⁺⁺ podem ser obtidos por estimulação *in vitro* de células naïve, com um estímulo inespecífico, observando que logo após 3 dias de estimulação, os LT começaram a adquirir o fenótipo de activação previamente descrito, facto que aconteceu à quase totalidade das células passado uma semana. O estudo do processo de activação dos LT normais permitiu-nos identificar as subpopulações cujo fenótipo mais se assemelha ao previamente descrito para as DLP-T mais frequentes.

Identificamos os LT CD27⁻CD28⁻ como sendo os homólogos normais dos LT neoplásicos de doentes com leucemia de linfócitos grandes granulares T (LGLL-T) e os LT CD27⁺CD28⁺⁺ como sendo os homólogos normais dos LT neoplásicos de doentes com Linfoma periférico de células T (PTCL). Estas populações de LT normais correspondem provavelmente às populações de origem destas doenças.

Com esta informação em mente, comparamos a expressão de vários RQ de inflamação (precoce e tardia), homeostáticos e de migração para órgãos, entre as populações, previamente descritas, de LT do SP de indivíduos normais e os LT neoplásicos de indivíduos com LGLL-T e indivíduos com PTCL.

Ao comparar a expressão de RQ, à superfície dos LT neoplásicos, entre doentes com LGLL-T e doentes com PTCL, concluímos que no primeiro caso, os LT neoplásicos expressam principalmente os RQ inflamatórios CXCR1 e CXCR2, enquanto, no segundo caso, os LT neoplásicos expressam essencialmente os RQ de tropismo para órgãos (CCR4, CCR6 e CCR7). Não foi observada expressão significativa de CXCR1 ou CXCR2 em nenhum dos casos de PTCL, sendo o mesmo verdade para a expressão de CCR4, CCR6 e CCR7 nos casos de LGLL-T.

Observamos que não existe relação directa entre a expressão de CCR4 e a infiltração cutânea pelas células de linfoma, nem entre a expressão de CCR7 e o atingimento ganglionar, facto que seria de prever pela função fisiológica do CCR4 e CCR7 em indivíduos normais.

Pela comparação do reportório de RQ entre os LT neoplásicos de doentes com LGLL-T e PTCL e os seus LT homólogos normais, verificamos que, em ambas as

patologias, os LT neoplásicos mantêm a expressão dos mesmos RQ, apresentando contudo um fenótipo mais exacerbado.

Nos casos de LGLL-T observamos uma sobre-expressão dos RQ de inflamação terminal, e sub-expressão dos RQ de inflamação precoce, por comparação com os LT CD27⁺CD28⁺ normais. Vimos ainda que, nos doentes com LGLL-T, a diminuição da percentagem de LT neoplásicos CCR5⁺ tinha relação directa com a linfocitose e, nos casos de LGLL-T CD8⁺, com neutropenia. Esta correlação entre a percentagem de LT neoplásicos CCR5⁺ e a linfocitose observou-se também nos PTCL, embora de forma menos evidente.

Nos doentes com LGLL-T CD8⁺ observamos ainda que a diferença de expressão entre RQ de inflamação tardia e precoce é maior nos casos em que os LT neoplásicos apresentam o fenótipo CD11c⁺CD57⁻, um fenótipo considerado aberrante, e com implicações clínicas, nomeadamente neutropenia e linfocitose.

Em contrapartida, verificamos que a sobre-expressão de CCR4 é frequentemente uma característica dos LT neoplásicos de doentes com PTCL, mesmo nos casos sem apresentação cutânea da doença, o que está de acordo com o aumento de expressão de CCR4, observado após estimulação dos LT CD4⁺. Este aumento da expressão de CCR4 é concomitante com a diminuição da expressão de outros receptores de migração para órgãos como o CCR6 e CCR7.

Por tudo o exposto, concluímos que a caracterização do padrão de expressão dos RQ pode contribuir para um melhor diagnóstico diferencial entre LGLL-T e PTCL e para explicar a linfocitose e a neutropenia associadas a algumas DLP-T, mas não permite prever o atingimento específico de determinados órgãos ou tecidos, como os gânglios linfáticos e/ou a pele.

Summary

The biggest difficulty to the comprehension of T-cell linfoproliferative disorder (TCLD) clinical evolution comes from our inability to fully comprehend their origin, and the physiopathologic mechanisms that underline their biologic behavior and clinical manifestations. The resemblance in phenotype, between normal and neoplastic T-cells, together with the existence of multiple peripheral blood (PB) T-cell populations, representing different activation/differentiation stages, makes TCLP diagnosis difficult, and the correct disease staging even more difficult.

The migration of immune cells in general, and that of T-cells in particular, is regulated by the interaction between chemokines and their receptors, as well as by adhesion molecules, with the same probably being true for TCLD. We hope that, by understanding the malignant T-cell tropism, we will be able to better understand the disease, namely its clinical manifestations and prognosis.

Aiming for a better comprehension of TCLD clinical behavior, we studied the circulating T-cell subpopulations, and characterized the phenotypic transformations that T-cells undergo during both the *in vitro* and *ex vivo* activation process. We also evaluated chemokine receptor (CR) expression on normal and neoplastic T-cell surface in an attempt to understand their tropism, as well as, TCLD organ involvement.

We identified and characterized two major populations among normal blood T-cells, based on CD27 and CD28 expression, the CD27⁺CD28⁺ and the CD27⁺CD28⁻. We have shown that the CD27⁺CD28⁺ T-cell population can be subdivided into: the CD27⁺⁺CD28⁺ subpopulation, which corresponds to naïve cells, and the CD27⁺CD28⁺⁺ subpopulation, which has a clear activation phenotype, although it was never identified as so. We have shown that CD27⁺CD28⁺⁺ T-cells have low levels of CD62L and CCR7 expression, being the only ones that express CCR4 and CCR6, and secreting high amounts of Th1 cytokines (IL-2, IFN-γ e TNF-α), mainly IL-2, upon *in vitro* stimulation.

We quantified the percentage of circulating CD27⁺CD28⁺⁺ T-cells in normal individuals, from new-borns to 85 year-olds, concluding that it is inexistent in cord blood, increasing considerably until it reaches 20-40% of all T-cells, maintaining this percentage trough life. We then studied the *TCR-Vβ* repertoire, in the various T-cell activation stages, concluding that there was no clonal restriction in CD27⁺CD28⁺⁺ T-cells, which suggests that these cells are not memory, according to its commonly accepted definition.

We have also proved that CD27⁺CD28⁺⁺ T-cells can be obtained by *in vitro* stimulation of naïve T-cells, with an unspecific stimulus, observing that T-cells start to acquire the previously described activation phenotype only after 3 days of stimulation, a phenotype observed in all T-cells after one week.

By studying the T-cell activation process, we were able to identify certain subpopulations whose phenotype resembles that of the neoplastic T-cells from the most common TCLD. We have identified the CD27⁻CD28⁻ population as the normal counterparts of the neoplastic large granular lymphocytic leukemia (LGLL) T-cells and the CD27⁺CD28⁺⁺ population as the normal counterparts of neoplastic peripheral T-cell lymphoma (PTCL) cells. These normal counterparts are probably involved in disease genesis.

With this information in hand, we compared the inflammatory (both late and early), homeostatic and organ specific CR expression, between the previously described populations from the PB of normal healthy individuals and the neoplastic T-cells from LGLL-T and PTCL patients.

By comparing CR expression, between neoplastic T-cells from LGLL-T and PTCL patients, we concluded that in the first case, CXCR1 and CXCR2 are preferentially expressed, whereas in the second case, the organ specific CR CCR4, CCR6 and CCR7 are preferentially expressed. There was no significant CXCR1 and CXCR2 expression in PTCL cases, with the same being true for CCR4, CCR6 and CCR7 in LGLL-T cases.

We observed that there is no direct correlation between CCR4 expression and coetaneous infiltration by lymphoma cells, neither between CCR7 expression and lymph node involvement, a fact that would be expected from the physiological role of these receptors.

By comparing the CR repertoire between the neoplastic T-cells from LGLL-T and PTCL patients and their normal counterparts, we observed that, in both pathologies, the neoplastic T-cells retain the same CR repertoire, but present an exacerbated phenotype. By comparison to normal CD27⁻CD28⁻ T-cells, we observed that neoplastic T-cells from LGLL-T patients, over-express the terminal inflammatory CR and an under-express the early inflammatory CR.

We also observed that in LGLL-T patients, the decrease in the percentage of CCR5⁺ neoplastic T-cells linearly correlates with lymphocytosis, and in CD8⁺ LGLL-T cases, with neutropenia. This correlation between the percentage of CCR5⁺ neoplastic T-cells and lymphocytosis was also observed in PTCL patients, although less evident.

In CD8⁺ LGLL-T patients, we also observed that the difference between late and early inflammatory CR expression is significantly superior in the cases where neoplastic T-cells have the CD11c⁺CD57⁻ phenotype, usually considered aberrant, and with known clinical implications, namely neutropenia and lymphocytosis.

On the other hand, we observed that the over-expression of CCR4 is a characteristic of neoplastic T-cells from PTCL patients, even those with no disease skin involvement, which is in accordance to the increase in CCR4 expression observed after CD4⁺ T-cell stimulation. This increase in CCR4 expression is accompanied by a decrease in the expression of other organ-specific CR like CCR6 and CCR7.

For all the previously presented, we concluded that the CR expression pattern contributes for the differential diagnosis between LGLL-T and PTCL, and for the understanding of the association between some TCLD and lymphocytosis and neutropenia, but does not enable us to foresee specific organ or tissue (like skin or lymph node) disease involvement.

Résumé

La plus grande difficulté pour comprendre l'évolution clinique des maladies lymphoprolifératives T (MLP-T) relève de notre incapacité à comprendre nettement son origine et les mécanismes physiopathologiques qui sont à la source de son comportement biologique et de ses manifestations cliniques. La proximité de phénotype entre les lymphocytes T (LT) normaux et les LT néoplasiques, joint au fait qu'il existe dans le sang périphérique (SP) un mélange de populations de LT à différents stades d'activation/différentiation, cause un diagnostic difficile des MLP-T, et rend encore plus complexe le fait d'établir la phase de la maladie.

La migration des cellules du système immunitaire en général et des LT en particulier est régulée par l'interaction entre les chimiocines et leurs récepteurs, aussi bien que par les molécules d'adhésion, prévoyant que la même chose se produit dans les MLP-T. On pourra, à la limite, entraîner des déductions à propos de la maladie, de ses manifestations cliniques et de son pronostic, à partir de la compréhension du tropisme cellulaire des LT malignes.

Pour mieux comprendre le comportement clinique des MLP-T, il était développé l'étude des sous populations circulantes de LT normaux, comme la caractérisation des altérations phénotypiques qui arrivent, dans les LT, pendant le processus d'activation, soit *in vitro*, soit *ex vivo*. Nous aurons aussi recours à l'évaluation de l'expression de récepteurs de chimiocines (RQ) à la surface des LT normaux et pathologiques, dans un essai de compréhension du tropisme de ces cellules, bien comme le niveau d'atteinte des organes par les MLP-T.

Parmi les LT circulants, il a été identifié et caractérisé deux populations majoritaires, ayant comme base son expression de CD27 et CD28, à CD27⁺CD28⁺ et à CD27⁻CD28⁻. Il a été montré que la population CD27⁺CD28⁺ peut être divisée en deux : une sous population de LT CD27⁺⁺CD28⁺, correspondante à des cellules naïve et une sous population de LT CD27⁺CD28⁺⁺, présentant un phénotype évident d'activation, n'ayant jamais, jusqu'à ce moment, été identifié comme tel. Il a été montré que les LT CD27⁺CD28⁺⁺ présentent des bas niveaux d'expression de CD62L et de CCR7, tout en étant les seules à exprimer CCR4 et CCR6 et à produire en sécrétion des grandes quantités de cytokines type Th1 (IL-2, IFN-γ e TNF-α), surtout IL-2, après stimulation *in vitro*.

Il a été quantifié le pourcentage des LT CD27⁺CD28⁺⁺ circulant dans des individus normaux, depuis les nouveaux nés jusqu'aux adultes de 85 ans, et conclu que celle-ci, inexistante dans le sang du cordon ombilical des nouveaux nés, augmente significativement jusqu'à une stabilisation entre les 20-40% et se maintient dans cet état tout au long de la vie. Ensuite, il a été développé l'étude du répertoire TCR-V β à plusieurs stades d'activation des LT, et conclu qu'il n'existait aucune restriction clonale dans les LT CD27⁺CD28⁺⁺, ce qui suggère que ces lymphocytes ne sont pas des cellules de mémoire, en accord avec la définition habituellement admise.

Il a été encore établi que les LT CD27⁺CD28⁺⁺ peuvent être obtenus à travers la stimulation *in vitro* des cellules naïves, avec un stimulus non spécifique, et avons remarqué que tout de suite après 3 jours de stimulation, les LT ont commencé à acquérir le phénotype d'activation déjà décrit, ce qui est arrivé aussi à la quasi totalité des cellules, une semaine après. L'étude du processus d'activation des LT normaux nous a permis d'identifier les sous populations dont le phénotype ressemble davantage à celui déjà décrit pour les DLP-T plus fréquents.

On a identifié les LT CD27⁻CD28⁻ comme étant les homologues normaux des LT néoplasiques de malades avec leucémie de lymphocytes grands granulaires T (LGLL-T). Par ailleurs, les LT CD27⁺CD28⁺⁺ ont été identifiés comme homologues normaux des LT néoplasiques de malades avec Lymphome périphérique de cellules T (PTCL). Ces populations-ci de LT normaux correspondent probablement aux populations d'origine de ces maladies.

En ayant toujours cette information présente à l'esprit, on a comparé l'expression de plusieurs RQ d'inflammation (précoce et tardive), homéostatiques et de migration pour des organes, entre les populations, déjà décrites, de LT du SP d'individus normaux et les LT néoplasiques d'individus avec LGLL-T et d'individus avec PTCL.

En comparant l'expression de RQ à la surface des LT néoplasiques, entre des malades avec LGLL-T et des malades avec PTCL, nous avons conclu que dans le premier cas, les LT néoplasiques révèlent surtout les RQ inflammatoires CXCR1 et CXCR2, alors que, dans le deuxième cas, les LT néoplasiques révèlent surtout les RQ de tropisme pour des organes (CCR4, CCR6 e CCR7). Il n'a pas été observé une expression significative de CXCR1 ou CXCR2 dans aucun des cas de PTCL, ni pour l'expression de CCR4, CCR6 et CCR7 dans le cas de LGLL-T.

Il a été observé qu'il n'existe pas une relation directe entre l'expression de CCR4 et l'infiltration cutanée par les cellules de lymphome, ni entre l'expression de CCR7 et

l'atteinte ganglionnaire. Ceci pourrait être prévu grâce à l'observation de la fonction physiologique du CCR4 et du CCR7 dans des individus normaux.

La comparaison du répertoire de RQ entre les LT néoplasiques des malades avec LGLL-T et PTCL et ses LT homologues normaux, a permis de vérifier que, dans les deux pathologies, les LT néoplasiques maintiennent l'expression des mêmes RQ, présentant, cependant, un phénotype plus exacerbé.

Dans les cas de LGLL-T, il a été observé une surexpression des RQ d'inflammation terminal et une sous expression des RQ d'inflammation précoce, par comparaison avec les LT CD27⁻CD28⁻ normaux. Il a été constaté encore que, dans les malades avec LGLL-T, la diminution du pourcentage de LT néoplasiques CCR5⁺ avait un rapport direct avec la lymphocytose et, dans les cas de LGLL-T CD8⁺, avec la neutropénie. Cette corrélation entre le pourcentage de LT néoplasiques CCR5⁺ et la lymphocytose a été aussi observée dans les PTCL, mais d'une façon moins évidente.

Pour les malades avec LGLL-T CD8⁺ il a été observé encore que la différence d'expression entre RQ d'inflammation tardive et précoce est plus grande dans les cas où les LT néoplasiques présentent le phénotype CD11c⁺CD57⁻, un phénotype considéré aberrant et avec des implications cliniques, notamment la neutropénie et lymphocytose.

Au contraire, il a été vérifié que la surexpression de CCR4 est souvent une caractéristique des LT néoplasiques de malades avec PTCL, même dans les cas où il n'existe pas une présentation cutanée de la maladie, ce qui coïncide avec l'augmentation d'expression de CCR4, observée après la stimulation des LT CD4⁺. Cette augmentation de l'expression de CCR4 est concomitante avec la diminution de l'expression d'autres récepteurs de migration pour organes comme le CCR6 et le CCR7.

Vis à vis de l'exposé, il a été conclu que la caractérisation du modèle d'expression des RQ peut contribuer à un meilleur diagnostic différentiel entre LGLL-T et PTCL et expliquer la lymphocytose et la neutropénie associées à quelques unes DLP-T. Par contre, elle ne permet pas de prévoir l'atteinte spécifique de certains organes ou tissus, comme les ganglions lymphatiques et/ou la peau.

Abreviaturas

- ALK:** “Anaplastic Lymphoma Kinase” Cinase do linfoma anaplásico
- ATLL:** “Adult T-cell Leukemia Lymphoma” Leucemia/linfoma de células T do adulto
- CLA:** “Cutaneous Lymphocyte Antigen” Antígeno associado aos linfócitos cutâneos
- DLP:** Doença (s) linfoproliferativa (s)
- DNA:** “Deoxyribonucleic Acid” Ácido desoxirribonucleico
- EBV:** “Epstein Barr Virus” Vírus Epstein Barr
- EORTC:** “European Organization for Research and Treatment of Cancer” Organização Europeia para a Investigação e Tratamento do Cancro
- HIV:** “Human Immunodeficiency Virus” Vírus da imunodeficiência humana
- HLA:** “Human Leukocyte Antigens” Antígenos leucocitários humanos
- HTLV:** “Human T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus” Vírus da leucemia/linfoma de células T
- IFN:** “Interferon” interferão
- IL:** Interleucina (s)
- LGLL:** “Large Granular Lymphocytic Leukemia” leucemia de linfócitos grandes granulares
- LT:** Linfócito (s) T
- mAb:** “Molecular Antibody” Anticorpo (s) monoclonal (is)
- MF:** Micose fungóide
- MHC:** “Major Histocompatibility Complex” complexo maior de histocompatibilidade
- MO:** Medula óssea
- OMS:** Organização Mundial de Saúde (também referente ao sistema de classificação de doenças hemato-oncológicas desta organização)
- PCR:** “Polimerase Chain Reaction” reação em cadeia da polimerase do DNA
- PTCL:** “Peripheral T-cell Lymphoma” Linfoma T periférico
- PTCL-NOS:** “Peripheral T-cell Lymphoma Not Otherwise Specified” Linfoma T periférico não especificado
- QC:** Quimiocina (s)
- REAL:** “Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasms”
- RQ:** Receptor (s) de quimiocina (s)
- SP:** Sangue periférico
- SS:** Síndrome de Sezary
- T-ALL:** “T-cell Lymphoblastic Leukemia / Lymphoma” leucemia (s) / linfoma (s) linfoblástico (s) T
- TCR:** “T-cell receptor”; receptor da célula T

TCR-V β : Famílias de regiões variáveis da cadeia beta do receptor da célula T

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

Prologo

Desde o tempo em que ser imune significava estar livre do peso dos impostos, o avanço na área da imunologia tem sido impressionante.

Considerando que a imunologia tem cerca de 120 anos, é notável que só a partir dos últimos 60 anos com o aparecimento da imunologia celular se conseguiu aplicar esta à medicina.

Desde a descoberta dos anticorpos, a imunologia tem sido dominada pelo estudo intensivo do linfócito B, devendo-se a estes estudos a descoberta de inúmeras vacinas cuja importância é deveras conhecida. Neste contexto, Jaques Miller et al. (1961-62), começaram a estudar o envolvimento do timo na imunidade celular, surgindo a ideia de que de alguma forma a célula T cooperava com a célula B, amplificando a resposta imunológica.

Abriu-se assim uma “Caixa de Pandora”, que ainda hoje encontra motivos para nos surpreender ...

Capítulo 1

Capítulo 1

1. Introdução

1.1 A resposta imunológica

1.1.1 Migração celular durante a resposta imunológica

1.1.2 Quimiocinas e seus receptores

1.1.3 Migração de linfócitos T

1.1.3.1 Alteração do padrão de migração dos linfócitos T com a activação

1.1.3.2 Subpopulações de linfócitos T no sangue periférico

1.2 Doenças linfoproliferativas T

1.2.1 Classificação de doenças linfoproliferativas de linfócitos T

1.2.2 Apresentação clínica das patologias de linfócitos T maduros

1.2.2.1 Linfomas de linfócitos T

1.2.2.2 Leucemias de linfócitos T

1.2.3 Migração e atingimento tecidular dos linfócitos T neoplásicos

1.3 Desenho da tese

1.4 Bibliografia

1. Introdução

1.1 A resposta imunológica

A resposta imune é um processo complexo que envolve a interacção entre vários componentes, desde as barreiras anatómicas até às células especializadas. Esta interacção entre os vários componentes do sistema imune é extremamente vantajosa para o organismo; através do contínuo diálogo entre a resposta imune inata e a adquirida, é garantida a eficácia da resposta imune final quer no controlo da infecção por diferentes agentes patogénicos quer na defesa anti-tumoral.

Para que o sistema funcione como um todo, é necessário, para além da regulação do processo de activação celular, uma regulação concertada da migração das células envolvidas dentro do próprio organismo. Esta regulação tem que ser feita de um modo preciso e rápido, para que as células imunológicas encontrem os agentes patogénicos e os destruam, mas também para não se acumularem nos locais inflamatórios, uma vez resolvido o processo infeccioso.

A capacidade da resposta imunológica é tanto mais forte quanto menor for o seu tempo de resposta. Dada a baixíssima frequência de células específicas para um determinado agente patogénico, seria quase impossível que um pequeno grupo de células encontrasse um agente patogénico que conseguisse reconhecer (1).

Para tal, o sistema evoluiu no sentido de criar estruturas ganglionares, onde células especializadas no processamento e apresentação de antígenos, pudessem encontrar a componente linfóide do sistema imune, responsável pela especificidade e amplitude da subsequente resposta imunológica (2). É a partir destas estruturas e das potencialidades geradas pela rápida locomoção através dos sistemas sanguíneo e linfático, que a resposta imunológica chega prontamente às fronteiras do organismo humano, por onde geralmente ocorre a entrada dos agentes patogénicos.

1.1.1 Migração celular durante a resposta imunológica

A migração celular é uma componente fundamental da resposta imunológica, sendo imprescindível que ocorra de uma forma rápida e precisa (3). Entende-se por migração celular a viagem selectiva de uma célula até ao seu local alvo, implicando uma atitude pró-activa da célula e do meio que a rodeia. Exclui-se portanto deste conceito a simples recirculação celular através dos sistemas sanguíneo e linfático.

A migração dos leucócitos é regulada por dois fenómenos diferentes mas complementares:

- a) A deslocação selectiva para certos órgãos, tecidos ou locais de inflamação, regulada por gradientes de mediadores químicos (nomeadamente pela interacção entre quimiocinas e seus receptores) (4).
- b) O sequestro ou retenção tecidular levado a cabo pela interacção entre moléculas de adesão à superfície dos leucócitos (nomeadamente selectinas [CD62], integrinas [CD11, CD49, CD103 e CD104] ou imunoglobulinas), e os seus ligandos nas células endoteliais (5).

O recrutamento leucocitário que ocorre durante a inflamação é, portanto, controlado em última instância pelo próprio tecido lesado, o que proporciona a retenção dos leucócitos durante o processo de cicatrização. Este *modus operandi* é importante não só para a defesa imunológica contra agentes patogénicos mas também para a destruição das células afectadas e subsequente reconstrução tecidular (6).

Por sua vez a expressão endotelial de moléculas de adesão é controlada pelo microambiente de citocinas formado no local de inflamação, nomeadamente pela acção das células fagocitárias (7). Esta auto-regulação é conveniente ao organismo pois garante uma resposta imunológica proporcional à área de tecido lesado.

A migração celular para o tecido inflamado é controlada em parte pelo tecido lesado, mas também pelos próprios agentes infecciosos. Destes salientam-se os péptidos com N-formil-metionina, produzidos pelas bactérias, que são reconhecidos por receptores à superfície dos neutrófilos e macrófagos, tendencialmente as primeiras células a chegar ao local de infecção (8). Num organismo não imuno-comprometido, apenas as mitocôndrias produzem proteínas com N-formil-metionina, as quais nunca são excretadas para o exterior da célula.

Durante o processo inflamatório e para além dele, a migração leucocitária é essencialmente controlada pela interacção entre um tipo específico de interleucinas, as quimiocinas, e os seus receptores.

1.1.2 Quimiocinas e seus receptores

As quimiocinas (QC) são pequenas proteínas de 8 a 12 KD com capacidade quimiotáctica, cuja descoberta original data de 1987 e, curiosamente, surgiu no decorrer do estudo da migração de linfócitos T (LT) para o timo (9).

Estruturalmente, as QC caracterizam-se por possuírem 4 resíduos de cisteína altamente conservados. Estes resíduos estabelecem, entre si, pontes dissulfureto, formando dois “loops” característicos (9).

Organizacionalmente as QC dividem-se essencialmente em dois grupos, consoante as cisteínas envolvidas nos “loops” sejam adjacentes (CC) ou estejam separadas por um resíduo de aminoácido (CXC). São ainda conhecidas duas QC em que apenas existem duas cisteínas (C) e um caso com três resíduos de aminoácido entre as cisteínas (CX₃C) (9).

Esta organização tem alguma tradução nas células alvo da sua acção, actuando as QC CXC preferencialmente nos neutrófilos e as CC preferencialmente nas restantes populações leucocitárias.

Relativamente ao contexto de produção, as QC podem dividir-se em duas classes: as QC homeostáticas, que são constitutivamente produzidas e regulam a migração basal das células imunitárias, intervindo directamente na homeostasia do sistema, e as QC inflamatórias, produzidas durante o processo inflamatório, sendo responsáveis pela migração das células imunológicas até ao local de inflamação (10).

A acção quimiotáctica das QC resulta da sua interacção com receptores específicos à superfície das células, os receptores de quimiocinas (RQ). Ao interagirem com estes receptores as QC provocam várias alterações a nível celular, nomeadamente no citoesqueleto celular e na expressão membranar de moléculas de adesão, entre outros. Como consequência destas transformações, as células migram no sentido do gradiente de concentração da QC, em direcção ao local da sua produção (9).

São já conhecidos 19 RQ distintos, possuindo todos a mesma estrutura característica. Quimicamente são proteínas com cerca de 350 aminoácidos e 7 domínios transmembranares, ligados no seu C-terminal a um complexo proteína-G para transmissão de sinal (9) (**Fig. 1**).

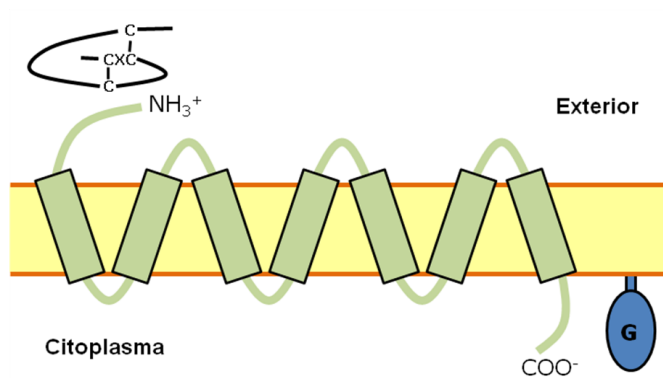


Figura 1 – Representação esquemática da ligação entre QC e RQ.

Após interacção entre QC e RQ, este último sofre uma mudança de conformação, levando à troca de GDP por GTP na subunidade α do complexo proteína-G, o que, por sua vez, leva à dissociação do complexo proteína-G da membrana celular, activando a via do inositol-trifosfato que origina a libertação de Ca^{2+} no citoplasma, e consequentemente, a activação de várias proteínas citoplasmáticas (11).

É na cadeia N-terminal que reside a especificidade da ligação entre QC e RQ, sendo o C-terminal, rico em resíduos de serina e treonina, o local de regulação via fosforilação. Este tipo de regulação é importante para o processo de dessensibilização do próprio receptor (11).

Devido à ligação preferencial a quimiocinas do tipo CC ou CXC, podemos dividir os RQ em receptores CC e receptores CXC, sendo conhecidos, à data, 9 receptores do tipo CC (CCR1-9) e 6 receptores do tipo CXC (CXCR1-6). São ainda conhecidos 2 receptores do tipo C (XCR1 e XCR2) e 1 do tipo CX_3C ($\text{CX}_3\text{C1}$) (9).

A contextualização dos RQ e sua subsequente divisão em homeostáticos e inflamatórios não é tão clara como no caso das QC, devido à promiscuidade na ligação QC-RQ existente numa grande parte dos RQ. De facto, apenas 10 dos 19 RQ conhecidos apresentam uma preferência significativa ($k_d \sim 1\text{nM}$) por um só ligando, sendo por isso denominados de específicos (12).

São muitas as funções dos RQ, para lá do processo de migração celular, estando envolvidos quer na diferenciação celular quer na angiogénese.

É interessante observar que, embora sejam várias as células a produzir QC e exista uma certa promiscuidade na interacção entre QC e RQ, estes receptores apresentam uma grande especificidade ao nível da migração preferencial para um determinado órgão, tecido ou simplesmente local inflamatório.

1.1.3 Migração de linfócitos T

A interacção entre QC e RQ é determinante para a migração de subtipos particulares de LT para áreas específicas dos órgãos linfóides secundários, tais como gânglios linfáticos ou baço, determinando ainda a migração dos linfócitos para o tecido linfóide associado a órgãos e tecidos primariamente não linfóides, como a pele e o tubo digestivo e, de uma forma geral, para os tecidos inflamados (9, 10, 13).

É já conhecido que muitos RQ medeiam o tropismo preferencial das células para os diferentes órgãos e tecidos, em diferentes circunstâncias. Salienta-se o papel do CXCR1 e CXCR2 como receptores de tropismo inflamatório, o CCR5 e CXCR3 como

receptores inflamatórios e característicos de LT Th1, o CCR4 como receptor característico de LT Th2 e junto com o CCR10 de migração para a pele, o CCR6 como receptor característico de migração para o fígado e o CCR7 como receptor característico de migração para os gânglios (14) (**Fig. 2**).

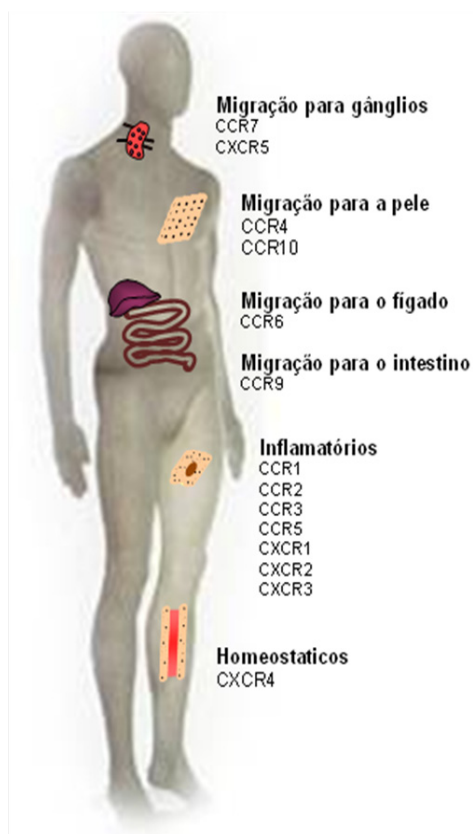


Figura 2 – Função quimiotática de alguns RQ expressos à superfície de LT normais.

A estrutura ganglionar evoluiu no sentido de criar um ambiente rico em CCL19, CCL21 (ligandos do CCR7) e CXCL13 (ligando do CXCR5). Seguindo o gradiente destas QC, os LT não estimulados migram para o gânglio, onde tomam contacto com as células apresentadoras de antígeno e desenvolvem interações produtivas com as células dendríticas e os linfócitos B que conduzem à produção de imunoglobulinas (15).

Após activação, e dependendo do ambiente de interleucinas (IL), os LT definem o seu destino. A sua polarização irá influenciar directamente o tipo de RQ que expressam, com predomínio de CCR5 e CXCR3 no caso de polarização Th1, CCR4 e CCR8 no caso de Th2 (16) e CCR6 no caso de Th17 (17), migrando assim para locais diferentes do organismo e garantindo uma imuno-vigilância adequada.

Por sua vez, o processo inflamatório suscita a produção localizada de várias QC que promovem a migração de LT para os tecidos inflamados, nomeadamente CCL3-CCL6 e CCL8-CCL11, onde os LT ajudam na eliminação dos agentes patogénicos.

Com base na expressão de CCR7 foram ainda identificados dois tipos específicos de LT de memória ($CD45RO^+$), os LT de memória central (LT_{CM}), que expressam CCR7 e, portanto, recirculam pelos gânglios, e os LT de memória efectora (LT_{EM}), que não expressam CCR7 e migrarão preferencialmente para os tecidos inflamados (18). Como a relação directa entre a expressão de $CD45RO$ e a função de memória dos LT é dúbia, foi mais tarde proposta a criação de um terceiro grupo de LT de memória efectora que não expressam $CD45RO$ (LT_{EMRA}) (19).

Surge portanto a necessidade de caracterizar o processo de activação dos LT, nomeadamente ao nível da alteração na expressão de RQ, no sentido de compreender de que forma a migração do LT é alterada com o próprio processo de activação.

1.1.3.1 Alteração do padrão de migração dos linfócitos T com a activação

A activação dos LT é um processo complexo, mediado por estímulos directos que implicam o contacto celular e/ou por mediadores celulares solúveis como as interleucinas.

A activação efectiva de um LT depende essencialmente do nível de fosforilação citoplasmático, nomeadamente dos domínios ITAM das cadeias da ZAP-70. Para atingir este nível de fosforilação, necessário para que os LT exerçam a sua função citotóxica e/ou de produção de citocinas, é necessário que a estimulação via receptor da célula T (TCR) seja acompanhada pela estimulação via receptores de co-estimulação, sendo esta importante para que o linfócito não se torne anérgico.

São várias as moléculas com capacidade co-estimuladora identificadas em LT, das quais se salientam pela sua importância o $CD28$ e o $CD27$. Enquanto o papel do $CD28$ como molécula de adesão e co-estimuladora é já bem conhecido - por interacção com $CD80$ ($B7-1$) ou $CD86$ ($B7-2$) das células apresentadoras de antígeno (APC) (20), o mecanismo de acção do $CD27$ como molécula co-estimuladora (por interacção com $CD70$ das APC) não está tão esclarecido, sabendo-se contudo que a estimulação via $CD27$ aumenta a expansão de LT induzida via TCR (21).

Durante o processo de activação os LT perdem gradualmente a expressão das moléculas co-estimuladoras $CD28$ e $CD27$, pelo que se torna possível discriminar os vários estadios de activação celular utilizando os níveis de expressão destas moléculas, desde os LT naïve $CD28^+CD27^+$, até aos LT efectores terminais $CD28^-CD27^-$, apelidados de linfócitos grandes granulares devido às suas características morfológicas típicas (22).

Foram já dados passos importantes no sentido de caracterizar a alteração no padrão de migração dos LT nos momentos que sucedem a estimulação, demonstrando-

-se que logo após estimulação, a célula mantém a expressão de CD62L (L-selectina) e CCR7, o que parece indicar que é necessário haver algum tipo de polarização para as células alterarem o seu padrão de migração (23). *In vitro*, foram caracterizadas as alterações que ocorrem nos primeiros 3 dias de estimulação com anti-CD3, tendo-se observado apenas um significativo aumento nos níveis de expressão de CXCR3 (24).

Apesar dos estudos publicados nesta área, a sequência de modificações da expressão de RQ à superfície celular após estimulação não está ainda clara e merece um estudo mais detalhado.

Embora os LT naïve não produzam quimiocinas, os LT activados/efectores são uma fonte de quimiocinas inflamatórias, contribuindo assim para o recrutamento celular durante o processo inflamatório.

1.1.3.2 Subpopulações de linfócitos T no sangue periférico

No sangue periférico (SP) de um indivíduo normal encontramos uma mistura de LT em vários estadios de activação e diferenciação, formando populações mais ou menos definidas, o que torna a análise imunofenotípica complexa, pela mistura de fenótipos correspondentes aos vários estadios que estas células atravessam, sendo apenas visíveis aqueles, cujos tempos de vida são mais prolongados, ou em que a expressão de um determinado marcador celular é exuberante ou característica (25).

Apesar de o sangue ser um veículo por excelência para a migração celular, nomeadamente no que diz respeito às células do sistema imunológico, não é de esperar encontrar no SP, em condições normais, todos os estadios de activação dos LT, visto que a maior parte do processo de estimulação e expansão linfocitário ocorre nos tecidos infectados.

Contudo, em indivíduos sujeitos a estímulos imunológicos fortes como infecções agudas ou crónicas, certas populações podem sobressair, sendo nestes casos de enorme importância o seu conhecimento para caracterizar as modificações fenotípicas que ocorrem nos LT em resposta à activação celular. Tendo como base estes pressupostos, foram caracterizados os perfis fenotípicos associados à activação recente e tardia dos LT, observados em condições patológicas associadas à estimulação aguda (infecções víricas agudas) e crónica (tumores e infecções crónicas) destas células (26).

Por outro lado, o recurso à estimulação *in-vitro*, pode dar-nos algumas informações sobre o que poderá ocorrer *in-vivo*, quando o LT contacta com o meio

inflamatório que rodeia um local de infecção, nomeadamente ao nível das alterações fenotípicas que o LT sofre, imediatamente após estimulação.

Seria contudo ideal podermos estudar os LT nos vários tecidos para onde migram, quer por via inflamatória quer por via homeostática. Contudo, no que diz respeito ao ser humano, tal estudo não é possível por questões éticas.

Será portanto esta a base para o estudo comparativo dos mecanismos de migração dos LT normais (de indivíduos saudáveis) e dos LT neoplásicos, de indivíduos com doenças linfoproliferativas de LT maduros.

1.2 Doenças linfoproliferativas T

As doenças linfoproliferativas T (DLP-T) são doenças raras que representam menos do que 10% de todas as neoplasias linfoides. Estima-se que nos Estados Unidos da América afectem 2,6 pessoas por cada 100.000 habitantes em cada ano (27).

A sua incidência varia consideravelmente a nível geográfico, atingindo maior incidência em locais onde a infecção por HTLV e EBV é endémica, como a Ásia e a bacia das Caraibas. Para esta assimetria na distribuição geográfica das DLP-T contribui directamente o aumento dos casos de patologias relacionadas com infecções víricas, como a leucemia/linfoma de células T do adulto provocada pelo HTLV-1.

Independentemente da localização geográfica, observa-se uma prevalência racial de certas DLP-T, facto que se pressupõe ter origem no somatório das contribuições individuais de predisposições genéticas e factores ambientais. São disso exemplo a maior prevalência de linfomas T/NK nasais em indivíduos asiáticos e descendentes de nativos americanos, bem como a maior incidência de linfoma T associado a enteropatia, predominante em indivíduos do País de Gales e da Irlanda que partilham um haplotipo de HLA específico.

As DLP-T são geralmente doenças mais agressivas do que as DLP-B, com taxas de mortalidade e morbilidade mais elevadas, implicando geralmente tratamentos mais agressivos. O sucesso do tratamento destas DLP depende directamente do seu correcto diagnóstico.

O tratamento das DLP-T pode envolver quimioterapia (CHOP em grande parte das situações, mas com uma crescente utilização de análogos de nucleótidos), radioterapia, transplante medular e, em casos particulares, anticorpos monoclonais, como o caso do anti-CD52 e anti-CD30, e mais recentemente, anti-CD25, anti-CD4 e anti-CD2.

Os efeitos secundários destes tratamentos são graves, levando em muitos casos ao aparecimento de citopenias graves, implicando a necessidade transfusional e à perda da competência imunológica, com o aparecimento de infecções oportunistas.

Estes doentes têm uma maior incidência de outras neoplasias, disfunção de órgãos quer por infiltração das células neoplásicas quer como consequência do tratamento e redução da qualidade de vida em geral.

Torna-se, portanto, imprescindível a correcta classificação das DLP-T, de acordo com a sua apresentação clínica, morfologia e fenótipo celular, características genéticas e opções terapêuticas. Todos estes critérios vertem directamente na mais recente

classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) (27), dando-se crescente ênfase à origem de cada DLP-T.

Actualmente, torna-se cada vez mais aceite, a teoria que propõe a origem das DLP-T em alterações que ocorrem nos LT durante o processo de diferenciação/activação. À luz desta teoria, acredita-se que, o fenótipo observável em determinada DLP-T, têm como base as características de um determinado estadio de diferenciação/activação. É portanto pertinente definir qual o estadio de diferenciação/activação subjacente a cada DLP-T.

Pelas suas implicações práticas e potencialidades, quer ao nível do conhecimento das DLP-T, quer mesmo ao nível terapêutico, será dada ênfase a esta nova teoria no decorrer desta dissertação.

Por seu lado, o diagnóstico e classificação destas DLP tem sido prejudicado pelo desconhecimento dos perfis fenotípicos aberrantes a elas associados. Este desconhecimento resulta, em grande parte, da dificuldade em definir com clareza os imunofenótipos normais dos LT e as modificações fenotípicas que ocorrem nestas células após activação celular, bem como a alteração do seu perfil de migração.

1.2.1 Classificação de doenças linfoproliferativas de linfócitos T

As DLP-T podem apresentar uma expressão fundamentalmente leucémica ou ter um carácter linfomatoso, isto é, atingirem preferencialmente determinados órgãos ou tecidos. A fronteira entre leucemia e linfoma não é rígida, já que uma DLP-T com comportamento preferencialmente leucémico na data do diagnóstico pode, ao longo da evolução da doença, atingir órgãos específicos e vice-versa.

A classificação das DLP-T divide-se em dois grandes grupos, as DLP de linfócitos T imaturos e as DLP de linfócitos T maduros (27).

- No primeiro grupo encontramos as leucemias/linfomas linfoblásticos T (T-ALL), que se caracterizam por serem DLP de linhagem T $\alpha\beta$ com origem em linfócitos T tímicos e pré-tímicos, ainda não comprometidos às linhagens CD4 e CD8.

De acordo com o seu fenótipo, podemos subdividir as T-ALL em pró-T (cCD3⁺, CD7⁺, CD2⁻, CD1a⁻, CD34^{+/-}), pré-T (cCD3⁺, CD7⁺, CD2⁺, CD1a⁻, CD34^{+/-}), T-cortical (cCD3⁺, CD7⁺, CD2⁺, CD1a⁺, CD34⁻) e T-medular (cCD3⁺, CD7⁺, CD2⁺, CD1a⁻, CD34⁻, CD3⁺) (27).

De uma maneira geral estas DLP-T apresentam elevadas contagens de linfócitos com morfologia imatura, atingindo preferencialmente a medula óssea (MO) e o SP, denominando-se nestes casos leucemias, e/ou ter atingimento nodal, extra-nodal e/ou tímico, sob a forma de massas, chamando-se, nestas circunstâncias, linfomas. Mais uma vez, não é clara a fronteira entre leucemia e linfoma.

- Do segundo grupo fazem parte diversas entidades, com características morfológicas, fenotípicas e genéticas distintas, mas que comungam da origem em linfócitos T maduros, quer da linhagem $\alpha\beta$ quer da linhagem $\gamma\delta$. (É de salientar que as DLP de células NK maduras são classificadas em conjunto com as DLP-T e incluídas no grande grupo das neoplasias de células T e NK maduras. Embora clinicamente sejam de apresentação semelhante, estas neoplasias têm origem em células distintas e, não sendo objecto deste estudo, não voltarão a ser mencionadas).

Com a excepção da leucemia prolinfocítica T, as DLP de linfócitos T maduros geralmente não apresentam elevadas contagens linfocitárias, podendo apresentar atingimento sanguíneo e/ou medular, no caso das leucemias, ou, no caso dos linfomas, envolver órgãos ou tecidos, dos quais se salientam pela sua maior incidência a pele, gânglios e/ou baço no caso das DLP-T $\alpha\beta$ e o intestino, no caso das DLP-T $\gamma\delta$.

Fazem parte do grupo das neoplasias de linfócitos T maduros as seguintes neoplasias: leucemia prolinfocítica T (T-PLL), a leucemia de linfócitos grandes granulares T (LGLL-T), a DLP-T infantil EBV⁺, a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL), o linfoma T extra-nodal do tipo nasal, o linfoma T associado a enteropatia, o linfoma T hepatoesplénico, o linfoma subcutâneo T tipo paniculite, a micose fungoide (MF), o síndrome de Sézary (SS), DLP-T CD30⁺ primariamente cutânea, linfoma T $\gamma\delta$ primariamente cutâneo, linfoma T periférico não especificado (PTCL-NOS), linfoma T angioimunoblástico, linfoma anaplásico de células grandes ALK⁺ e linfoma anaplásico de células grandes ALK⁻ (27).

À imagem do que acontece nos LT normais, estamos convictos que o estudo da expressão dos RQ nos LT neoplásicos será fundamental para estabelecer as bases para a compreensão do comportamento clínico e biológico das DLP-T, devendo futuramente constar dos critérios subjacentes à classificação das neoplasias de linfócitos T, nomeadamente ao nível da ténue distinção entre leucemia e linfoma.

1.2.2 Apresentação clínica das patologias de linfócitos T maduros

1.2.2.1 Linfomas de linfócitos T

As DLP-T com comportamento linfomatoso podem ter uma apresentação predominantemente nodal (como é o caso dos linfomas de LT periféricos em geral) ou extra-nodal. Os linfomas T extra-nodais podem atingir preferencialmente a pele (como acontece nos linfomas T cutâneos de tipo Micose Fungóide ou Síndrome de Sezary), o tubo digestivo (linfoma T intestinal associado a enteropatia), o baço e o fígado (linfoma T hepato-esplênico) ou outros órgãos (28). Os mecanismos que determinam estas diferenças no comportamento clínico são ainda desconhecidos.

a) Linfomas T de atingimento primariamente cutâneo

- ***Micose fungoide (MF)***

A MF é o linfoma T primariamente cutâneo mais comum, representando quase 50% dos casos (29). Embora comece invariavelmente por atingir a pele, em estadios mais avançados da doença, pode atingir o SP, gânglios e baço e em certos casos o fígado (29). É uma doença de evolução lenta, provocada pela acumulação cutânea de LT CD4⁺ (30) com expressão membranar da molécula CLA (31), associada à migração para a pele e perda frequente de CD7 (30).

- ***Síndrome de Sézary (SS)***

O SS é uma DLP-T rara, caracterizada pela presença de células com uma morfologia característica (núcleo cerebriforme) na pele e SP, podendo surgir ainda atingimento ganglionar, facto que fez desta DLP-T uma das melhor caracterizadas (29). Tal como no caso da MF as células de Sézary são LT CD4⁺ com expressão frequente de CLA e com perda habitual de CD7 (32), expressando ainda o RQ de endereçamento para a pele, CCR4 (33).

- ***Linfoma T/NK extra-nodal do tipo nasal***

Este tipo particular de linfoma caracteriza-se pela infiltração de linfócitos com características citotóxicas nos tecidos, provocando danos vasculares e necrose extensa. Ocorre sempre em indivíduos portadores de EBV (na maioria dos casos do subtipo A), o que evidencia um possível papel patogénico do vírus (34).

As células neoplásicas atingem preferencialmente o trato aerodigestivo superior, incluindo a cavidade nasal, a nasofaringe, os seios perinasais e o palato, podendo ainda atingir outros tecidos com menor incidência (35).

- ***Linfoma subcutâneo T tipo paniculite***

Este tipo raro de linfoma T subcutâneo apresenta acumulação de LT CD8⁺ citotóxicos no tecido subcutâneo, e consequente necrose das células adiposas (36). Embora cerca de 20% dos pacientes apresentem lúpus, a ligação entre estas duas patologias ainda não foi demonstrada (37).

- ***DLP-T cutâneas CD30⁺***

As DLP-T CD30⁺ englobam diversas entidades, das quais se salientam pela sua importância o linfoma anaplásico primariamente cutâneo e a papulose linfomatóide. No seu conjunto, estas patologias representam cerca de 20% dos casos de linfomas cutâneos, constituindo o segundo maior grupo de linfomas cutâneos (38).

Em qualquer dos casos, as células neoplásicas responsáveis por estas patologias são LT CD4⁺ com fenótipo de activação, e perda frequente de CD2, CD3 e CD5. Existem sempre pelo menos 75% de células com expressão de CD30 (39) (40).

- ***Subtipos raros de linfomas T primariamente cutâneos***

Nesta categoria cabem 3 entidades raras, cujo local principal de atingimento é a pele: o linfoma T γδ primariamente cutâneo, o linfoma T CD8⁺ citotóxico agressivo epidermotrópico primariamente cutâneo e o linfoma T CD4⁺ de células pequenas/médias pleomórficas primariamente cutâneo (38). Caracterizam-se pela infiltração cutânea por parte de LT activados/citotóxicos, com excepção do último caso onde os LT CD4⁺ não expressam proteínas citotóxicas (41). É ainda comum observar-se a perda de marcadores pan-T (42). A classificação destes linfomas é difícil, sendo necessária a exclusão de todas as outras DLP-T.

b) Linfomas T de atingimento primariamente intestinal

- ***Linfoma T associado a enteropatia***

O linfoma T associado a enteropatia é um tumor intestinal que afecta principalmente o jejuno e o íleo, e tem origem em transformações que ocorrem em LT intra-epiteliais, normalmente em contexto inflamatório (43). Existem duas variantes com fenótipos distintos (Tipo I – CD8⁺CD56⁻ e Tipo II – CD8⁺CD56⁺), embora ambas tenham apresentação clínica semelhante (44).

c) Linfomas T de atingimento primariamente hepato-esplénico

- **Linfoma T hepatoesplénico**

Esta patologia surge normalmente em indivíduos jovens, associada a estados de imunossupressão, e caracteriza-se por uma infiltração de LT δ neoplásicos (normalmente $\delta 1$) no baço e frequentemente no fígado (45). É de salientar que apesar da marcante hepatoesplenomegalia, esta é uma doença sistémica, envolvendo normalmente a medula e o SP, mas sem atingimento ganglionar (46).

d) Linfomas T de atingimento primariamente ganglionar

- **Linfoma T periférico não especificado (PTCL-NOS)**

O PTCL-NOS é o tipo de linfoma T mais comum, representando cerca de 30% dos linfomas T periféricos nos países ocidentais (47). Embora a maioria dos pacientes com PTCL-NOS apresente atingimento ganglionar, esta patologia pode infiltrar a medula óssea, o fígado, o baço, a pele e o intestino (47) (28). Embora surjam células de linfoma no SP, a apresentação primariamente leucémica é rara.

Como a designação PTCL-NOS representa uma mistura de diversas entidades, o fenótipo das células neoplásicas também é heterogéneo (28). São normalmente LT CD4⁺, podendo, em situações mais raras, ser LT CD8⁺ ou mesmo LT CD4⁺CD8⁺, podendo inclusive apresentar características citotóxicas (48). A perda de CD5 e CD7 é uma característica frequente (48).

- **Linfoma T angioimunoblástico**

Este tipo de linfoma caracteriza-se por ser uma doença sistémica, embora apresente um forte envolvimento ganglionar. Para além da linfadenopatia generalizada, pode atingir o baço, o fígado, a pele e a MO, sendo frequente a apresentação clínica envolver hepatoesplenomegalia e prurido cutâneo (49).

Fenotipicamente, estas células neoplásicas são muito semelhantes aos LT CD4⁺ “helper” foliculares de indivíduos normais, apresentando expressão de CD10 (50) e CXCR5, e produção de CXCL13, a quimiocina envolvida na expansão de linfócitos B e células dendríticas no folículo ganglionar (51). Esta expansão exagerada de linfócitos B e células dendríticas mascara por vezes a doença, sugerindo um fenómeno reactivo (52).

- **Linfoma anaplásico de células grandes ALK⁺ e ALK⁻**

No linfoma anaplásico de células grandes as células neoplásicas são geralmente grandes, com citoplasma abundante, apresentando frequentemente o núcleo em forma de ferradura (53). Esta DLP-T apresenta frequentemente quer envolvimento ganglionar quer envolvimento extra-nodal generalizado, com a excepção do intestino e do sistema nervoso central, onde o atingimento é muito raro (54).

Fenotipicamente são LT CD4⁺ citotóxicos, com expressão frequente de granzimas, perforinas e marcadores de activação como o CD25. Geralmente não expressam CD3 na membrana, apresentando contudo CD3 no citoplasma (55). Estas células são normalmente CD30⁺ e podem dividir-se consoante a expressão da cinase do linfoma anaplásico (ALK) em duas entidades distintas, com morfologia e fenótipo semelhante, mas diferente prognóstico (56).

1.2.2.2 Leucemias de linfócitos T

O termo “leucemia de LT” compreende entidades muito distintas, caracterizadas pela expansão de LT em estadios de diferenciação/activação variados, desde um estadio de prolinfócito (como é o caso da T-PLL), até LT de activação terminal (como é o caso da LGLL-T). Tal como o nome indica, as leucemias de LT maturos apresentam o SP como principal local de atingimento, podendo contudo infiltrar outros tecidos, linfóides e não-linfóides, durante o desenvolvimento da doença.

- ***Leucemia de linfócitos grandes granulares T (LGLL-T)***

A LGLL-T é a DLP-T crónica mais prevalente na Europa e caracteriza-se pela acumulação de LT num estadio de activação terminal, numa fase em que já perderam a expressão dos co-estimuladores CD27 e CD28 (57). Estes LT neoplásicos são geralmente CD8⁺, podendo ainda ser CD4⁺, e apresentam geralmente uma diminuição na expressão de CD5 e/ou CD7, e um aumento da expressão de moléculas associadas a LT citotóxicos como o CD16, CD56, CD57, granzimas e perforinas (57) (58) (59).

É uma doença com comportamento indolente, atingindo preferencialmente indivíduos com idades superiores a 45 anos e apresentando frequentemente neutropenia, por vezes associada a anemia (60).

Envolve maioritariamente o SP e a MO, podendo ainda atingir o baço e o fígado, sendo o atingimento ganglionar muito raro (60).

- ***Leucemia prolinfocítica T (T-PLL)***

A T-PLL é uma doença rara, caracterizada pela elevada proliferação de prolinfócitos T, maioritariamente CD4⁺, ou ocasionalmente CD4⁺CD8⁺ ou ainda CD4⁺CD8⁺, o que geralmente origina uma elevada linfocitose. O envolvimento medular origina frequentemente anemia e trombocitopenia. Observa-se ainda, com frequência, atingimento ganglionar, esplénico, hepático e cutâneo (60).

As células neoplásicas expressam geralmente os marcadores pan-T, apresentando normalmente uma expressão forte de CD52, podendo este ser utilizado a nível terapêutico (61).

- ***DLP-T infantil EBV+***

Este tipo de DLP-T está intimamente relacionado com a infecção por EBV, ocorrendo frequentemente após ou durante uma infecção aguda por EBV (62).

Caracteriza-se pela proliferação de LT específicos para o EBV, com características citotóxicas e que, a partir do SP, podem infiltrar o fígado, o baço, os gânglios, a medula óssea, a pele e o pulmão, originando uma doença sistêmica (63).

- ***Leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL)***

A ATLL é uma doença causada pela infecção pelo retrovírus HTLV-1, sendo endêmica em regiões de maior prevalência do vírus como a Ásia e a bacia das Caraíbas (64).

Para além do envolvimento sanguíneo pela doença, a maioria dos pacientes apresenta ainda envolvimento ganglionar generalizado, podendo envolver ainda a pele e mais raramente a MO, o baço, o pulmão, o fígado, o trato intestinal e o sistema nervoso central (65).

Fenotipicamente as células de ATLL são LT CD4⁺ (podendo em casos raros ser CD8⁺ ou mesmo CD4⁺CD8⁺), com um fenótipo semelhante às células T reguladoras, com elevada expressão de CD25, FOXP3, expressando ainda CCR4 (66).

1.2.3 Migração e atingimento tecidular dos linfócitos T neoplásicos

A mais recente classificação de tumores hematológicos, da OMS, enfatiza a teoria que postula uma evolução directa do LT neoplásico a partir de um LT normal, perdendo este a capacidade de regulação homeostática (27). Esta teoria pressupõe que a cada DLP-T corresponde uma população particular de LT normal.

Será portanto lícito pressupor que os LT neoplásicos seguirão, em linhas gerais, a mesma migração celular observada nos LT normais de onde tiveram origem. Contudo, não é fácil deduzir qual será essa população origem na maior parte das DLP-T, nem prever de que forma as alterações ocorridas nos LT neoplásicos podem influenciar a sua migração.

No entanto, trabalhos publicados recentemente indicam que o tropismo tecidular de alguns linfomas se relaciona com o padrão de expressão de RQ pelas células linfomatosas.

Um exemplo clássico desta associação é a forte expressão de CCR4 pelas células de Sézary, responsável pela sua infiltração cutânea (33). O CCR4 está ainda implicado directamente na infiltração cutânea provocada pela ATLL (67).

Não está ainda descrito o envolvimento do CCR4 na infiltração cutânea de outros linfomas de células T, sendo contudo de esperar que esta relação seja mais abrangente.

Também, no que diz respeito á migração para o gânglio, encontra-se uma forte relação entre reportório de RQ e migração preferencial, sendo característica a elevada expressão de CXCR5 pelas células neoplásicas do linfoma Angioimunoblástico (68).

No entanto, os estudos existentes são ainda muito escassos e merecem ser aprofundados e alargados a um maior número de patologias.

Por outro lado, os RQ expressos pelos LT neoplásicos podem vir a constituir num futuro próximo alvos terapêuticos preferenciais, nomeadamente através da utilização de anticorpos monoclonais anti-RQ, à semelhança do que já é feito com sucesso em doenças autoimunes, como por exemplo a artrite reumatóide e a esclerose múltipla (69) (70).

Desta forma, a caracterização da expressão de RQ na superfície das células T neoplásicas pode abrir novas perspectivas no diagnóstico, prognóstico e tratamento das neoplasias de LT.

1.3 Desenho da tese

Este trabalho tem como objectivos:

1. Compreender a alteração do padrão de expressão dos RQ nos LT normais após estimulação.
2. Compreender o tropismo tecidular de certos tumores hematológicos, isto é, porque é que determinadas DLP-T têm um comportamento preferencialmente leucémico – tomando como modelo de leucemia de LT maturos a LGLL-T – enquanto outras evidenciam um atingimento preferencial de determinados órgãos ou tecidos – tomando como modelo de linfoma de LT maturos o PTCL, nomeadamente o linfoma T cutâneo CD4⁺.
3. Relacionar a expressão de RQ nos LT neoplásicos com características clínicas relacionadas com a evolução da doença e seu prognóstico.

Durante o primeiro capítulo foi apresentado o estado da arte relativamente aos processos que regulam a migração de LT normais durante a resposta imunológica e fora desta, com maior ênfase no processo de activação do LT e as alterações que ocorrem ao nível do fenótipo, da sua função e do potencial de migração, como resposta à estimulação.

Foi dada uma visão geral sobre as várias DLP-T, tendo como base a mais recente classificação dos tumores hematológicos da OMS. Foram abordadas as manifestações clínicas mais relevantes bem como a caracterização fenotípica destas doenças, dando especial relevo à descrição do que já é conhecido sobre a migração preferencial dos LT neoplásicos nas várias patologias, bem como aos RQ, cuja expressão nos LT neoplásicos já é conhecida.

No decorrer dos próximos capítulos (2 e 3) será apresentado o trabalho experimental desenvolvido no sentido de atingir os objectivos propostos, juntamente com as conclusões específicas de cada capítulo.

O capítulo 2 versará sobre a caracterização do processo de activação de LT normais, especificamente ao nível das alterações fenotípicas que ocorrem após estimulação. Será dada especial importância ao relatório de RQ expresso pelos vários estadios de activação dos LT. Serão ainda analisadas as subpopulações de LT correspondentes aos estadios de activação mais exuberantes, que se encontram no sangue periférico de indivíduos normais. Estes dados serão comparados posteriormente com observações feitas nos LT neoplásicos presentes no SP de indivíduos com DLP-T.

No capítulo 3 serão abordados os perfis de migração dos LT neoplásicos presentes nas várias DLP-T, sendo comparado o reportório de RQ entre estes LT e os LT normais com fenótipo semelhante. Será comparado ainda o reportório de RQ entre células neoplásicas de linfomas e leucemias de LT maduros, e comparado o mesmo reportório com aspectos fenotípicos particulares com indicação prognóstica. Serão ainda relacionados aspectos clínicos relevantes com o fenótipo, e em particular com a expressão de determinados RQ.

No capítulo 4 será efectuada uma discussão geral dos resultados obtidos, bem como as perspectivas futuras abertas por este trabalho.

1.4 Bibliografia

1. Panijel, J., M. A. Delpierre, J. Maridat, and M. Terquem. 1976. The repertoire of specificity of lymphoid cells: primary response and antigenic competition in microcultures. *Ann Immunol (Paris)* 127:475-487.
2. Batista, F. D., and N. E. Harwood. 2009. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 9:15-27.
3. Jalkanen, S., R. A. Reichert, W. M. Gallatin, R. F. Bargatze, I. L. Weissman, and E. C. Butcher. 1986. Homing receptors and the control of lymphocyte migration. *Immunol Rev* 91:39-60.
4. Martinez Martinez, C. M., and R. Hernandez Pando. 1999. [Chemokines, a new family of cytokines in inflammatory cell recruitment]. *Rev Invest Clin* 51:255-268.
5. Yong, K., and A. Khwaja. 1990. Leucocyte cellular adhesion molecules. *Blood Rev* 4:211-225.
6. Taub, D. D., and J. J. Oppenheim. 1994. Chemokines, inflammation and the immune system. *Ther Immunol* 1:229-246.
7. Johnson, L. A., and D. G. Jackson. 2008. Cell traffic and the lymphatic endothelium. *Ann N Y Acad Sci* 1131:119-133.
8. Le, Y., Y. Yang, Y. Cui, H. Yazawa, W. Gong, C. Qiu, and J. M. Wang. 2002. Receptors for chemotactic formyl peptides as pharmacological targets. *Int Immunopharmacol* 2:1-13.
9. Pease, J. E., and T. J. Williams. 2006. The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S212-221.
10. Bromley, S. K., T. R. Mempel, and A. D. Luster. 2008. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol* 9:970-980.
11. Underwood, D. J., and K. Prendergast. 1997. Getting it together: signal transduction in G-protein coupled receptors by association of receptor domains. *Chem Biol* 4:239-248.
12. Kim, C. H. 2004. Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 4:343-361.
13. Ono, S. J., T. Nakamura, D. Miyazaki, M. Ohbayashi, M. Dawson, and M. Toda. 2003. Chemokines: Roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111:1185.

14. Jin, T., X. Xu, and D. Hereld. 2008. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine* 44:1-8.
15. Picker, L. J., and E. C. Butcher. 1992. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 10:561-591.
16. Qin, S., J. B. Rottman, P. Myers, N. Kassam, M. Weinblatt, M. Loetscher, A. E. Koch, B. Moser, and C. R. Mackay. 1998. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 101:746-754.
17. Singh, S. P., H. H. Zhang, J. F. Foley, M. N. Hedrick, and J. M. Farber. 2008. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J Immunol* 180:214-221.
18. Campbell, J. J., K. E. Murphy, E. J. Kunkel, C. E. Brightling, D. Soler, Z. Shen, J. Boisvert, H. B. Greenberg, M. A. Vierra, S. B. Goodman, M. C. Genovese, A. J. Wardlaw, E. C. Butcher, and L. Wu. 2001. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* 166:877-884.
19. Jacobsen, M., A. K. Detjen, H. Mueller, A. Gutschmidt, S. Leitner, U. Wahn, K. Magdorf, and S. H. Kaufmann. 2007. Clonal expansion of CD8⁺ effector T cells in childhood tuberculosis. *J Immunol* 179:1331-1339.
20. Goronzy, J. J., and C. M. Weyand. 2008. T-cell co-stimulatory pathways in autoimmunity. *Arthritis Res Ther* 10 Suppl 1:S3.
21. Hendriks, J., Y. Xiao, and J. Borst. 2003. CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J Exp Med* 198:1369-1380.
22. Dolfi, D. V., and P. D. Katsikis. 2007. CD28 and CD27 costimulation of CD8⁺ T cells: a story of survival. *Adv Exp Med Biol* 590:149-170.
23. Iezzi, G., D. Scheidegger, and A. Lanzavecchia. 2001. Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 193:987-993.
24. Rabin, R. L., M. K. Park, F. Liao, R. Swofford, D. Stephany, and J. M. Farber. 1999. Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *J Immunol* 162:3840-3850.
25. Tough, D. F., and J. Sprent. 1995. Lifespan of lymphocytes. *Immunol Res* 14:1-12.
26. Lima, M., A. Teixeira Mdos, M. L. Queiros, A. H. Santos, C. Goncalves, J. Correia, F. Farinha, F. Mendonca, J. M. Soares, J. Almeida, A. Orfao, and B. Justica. 2003.

Immunophenotype and TCR-Vbeta repertoire of peripheral blood T-cells in acute infectious mononucleosis. *Blood Cells Mol Dis* 30:1-12.

27. Swerdlow, S. H., and International Agency for Research on Cancer. 2007. *WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
28. Rodriguez-Abreu, D., V. B. Filho, and E. Zucca. 2008. Peripheral T-cell lymphomas, unspecified (or not otherwise specified): a review. *Hematol Oncol* 26:8-20.
29. Willemze, R., E. S. Jaffe, G. Burg, L. Cerroni, E. Berti, S. H. Swerdlow, E. Ralfkiaer, S. Chimenti, J. L. Diaz-Perez, L. M. Duncan, F. Grange, N. L. Harris, W. Kempf, H. Kerl, M. Kurrer, R. Knobler, N. Pimpinelli, C. Sander, M. Santucci, W. Sterry, M. H. Vermeer, J. Wechsler, S. Whittaker, and C. J. Meijer. 2005. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 105:3768-3785.
30. Ralfkiaer, E. 1991. Immunohistological markers for the diagnosis of cutaneous lymphomas. *Semin Diagn Pathol* 8:62-72.
31. Whittaker, S. 2006. Biological insights into the pathogenesis of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL). *Semin Oncol* 33:S3-6.
32. Sokolowska-Wojdylo, M., J. Wenzel, E. Gaffal, J. Steitz, J. Roszkiewicz, T. Bieber, and T. Tuting. 2005. Absence of CD26 expression on skin-homing CLA⁺ CD4⁺ T lymphocytes in peripheral blood is a highly sensitive marker for early diagnosis and therapeutic monitoring of patients with Sezary syndrome. *Clin Exp Dermatol* 30:702-706.
33. Fierro, M. T., A. Comessatti, P. Quaglino, M. Ortoncelli, S. Osella Abate, R. Ponti, M. Novelli, and M. G. Bernengo. 2006. Expression pattern of chemokine receptors and chemokine release in inflammatory erythroderma and Sezary syndrome. *Dermatology* 213:284-292.
34. Kanno, H., S. Kojya, T. Li, M. Ohsawa, S. Nakatsuka, M. Miyaguchi, Y. Harabuchi, and K. Aozasa. 2000. Low frequency of HLA-A*0201 allele in patients with Epstein-Barr virus-positive nasal lymphomas with polymorphic reticulosis morphology. *Int J Cancer* 87:195-199.
35. Chan, J. K. 1998. Natural killer cell neoplasms. *Anat Pathol* 3:77-145.
36. Kumar, S., L. Krenacs, J. Medeiros, K. S. Elenitoba-Johnson, T. C. Greiner, L. Sorbara, D. W. Kingma, M. Raffeld, and E. S. Jaffe. 1998. Subcutaneous

panniculitic T-cell lymphoma is a tumor of cytotoxic T lymphocytes. *Hum Pathol* 29:397-403.

37. Willemze, R., P. M. Jansen, L. Cerroni, E. Berti, M. Santucci, C. Assaf, M. R. Canninga-van Dijk, A. Carlotti, M. L. Geerts, S. Hahtola, M. Hummel, L. Jeskanen, W. Kempf, C. Massone, P. L. Ortiz-Romero, M. Paulli, T. Petrella, A. Ranki, J. L. Peralto, A. Robson, N. J. Senff, M. H. Vermeer, J. Wechsler, S. Whittaker, and C. J. Meijer. 2008. Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma: definition, classification, and prognostic factors: an EORTC Cutaneous Lymphoma Group Study of 83 cases. *Blood* 111:838-845.
38. Rosen, S. T., and C. Querfeld. 2006. Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Hematology* 2006:323-330.
39. Bekkenk, M. W., F. A. Geelen, P. C. van Voorst Vader, F. Heule, M. L. Geerts, W. A. van Vloten, C. J. Meijer, and R. Willemze. 2000. Primary and secondary cutaneous CD30(+) lymphoproliferative disorders: a report from the Dutch Cutaneous Lymphoma Group on the long-term follow-up data of 219 patients and guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 95:3653-3661.
40. Kummer, J. A., M. H. Vermeer, D. Dukers, C. J. Meijer, and R. Willemze. 1997. Most primary cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorders have a CD4-positive cytotoxic T-cell phenotype. *J Invest Dermatol* 109:636-640.
41. Massone, C., A. Chott, D. Metze, K. Kerl, L. Citarella, E. Vale, H. Kerl, and L. Cerroni. 2004. Subcutaneous, blastic natural killer (NK), NK/T-cell, and other cytotoxic lymphomas of the skin: a morphologic, immunophenotypic, and molecular study of 50 patients. *Am J Surg Pathol* 28:719-735.
42. Bekkenk, M. W., M. H. Vermeer, P. M. Jansen, A. M. van Marion, M. R. Canninga-van Dijk, P. M. Kluin, M. L. Geerts, C. J. Meijer, and R. Willemze. 2003. Peripheral T-cell lymphomas unspecified presenting in the skin: analysis of prognostic factors in a group of 82 patients. *Blood* 102:2213-2219.
43. Chott, A., W. Haedicke, I. Mosberger, M. Fodinger, K. Winkler, C. Mannhalter, and H. K. Muller-Hermelink. 1998. Most CD56+ intestinal lymphomas are CD8+CD5-T-cell lymphomas of monomorphic small to medium size histology. *Am J Pathol* 153:1483-1490.
44. Deleeuw, R. J., A. Zettl, E. Klinker, E. Haralambieva, M. Trottier, R. Chari, Y. Ge, R. D. Gascoyne, A. Chott, H. K. Muller-Hermelink, and W. L. Lam. 2007. Whole-

genome analysis and HLA genotyping of enteropathy-type T-cell lymphoma reveals 2 distinct lymphoma subtypes. *Gastroenterology* 132:1902-1911.

45. Belhadj, K., F. Reyes, J. P. Farcet, H. Tilly, C. Bastard, R. Angonin, E. Deconinck, F. Charlotte, V. Leblond, E. Labouyrie, P. Lederlin, J. F. Emile, B. Delmas-Marsalet, B. Arnulf, E. S. Zafrani, and P. Gaulard. 2003. Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma is a rare clinicopathologic entity with poor outcome: report on a series of 21 patients. *Blood* 102:4261-4269.
46. Farcet, J. P., P. Gaulard, J. P. Marolleau, J. P. Le Couedic, T. Henni, M. F. Gourdin, M. Divine, C. Haioun, S. Zafrani, M. Goossens, and et al. 1990. Hepatosplenic T-cell lymphoma: sinusal/sinusoidal localization of malignant cells expressing the T-cell receptor gamma delta. *Blood* 75:2213-2219.
47. Rizvi, M. A., A. M. Evens, M. S. Tallman, B. P. Nelson, and S. T. Rosen. 2006. T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107:1255-1264.
48. Went, P., C. Agostinelli, A. Gallamini, P. P. Piccaluga, S. Ascani, E. Sabattini, F. Bacci, B. Falini, T. Motta, M. Paulli, T. Artusi, M. Piccioli, P. L. Zinzani, and S. A. Pileri. 2006. Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score. *J Clin Oncol* 24:2472-2479.
49. Dogan, A., A. D. Attygalle, and C. Kyriakou. 2003. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 121:681-691.
50. Attygalle, A., R. Al-Jehani, T. C. Diss, P. Munson, H. Liu, M. Q. Du, P. G. Isaacson, and A. Dogan. 2002. Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood* 99:627-633.
51. Dupuis, J., K. Boye, N. Martin, C. Copie-Bergman, A. Plonquet, B. Fabiani, A. C. Baglin, C. Haioun, M. H. Delfau-Larue, and P. Gaulard. 2006. Expression of CXCL13 by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL): a new diagnostic marker providing evidence that AITL derives from follicular helper T cells. *Am J Surg Pathol* 30:490-494.
52. de Leval, L., D. S. Rickman, C. Thielen, A. Reynies, Y. L. Huang, G. Delsol, L. Lamant, K. Leroy, J. Briere, T. Molina, F. Berger, C. Gisselbrecht, L. Xerri, and P. Gaulard. 2007. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood* 109:4952-4963.

53. Stein, H., H. D. Foss, H. Durkop, T. Marafioti, G. Delsol, K. Pulford, S. Pileri, and B. Falini. 2000. CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood* 96:3681-3695.
54. Brugieres, L., M. C. Deley, H. Pacquement, Z. Meguerian-Bedoyan, M. J. Terrier-Lacombe, A. Robert, C. Pondarre, G. Leverger, C. Devalck, C. Rodary, G. Delsol, and O. Hartmann. 1998. CD30(+) anaplastic large-cell lymphoma in children: analysis of 82 patients enrolled in two consecutive studies of the French Society of Pediatric Oncology. *Blood* 92:3591-3598.
55. Bonzheim, I., E. Geissinger, S. Roth, A. Zettl, A. Marx, A. Rosenwald, H. K. Muller-Hermelink, and T. Rudiger. 2004. Anaplastic large cell lymphomas lack the expression of T-cell receptor molecules or molecules of proximal T-cell receptor signaling. *Blood* 104:3358-3360.
56. Falini, B., S. Pileri, P. L. Zinzani, A. Carbone, V. Zagonel, C. Wolf-Peeters, G. Verhoef, F. Menestrina, G. Todeschini, M. Paulli, M. Lazzarino, R. Giardini, A. Aiello, H. D. Foss, I. Araujo, M. Fizzotti, P. G. Pelicci, L. Flenghi, M. F. Martelli, and A. Santucci. 1999. ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood* 93:2697-2706.
57. Lima, M., J. Almeida, M. dos Anjos Teixeira, M. d. C. Alguero, A. H. Santos, A. Balanzategui, M. L. Queiros, P. Barcena, A. Izarra, S. Fonseca, C. Bueno, B. Justica, M. Gonzalez, J. F. San Miguel, and A. Orfao. 2003. TCR{alpha}{beta}+/CD4+ Large Granular Lymphocytosis: A New Clonal T-Cell Lymphoproliferative Disorder. *Am J Pathol* 163:763-771.
58. Chan, W. C., S. Link, A. Mawle, I. Check, R. K. Brynes, and E. F. Winton. 1986. Heterogeneity of large granular lymphocyte proliferations: delineation of two major subtypes. *Blood* 68:1142-1153.
59. Lundell, R., L. Hartung, S. Hill, S. L. Perkins, and D. W. Bahler. 2005. T-cell large granular lymphocyte leukemias have multiple phenotypic abnormalities involving pan-T-cell antigens and receptors for MHC molecules. *Am J Clin Pathol* 124:937-946.
60. Lamy, T., and T. P. Loughran, Jr. 1999. Current concepts: large granular lymphocyte leukemia. *Blood Rev* 13:230-240.
61. Dearden, C. E. 2006. T-cell prolymphocytic leukemia. *Med Oncol* 23:17-22.
62. Quintanilla-Martinez, L., S. Kumar, F. Fend, E. Reyes, J. Teruya-Feldstein, D. W. Kingma, L. Sorbara, M. Raffeld, S. E. Straus, and E. S. Jaffe. 2000. Fulminant

- EBV(+) T-cell lymphoproliferative disorder following acute/chronic EBV infection: a distinct clinicopathologic syndrome. *Blood* 96:443-451.
63. Suzuki, K., K. Ohshima, K. Karube, J. Suzumiya, S. Ohga, S. Ishihara, K. Tamura, and M. Kikuchi. 2004. Clinicopathological states of Epstein-Barr virus-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorders (severe chronic active EBV infection) of children and young adults. *Int J Oncol* 24:1165-1174.
 64. Vrieling, H., and H. W. Reesink. 2004. HTLV-I/II prevalence in different geographic locations. *Transfus Med Rev* 18:46-57.
 65. Bunn, P. A., Jr., G. P. Schechter, E. Jaffe, D. Blayney, R. C. Young, M. J. Matthews, W. Blattner, S. Broder, M. Robert-Guroff, and R. C. Gallo. 1983. Clinical course of retrovirus-associated adult T-cell lymphoma in the United States. *N Engl J Med* 309:257-264.
 66. Karube, K., K. Ohshima, T. Tsuchiya, T. Yamaguchi, R. Kawano, J. Suzumiya, A. Utsunomiya, M. Harada, and M. Kikuchi. 2004. Expression of FoxP3, a key molecule in CD4CD25 regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells. *Br J Haematol* 126:81-84.
 67. Ishida, T., A. Utsunomiya, S. Iida, H. Inagaki, Y. Takatsuka, S. Kusumoto, G. Takeuchi, S. Shimizu, M. Ito, H. Komatsu, A. Wakita, T. Eimoto, K. Matsushima, and R. Ueda. 2003. Clinical Significance of CCR4 Expression in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma: Its Close Association with Skin Involvement and Unfavorable Outcome. *Clin Cancer Res* 9:3625-3634.
 68. Vermi, W., S. Lonardi, D. Bosisio, M. Uguccioni, G. Danelon, S. Pileri, C. Fletcher, S. Sozzani, F. Zorzi, G. Arrighi, C. Doglioni, M. Ponzoni, and F. Facchetti. 2008. Identification of CXCL13 as a new marker for follicular dendritic cell sarcoma. *J Pathol* 216:356-364.
 69. Turner, J. E., O. M. Steinmetz, R. A. Stahl, and U. Panzer. 2007. Targeting of Th1-associated chemokine receptors CXCR3 and CCR5 as therapeutic strategy for inflammatory diseases. *Mini Rev Med Chem* 7:1089-1096.
 70. Waubant, E. 2007. Emerging therapies for MS. *Rev Neurol (Paris)* 163:688-696.

Capítulo 2

Parte dos resultados que constam deste capítulo foram submetidos para publicação ao Journal of immunology (**pdf em anexo no CD-ROM que acompanha esta tese**) e apresentados sobre a forma de comunicação oral e poster nos seguintes congressos nacionais e internacionais:

Comunicações orais

Moura J, Gonçalves M, Fonseca S, Santos AH, Queirós ML, Ribeiro F, Acosta MJ, Teixeira MA, Rodrigues AS, Júnior EC, Lima M: HUMAN BLOOD T AND NK CELL IN-VITRO STIMULATION REVEALS A SIMILAR ACTIVATION FENOTYPE THAT RESEMBLES EARLY ACTIVATION STAGES DURING ACUTE VIRUS INFECTION. 5th Euroconference on Clinical Cell Analysis; Atenas, Grécia, 2005.

Moura J, Gonçalves M, Fonseca S, Santos AH, Queirós ML, Ribeiro F, Acosta MJ, Teixeira MA, Rodrigues AS, Júnior EC, Lima M: HUMAN CD27+ CD28+ T CELLS UNFOLD INTO TWO DIFFERENT POPULATIONS REPRESENTING DIFFERENT ACTIVATION STAGES. 5th Euroconference on Clinical Cell Analysis; Atenas, Grécia, 2005.

Moura J, Gonçalves M, Fonseca S, Santos AH, Queirós ML, Santos M, Ribeiro F, Acosta MJ, Teixeira MA, Rodrigues AS, Júnior EC, Lima M: A NEW HUMAN T CELL POPULATION WITH RECENT ACTIVATION PHENOTYPE. XXXII Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Imunologia, Braga, Portugal, 2006.

Moura J: ESTUDO COMPARATIVO DOS MECANISMOS QUE REGULAM A MIGRAÇÃO E O TROPISMO TECIDULAR DOS LINFÓCITOS T NORMAIS E NEOPLÁSICOS - UTILIDADE PARA O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS. I Jornadas de Análises Clínicas e Saúde Pública de Bragança, Bragança, Portugal, 2007.

Moura J, Rodrigues J, Gonçalves M, Santos AH, Lau C, Queirós ML, Teixeira MA, Santos M, Fonseca S, Ferreira P, Lima H: HUMAN T-CELL MEMORY: TO TRULY REMEMBER OR JUST GUESS! XXXIV Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Imunologia, Porto, Portugal, 2008.

Comunicações em poster

Moura J, Gonçalves M, Fonseca S, Santos AH, Queirós ML, Teixeira MA, Lima M: HUMAN T CELL IN VITRO STIMULATION REVEALS EARLY ACTIVATION STAGES PRIOR IDENTIFIED IN VIVO DURING ACUTE VIRUS INFECTION. XXX Reunião anual da Sociedade Portuguesa de Imunologia; Lisboa, 2004.

Moura J, Gonçalves M, Fonseca S, Santos AH, Ribeiro F, Acosta MJ, Teixeira MA, Rodrigues AS, Júnior EC, Lima M: HUMAN CD27+ CD28+ CD8+ T CELLS UNFOLD INTO TWO DIFFERENT POPULATIONS REPRESENTING DIFFERENT ACTIVATION STAGES. IX Congresso da Sociedade Ibérica de Citometria; Porto, 2005.

Moura J, Gonçalves M, Fonseca S, Queirós ML, Ribeiro F, Acosta MJ, Teixeira MA, Rodrigues AS, Júnior EC, Lima M: HUMAN CD8+ T CELL CHEMOKINE RECEPTOR

REPERTOIRE DEPENDS ON THE IN VIVO ACTIVATION STATE. IX Congresso da Sociedade Ibérica de Citometria; Porto, 2005.

Moura J, Gonçalves M, Fonseca S, Santos AH, Queirós ML, Teixeira MA, Lima M: HUMAN BLOOD T AND NK CELL IN VITRO STIMULATION REVEALS A SIMILAR ACTIVATION PHENOTYPE THAT RESEMBLES EARLY ACTIVATION STAGES DURING ACUTE VIRUS INFECTION. XXXII Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Imunologia, Braga, Portugal, 2006.

Moura J, Gonçalves M, Santos AH, Santos M, Queirós ML, Fonseca S, Teixeira MA, Rodrigues J, Acosta MJ, Júnior EC, Ribeiro F, Rodrigues AS, Ferreira P, Lima M: NEW T-CELL POPULATION WITH RECENTLY ACTIVATED PHENOTYPE. ImmunoRIO 2007, Rio de Janeiro, Brasil, 2007.

2. Estudo do processo de migração de linfócitos T normais

2.1 Introdução

2.2 Material e métodos

2.2.1 Amostras

2.2.2 Fenotipagem de LT

2.2.3 Quantificação da produção de citocinas pelos LT

2.2.4 “Sorting” das populações de LT

2.2.5 Determinação da diversidade do gene *TCR-β* nas populações de LT

2.2.6 Culturas celulares

2.2.7 Análise estatística

2.2.8 Implicações éticas

2.3 Resultados

2.3.1 Subpopulações de LT definidas pela expressão de CD27 e CD28

2.3.2 Caracterização fenotípica das subpopulações de LT CD27⁺⁺CD28⁺ e CD27⁺CD28⁺⁺

2.3.3 Potencial de produção de citocinas e reportório de RQ das populações de LT mais representativas

2.3.4 Determinação da diversidade do gene *TCR-β* nas populações de LT

2.3.5 Estimulação *In vitro* aumenta a percentagem de LT CD27⁺CD28⁺⁺

2.3.6 Os LT CD27⁺⁺CD28⁺ respondem menos a um estímulo inespecífico do que os LT CD27⁺CD28⁺⁺, mas transformam-se nestes após estimulação

2.4 Discussão

2.4.1 CD27⁺CD28⁺⁺ - Uma população de LT activados circulantes

2.4.2 O que distingue a memória da activação?

2.4.3 Poderemos considerar a população CD27⁺CD28⁺⁺ de memória, pela sua expressão elevada de CD45RO?

2.4.4 A estimulação *in vitro* reflecte o processo de activação *in vivo*.

2.4.5 Qual poderá ser a função da população CD27⁺CD28⁺⁺?

2.5 Bibliografia

2. Estudo do processo de migração de linfócitos T normais

2.1 Introdução

A activação dos LT é um processo coordenado que prepara estas células para a sua função imunológica.

Tal como foi demonstrado *in vivo* (1), em seres humanos, os LT seguem um mecanismo de activação comum, que parece ser independente da natureza do estímulo, e que pode ser monitorizado pela expressão dos receptores de co-estimulação CD28 e CD27 (2).

A co-estimulação através do CD28 é necessária para a amplificação do processo de activação dos LT via TCR, aumentando o potencial de fosforilação que precede a cascata do inositol-3-fosfato. O CD28 interage com o CD80 (B7-1) e o CD86 (B7-2) das APC, possuindo o duplo papel de molécula co-estimuladora e de adesão. O CD27 também está envolvido na amplificação do sinal vindo do TCR, quando activado pelo seu ligando, o CD70, também expresso nas células apresentadoras de antígeno (3,4).

É geralmente aceite que a expressão de ambos os receptores à superfície do LT, diminui após estimulação, e que este fenómeno está relacionado com o desenvolvimento da resposta imune (2). Esta ideia baseia-se sobretudo em estudos *in vivo*, onde foi observada a perda de expressão de CD27 e CD28 em doentes com infecções agudas, concomitantemente com um aumento da percentagem de células CD27⁺CD28⁺ em doentes com infecções crónicas, doenças neoplásicas ou simplesmente com a idade (1,5).

Foram já propostos vários modelos para o processo de activação do LT, baseando-se na expressão de várias moléculas, produção de citocinas e capacidade funcional (6-11). Uma das primeiras propostas distinguia vários estádios de activação dos LT pela expressão diferencial das isoformas do CD45, sendo capaz de distinguir entre LT naïve (CD45RA⁺) e activados (CD45RO⁺) (12). Contudo, estudos subsequentes revelaram que os LT de memória também expressam CD45RO (13).

Foi ainda descrita a expressão preferencial do RQ CCR7 em LT naïve (definidos pela co-expressão de CD62L e CD45RA), dividindo ainda as células de memória (definidas pela expressão de CD45RO) em dois grupos: LT de memória central (CCR7⁺) e LT de memória efectora (CCR7⁻) (7,9-11). Os LT de memória central são capazes de produzir IL-2 e migrar para os gânglios, enquanto os LT de memória efectora produzem principalmente IFN- γ após estimulação.

A análise da expressão de CD45RA e CD27 permitiu a distinção de dois grandes grupos de LT CD8⁺ activados com funções diferentes: os LT CD27⁺CD45RA⁺ com a capacidade de produzir IL-2 e IL-4, e os LT CD27⁻CD45RA⁻, incapazes de produzir IL-2 ou IL-4 mas com capacidade efectora (8).

Recentemente os LT CD4⁺ foram divididos em 6 subpopulações fenotípica e funcionalmente diferentes, pela expressão de CD28, CD45RA e CCR7 (6). Segundo este modelo de diferenciação, o CCR7 distingue os LT produtores de citocinas (CCR7⁻) dos não produtores (CCR7⁺) e o CD28 distingue entre LT citotóxicos (CD28⁻) e não citotóxicos (CD28⁺).

Cada uma das populações identificadas pelo CCR7 e CD28 foi ainda dividida de acordo com a expressão de CD45RA, sem contudo se demonstrar uma relação com qualquer função ou característica celular.

Apesar da utilização de RQ na identificação de subpopulações de LT (14-16), a relação entre o reportório de RQ e o processo de activação do LT ainda não é clara, sabendo-se contudo que durante a activação os LT alteram a expressão de certos RQ (17-19), nomeadamente CXCR1, CXCR2, CCR5 e CXCR3, cuja expressão aumenta pela acção da IL-2, e diminui por estimulação via anti-CD3 e/ou anti-CD28 (20).

Neste estudo descrevemos uma nova população de LT (CD27⁺CD28⁺⁺) com um fenótipo, um reportório de RQ e um potencial de secreção de interleucinas característico, sugerindo ser um estadio intermédio de activação. Esta população, inexistente no sangue do cordão umbilical (SCU), representa uma grande percentagem dos LT do SP de indivíduos adultos saudáveis e aumenta preferencialmente após estimulação *in vitro*. No seu todo, estes resultados sugerem que os LT CD27⁺CD28⁺⁺ representam uma população distinta de LT activados.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Amostras

Foram colhidas amostras de SCU de 6 recém-nascidos saudáveis e SP de 28 indivíduos adultos saudáveis (12 indivíduos com idades compreendidas entre os 25 e os 50 anos e 16 indivíduos adultos com idade superior a 60 anos), em tubos com EDTA-K3 para análise do imunofenótipo. As amostras de SCU foram também utilizadas para cultura celular. Adicionalmente, foram colhidas amostras de SP de 9 indivíduos adultos saudáveis, 6 em tubos com heparina para cultura celular e para testes de produção de citocinas, e 3 em tubos com EDTA-K3 para “sorting” das populações de LT.

2.2.2 Fenotipagem de LT

A análise fenotípica dos LT do SP foi realizada, em todos os casos, por marcação directa de sangue total, a quatro cores, utilizando diferentes combinações dos seguintes anticorpos monoclonais (mAb) (**Tab. 1**).

Tabela 1 - Especificidade, clone e origem dos anticorpos monoclonais utilizados.

Especif.	Clone	Fluorocromo ^a	Origem ^b	Especif.	Clone	Fluorocromo ^a	Origem ^b
CD2	SFC13Pt2H9	FITC	BC	CXCR1	5A12	PE	PH
CD7	3A1E-12H7	PE	BC	CXCR2	6C6	PE	PH
CD3	SK7	APC	BD	CXCR3	1C6	PE	PH
CD4	SK3	APC	BD	CXCR4	12G5	PE	PH
CD8	SK1	APC	BD	VB1.1	BL37.2	FITC	IOT
CD4	SK3	PerCP	BD	VB3.1	8F10	FITC	END
CD8	SK1	PerCP	BD	VB5.1	1552	FITC	IOT
CD27	9F4	FITC	CLB	VB5.2	36213	FITC	IOT
CD27	1A4	PC5	IOT	VB6.7	TCR2657	FITC	END
CD28	L293	PE	BD	VB7.1	IM2408	FITC	IOT
CD28	CD28.2	PC5	IOT	VB8.1	56C5.2	FITC	IOT
CD45RA	L48	FITC	BD	VB11.1	C21	FITC	IOT
CD45RO	UCHL-1	PE	BD	VB12.1	VER2.32.1	FITC	IOT
HLA-DR	L243	FITC	BD	VB13.1	IMMU222	FITC	IOT
CCR4	1G1	PE	PH	VB13.6	JU74.3	FITC	IOT
CCR5	3A9	PE	PH	VB16.1	TAMAYA1.2	FITC	IOT
CCR6	11A9	PE	PH	VB20.1	ELL1.4	FITC	IOT
CCR7	3D12	PE	PH	VB21.3	IG125	FITC	IOT

^a APC - Alofococianina; FITC - Isotiocianato de Fluoresceína; PC5 - Ficoeritrina-Cy5-tandem; PE – Ficoeritrina; PerCP - Complexo Peridina-Clorofila.

^b BC - Beckman Coulter, Miami, FL, USA; BD - Becton-Dickinson, San José, CA, USA; CLB - Sanquin, Amsterdam, The Netherlands; END - Endogene, Woburn, MA, USA; IOT - Immunotech, Marseille, France; PH - Pharmingen, San Diego, CA, USA.

As células foram preparadas para citometria de fluxo conforme previamente descrito (21). Resumidamente, as células do SP foram incubadas com os mAb, durante 15min à temperatura ambiente, seguindo-se a lise dos eritrócitos e a fixação dos leucócitos, com a solução FACSlising[®] (Becton-Dickinson, San José, California, USA).

Todas as experiências foram realizadas com o citómetro FACSCalibur, utilizando o software CellQuest versão 3.1 para aquisição de eventos e o software Paint-a-gate Pro para análise dos dados (Becton-Dickinson, San José, Califórnia, USA).

Foram caracterizadas subpopulações de LT CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ seleccionadas pelo padrão de expressão de CD27 e CD28, respectivamente: CD27⁺CD28⁺, CD27⁺CD28⁻, CD27⁻CD28⁺, CD27⁻CD28⁻.

A população CD27⁺CD28⁺ foi ainda subdividida em duas subpopulações (CD27⁺⁺CD28⁺ e CD27⁺CD28⁺⁺). As diferentes populações foram seleccionadas utilizando os anticorpos anti-CD4 ou anti-CD8 conjugados com alofococianina (APC) em conjunto com anti-CD27 conjugado com fluoresceína (FITC) e anti-CD28 conjugado com ficoeritrina (PE), ou noutros casos utilizando anti-CD27 conjugado com o tandem ficoeritrina-Cy5 (PC5) e anti-CD28 FITC.

2.2.3 Quantificação da produção de citocinas pelos LT

Procedeu-se à cultura de células (1x10⁶/ml) em tubos de 15ml, durante 5 horas, em ambiente estéril, a 37°C, em ambiente húmido com 5% CO₂. As células foram cultivadas em meio completo (RPMI-1640 + 10% FCS + 1M tampão HEPES + 200mM L-Glutamina) na presença de Brefeldina A (10µg/ml), com (culturas estimuladas) ou sem (culturas não estimuladas) PMA (25ng/ml) e Ionomicina (1µg/ml).

A marcação intracelular foi realizada conforme previamente descrito (22). Resumidamente, as células foram colhidas e marcadas com anticorpos para os antígenos de superfície, conforme protocolo anterior, e depois fixadas e permeabilizadas utilizando os reagentes FIX & PERM (Caltag Laboratories, San Francisco, CA, USA). As células foram então marcadas com os anticorpos anti-IL-2 PE, anti-IL-10 PE, anti-IFN-γ PE e anti-TNF-α PE, e analisadas por citometria de fluxo.

2.2.4 “Sorting” das populações de LT

As células mononucleares foram separadas do SP através de centrifugação em gradiente de densidade (Lymphoprep, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega), e, de seguida, marcadas utilizando a técnica de marcação directa previamente descrita.

Todas as experiências foram realizadas usando um “sorter” FACSAria utilizando o software FACSDiva da Becton-Dickinson BioSciences, San José, CA, USA.

As diferentes populações de LT foram seleccionadas utilizando os anticorpos anti-CD3 APC, anti-CD28 PC5, anti-CD45RO PE e anti-CD27 FITC. Foram isolados LT CD27⁺⁺CD28⁺CD45RO⁻, CD27⁺CD28⁺⁺CD45RO⁺ e CD27⁻CD28⁻, com mais de 99,5% de pureza.

2.2.5 Determinação da diversidade do gene *TCR-β* nas populações de LT

Foi extraído DNA das populações de LT, separadas a partir do SP de indivíduos normais, utilizando o kit GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep da Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado utilizando o espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop Technologies).

Para a amplificação por PCR foram utilizados 100ng de DNA de cada amostra, tal como descrito no protocolo Biomed II (23), utilizando o TCR-β Gene Clonality Assay (InVivoScribe Technologies, San Diego, CA, USA). Resumidamente, foram realizados dois PCRs multiplex, cada um amplificando zonas diferentes do locus *TCR*. O primeiro PCR foi desenhado para a detecção de rearranjos entre as regiões $V\beta$ e $J\beta$, incluindo “primers forward” para as seguintes famílias $V\beta$ β 2, $V\beta$ 4, $V\beta$ 5, $V\beta$ 6, $V\beta$ 7, $V\beta$ 8, $V\beta$ 9, $V\beta$ 10, $V\beta$ 11, $V\beta$ 12, $V\beta$ 13, $V\beta$ 13, $V\beta$ 16, $V\beta$ 17, $V\beta$ 18, $V\beta$ 19, $V\beta$ 20, $V\beta$ 21, $V\beta$ 22, $V\beta$ 23 e $V\beta$ 24, e “primers reverse” para $J\beta$ 1.1, $J\beta$ 1.2, $J\beta$ 1.3, $J\beta$ 1.4, $J\beta$ 1.5, $J\beta$ 1.6, $J\beta$ 2.2, $J\beta$ 2.6 e $J\beta$ 2.7, cobrindo aproximadamente 90% de todos os segmentos $V\beta$.

O segundo PCR foi desenhado para a detecção de rearranjos entre as regiões $D\beta$ e $J\beta$, utilizando “primers forward” para $D\beta$ 1 e $D\beta$ 2 e “primers reverse” para $J\beta$ 2.1, $J\beta$ 2.3, $J\beta$ 2.4 e $J\beta$ 2.5.

Para a amplificação utilizou-se o termociclador PE 9600 da Perkin Elmer e o tamanho dos produtos de PCR foi detectado com o sistema de electroforese capilar ABI 310 da Applied Biosystems, utilizando capilares de 47cm x 50μm com sensibilidade de uma base.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software Peak Scanner da Applied Biosystems.

2.2.6 Culturas celulares

As células mononucleares foram separadas do SP através de centrifugação em gradiente de densidade (Lymphoprep, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega) e lavadas duas vezes com PBS + BSA a 0,2% e uma vez em meio completo (RPMI-1640 + 10% FCS + 1M tampão HEPES + 200mM L-Glutamina) suplementado com 100U/ml de solução de Penicilina e Estreptomicina.

Para a caracterização das populações de LT, cultivaram-se as células mononucleares durante 5 semanas em placas de cultura de 2ml em ambiente estéril (37°C) e húmido, a 5% CO₂, com (culturas estimuladas) ou sem (culturas não estimuladas) Con A (µg/ml) e IL-2 (20U/ml). O meio completo e a IL-2 foram renovados a cada 7 dias. As células foram colhidas duas vezes por semana e lavadas duas vezes com PBS + BSA a 0,2%, antes de se proceder à análise.

Para o estudo das populações de LT do SCU, cultivaram-se as células mononucleares durante 5 dias em placas de cultura, com poços de 1ml, em ambiente estéril (37°C) e húmido, a 5% CO₂, em meio de cultura completo, na presença de Con A (5µg/ml) e IL-2 (20U/ml). As células foram colhidas ao dia 2 e 5, e lavadas duas vezes com PBS + BSA a 0,2%, antes de se proceder à análise.

2.2.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste Mann-Whitney U e o software SPSS 12. As diferenças só foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

2.2.8 Implicações éticas

Todas as amostras foram colhidas mediante consentimento informado e o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde do Hospital de Santo António.

2.3 Resultados

2.3.1 Subpopulações de LT definidas pela expressão de CD27 e CD28

Em indivíduos adultos saudáveis, foram identificadas quatro populações de LT maioritárias, tendo como base a expressão de CD27 e CD28 (CD27⁺CD28⁺, CD27⁺CD28⁻, CD27⁻CD28⁺ e CD27⁻CD28⁻).

A representação destas populações no SP de indivíduos normais difere com a idade (Fig. 1).

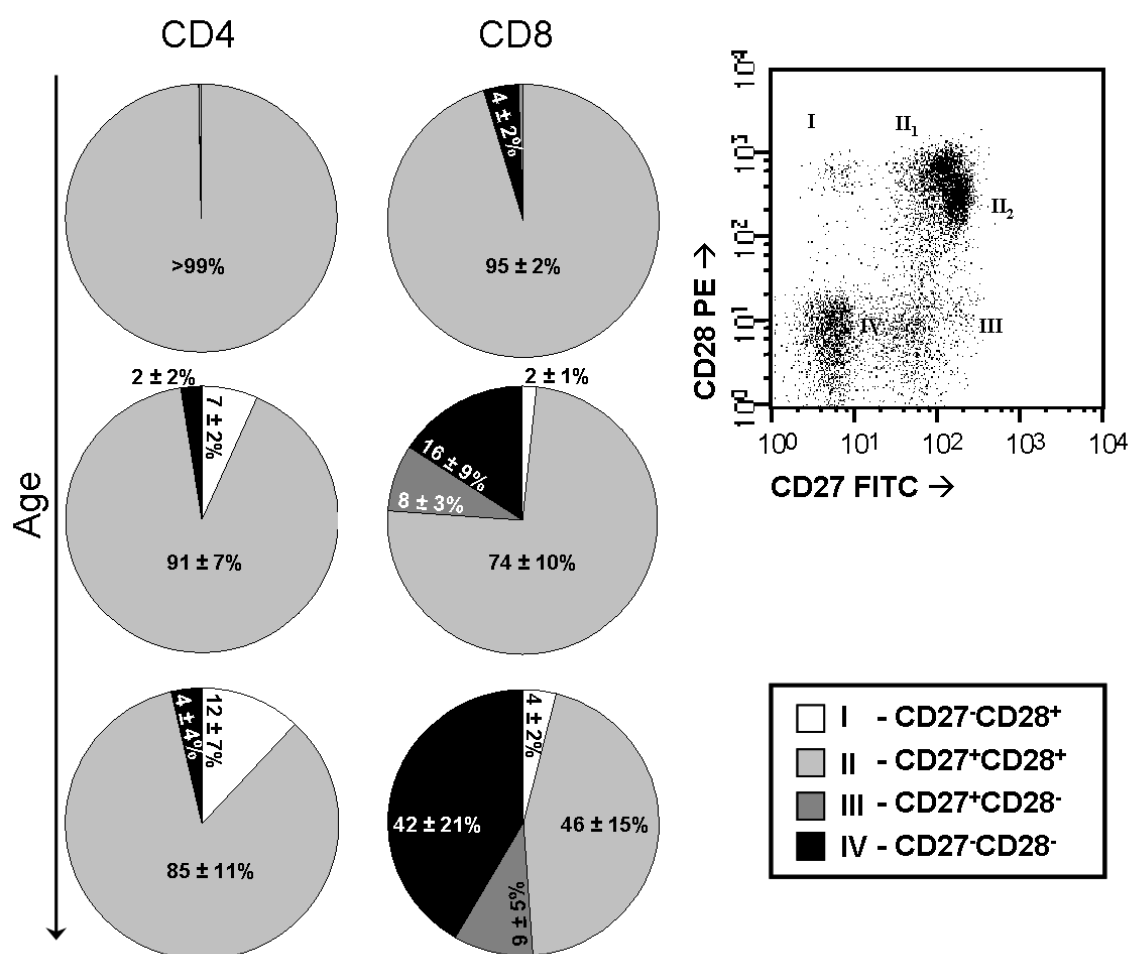


Figura 1 – Populações de LT, definidas pela expressão de CD27 e CD28, presentes no SCU de 6 recém-nascidos saudáveis, no SP de 12 indivíduos adultos saudáveis (entre 25 e 50 anos) e no SP de 16 indivíduos idosos saudáveis (>60 anos). São facilmente identificáveis 4 populações (CD27⁺CD28⁺, CD27⁻CD28⁺, CD27⁺CD28⁻ e CD27⁻CD28⁻), podendo a população CD27⁺CD28⁺ ser subdividida em duas subpopulações (CD27⁺⁺CD28⁺ e CD27⁺CD28⁺⁺), com base na intensidade de expressão de CD27 e CD28.

Quase todos os LT do SCU eram CD27⁺CD28⁺, enquanto, em indivíduos adultos, as populações CD27⁺CD28⁻, CD27⁻CD28⁺ e CD27⁻CD28⁻, representavam uma fracção variável dos LT presentes no SP.

Com base nos níveis de expressão de CD27 e CD28, dividimos a população CD27⁺CD28⁺ em duas subpopulações distintas, a CD27⁺CD28⁺⁺ e a CD27⁺⁺CD28⁺ (**Fig. 1**). Ambas as subpopulações representavam uma fracção considerável dos LT de indivíduos adultos normais, constituindo, no seu conjunto, a maior fracção de LT presentes no SP, enquanto, no SCU, praticamente todos os LT CD27⁺CD28⁺ eram CD27⁺⁺CD28⁺.

Em adultos, observamos que a percentagem de LT CD27⁺⁺CD28⁺ diminuía com a idade, enquanto a percentagem de LT CD27⁺CD28⁺⁺ se mantinha relativamente constante (**Tab. 2**).

Neste estudo caracterizamos a subpopulação de LT CD27⁺CD28⁺⁺, comparando-a com as restantes populações maioritárias de LT (CD27⁺⁺CD28⁺ e CD27⁻CD28⁻), e investigamos o seu possível papel fisiológico.

Tabela 2 – Percentagem das duas subpopulações de LT CD27⁺CD28⁺ (CD27⁺⁺CD28⁺ e CD27⁺CD28⁺⁺), nos LT CD4⁺ e CD8⁺ do SCU de 6 recém-nascidos saudáveis, do SP de 12 indivíduos adultos saudáveis (entre 25 e 50 anos) e do SP de 16 indivíduos idosos saudáveis (>60 anos).

Subpopulações de LT		Recém-nascidos ^a	Adultos ^a	Idosos ^a
CD4 ⁺	CD27 ⁺⁺ CD28 ⁺	>99	55 ± 8	56 ± 11
	CD27 ⁺ CD28 ⁺⁺	0	36 ± 7	29 ± 8
CD8 ⁺	CD27 ⁺⁺ CD28 ⁺	95 ± 2	43 ± 10	15 ± 9
	CD27 ⁺ CD28 ⁺⁺	0	31 ± 10	31 ± 15

^a Os resultados são expressos em média ± desvio padrão.

2.3.2 Caracterização fenotípica das subpopulações de LT CD27⁺⁺CD28⁺ e CD27⁺CD28⁺⁺

Os LT CD27⁺CD28⁺⁺ apresentavam a expressão mais elevada das moléculas CD45RO e HLA-DR ($p < 0,01$ em ambos os casos), e apenas expressão residual de CD45RA (**Tab. 3 e Fig. 2**). Esta subpopulação também apresentava uma menor percentagem de células com expressão de CD62L, quando comparada com a subpopulação CD27⁺⁺CD28⁺ ($71 \pm 14\%$ e $98 \pm 1\%$, respectivamente; $p < 0,01$). Por outro lado, os LT CD27⁺⁺CD28⁺ apresentavam a expressão mais alta de CD62L e CD45RA e uma expressão baixa/ausente de CD45RO e HLA-DR.

Tabela 3 – Intensidade média de fluorescência da expressão de CD45RA, CD45RO, CD62L e HLA-DR nas subpopulações CD27⁺⁺CD28⁺ e CD27⁺CD28⁺⁺ dos LT CD4⁺ e CD8⁺ do SP de 12 indivíduos adultos saudáveis.

		CD45RA ^a	CD45RO ^a	CD62L ^a	HLA-DR ^a
CD27 ⁺⁺ CD28 ⁺	CD4	123 ± 19	148 ± 94	102 ± 37	10 ± 7
	CD8	228 ± 20	40 ± 16	98 ± 25	14 ± 3
CD27 ⁺ CD28 ⁺⁺	CD4	20 ± 1	855 ± 162	72 ± 31 ^b	52 ± 23
	CD8	22 ± 3	348 ± 77	45 ± 13	49 ± 13

^a Os resultados são expressos em média ± desvio padrão. ^b Não é estatisticamente significativo.

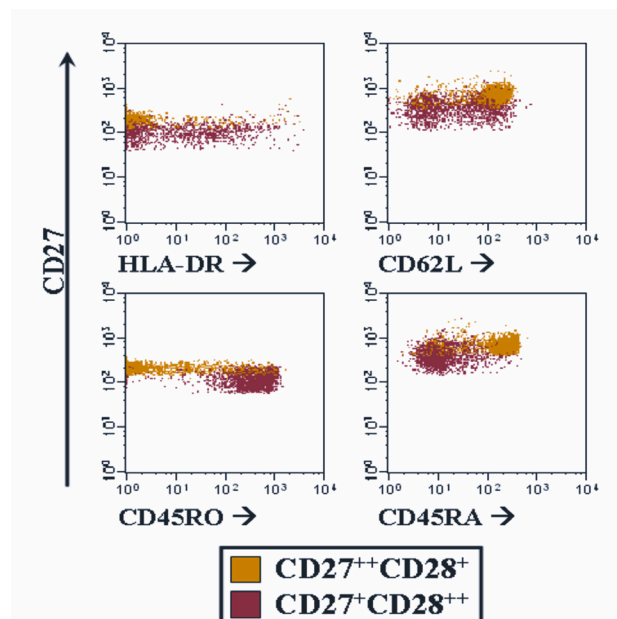


Figura 2 – Padrão típico de expressão de CD45RA, CD45RO, CD62L e HLA-DR nas subpopulações de LT CD27⁺⁺CD28⁺ e CD27⁺CD28⁺⁺ do SP de indivíduos adultos saudáveis. A expressão destas moléculas de activação foi avaliada por citometria de fluxo, em SP, imediatamente após colheita.

2.3.3 Potencial de produção de citocinas e reportório de RQ das populações de LT mais representativas

Observamos que ambas as populações de LT CD27⁺CD28⁺ (CD27⁺⁺CD28⁺ e CD27⁺CD28⁺⁺), quer CD4⁺ (**Fig. 3A**), quer CD8⁺ (**Fig. 3B**), produzem IL-2 após estimulação *in vitro*, não se tendo observado qualquer produção de IL-2 pela população CD27⁻CD28⁻, nas mesmas condições.

A percentagem de células capazes de produzir IL-2 era maior na população CD27⁺CD28⁺⁺ do que na população CD27⁺⁺CD28⁺ ($p < 0,01$ para os LT CD8⁺ e $p < 0,05$ para os LT CD4⁺).

Em contraste, a expressão de IFN- γ e TNF- α foi apenas detectada nas populações CD27⁺CD28⁺⁺ e CD27⁻CD28⁻, com uma expressão significativamente

superior de IFN- γ na população CD27⁺CD28⁻ ($p < 0,005$) (**Fig. 3**). Não foi detectada qualquer produção relevante de IL-4 e IL-10, quer após 5h ou 24h de estimulação com PMA + Ionomicina (informação não disponibilizada).

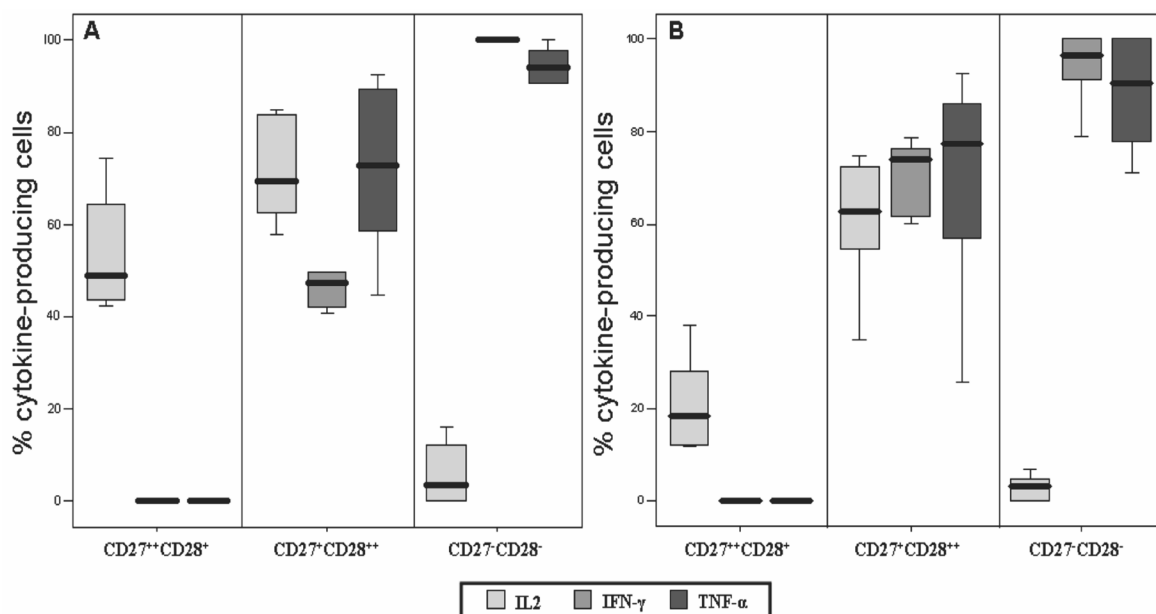


Figura 3 – Percentagem de expressão de IL-2, IFN- γ e TNF- α nas populações CD27⁺⁺CD28⁺, CD27⁺CD28⁺⁺ e CD27⁻CD28⁻ dos LT CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) do SP de 6 indivíduos adultos saudáveis, após estimulação *in vitro* com PMA + Ionomicina durante 5 horas. As células foram colhidas ao dia 10 e 24, e LT recém-colhidos do SP foram utilizados como controlos, representados como dia 0. A expressão de CD25, CD27, CD28, CD38, CD45RA, CD45RO, CD69 e HLA-DR foi avaliada por citometria de fluxo.

No que diz respeito à expressão de RQ nas populações de LT, observamos que a presença dos RQ de migração para órgãos, CCR4 e CCR6, se restringe especificamente à população CD27⁺CD28⁺⁺ ($p < 0,005$) (**Fig. 4**), com uma expressão maior nos LT CD4⁺ (**Fig. 4A**). Esta população apresentava ainda a expressão mais alta de CXCR3 nos LT CD8⁺ ($p < 0,01$) (**Fig. 4B**), tendo uma expressão intermédia nos LT CD4⁺. Ao contrário da população CD27⁻CD28⁻, a expressão dos RQ inflamatórios terminais, CXCR1 e CXCR2, não foi detectada na população CD27⁺CD28⁺⁺, que já apresentava o RQ de inflamação precoce, CCR5 ($p < 0,005$). De facto, a população CD27⁻CD28⁻ era a única capaz de expressar CXCR1 e CXCR2 ($p < 0,001$), quer nos LT CD4⁺ (**Fig. 4A**), quer nos LT CD8⁺ (**Fig. 4B**), sempre com maior expressão nos últimos.

Em contrapartida, a população CD27⁺⁺CD28⁺ não expressava nenhum destes RQ inflamatórios, com a excepção do CXCR3 nos LT CD8⁺, mas apresentava a percentagem mais alta de células CCR7⁺ e CXCR4⁺ ($p < 0,005$), em relação às outras populações de LT.

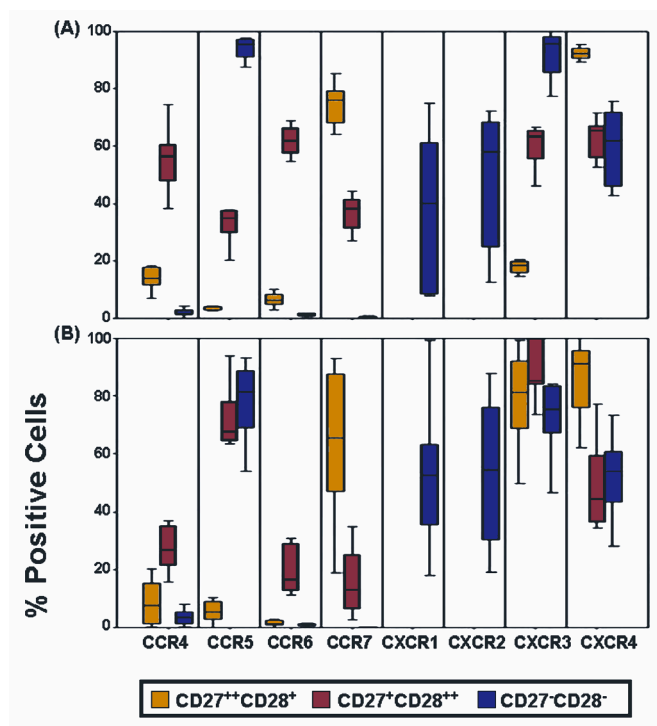


Figura 4 – Percentagem de células CCR4⁺, CCR5⁺, CCR6⁺, CCR7⁺, CXCR1⁺, CXCR2⁺, CXCR3⁺ e CXCR4⁺ nas populações CD27⁺⁺CD28⁺, CD27⁺CD28⁺⁺ e CD27⁻CD28⁻ dos LT CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) do SP de 12 indivíduos adultos saudáveis. A expressão destes RQ foi avaliada por citometria de fluxo, em SP, imediatamente após colheita.

2.3.4 Determinação da diversidade do gene *TCR-β* nas populações de LT

Foi estudada, por PCR, a diversidade de rearranjos do gene que codifica a cadeia beta do TCR (*TCR-β*) e, por citometria de fluxo, a expressão de famílias de regiões variáveis da cadeia beta do TCR (*TCR-Vβ*), nas populações de LT CD27⁺⁺CD28⁺, CD27⁺CD28⁺⁺ e CD27⁻CD28⁻ separadas do SP de indivíduos adultos saudáveis.

Ao nível fenotípico observamos que ambas as populações de LT, CD27⁺⁺CD28⁺ (**Fig. 5A**) e CD27⁺CD28⁺⁺ (**Fig. 5B**) expressavam um repertório diversificado de famílias *TCR-Vβ*. Em contraste, a população CD27⁻CD28⁻ apresentava uma clara tendência para a maior representação de determinadas famílias *Vβ* (diferentes entre indivíduos), com a consequente diminuição da representação de outras (**Fig. 5C**).

Ao nível genotípico, observamos que ambas as populações de LT CD27⁺⁺CD28⁺ (**Fig. 5D**) e CD27⁺CD28⁺⁺ (**Fig. 5E**) apresentavam uma distribuição aleatória de tamanhos dos produtos de PCR, refletindo uma distribuição policlonal dos rearranjos do gene *TCR-β*. Mais uma vez, observamos uma clara diferença em relação à população CD27⁻CD28⁻ (**Fig. 5F**), que apresentava uma clara tendência para a expansão clonal de LT com determinados rearranjos do gene *TCR-β*, quer na região *Vβ-Jβ* quer na região *Dβ-Jβ*.

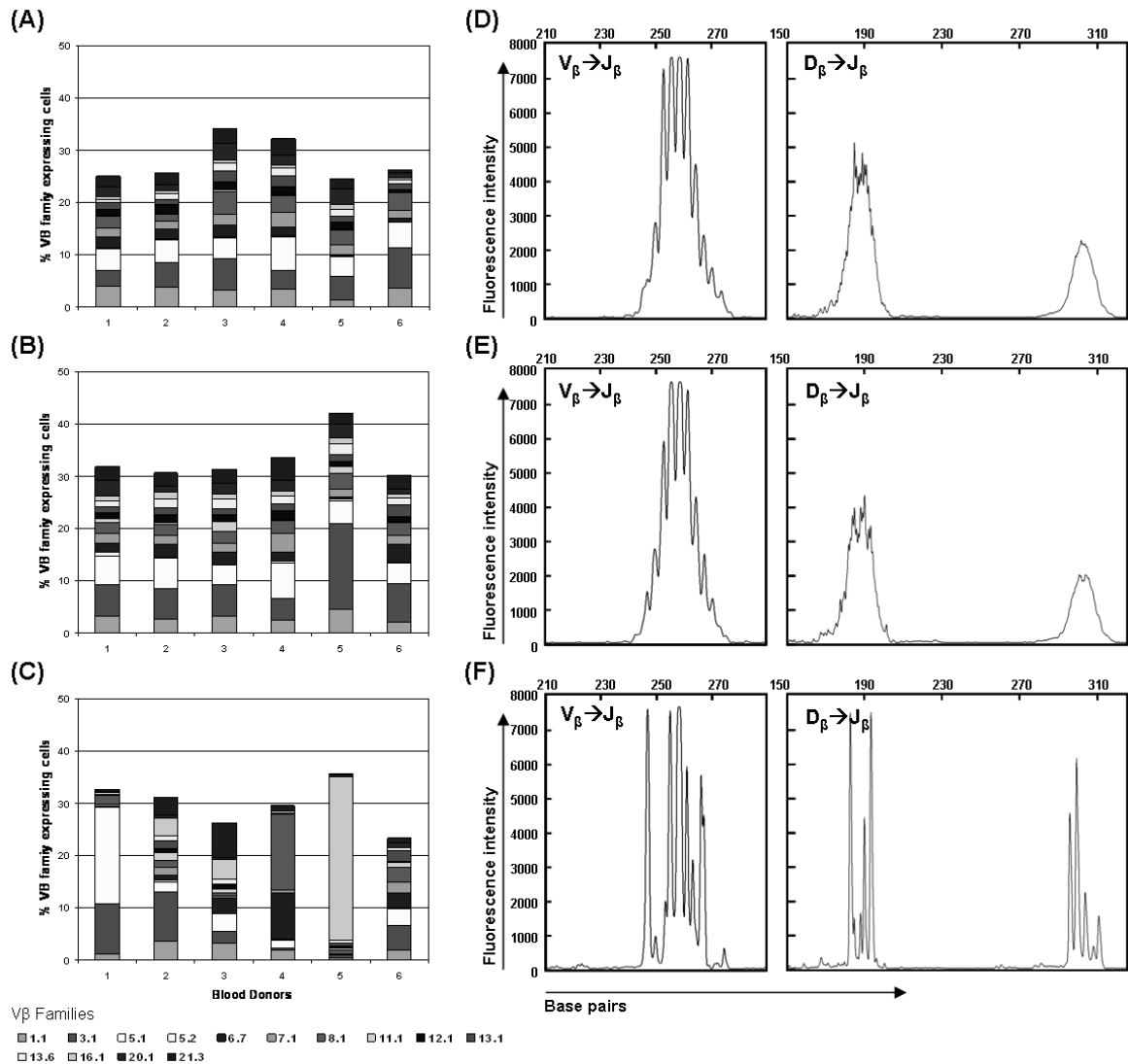


Figura 5 – Reportório de famílias Vβ das populações CD27⁺⁺CD28⁺ (A), CD27⁺CD28⁺⁺ (B), e CD27⁻CD28⁻ (C) de LT do SP de 6 indivíduos adultos saudáveis, avaliado por citometria de fluxo. Análise das regiões V_β-J_β e D_β-J_β, do locus *TCR-β*, das populações CD27⁺⁺CD28⁺ (D), CD27⁺CD28⁺⁺ (E) e CD27⁻CD28⁻ (F), separadas do SP de 3 indivíduos adultos saudáveis (apenas é mostrado 1 exemplo), reflectindo os rearranjos do gene *TCR-β*. Os produtos de PCR foram separados por electroforese capilar, pelo seu tamanho, num ABI 310. Numa distribuição policlonal dos LT espera-se encontrar um perfil gaussiano de distribuição dos tamanhos dos produtos de PCR. Os picos que se destacam deste perfil gaussiano são considerados expansões clonais.

2.3.5 Estimulação *in vitro* aumenta a percentagem de LT CD27⁺CD28⁺⁺

Após uma curta estimulação inicial com Con A e estimulação contínua com IL-2, observamos o aumento da expressão de CD28, quer nos LT CD4⁺, quer nos LT CD8⁺, concomitantemente com uma diminuição da expressão de CD27 (Fig. 6 e 7). Simultaneamente observamos um aumento significativo da expressão dos marcadores de activação CD25, CD38, CD45RO e HLA-DR ($p < 0,01$ em todos os casos) (Fig. 6),

juntamente com um aumento de expressão de CD2, CD7 e CD11c (**Fig. 7**). Este fenótipo foi transitório e precedeu a perda total de CD27 e CD28.

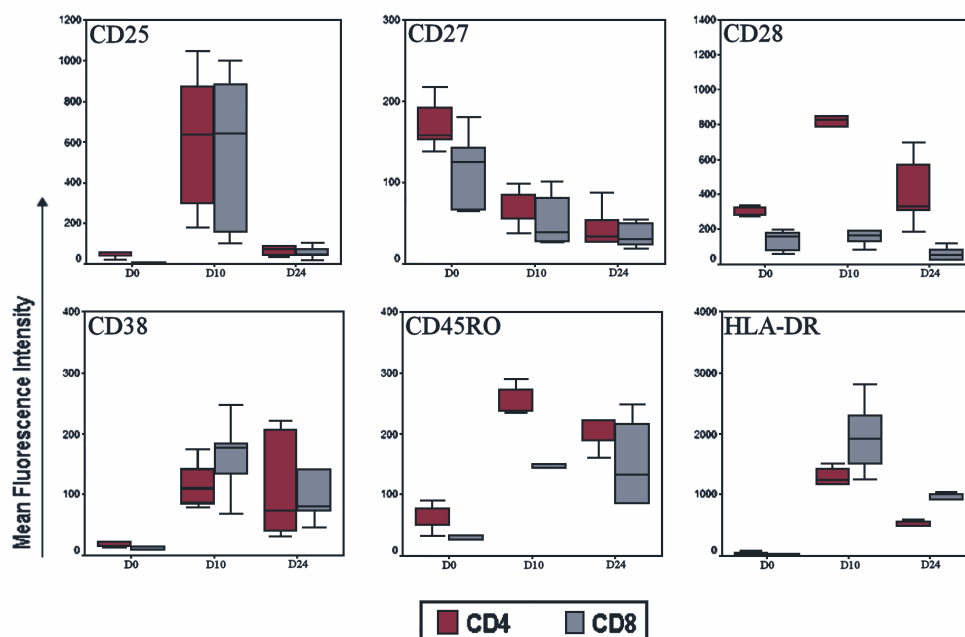


Figura 6 – Expressão de CD25, CD27, CD28, CD38, CD45RO e HLA-DR nos LT CD4⁺ e CD8⁺ após estimulação *in vitro* com Con A e IL-2, avaliada por citometria de fluxo. A estimulação foi realizada com as células mononucleares do SP de 6 indivíduos adultos normais. As células foram colhidas aos dias 10 e 24, e LT recém-colhidos do SP foram utilizados como controles, representados como dia 0.

No que diz respeito à perda total de CD28, foram observadas diferenças significativas entre os LT CD4⁺ e CD8⁺. De facto os LT CD8⁺ perderam completamente a expressão de CD28 durante as 5 semanas de cultura com Con A e IL-2, ao contrário dos LT CD4⁺ (**Fig. 7**), provavelmente por falta de co-estimulação.

Os LT CD27⁻CD28⁻ formados durante a cultura não expressavam CD25 ($p < 0,05$), e apresentavam uma expressão significativamente inferior de HLA-DR, em relação aos LT CD27⁺CD28⁺⁺ ($p < 0,01$ para os LT CD4⁺ e $p < 0,05$ para os LT CD8⁺). Estas células apresentavam ainda uma ligeira diminuição na expressão de CD38 e CD45RO (**Fig. 6**), e uma perda parcial de CD7 e CD11c ($p < 0,05$) com ganho de CD57 ($p < 0,01$) (**Fig. 7**), quando comparada com os LT CD27⁺CD28⁺⁺.

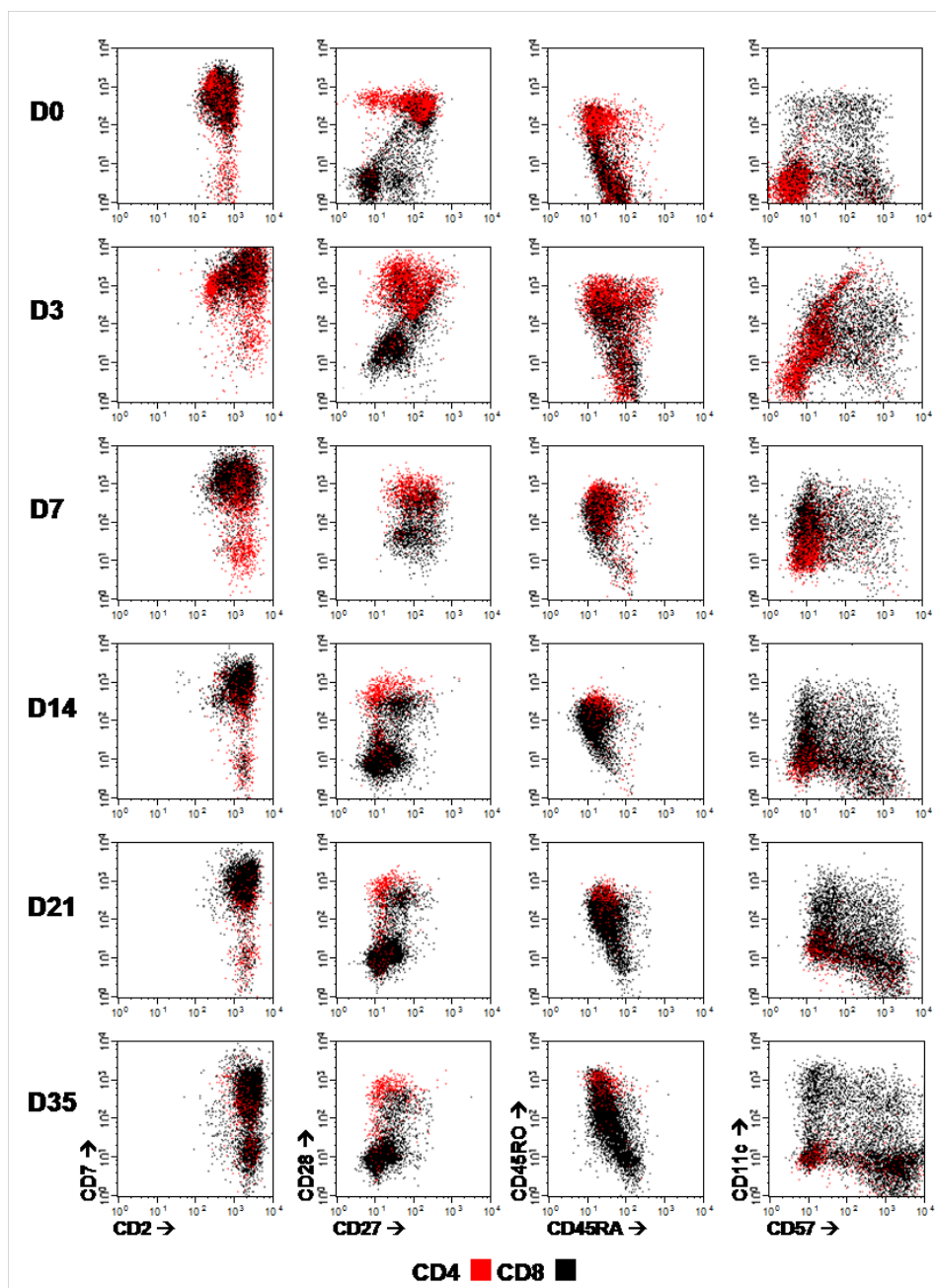


Figura 7 – Exemplo típico da evolução da expressão de CD2, CD7, CD11c, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO e CD57 nos LT CD4⁺ e CD8⁺ do SP de 6 indivíduos normais, a diversos tempos, após estimulação *in vitro* com Con A e IL-2, avaliada por citometria de fluxo.

Ao nível da expressão de RQ, observamos aumento na percentagem de LT CXCR3⁺, juntamente com uma diminuição da percentagem de LT CCR5⁺ e CCR7⁺, após estimulação *in vitro* com Con A e IL-2. Observamos ainda que a percentagem de LT CD4⁺CCR4⁺ aumentava após estimulação, ao mesmo tempo que a percentagem de LT CD8⁺CCR4⁺ diminuía, tornando-se praticamente nula, após 32 dias de cultura (**Fig. 8**).

A expressão de CXCR1 e CXCR2 revelou-se inconstante durante o período de cultura (dados não apresentados), apresentando subidas e descidas diferentes de indivíduo para indivíduo.

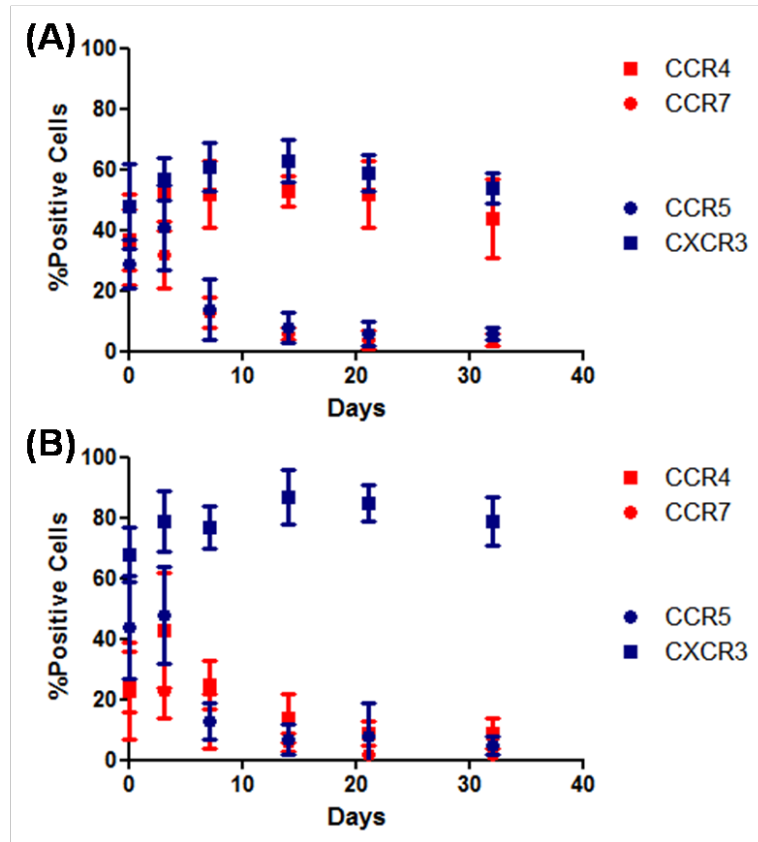


Figura 8 – Evolução da expressão dos RQ específicos de migração para órgãos CCR4 e CCR7 e os RQ inflamatórios CCR5 e CXCR3 nos LT CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) do SP de 8 indivíduos normais, a diversos tempos, após estimulação *in vitro* com Con A e IL-2, avaliada por citometria de fluxo.

2.3.6 Os LT CD27⁺⁺CD28⁺ respondem menos a um estímulo inespecífico do que os LT CD27⁺CD28⁺⁺, mas transformam-se nestes após estimulação

A expressão membranar de CD25 é um dos primeiros sinais de activação nos LT. Para analisar a cinética de resposta das populações de LT, isolamos as populações de LT (CD27⁺⁺CD28⁺, CD27⁺CD28⁺⁺ e CD27⁻CD28⁻) a partir do SP de indivíduos adultos saudáveis e estimulamos cada população com Con A e IL-2.

Os LT CD27⁻CD28⁻ demonstraram a resposta mais rápida pós-estimulação (**Fig. 9A**), apresentando uma expressão de CD25, ao 7º dia, significativamente superior, quando comparada com as restantes populações de LT. Embora a cinética de expressão de CD25 por parte dos LT CD27⁺CD28⁺⁺ não tenha sido tão rápida, esta população

atingiu a mesma percentagem de células CD25⁺ apresentada pela população CD27⁻CD28⁻, o que não foi o caso com da população CD27⁺⁺CD28⁺.

Quando estimuladas, as populações CD27⁻CD28⁻ e CD27⁺⁺CD28⁺ apresentaram um aumento da expressão de CD45RO, seguindo-se a sua perda gradual (**Fig. 9B**). Logo após 2 dias de estimulação com Con A e IL-2, os LT CD27⁺⁺CD28⁺ do SCU aumentaram a expressão de CD28 e CD45RO, adquirindo um fenótipo semelhante à população CD27⁺CD28⁺⁺ (**Fig. 9C**).

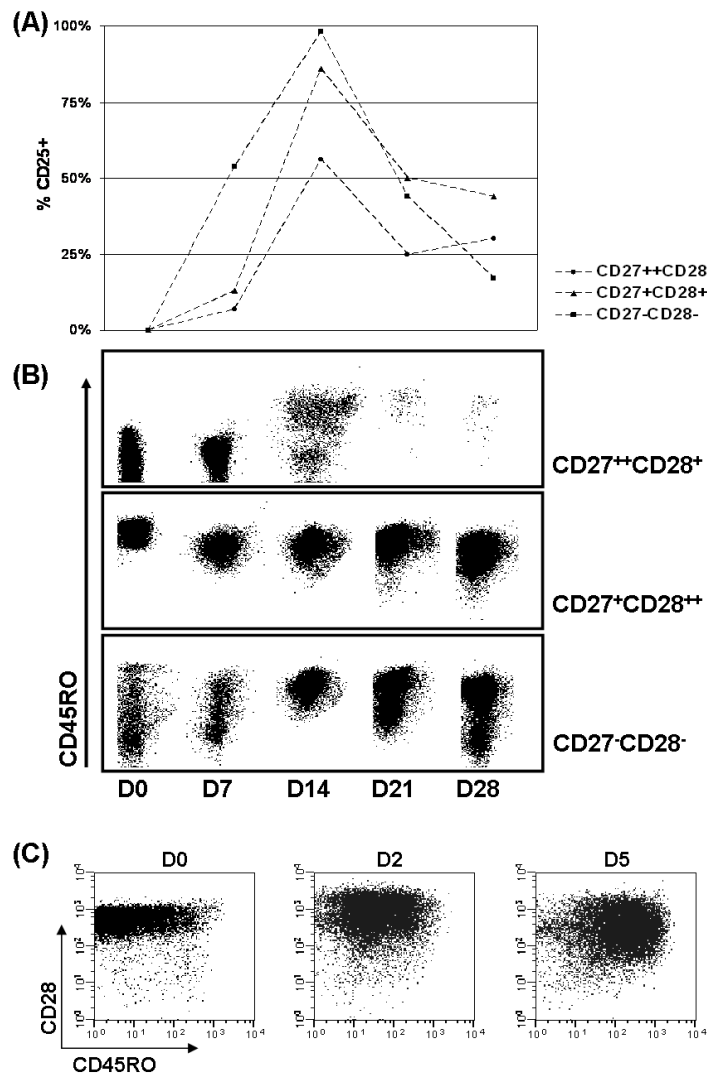


Figura 9 – A expressão de CD25 (**A**) e CD45RO (**B**), foi avaliada, por citometria de fluxo, nas populações de LT CD27⁻CD28⁻, CD27⁺CD28⁺⁺ e CD27⁺⁺CD28⁺, separadas do SP de 3 indivíduos adultos saudáveis, durante estimulação *in vitro* com Con A e IL-2. As células foram colhidas aos dias 7, 14, 21 e 28, e LT recém-colhidos do SP foram utilizados como controlos, representados como dia 0. (**C**) Expressão de CD28 e CD45RO nos LT do SCU de 6 recém-nascidos saudáveis, durante estimulação *in vitro*, de curta duração, com Con A e IL-2, avaliada por citometria de fluxo. A estimulação foi realizada em células mononucleares do SCU de 6 recém-nascidos saudáveis. As células foram colhidas aos dias 2 e 5, e LT recém-colhidos do SCU foram utilizados como controlos, representados como dia 0.

2.4 Discussão

2.4.1 CD27⁺CD28⁺⁺ - Uma população de LT activados circulantes

Ao longo deste trabalho observamos que a população de LT CD27⁺CD28⁺, previamente considerada de LT naïve, compreende duas subpopulações distintas, CD27⁺⁺CD28⁺ e CD27⁺CD28⁺⁺, com fenótipo, repertório de RQ e potencial de produção de citocinas diferente.

Seguindo a definição de LT naïve proposta por Pedro Romero et. Al. (24), que se baseia na expressão de CCR7 em conjunto com CD45RA, e ausência de marcadores de activação, e de acordo com trabalhos anteriores (7, 10, 17), concluímos que apenas a subpopulação CD27⁺⁺CD28⁺ cumpre estes critérios.

Tal como os LT CD27⁺⁺CD28⁺ aparentam corresponder ao *pool* de LT naïve, nós propomos que os LT CD27⁺CD28⁺⁺ representem um *pool* de LT activados, tendo como base a sua forte expressão de marcadores de activação (como o CD45RO e o HLA-DR), e a elevada capacidade de produção de IL-2, e em menor extensão de IFN- γ e TNF- α .

O facto de esta população ser a única capaz de expressar CCR4 (RQ de migração para a pele) e CCR6 (RQ conhecido pelo seu envolvimento na migração para o fígado) (15), favorece a ideia de que esta população possui uma função específica. Para além da população CD27⁺CD28⁺⁺ ser a única capaz de expressar CCR4 e CCR6, também expressa CD62L e CCR7, o que lhe confere a capacidade de migração para os gânglios linfáticos. De facto, a perda completa de CCR7 parece estar restrita aos LT efectores terminais (definidos pela ausência de expressão dos co-estimuladores, CD27 e CD28).

No caso de uma resposta Th1, para um LT poder ser considerado activado ("primed"), terá de produzir citocinas inflamatórias, como o IFN- γ , TNF- α e IL-2. Na realidade, os LT de activação recente (CD27⁺CD28⁺⁺), parecem ser os maiores produtores de IL-2, sendo ao mesmo tempo capazes de produzir IFN- γ e TNF- α , embora em menor extensão do que os LT efectores terminais (CD27⁻CD28⁻).

A expressão forte e homogénea de CD45RO e a ausência de CD45RA nos LT CD27⁺CD28⁺⁺, em conjunto com a ausência desta população em recém-nascidos, pode sugerir que estamos perante uma população de memória, conforme previamente descrito (6, 8, 9, 11).

2.4.2 O que distingue a memória da activação?

Para responder a esta questão temos primeiro que definir memória.

Memória não é um fenótipo mas uma propriedade do sistema imune, que lhe permite desenvolver uma resposta mais forte após re-estimulação, um fenómeno descrito pela primeira vez por Tucídides na Grécia antiga, durante a praga de Atenas que ocorreu por volta de 430 AC, onde: “O mesmo homem nunca foi atacado duas vezes”.

Uma das melhores definições de LT de memória foi proposta por Martin E. Sanders et. al. (25), e diz-nos que os LT de memória são “células que sofreram primeira estimulação com antígeno e são capazes de montar uma segunda resposta mais rápida e mais forte”.

A partir desta definição, amplamente aceite, podemos extrair duas características principais, uma é a especificidade e a outra a longevidade. Na realidade, a memória é a capacidade de recordar uma estimulação antigénica, e para tal, uma célula (ou uma população) terá de ser estimulada pelo antígeno e sobreviver até ser re-estimulada, aumentando a resposta secundária.

2.4.3 Poderemos considerar a população CD27⁺CD28⁺⁺ de memória, pela sua expressão elevada de CD45RO?

Esta questão surge apenas porque é comumente aceite que a expressão de CD45RO é predominante nos LT de memória, mas esta convicção nem sempre foi aceite. De facto, o primeiro trabalho que descreveu a expressão de CD45RO (na altura UCHL1) nos LT de humanos (26), publicado em 1988 no Journal of Immunology, demonstrava que: “a perda de CD45R, juntamente com a expressão de UCHL1, é uma característica dos LT activados”. Só quando Martin E. Sanderst et. al. (25) descreveram o aumento da expressão de CD45RO nos LT de memória é que foi feita a generalização, que o CD45RO identifica os LT de memória.

Subsequentemente foram identificadas novas subpopulações de LT de memória, identificadas com base em diferentes características fenotípicas (8).

Neste trabalho tentamos argumentar que os LT CD27⁺CD28⁺⁺ não representam uma população de memória, analisando esta questão de três perspectivas diferentes.

Em primeiro lugar, estimulando as células mononucleares do SP, observamos que a percentagem de LT CD27⁺CD28⁺⁺ aumenta rapidamente, representando mais de 90% de todos os LT ao dia 10 de estimulação, o que apenas pode ser interpretado de duas

maneiras: ou estamos perante uma expansão da população de memória, ou este fenótipo não representa LT de memória mas sim de activação recente, porque a escala temporal não permite a formação de uma nova população de memória.

A estimulação de LT do SCU (quase todos naïve, sem qualquer contacto antigénico) suporta a segunda hipótese, porque os LT naïve do SCU ($CD27^{++}CD28^{+}$) adquirem o fenótipo de activação ($CD27^{+}CD28^{++}$) em menos de 5 dias.

Em segundo lugar, ao comparar a representação das famílias TCR-V β , e ao analisar os rearranjos do *locus* TCR- β nas três populações de LT mais abundantes no SP ($CD27^{++}CD28^{+}$, $CD27^{+}CD28^{++}$ e $CD27^{-}CD28^{-}$), observamos que, tal como os LT naïve ($CD27^{++}CD28^{+}$), os LT activados ($CD27^{+}CD28^{++}$) não apresentavam qualquer restrição nas famílias TCR-V β , não tendo sido observadas quaisquer expansões clonais, o que seria de esperar se fossem uma população de memória.

Como os LT respondem a um estímulo com uma expansão clonal, seria de esperar que um “pool” de células de memória fosse constituído por clones específicos, que representariam contactos antigénicos prévios, tal como acontece na população $CD27^{-}CD28^{-}$.

Em terceiro lugar, os LT específicos para vírus (27) ou bactérias (28), em indivíduos sem infecção activa, pertencem à população $CD27^{-}CD28^{-}$, normalmente com expressão de CD45RO.

2.4.4 A estimulação *in vitro* reflecte o processo de activação *in vivo*.

Pela estimulação *in vitro* de células mononucleares do SP, observamos uma sequência de modificações fenotípicas dos LT previamente observadas *ex vivo* em infecções víricas agudas (5). Observamos ainda alterações fenotípicas precoces que não são observáveis *ex vivo*, como o aumento da expressão de CD7 e de CD25.

Nos LT do SP de doentes com infecções víricas agudas observamos um aumento da expressão de CD2 e perda de CD7, juntamente com um aumento da expressão de CD11c e CD45RO, culminando o processo de activação com um aumento da expressão de CD57, concomitante com a perda de CD27, CD28 e CD45RO.

Foram exactamente estas as alterações fenotípicas observadas após estimulação *in vitro* dos LT, ocorrendo contudo em tempos diferentes daqueles observados *ex vivo*, nomeadamente no que diz respeito ao aumento da expressão de CD57, que *in vitro* precede a perda de CD28.

Ao nível da expressão de RQ, observamos um aumento da expressão do receptor inflamatório CXCR3, e uma diminuição da expressão do receptor de migração para gânglios CCR7, facto que se coaduna com a predisposição para a migração para os locais inflamados que se esperaria encontrar nos LT activados, bem como a sua menor recirculação pelo e para o tecido linfoide.

Observamos contudo uma diminuição da expressão do RQ inflamatório CCR5, que não seria espectável em LT activados, pelas razões acima expostas, nem é observada nos LT activados de indivíduos adultos normais.

Era também espectável o aumento da expressão de CCR4 nos LT CD4⁺, após estimulação, facto que lhes permite migrar para um dos locais de fronteira corporal, a pele, onde é mais provável ocorrerem lesões que permitam a entrada de agentes patogénicos. Este aumento na expressão de CCR4 também é observável nos LT CD4⁺ activados presentes no SP de indivíduos adultos normais.

Observamos contudo que nos LT CD8⁺, após estimulação, o aumento da expressão de CCR4 é muito breve, e não significativo, sendo seguido de uma queda acentuada, facto que se relaciona com uma menor expressão de CCR4 por parte dos LT CD8⁺ activados do SP de indivíduos adultos normais e que poderá ser explicado por uma menor predisposição genética para a expressão de CCR4, após estimulação, por parte destes LT.

2.4.5 Qual poderá ser a função da população CD27⁺CD28⁺⁺?

A cinética de expressão de CD25, *in vitro* (**Fig. 9**), sugere que a população CD27⁺CD28⁺⁺ responde melhor a um estímulo inespecífico do que os LT naïve, sendo apenas superada pela população CD27⁻CD28⁻. Esta observação sugere que a activação dos LT CD27⁺CD28⁺⁺ *in vivo* precede a activação dos LT naïve, o que pode justificar a resposta mais rápida a um novo estímulo, um fenómeno não específico normalmente atribuído à memória imunológica.

Acresce ainda o facto de esta população possuir um reportório de RQ único (dentro dos LT) e um padrão de produção de citocinas que se assemelha ao observado em LT efectores terminais, embora com franco predomínio de produção de IL-2, em relação à produção de IFN- γ e TNF- α .

Todas estas observações sugerem que estamos perante um estadio de activação dos LT claramente distinto, que precede a migração para o tecido inflamado. Esta hipótese encontra-se ilustrada no seguinte esquema (**Fig. 10**).

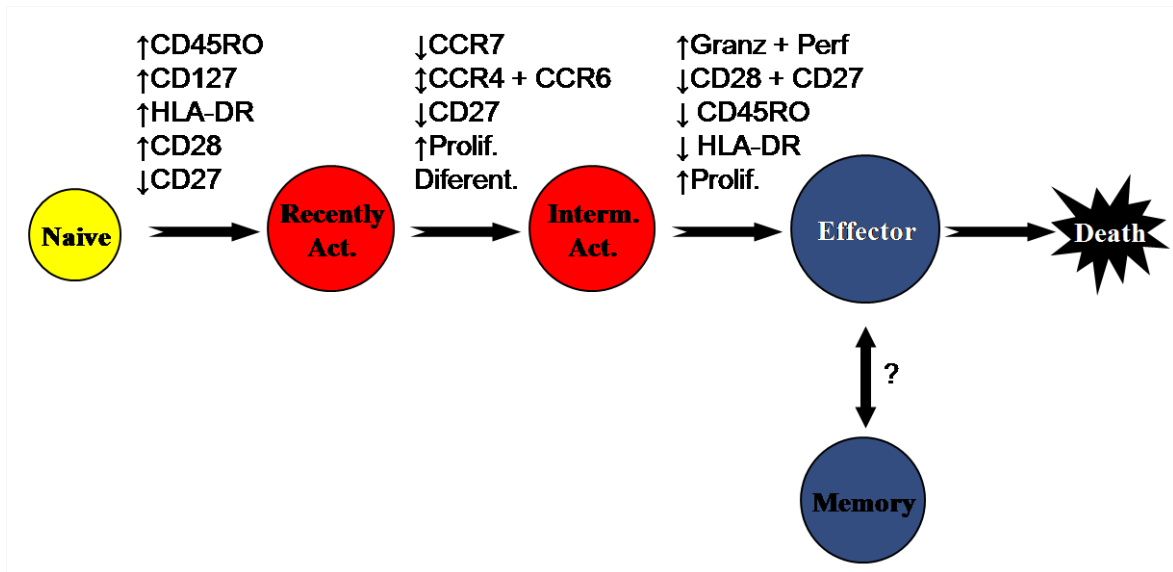


Figura 10 – Proposta de mecanismo para o processo de activação dos LT, tendo como base a expressão de CD27 e CD28, complementada pelos marcadores de activação e RQ mais importantes para cada estadio de activação dos LT.

A abundância desta população de LT no SP de indivíduos adultos normais, faz com que nos pareça estranho imaginar que sem qualquer infecção aparente, uma fracção tão grande dos LT se mantenha activada. Esta linha de pensamento leva-nos a propor que a estimulação destas células tenha origem em estímulos endógenos, com uma possível função homeostática.

2.5 Bibliografia

1. Lima, M., J. Almeida, M. dos Anjos Teixeira, M. d. C. Alguero, A. H. Santos, A. Balanzategui, M. L. Queiros, P. Barcena, A. Izarra, S. Fonseca, C. Bueno, B. Justica, M. Gonzalez, J. F. San Miguel, and A. Orfao. 2003. TCR $\{\alpha\}\{\beta\}$ +/ $CD4^+$ Large Granular Lymphocytosis: A New Clonal T-Cell Lymphoproliferative Disorder. *Am J Pathol* 163:763-771.
2. Hendriks, J., Y. Xiao, and J. Borst. 2003. CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J Exp Med* 198:1369-1380.
3. Hendriks, J., L. A. Gravestein, K. Tesselaar, R. A. van Lier, T. N. Schumacher, and J. Borst. 2000. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol* 1:433-440.
4. Hintzen, R. Q., R. de Jong, S. M. Lens, M. Brouwer, P. Baars, and R. A. van Lier. 1993. Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes. *J Immunol* 151:2426-2435.
5. Lima, M., A. Teixeira Mdos, M. L. Queiros, A. H. Santos, C. Goncalves, J. Correia, F. Farinha, F. Mendonca, J. M. Soares, J. Almeida, A. Orfao, and B. Justica. 2003. Immunophenotype and TCR-Vbeta repertoire of peripheral blood T-cells in acute infectious mononucleosis. *Blood Cells Mol Dis* 30:1-12.
6. Amyes, E., A. J. McMichael, and M. F. Callan. 2005. Human $CD4^+$ T cells are predominantly distributed among six phenotypically and functionally distinct subsets. *J Immunol* 175:5765-5773.
7. Campbell, J. J., K. E. Murphy, E. J. Kunkel, C. E. Brightling, D. Soler, Z. Shen, J. Boisvert, H. B. Greenberg, M. A. Vierra, S. B. Goodman, M. C. Genovese, A. J. Wardlaw, E. C. Butcher, and L. Wu. 2001. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* 166:877-884.
8. Hamann, D., P. A. Baars, M. H. Rep, B. Hooibrink, S. R. Kerkhof-Garde, M. R. Klein, and R. A. van Lier. 1997. Phenotypic and functional separation of memory and effector human $CD8^+$ T cells. *J Exp Med* 186:1407-1418.
9. Kaech, S. M., E. J. Wherry, and R. Ahmed. 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2:251-262.

10. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
11. Tomiyama, H., T. Matsuda, and M. Takiguchi. 2002. Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype. *J Immunol* 168:5538-5550.
12. Clement, L. T., N. Yamashita, and A. M. Martin. 1988. The functionally distinct subpopulations of human CD4+ helper/inducer T lymphocytes defined by anti-CD45R antibodies derive sequentially from a differentiation pathway that is regulated by activation-dependent post-thymic differentiation. *J Immunol* 141:1464-1470.
13. Clement, L. T. 1992. Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation. *J Clin Immunol* 12:1-10.
14. Kim, C. H., L. Rott, E. J. Kunkel, M. C. Genovese, D. P. Andrew, L. Wu, and E. C. Butcher. 2001. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest* 108:1331-1339.
15. Murdoch, C., and A. Finn. 2000. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95:3032-3043.
16. Rabin, R. L., M. K. Park, F. Liao, R. Swofford, D. Stephany, and J. M. Farber. 1999. Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *J Immunol* 162:3840-3850.
17. Potsch, C., D. Vohringer, and H. Pircher. 1999. Distinct migration patterns of naive and effector CD8 T cells in the spleen: correlation with CCR7 receptor expression and chemokine reactivity. *Eur J Immunol* 29:3562-3570.
18. Qin, S., J. B. Rottman, P. Myers, N. Kassam, M. Weinblatt, M. Loetscher, A. E. Koch, B. Moser, and C. R. Mackay. 1998. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 101:746-754.
19. Reiss, Y., A. E. Proudfoot, C. A. Power, J. J. Campbell, and E. C. Butcher. 2001. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* 194:1541-1547.

20. Loetscher, P., M. Seitz, M. Baggiolini, and B. Moser. 1996. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med* 184:569-577.
21. Renzi, P., and L. C. Ginns. 1987. Analysis of T cell subsets in normal adults. Comparison of whole blood lysis technique to Ficoll-Hypaque separation by flow cytometry. *J Immunol Methods* 98:53-56.
22. Campana, D., J. S. Thompson, P. Amlot, S. Brown, and G. Janossy. 1987. The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. *J Immunol* 138:648-655.
23. van Dongen, J. J., A. W. Langerak, M. Bruggemann, P. A. Evans, M. Hummel, F. L. Lavender, E. Delabesse, F. Davi, E. Schuurin, R. Garcia-Sanz, J. H. van Krieken, J. Droese, D. Gonzalez, C. Bastard, H. E. White, M. Spaargaren, M. Gonzalez, A. Parreira, J. L. Smith, G. J. Morgan, M. Kneba, and E. A. Macintyre. 2003. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17:2257-2317.
24. Romero, P., A. Zippelius, I. Kurth, M. J. Pittet, C. Tuvrey, E. M. Iancu, P. Cortesy, E. Devere, D. E. Speiser, and N. Rufer. 2007. Four Functionally Distinct Populations of Human Effector-Memory CD8+ T Lymphocytes. 4112-4119.
25. Sanders, M. E., M. W. Makgoba, S. O. Sharrow, D. Stephany, T. A. Springer, H. A. Young, and S. Shaw. 1988. Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2, and LFA-1) and three other molecules (UCHL1, CDw29, and Pgp-1) and have enhanced IFN-gamma production. *J Immunol* 140:1401-1407.
26. Akbar, A. N., L. Terry, A. Timms, P. C. Beverley, and G. Janossy. 1988. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol* 140:2171-2178.
27. Marchant, A., V. Appay, M. Van Der Sande, N. Dulphy, C. Liesnard, M. Kidd, S. Kaye, O. Ojuola, G. M. Gillespie, A. L. Vargas Cuero, V. Cerundolo, M. Callan, K. P. McAdam, S. L. Rowland-Jones, C. Donner, A. J. McMichael, and H. Whittle. 2003. Mature CD8(+) T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J Clin Invest* 111:1747-1755.

28. Jacobsen, M., A. K. Detjen, H. Mueller, A. Gutschmidt, S. Leitner, U. Wahn, K. Magdorf, and S. H. Kaufmann. 2007. Clonal expansion of CD8+ effector T cells in childhood tuberculosis. *J Immunol* 179:1331-1339.

Capítulo 3

Parte dos resultados constantes deste capítulo foram publicados no seguinte artigo (pdf em anexo no CD-ROM que acompanha esta tese):

João Moura, João Rodrigues, Ana Helena Santos, Maria dos Anjos Teixeira, Maria Luís Queirós, Marlene Santos, Marta Gonçalves, Sónia Fonseca, Carla Laranjeira, António Silva Rodrigues, Esmeraldina Correia Júnior, Fernanda Ribeiro, Maria João Acosta, Margarida Lima; CHEMOKINE RECEPTOR REPERTOIRE REFLECTS MATURE T-CELL LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDER CLINICAL PRESENTATION; Journal of Blood Cells Molecules and Diseases; 2009; 42: 57-63.

Estes resultados foram ainda apresentados sobre a forma de comunicação oral e poster nos seguintes congressos nacionais e internacionais:

Comunicações orais

Moura J, Fonseca S, Santos AH, Queirós ML, Ribeiro F, Acosta MJ, Teixeira MA, Rodrigues AS, Júnior EC, Lima M: CHEMOKINE RECEPTOR REPERTOIRE ON PERIPHERAL T-CELL LYMPHOMA AND T-CELL PROLYMPHOCYTIC LEUKAEMIA CELLS. IX Congresso da Sociedade Ibérica de Citometria; Porto, 2005.

Moura J: ESTUDO COMPARATIVO DOS MECANISMOS QUE REGULAM A MIGRAÇÃO E O TROPISMO TECIDULAR DOS LINFÓCITOS T NORMAIS E NEOPLÁSICOS - UTILIDADE PARA O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS. I Jornadas de Análises Clínicas e Saúde Pública de Bragança, Bragança, Portugal, 2007.

Comunicações em poster

Moura J, Gonçalves M, Santos AH, Queirós ML, Ribeiro F, Acosta MJ, Teixeira MA, Rodrigues AS, Júnior EC, Lima M: CHEMOKINE RECEPTOR REPERTOIRE ON LARGE GRANULAR LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA CELLS. IX Congresso da Sociedade Ibérica de Citometria; Porto, 2005.

Moura J, Fonseca S, Santos AH, Queirós ML, Ribeiro F, Acosta MJ, Teixeira MA, Rodrigues AS, Júnior EC, Lima M: CHEMOKINE RECEPTOR REPERTOIRE ON PERIPHERAL T-CELL LYMPHOMA AND T-CELL PROLYMPHOCYTIC LEUKAEMIA CELLS. IX Congresso da Sociedade Ibérica de Citometria; Porto, 2005.

Moura J, Gonçalves M, Fonseca S, Santos AH, Queirós ML, Ribeiro F, Acosta MJ, Teixeira MA, Arroiz MJ, Rodrigues AS, Júnior EC, Lima M: CHEMOKINE RECEPTOR REPERTOIRE ON LARGE GRANULAR LYMPHOCYTIC LEUKEMIA VS PERIPHERAL T-CELL LYMPHOMA AND T-CELL PROLYMPHOCYTIC LEUKEMIA: A COMPARATIVE STUDY. 5th Euroconference on Clinical Cell Analysis; Atenas, Grécia, 2005.

Moura J, Gonçalves M, Fonseca S, Santos AH, Queirós ML, Santos M, Ribeiro F, Acosta MJ, Teixeira MA, Rodrigues AS, Júnior EC, Lima M: CHEMOKINE RECEPTOR REPERTOIR IN T CELL LARGE GRANULAR LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA AND T CELL LYMPHOMAS VS NORMAL T-CELLS, A COMPARATIVE STUDY. XXXII Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Imunologia, Braga, Portugal, 2006.

Gonçalves M, **Moura J**, Santos AH, Santos M, Queirós ML, Fonseca S, Teixeira MA, Acosta MJ, Júnior EC, Ribeiro F, Rodrigues AS, Lima M: CHEMOKINE RECEPTOR REPERTOIRE REFLECTS T-CELL LINFOPROLIFERATIVE DISORDER ORIGIN AND CLINICAL PRESENTATION. ImmunoRIO 2007, Rio de Janeiro, Brasil, 2007.

Moura J, Rodrigues J, Gonçalves M, Santos AH, Santos M, Queirós ML, Fonseca S, Laranjeira C, Teixeira MA, Acosta MJ, Júnior EC, Ribeiro F, Rodrigues AS, Lima M: CHEMOKINE RECEPTOR REPERTOIRE REFLECTS T-CELL LINFOPROLIFERATIVE DISORDER CLINICAL PRESENTATION. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Imunologia, Porto, Portugal, 2008.

Capítulo 3

3. Expressão de receptores de quimiocinas em neoplasias de linfócitos T maturos

3.1 Introdução

3.2 Material e Métodos

3.2.2 Doentes e Controlos

3.2.3 Amostras

3.2.4 Citometria de Fluxo

3.2.5 Comparação entre os LT neoplásicos e os LT normais homólogos

3.2.6 Análise estatística

3.2.7 Implicações éticas

3.3 Resultados

3.3.1 Comparação do reportório de RQ entre PTCL e LGLL-T

3.3.2 Semelhanças e diferenças na expressão de RQ entre os LT neoplásicos e os seus homólogos normais

3.3.3 Relação entre expressão de CCR5, linfocitose e neutropenia

3.3.4 Relação entre o reportório de RQ inflamatórios e a expressão de CD11c e CD57 em LGLL-T CD8⁺

3.4 Discussão

3.5 Bibliografia

3. Expressão de receptores de quimiocinas em neoplasias de linfócitos T maduros

3.1 Introdução

As DLP-T são doenças raras, que resultam da acumulação de LT neoplásicos com fenótipo maduro, em virtude de uma proliferação descontrolada e/ou de uma inibição da apoptose. Em linhas gerais, podem ser divididas em leucemias e linfomas, dependendo da sua apresentação ao diagnóstico.

A OMS classifica as neoplasias de LT maduros de acordo com aspectos clínicos, morfológicos e fenotípicos. De entre as DLP-T mais frequentes salientam-se as LGLL-T e os linfomas de células T periféricas (PTCL, peripheral T cell lymphomas).

Os PTCL podem ser sub-classificados em linfomas nodais ou extra-nodais (1). Enquanto os primeiros afectam os gânglios ao diagnóstico, os últimos atingem outros órgãos e tecidos, como a pele, o trato gastrointestinal e o trato respiratório. Na maior parte dos casos, os PTCL têm origem em LT α/β^+CD4^+ , representando os linfomas T cutâneos a maior parte dos PTCL extra-nodais (2).

As LGLL-T, as leucemias de LT maduros mais comuns, caracterizam-se pela expansão de linfócitos grandes granulares T (LGL-T) monoclonais no SP, normalmente $CD8^+$, e são diagnosticadas tendo como base critérios morfológicos e fenotípicos, incluindo a perda completa de $CD28$, a expressão de moléculas associadas a células NK, e a presença de grânulos citotóxicos contendo perforina e granzima (3 e 4).

As LGLL-T $CD8^+$ são normalmente acompanhadas de neutropenia e outras citopenias, enquanto que as LGLL-T $CD4^+$ são frequentemente associadas com outras neoplasias hematológicas ou não-hematológicas (3). Com a excepção da esplenomegalia, que é relativamente frequente em doentes com LGLL-T $CD8^+$, é raro observar-se qualquer outra organomegalia, sendo a medula e o baço os principais locais de acumulação destas células (4). Ao contrário da T-PLL (5), não são conhecidas anomalias citogenéticas recorrentes associadas às LGLL-T (6).

As diferentes características das DLP-T tornam o seu diagnóstico diferencial difícil, implicando uma nova e melhor estratégia de classificação.

Ao longo dos anos, os sistemas de classificação evoluíram desde puramente morfológicos e combinados com categorias de prognóstico (Working Formulation), até sistemas de classificação que integram aspectos clínicos, biológicos e laboratoriais (REAL, OMS e EORTC) (7 e 8).

As T-ALL têm origem em estadios de diferenciação dos LT que ocorrem no timo, ao contrário das neoplasias T periféricas que têm origem em LT maduros (pós-tímicos). Pensa-se que a PLL-T têm origem em LT naïve, enquanto que o PTCL e a LGLL-T têm origem em diferentes estadios de activação antigénica, com a LGLL-T a sugerir um fenótipo de activação terminal (7).

O facto de no SP normal existir uma mistura de LT em diferentes estadios de activação, desde os LT naïve até aos LT efectores terminais, juntamente com a semelhança entre LT normais e patológicos, tornam difícil a identificação dos LT neoplásicos (9). O mesmo raciocínio pode ser aplicado à migração, devendo os LT neoplásicos seguir padrões de migração semelhantes aos LT normais, embora não tenha sido estabelecida nenhuma correlação clara entre a expressão de RQ e a afectação preferencial de determinados órgãos e tecidos pelos LT neoplásicos.

Para testar esta hipótese, analisamos a expressão de RQ, porque o tráfico celular pode ser indirectamente avaliado pela expressão destes receptores (10 e 11). Com esta finalidade, comparamos a expressão de RQ de migração específica para órgãos (CCR4, CCR6 e CCR7) (12, 13 e 14), de inflamação recente / específicos de resposta Th1 (CCR5 e CXCR3) (15 e 16), de activação terminal (CXCR1 e CXCR2) (17) e homeostáticos (CXCR4) (18), entre os LT neoplásicos do SP de doentes com PTCL CD4⁺ e doentes com LGLL-T CD4⁺ ou CD8⁺. Comparamos ainda o reportório de RQ de LT neoplásicos de doentes com as patologias referidas, com o reportório de RQ de LT normais com fenótipo equivalente.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Doentes e controlos

O relatório de RQ foi estudado nos LT anormais do SP de 18 indivíduos com PTCL CD4⁺, 2 com PTCL CD8⁺, 10 com LGLL-T CD4⁺ e 10 com LGLL-T CD8⁺, tendo sido utilizados 12 indivíduos normais na mesma faixa etária como controlos (doadores benévolos de sangue).

De uma forma geral, os doentes apresentavam valores de hemoglobina (11–13 g/dL), bem como contagem de plaquetas ($150\text{--}300 \times 10^3/\mu\text{L}$) normais, enquanto o número de leucócitos estava geralmente aumentado ($5\text{--}25 \times 10^3/\mu\text{L}$), devido à linfocitose causada pela proliferação de LT neoplásicos. A maior parte dos doentes com PTCL apresentava infiltração dos gânglios linfáticos ou da pele, por parte dos LT neoplásicos. A percentagem de LT neoplásicos dentro dos LT totais foi sempre superior a 15%.

As DLP-T foram diagnosticadas e classificadas com base em dados clínicos e laboratoriais de acordo com a classificação da OMS (7). A identificação dos LT neoplásicos teve como base o seu fenótipo aberrante, avaliado por citometria de fluxo (3). A clonalidade dos LT foi avaliada por pelo menos 1 dos seguintes métodos: expressão de uma só família da cadeia α do TCR, avaliada por citometria de fluxo (3) e/ou pela detecção de rearranjo monoclonal dos genes *TCR- γ* e *TCR- β* por PCR (19).

3.2.2 Amostras

As amostras de SP foram colhidas em tubos de EDTA-K3.

3.2.3 Citometria de fluxo

A análise imunofenotípica dos LT do SP foi realizada por uma técnica de marcação directa, seguida de lise eritrocitária, conforme previamente descrito em detalhe (3). Resumidamente, foram incubados 100 μL de sangue total, contendo $1\text{--}2 \times 10^6$ células, durante 15 min à temperatura ambiente, com mAb específicos, seguindo-se a lise eritrocitária e a fixação celular, utilizando a solução FACS lysing (Becton-Dickinson BioSciences, BD, San José, CA USA), de acordo com as instruções do fabricante.

De forma a assegurar a melhor selecção da população de LT neoplásicos, foram utilizadas diferentes combinações de mAb (**Tab. 1**). Anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 (para as DLP-T CD4⁺ e CD8⁺ respectivamente) conjugados com alofococianina (APC) foram

combinados com anticorpos anti-RQ conjugados com ficoeritrina (PE) em todos os casos. De forma a melhor identificar os LT neoplásicos do SP, foram utilizados anticorpos conjugados com o tandem ficoeritrina-Cianina5 (PC5) e fluoresceína (FITC), conforme a melhor combinação em cada caso. Nomeadamente, foram utilizados o anti-CD28-PC5 e o anti-CD27-FITC no caso das LGLL-T, enquanto o anti-CD3 conjugado com o complexo piridina-clorofila (PerCP) e o anti-CD7-FITC foram preferidos para identificar as células de PTCL. As LGLL-T foram ainda subdivididas em três grupos, de acordo com a expressão de CD11c e CD57 (CD11c⁺CD57⁻, CD11c⁺CD57⁺ e CD11c⁻CD57⁺), por parte dos LT neoplásicos.

Tabela 1 - Especificidade, clone e origem dos anticorpos monoclonais utilizados.

Especif.	Clone	Fluorocromo ^a	Origem ^b
CD3	SK7	PerCP	BD
CD4	SK3	APC	BD
CD7	CLB-3A1/1.7F3	FITC	CLB
CD8	SK1	APC	BD
CD11c	SHCL-3	PE	BD
CD27	9F4	FITC	CLB
CD28	CD28.2	PC5	IOT
CD57	HNK-1	FITC	BD
CCR4	1G1	PE	PH
CCR5	3A9	PE	PH
CCR6	11A9	PE	PH
CCR7	3D12	PE	PH
CXCR1	5A12	PE	PH
CXCR2	6C6	PE	PH
CXCR3	1C6	PE	PH
CXCR4	12G5	PE	PH

^a APC - Alofocianina; FITC - Isotiocianato de Fluoresceína; PC5 - Ficoeritrina-Cy5-tandem; PE - Ficoeritrina; PerCP — Complexo Peridina-Clorofila.

^b IOT — Immunotech, Marseille, France; BD — Becton-Dickinson, San José, CA, USA; CLB — Sanquin, Amsterdam, The Netherlands; PH — Pharmingen, San Diego, CA, USA.

Os LT neoplásicos de doentes com LGLL-T foram seleccionados com base na ausência de expressão de CD27 e CD28, enquanto os LT neoplásicos de doentes com PTCL foram seleccionados com base nas suas características anormais de dispersão de luz, e níveis anormais de expressão de CD3 e/ou CD7.

Todas as experiências foram realizadas num citómetro FACSCalibur (Beckton Dickinson), utilizando o software CellQuest versão 3.1 para aquisição e o software Paint-a-gate Pro para análise dos dados (Beckton Dickinson).

3.2.4 Comparação entre os LT neoplásicos e os LT normais homólogos

Os LT de activação terminal ($CD4^+CD27^-CD28^-$ e $CD8^+CD27^-CD28^-$) de indivíduos normais foram considerados os homólogos dos LT neoplásicos de LGLL-T $CD4^+$ e $CD8^+$, respectivamente.

Como os LT neoplásicos de indivíduos com PTCL não têm homologia directa com nenhum subtipo de LT normal, consideramos a população de LT $CD28^+CD45RO^+$ normais como a sua população homóloga, devido à semelhança de fenótipo, pois estas células neoplásicas são sempre $CD28^+$, com expressão frequente de moléculas de activação (20).

3.2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste Mann-Whitney U, sendo as diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$.

3.2.6 Implicações éticas

Todas as amostras foram colhidas após consentimento informado, e o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de Santo António.

3.3 Resultados

3.3.1 Comparação do reportório de RQ entre PTCL e LGLL-T

Os resultados obtidos mostram que os LT neoplásicos de doentes com PTCL e LGLL-T apresentavam um reportório de RQ bastante diferente (**Fig. 1A**), o que está de acordo com a sua apresentação clínica diversa (**Fig. 1B**). Ao comparar o reportório de RQ entre estes dois grupos de DLP-T, foi clara a existência de uma grande diferença, quer ao nível da percentagem de células a expressar cada um dos RQ (**Fig. 1B**), quer ao nível da intensidade de expressão dos mesmos (**Figs. 1C, D e E**). As células neoplásicas de doentes com PTCL expressavam geralmente uma variedade de RQ específicos de migração para órgãos, incluindo o CCR4, o CCR6 e o CCR7, enquanto as células neoplásicas de doentes com LGLL-T expressavam, quase exclusivamente, os RQ de inflamação tardia CXCR1 e CXCR2 (receptores de IL-8).

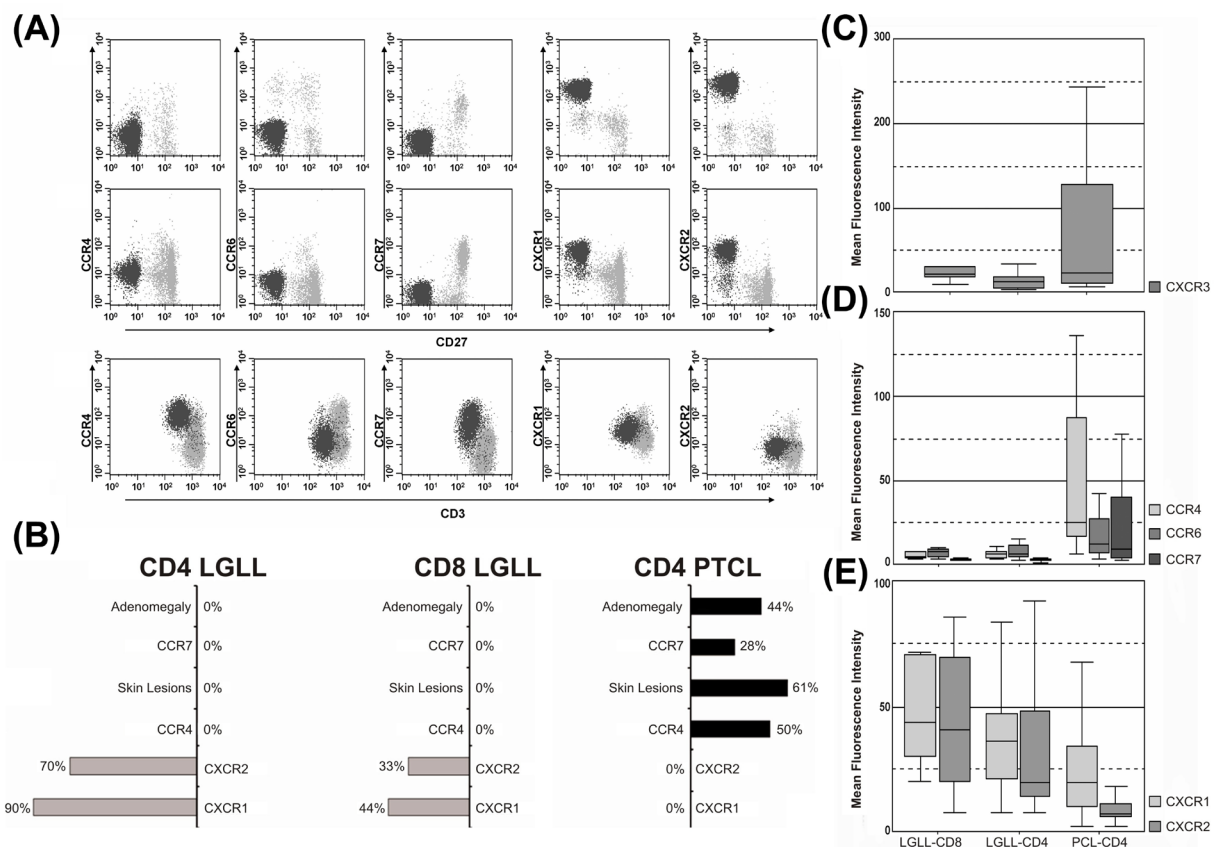


Figura 1 – (A) Histogramas representando os padrões de expressão típicos dos RQ de migração para órgãos (CCR4, CCR6 e CCR7), e de inflamação terminal (CXCR1 e CXCR2), nos LT neoplásicos (pontos pretos) de casos representativos de doentes com LGLL-T CD8⁺, LGLL-T CD4⁺ e PTCL CD4⁺ e LT normais (pontos cinzentos), obtidos por citometria de fluxo. **(B)** Percentagem de casos com expressão membranar dos vários RQ em 10 doentes com LGLL-T CD4⁺, 18 com LGLL-T CD8⁺, 18 com PTCL CD4⁺ e bem como nº de casos com atingimento tecidular por parte dos LT neoplásicos. Os gráficos C, D e E representam a intensidade

média de fluorescência da expressão dos RQ de **(C)** inflamação precoce (CXCR3), **(D)** migração para órgãos (CCR4, CCR6 e CCR7) e **(E)** inflamação terminal (CXCR1 e CXCR2), nos LT neoplásicos de 10 doentes com LGLL-T CD4⁺, 18 com LGLL-T CD8⁺, 18 com PTCL CD4⁺.

Os LT neoplásicos da maioria dos doentes com PTCL (78%) expressavam um ou mais RQ específicos de migração para gânglios, dos quais metade expressavam CCR4 e cerca de 1/3 expressavam CCR6 ou CCR7, o que se relaciona com a maior incidência de lesões cutâneas e adenomegalias, observadas nesses doentes (**Fig. 1B**). Contudo não foi observada correlação entre a expressão de CCR7 e o atingimento ganglionar, nem entre a expressão de CCR4 e a existência de lesões cutâneas. Na realidade, os LT neoplásicos de 2 em cada 8 casos de PTCL com adenopatias não apresentavam expressão de CCR7, e em 3 de 12 casos de PTCL com lesões cutâneas não se observou expressão de CCR4. Os LT de doentes com PTCL não apresentavam expressão de RQ de inflamação tardia.

O reduzido número de casos de PTCL CD8⁺ que conseguimos incluir neste estudo apenas permite sugerir que esta patologia se assemelha ao PTCL CD4⁺, mas não permite qualquer análise estatística. Este número reduzido de casos já era esperado, dada a raridade da neoplasia em causa. Pela reduzida casuística, decidimos excluir esta patologia do corrente estudo, ressaltando apenas a enorme semelhança fenotípica entre os casos de PTCL CD8⁺ e PTCL CD4⁺.

Por outro lado, foi observada a expressão de CXCR1 e CXCR2 na maioria dos casos de LGLL-T CD4⁺ (90% e 70% respectivamente) e numa grande fracção dos casos de LGLL-T CD8⁺ (44% e 33% respectivamente). Os LT neoplásicos de doentes com LGLL-T não apresentavam expressão de RQ específicos de migração para órgãos, o que está de acordo com a ausência de lesões cutâneas, adenomegalias ou outras organomegalias (**Fig. 1B**). A expressão dos RQ inflamatórios / específicos de resposta Th1 (CCR5 e CXCR3), por parte dos LT neoplásicos, foi observada numa fracção dos doentes com PTCL (28% e 50% respectivamente) e dos doentes com LGLL-T (10% e 26% respectivamente), sem qualquer diferença estatisticamente significativa, com a excepção de uma maior intensidade média de fluorescência para o CXCR3, nos casos de PTCL (**Fig. 1C**), em comparação com os casos de LGLL-T ($p < 0,05$). Não foi observada qualquer diferença na expressão de CXCR4 entre essas patologias.

3.3.2 Semelhanças e diferenças na expressão de RQ entre os LT neoplásicos e os seus homólogos normais

Ao comparar o perfil de expressão de RQ dos LT neoplásicos de doentes com LGLL-T CD4⁺ (**Fig. 2A**) e CD8⁺ (**Fig. 2B**) com os LT de activação terminal normais (CD3⁺CD27⁻CD28⁻) CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente, observamos que os LT neoplásicos de doentes com LGLL-T apresentavam uma expressão de CCR5 e CXCR3 significativamente diminuída ($p<0,005$). Concomitantemente, os LT neoplásicos de doentes com LGLL-T apresentavam um aumento na expressão de CXCR1 e CXCR2, embora apenas significativo para o caso de LGLL-T CD4⁺ ($p<0,05$). Os LT neoplásicos de doentes com PTCL CD4⁺ apresentavam uma expressão significativamente superior de CCR4 (RQ de migração para a pele) ($p<0,05$) e uma diminuição significativa da expressão de CCR6, CCR7 e CXCR4 ($p<0,05$), em comparação com os LT CD4⁺CD28⁺CD45RO⁺ do SP de indivíduos normais (**Fig. 2C**).

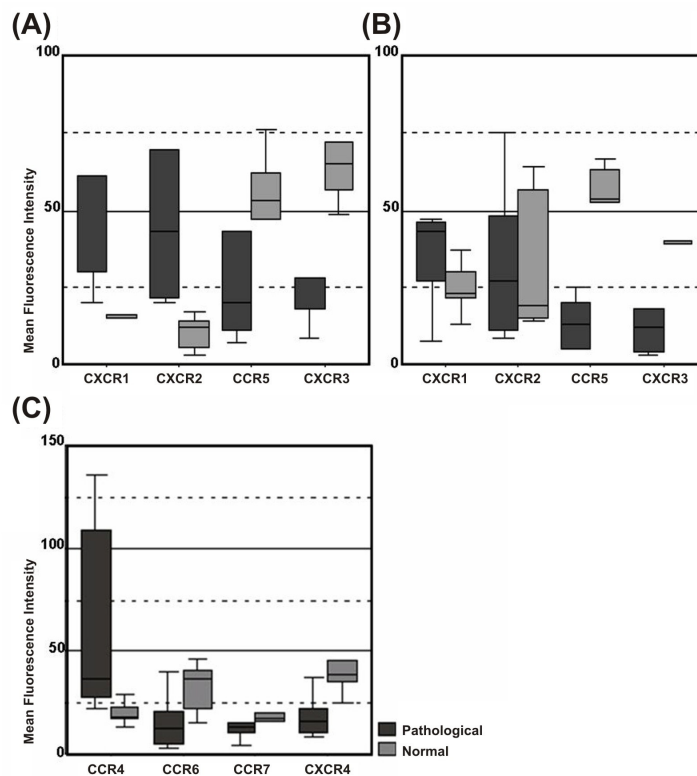


Figura 2 – Comparação do reportório de RQ entre LT normais e neoplásicos obtido por citometria de fluxo. Foi comparada a intensidade média de fluorescência da expressão de RQ inflamatórios (CCR5, CXCR1, CXCR2 e CXCR3) entre os LT CD27⁻CD28⁻ de 10 indivíduos adultos normais e os LT neoplásicos de (A) 10 doentes com LGLL-T CD4⁺ e (B) 18 com LGLL-T CD8⁺. (C) Comparação da expressão de CCR4, CCR6, CCR7 e CXCR4 entre os LT CD4⁺CD28⁺CD45RO⁺ do SP de 10 indivíduos adultos normais e os LT neoplásicos de 18 doentes com PTCL CD4⁺.

3.3.3 Relação entre expressão de CCR5, linfocitose e neutropenia

Comparamos a percentagem de células CCR5⁺ do SP de doentes com LGLL-T, com a percentagem de linfócitos e neutrófilos no SP dos mesmos doentes.

No caso de doentes com LGLL-T CD4⁺, a percentagem de LT CCR5⁺, dentro da população de LT neoplásicos, correlacionava-se linearmente com a linfocitose ($R^2=0,91$) (**Fig. 3A**), enquanto nos casos de LGLL-T CD8⁺, esta correlação, embora existisse, não era tão forte ($R^2=0,32$) (**Fig. 3B**). Contudo, os 5 casos de LGLL-T CD8⁺ com contagens mais altas de linfócitos, correspondiam aos casos em que não se observou expressão de CCR5.

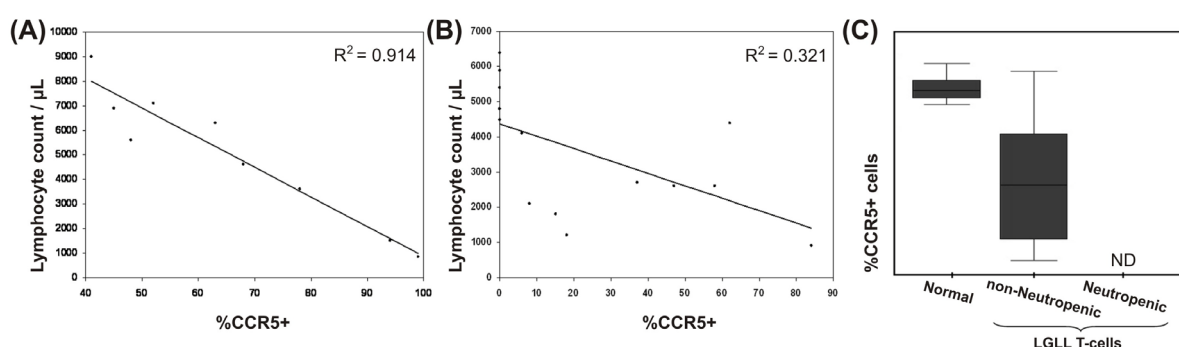


Figura 3 – Relação entre a percentagem de LT neoplásicos CCR5⁺ e a contagem linfocitária por microlitro de SP em (A) 9 doentes com LGLL-T CD4⁺ e (B) 14 doentes com LGLL-T CD8⁺. Os doentes com outras patologias que pudessem influenciar a contagem linfocitária foram excluídos desta experiência. (C) A percentagem de células CCR5⁺ foi aferida na população de LT CD8⁺CD27⁺CD28⁺ do SP de 10 indivíduos normais, 13 doentes com LGLL-T CD8⁺ não-neutropénicos (>1500 neutrófilos) e 5 doentes com LGLL-T CD8⁺ neutropénicos (<1500 neutrófilos). Nenhum dos doentes neutropénicos apresentava qualquer evidência de anticorpos anti-plaquetários no SP. A contagem de linfócitos e neutrófilos foi realizada com um contador hematológico, logo após a colheita, e a percentagem de células CCR5⁺ foi quantificada por citometria de fluxo.

No caso dos doentes com PTCL, não se observou uma correlação directa entre a expressão de CCR5 e a linfocitose, no entanto, os doentes com PTCL, em que não se observou expressão de CCR5, apresentaram as contagens linfocitárias mais altas dentro do grupo ($p<0,05$).

No caso dos doentes com LGLL-T CD8⁺, observamos que a percentagem de LT neoplásicos CCR5⁺ era significativamente menor do que em LT normais e, ao comparar doentes neutropénicos com não-neutropénicos, observamos que esta era nula no caso de doentes com LGLL-T CD8⁺ neutropénicos (**Fig. 3C**).

3.3.4 Relação entre o relatório de RQ inflamatórios e a expressão de CD11c e CD57 em LGLL-T CD8⁺

Subdividimos os doentes com LGLL-T CD8⁺ em três grupos, tendo como base a expressão de CD11c e CD57 (CD11c⁺CD57⁻, CD11c⁺CD57⁺ e CD11c⁻CD57⁺) nos LT neoplásicos. Observamos que o grupo CD11c⁺CD57⁻ apresentava os níveis mais elevados de expressão dos RQ de inflamação terminal (CXCR1 e CXCR2), e os níveis mais baixos de expressão os RQ de inflamação recente (CCR5 e CXCR3). Em contraste, os níveis mais elevados de expressão de CCR5 e CXCR3 ocorreram no grupo CD11c⁻CD57⁺ (Fig. 4A).

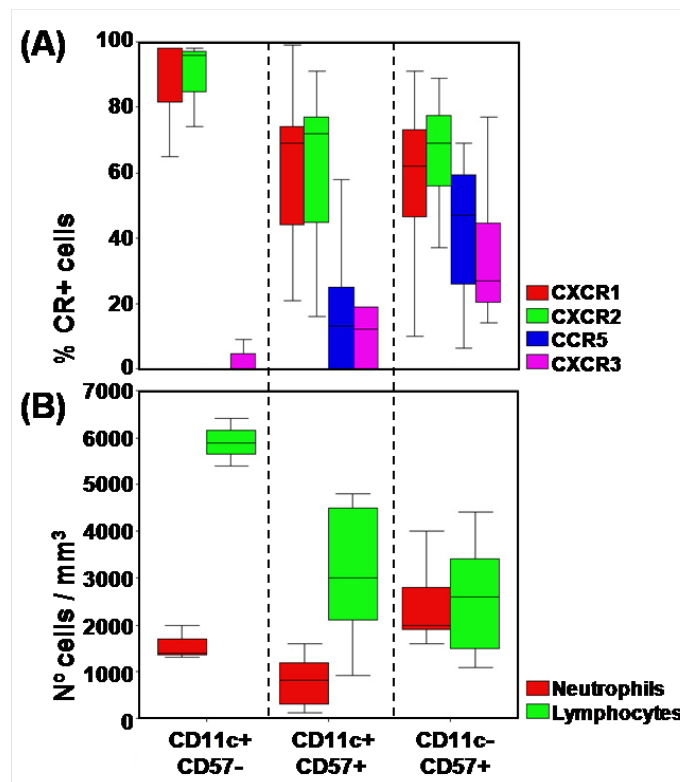


Figura 4 – Relação entre a expressão das moléculas de activação CD11c e CD57 e (A) a percentagem de expressão dos RQ inflamatórios mais relevantes nos LT neoplásicos e (B) a contagem de linfócitos e neutrófilos por microlitro de SP, em doentes com LGLL-T CD8⁺. A contagem de linfócitos e neutrófilos foi realizada com um contador hematológico, logo após a colheita, e a percentagem de células RQ⁺ foi quantificada por citometria de fluxo.

Observamos ainda uma correlação directa entre as contagens linfocitárias e a diferença entre percentagem de expressão dos RQ de inflamação terminal e os RQ de inflamação recente, surgindo as contagens linfocitárias mais elevadas no grupo de doentes com LGLL-T CD8⁺CD11c⁺CD57⁻. Por contrapartida a neutropenia severa surgiu no grupo CD11c⁺CD57⁺, onde se observou uma expressão intermédia dos RQ previamente referidos (Fig. 4B).

3.4 Discussão

Até ao momento, não foi estabelecida uma relação clara entre o reportório de RQ de LT neoplásicos e LT normais, nem entre o reportório de RQ e a apresentação leucémica ou linfomatosa das DLP-T. Do mesmo modo, o padrão de migração dos LT neoplásicos e a infiltração preferencial de determinados órgãos ou tecidos por estes linfócitos não foi satisfatoriamente explicada, apesar da caracterização exaustiva da migração dos LT para a pele, mediada por CCR4, em casos de linfomas cutâneos como o síndrome de Sézary e a micose fungoide (21 e 22).

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a análise da expressão de RQ é uma ferramenta importante para o diagnóstico diferencial entre PTCL e LGLL-T. Em todos os doentes estudados, uma expressão elevada de CCR4 ou CCR7, e ausência de CXCR1 e CXCR2 nos LT neoplásicos caracteriza os PTCL, enquanto nas LGLL-T se observa o oposto. Apesar desta relação, nem a percentagem de LT CCR4⁺, nem a intensidade de expressão de CCR4 se correlaciona com o envolvimento cutâneo por parte dos LT neoplásicos, sendo o mesmo verdade para o CCR7 e o envolvimento ganglionar. Esta observação apoia a ideia que o CCR4 e o CCR7 não são os únicos RQ responsáveis pela migração dos LT para a pele (29) e para os gânglios linfáticos (23), respectivamente.

Durante o processo de activação dos LT ocorrem alterações na expressão de RQ, tal como foi provado pela observação do aumento de expressão de CCR1 e CCR2 por estimulação *in-vitro* com IL-2, e sua diminuição por estimulação com anti-CD3 e/ou anti-CD28 (24). O CCR7 e o CCR5 foram os primeiros RQ associados aos LT naive (25) e activados (26), respectivamente, tendo, até à data, sido identificados inúmeros RQ com expressão preferencial, e muitos outros se seguirão certamente, dada a sua redundância.

Os nossos resultados reflectem a relação entre a activação e o reportório de RQ, levando-nos à conclusão que, apenas a compreensão da normal sequência de activação dos LT e do tráfego linfóide fisiológico, tornará possível determinar a origem das DLP-T, bem como a migração dos LT neoplásicos, sendo estes factores essenciais para uma melhor compreensão das DLP-T e sua evolução.

Quer os LT de activação terminal de indivíduos normais, quer os LT neoplásicos de doentes com LGLL-T expressam predominantemente RQ inflamatórios, apesar de diferirem na expressão de RQ de inflamação recente e terminal, com os primeiros a expressarem preferencialmente CCR5 e CXCR3 e os últimos CXCR1 e CXCR2. Esta observação indica que os LT neoplásicos de doentes com LGLL-T apresentam um fenótipo de inflamação terminal exagerado, por comparação com os LT citotóxicos

normais, o que está de acordo com observações anteriores, que demonstraram a produção constitutiva de citocinas pró-inflamatórias (RANTES, MIP-1 β e IL-18) pelas células mononucleares de doentes com LGLL-T (27).

Os LT neoplásicos de doentes com PTCL (com ou sem envolvimento cutâneo) apresentam uma expressão significativamente aumentada de CCR4 (RQ de migração para a pele), quando comparada com os LT normais com fenótipo semelhante (CD4⁺CD28⁺CD45RO⁺).

Este aumento na expressão de CCR4 está de acordo com estudos anteriores que sugerem que o CCR4 é responsável pela migração para a pele dos LT neoplásicos de doentes com síndrome de Sézary (28 e 29) e outros linfomas cutâneos (30), estando ainda de acordo com a expressão deste RQ em outros PTCL com envolvimento cutâneo (21 e 31). Acresce ainda o facto de, tal como confirmado neste estudo, os LT neoplásicos de doentes com MF (32 e 33), e outros PTCL (34), expressarem CCR4 em conjunto com os RQ de inflamação recente (e específicos de resposta Th1), nomeadamente CCR5 e CXCR3, suportando a ideia que os LT neoplásicos de doentes com PTCL derivam de LT activados. Por comparação com os LT normais equivalentes, os LT neoplásicos de doentes com PTCL apresentam expressão mais baixa e pouco frequente de CCR6 e CCR7, facto que não pode ser apenas explicado pelo predomínio de PTCL cutâneos sobre PTCL nodais neste estudo (61% dos doentes apresentavam lesões cutâneas, enquanto apenas 44% apresentavam atingimento ganglionar), porque mesmo os doentes com adenopatias apresentavam menor expressão de CCR7 à superfície dos LT neoplásicos do que os LT normais equivalentes.

A correlação inversa entre a percentagem de LT neoplásicos CCR5⁺ e a contagem linfocitária, em doentes com LGLL-T ou PTCL, está de acordo com o possível papel fisiológico do CCR5 na regulação da proliferação e/ou morte de LT, bem como na adesão endotelial e consequente migração para o tecido inflamado (35, 36 e 37). Em contraste, a correlação entre a expressão de CCR5 e a contagem de neutrófilos nos doentes com LGLL-T CD8⁺, que expressam preferencialmente os RQ de inflamação terminal, pode ser explicada pela actividade citolítica dos LT CD8⁺ neoplásicos sobre os neutrófilos.

Globalmente, estas duas observações sugerem que, no caso das LGLL-T CD8⁺, a diminuição da percentagem de LT neoplásicos CCR5⁺ está implicada no aparecimento quer da neutropenia quer da linfocitose, que são dois parâmetros úteis para a monitorização da doença. Esta observação é importante porque demonstra uma relação entre a activação dos LT neoplásicos de doentes com LGLL-T e o aparecimento de

neutropenia e linfocitose, que por sua vez podem ser monitorizados pela expressão de CCR5.

A expressão de RQ é determinante para a apresentação clínica das DLP-T, pelo que é razoável presumir que, pela monitorização da expressão dos RQ analisados e de outros como o CCR10 (38 e 39), poderemos seguir as manifestações clínicas das DLP-T, e prever o envolvimento tecidular durante o decurso da doença. De facto, resultados preliminares sugerem que é possível identificar um grupo de doentes, cujos LT neoplásicos apenas expressam CCR4, e que apresentam o comportamento clínico mais agressivo (dados não apresentados).

Esta observação torna a análise, por citometria de fluxo, do reportório de RQ útil para a classificação das DLP-T, e especialmente importante para uma sólida distinção entre leucemia e linfoma. No futuro, o conhecimento das especificidades do reportório de RQ nas diferentes DLP-T, pode ainda ter um papel importante no tratamento destas doenças neoplásicas, dirigido aos RQ.

3.5 Bibliografia

1. Jaffe, E. S. 2006. Pathobiology of Peripheral T-cell Lymphomas. *Hematology* 2006:317-322.
2. Rosen, S. T., and C. Querfeld. 2006. Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Hematology* 2006:323-330.
3. Lima, M., J. Almeida, M. dos Anjos Teixeira, M. d. C. Alguero, A. H. Santos, A. Balanzategui, M. L. Queiros, P. Barcena, A. Izarra, S. Fonseca, C. Bueno, B. Justica, M. Gonzalez, J. F. San Miguel, and A. Orfao. 2003. TCR{alpha}{beta}+/CD4+ Large Granular Lymphocytosis: A New Clonal T-Cell Lymphoproliferative Disorder. *Am J Pathol* 163:763-771.
4. Lamy, T., and T. P. Loughran, Jr. 1999. Current concepts: large granular lymphocyte leukemia. *Blood reviews* 13:230-240.
5. Magro, C. M., C. D. Morrison, N. Heerema, P. Porcu, N. Sroa, and A. C. Deng. 2006. T-cell prolymphocytic leukemia: An aggressive T cell malignancy with frequent cutaneous tropism. *Journal of the American Academy of Dermatology* 55:467.
6. Lazaro, E., O. Caubet, F. Menard, J. L. Pellegrin, and J. F. Viallard. 2007. [Large granular lymphocyte leukemia]. *Presse Med* 36:1694-1700.
7. Harris, N. L., E. S. Jaffe, J. Diebold, G. Flandrin, H. K. Muller-Hermelink, J. Vardiman, T. A. Lister, and C. D. Bloomfield. 1999. The 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. *Ann Oncol* 10:1419-1432.
8. Willemze, R., E. S. Jaffe, G. Burg, L. Cerroni, E. Berti, S. H. Swerdlow, E. Ralfkiaer, S. Chimenti, J. L. Diaz-Perez, L. M. Duncan, F. Grange, N. L. Harris, W. Kempf, H. Kerl, M. Kurrer, R. Knobler, N. Pimpinelli, C. Sander, M. Santucci, W. Sterry, M. H. Vermeer, J. Wechsler, S. Whittaker, and C. J. Meijer. 2005. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 105:3768-3785.
9. Amyes, E., A. J. McMichael, and M. F. Callan. 2005. Human CD4+ T cells are predominantly distributed among six phenotypically and functionally distinct subsets. *J Immunol* 175:5765-5773.
10. Moser, B., M. Wolf, A. Walz, and P. Loetscher. 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control*. *Trends in Immunology* 25:75.

11. Ono, S. J., T. Nakamura, D. Miyazaki, M. Ohbayashi, M. Dawson, and M. Toda. 2003. Chemokines: Roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111:1185.
12. Reiss, Y., A. E. Proudfoot, C. A. Power, J. J. Campbell, and E. C. Butcher. 2001. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* 194:1541-1547.
13. Schutysse, E., S. Struyf, and J. Van Damme. 2003. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14:409.
14. Potech, C., D. Vohringer, and H. Pircher. 1999. Distinct migration patterns of naive and effector CD8 T cells in the spleen: correlation with CCR7 receptor expression and chemokine reactivity. *Eur J Immunol* 29:3562-3570.
15. Qin, S., J. B. Rottman, P. Myers, N. Kassam, M. Weinblatt, M. Loetscher, A. E. Koch, B. Moser, and C. R. Mackay. 1998. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 101:746-754.
16. Kim, C. H., L. Rott, E. J. Kunkel, M. C. Genovese, D. P. Andrew, L. Wu, and E. C. Butcher. 2001. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest* 108:1331-1339.
17. Murdoch, C., and A. Finn. 2000. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95:3032-3043.
18. Campbell, D. J., C. H. Kim, and E. C. Butcher. 2003. Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunological Reviews* 195:58-71.
19. van Dongen, J. J., A. W. Langerak, M. Bruggemann, P. A. Evans, M. Hummel, F. L. Lavender, E. Delabesse, F. Davi, E. Schuurin, R. Garcia-Sanz, J. H. van Krieken, J. Droese, D. Gonzalez, C. Bastard, H. E. White, M. Spaargaren, M. Gonzalez, A. Parreira, J. L. Smith, G. J. Morgan, M. Kneba, and E. A. Macintyre. 2003. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17:2257-2317.
20. Rudiger, T., E. Geissinger, and H. K. Muller-Hermelink. 2006. 'Normal counterparts' of nodal peripheral T-cell lymphoma. *Hematol Oncol* 24:175-180.

21. Ishida, T., A. Utsunomiya, S. Iida, H. Inagaki, Y. Takatsuka, S. Kusumoto, G. Takeuchi, S. Shimizu, M. Ito, H. Komatsu, A. Wakita, T. Eimoto, K. Matsushima, and R. Ueda. 2003. Clinical Significance of CCR4 Expression in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma: Its Close Association with Skin Involvement and Unfavorable Outcome. *Clin Cancer Res* 9:3625-3634.
22. Narducci, M. G., E. Scala, A. Bresin, E. Caprini, M. C. Picchio, D. Remotti, G. Ragone, F. Nasorri, M. Frontani, D. Arcelli, S. Volinia, G. A. Lombardo, G. Baliva, M. Napolitano, and G. Russo. 2006. Skin homing of Sezary cells involves SDF-1-CXCR4 signaling and down-regulation of CD26/dipeptidylpeptidase IV. *Blood* 107:1108-1115.
23. Ebert, L. M., P. Schaerli, and B. Moser. 2005. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol Immunol* 42:799-809.
24. Loetscher, P., M. Seitz, M. Baggiolini, and B. Moser. 1996. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med* 184:569-577.
25. Campbell, J. J., K. E. Murphy, E. J. Kunkel, C. E. Brightling, D. Soler, Z. Shen, J. Boisvert, H. B. Greenberg, M. A. Vierra, S. B. Goodman, M. C. Genovese, A. J. Wardlaw, E. C. Butcher, and L. Wu. 2001. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* 166:877-884.
26. Mackay, C. R. 1993. Immunological memory. *Adv Immunol* 53:217-265.
27. Kothapalli, R., S. B. Nyland, I. Kusmartseva, R. D. Bailey, T. M. McKeown, and T. P. Loughran, Jr. 2005. Constitutive production of proinflammatory cytokines RANTES, MIP-1beta and IL-18 characterizes LGL leukemia. *International journal of oncology* 26:529-535.
28. Fierro, M. T., A. Comessatti, P. Quaglino, M. Ortoncelli, S. Osella Abate, R. Ponti, M. Novelli, and M. G. Bernengo. 2006. Expression pattern of chemokine receptors and chemokine release in inflammatory erythroderma and Sezary syndrome. *Dermatology (Basel, Switzerland)* 213:284-292.
29. Sokolowska-Wojdylo, M., J. Wenzel, E. Gaffal, J. Lenz, P. Speuser, S. Erdmann, F. Abuzahra, E. Bowman, J. Roszkiewicz, T. Bieber, and T. Tuting. 2005. Circulating clonal CLA(+) and CD4(+) T cells in Sezary syndrome express the skin-homing chemokine receptors CCR4 and CCR10 as well as the lymph node-homing chemokine receptor CCR7. *The British journal of dermatology* 152:258-264.

30. Ferenczi, K., R. C. Fuhlbrigge, J. Pinkus, G. S. Pinkus, and T. S. Kupper. 2002. Increased CCR4 expression in cutaneous T cell lymphoma. *The Journal of investigative dermatology* 119:1405-1410.
31. Harasawa, H., Y. Yamada, K. Hieshima, Z. Jin, T. Nakayama, O. Yoshie, K. Shimizu, H. Hasegawa, T. Hayashi, Y. Imaizumi, S. Ikeda, H. Soda, H. Soda, S. Atogami, Y. Takasaki, K. Tsukasaki, M. Tomonaga, K. Murata, K. Sugahara, K. Tsuruda, and S. Kamihira. 2006. Survey of chemokine receptor expression reveals frequent co-expression of skin-homing CCR4 and CCR10 in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia & lymphoma* 47:2163-2173.
32. Shimauchi, T., S. Imai, R. Hino, and Y. Tokura. 2005. Production of Thymus and Activation-Regulated Chemokine and Macrophage-Derived Chemokine by CCR4+ Adult T-Cell Leukemia Cells. 2427-2435.
33. Lu, D., M. Duvic, L. J. Medeiros, R. Luthra, D. M. Dorfman, and D. Jones. 2001. The T-cell chemokine receptor CXCR3 is expressed highly in low-grade mycosis fungoides. *American journal of clinical pathology* 115:413-421.
34. Ishida, T., H. Inagaki, A. Utsunomiya, Y. Takatsuka, H. Komatsu, S. Iida, G. Takeuchi, T. Eimoto, S. Nakamura, and R. Ueda. 2004. CXC chemokine receptor 3 and CC chemokine receptor 4 expression in T-cell and NK-cell lymphomas with special reference to clinicopathological significance for peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Clin Cancer Res* 10:5494-5500.
35. Ward, S. G., K. Bacon, and J. Westwick. 1998. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity* 9:1-11.
36. Fujiwara, H., and T. Hamaoka. 2001. Coordination of chemokine and adhesion systems in intratumoral T cell migration responsible for the induction of tumor regression. *Int Immunopharmacol* 1:613-623.
37. Murooka, T. T., M. M. Wong, R. Rahbar, B. Majchrzak-Kita, A. E. Proudfoot, and E. N. Fish. 2006. CCL5-CCR5-mediated apoptosis in T cells: Requirement for glycosaminoglycan binding and CCL5 aggregation. *J Biol Chem* 281:25184-25194.
38. Notohamiprodjo, M., S. Segerer, R. Huss, B. Hildebrandt, D. Soler, R. Djafarzadeh, W. Buck, P. J. Nelson, and I. von Lüttichau. 2005. CCR10 is expressed in cutaneous T-cell lymphoma. *International journal of cancer* 115:641-647.
39. Fujita, Y., R. Abe, M. Sasaki, A. Honda, M. Furuichi, Y. Asano, O. Norisugi, T. Shimizu, and H. Shimizu. 2006. Presence of circulating CCR10+ T cells and

elevated serum CTACK/CCL27 in the early stage of mycosis fungoides. *Clin Cancer Res* 12:2670-2675.

Capítulo 4

4. Discussão, conclusões e perspectivas futuras

4.1 Discussão

4.1.1 Perspectiva geral sobre as DLP-T

4.1.2 Processo de activação dos LT

4.1.3 Caracterização da subpopulação de LT activados (CD27⁺CD28⁺⁺)

4.1.4 A expressão de RQ ao longo do processo de activação dos LT

4.1.5 Homólogos normais dos LT neoplásicos de doentes com DLP-T

4.1.6 Expressão de RQ nas diferentes DLP-T

4.2 Conclusão geral

4.3 Perspectivas futuras

4.4 Bibliografia

4. Discussão, conclusões e perspectivas futuras

4.1 Discussão

4.1.1 Perspectiva geral sobre as DLP-T

As DLP-T são doenças raras que representam menos do que 10% de todas as neoplasias linfoides, variando a sua incidência, a nível geográfico. Esta assimetria na distribuição geográfica é em parte justificada pela diferente incidência de determinadas infecções víricas, como por exemplo a infecção pelo HTLV-1, que está na origem da leucemia/linfoma de células T do adulto. Observa-se ainda uma prevalência racial de certas DLP-T, facto que se pressupõe ter origem no somatório das contribuições individuais de predisposições genéticas e factores ambientais.

O tratamento destas DLP é geralmente agressivo, provocando efeitos secundários graves, implicando em muitos casos a necessidade transfusional e levando à perda da competência imunológica, pelo que aumenta a incidência de outras neoplasias e disfunção de órgãos, quer por infiltração das células neoplásicas, quer como consequência do tratamento, levando à redução da qualidade de vida em geral.

As DLP-T são, de uma forma geral, mais resistentes aos tratamentos convencionais do que as DLP-B, pelo que a sua investigação é fundamental, já que só a compreensão dos mecanismos etiopatogénios subjacentes, permitirá o desenvolvimento de novas armas terapêuticas.

Para melhorar o diagnóstico das DLP-T é imprescindível aprofundar o nosso conhecimento sobre estas neoplasias, nomeadamente ao nível da sua origem, vertendo estes conhecimentos na sua melhor classificação.

A classificação mais recente das DLP-T (1) propõe que estas doenças tenham origem em alterações que ocorrem nos LT durante o processo de maturação / activação / diferenciação terminal, implicando que o fenótipo observável em determinada DLP-T tenha, como base, as características do estadio da célula que lhe deu origem.

É, portanto, pertinente definir com clareza os imunofenótipos normais dos LT e as modificações fenotípicas, e de perfil de migração, que ocorrem nestas células após activação celular, para melhor identificar os perfis fenotípicos aberrantes associados às DLP-T.

4.1.2 Processo de activação dos LT

Foram vários os mecanismos propostos para caracterizar a sequência de alterações fenotípicas que ocorrem nos LT após estimulação (1-9). Estes mecanismos baseiam-se na sequência de alterações que ocorrem ao nível da expressão de moléculas envolvidas na activação, adesão e migração celular, entre outras.

Com base no perfil de expressão de toda esta panóplia de moléculas, podem ser definidos vários estadios de activação. No entanto, corremos sempre o risco de definir numa sequência artificial de alterações fenotípicas, que embora possa ser conceptualmente satisfatória e assente em observações empíricas, não tenha tradução real na sequência de fenómenos que ocorrem a nível fisiológico.

Dadas as limitações éticas que se impõem à experimentação em seres Humanos, uma das melhores estratégias para definir a sequência de alterações fenotípicas que ocorrem durante o processo de activação dos LT provem de estudos *ex vivo*, nomeadamente pela observação de LT de doentes com infecções agudas e doentes com infecções crónicas. Muitos destes estudos foram realizados no Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia do Hospital de Santo António (10, 11), tendo sido observadas modificações fenotípicas características que podem ser resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 – Alterações fenotípicas que ocorrem nos LT de indivíduos com infecções agudas e indivíduos com infecções crónicas, por comparação com os LT de indivíduos adultos normais.

Infecções agudas	Infecções crónicas
↑ Complexidade	↑ Complexidade
↑ Tamanho	↑ Tamanho
↑ CD2	↑ CD2
↓ CD7	↓ CD7
↑ CD11c	↑ CD11c
↑ CD38	⇔ CD38
↑ HLA-DR	⇔ HLA-DR
- CD57	↑ CD57
↓ CD28	↓ CD28
↓ CD45RA	⇔ CD45RA
↑ CD45RO	⇔ CD45RO

Contudo, este tipo de abordagem apenas nos permite caracterizar as fases mais tardias do processo de activação dos LT, quando a infecção se torna sintomática, sendo necessárias novas estratégias para caracterizar a fase inicial do processo de activação.

De forma a completar a informação já obtida com os estudos *ex vivo* e caracterizar as fases iniciais de activação dos LT, procedemos à estimulação *in vitro* de LT do SP de indivíduos adultos normais. Assim, caracterizamos uma sequência de modificações fenotípicas que ocorrem nas fases precoces após estimulação e confirmamos a sequência de modificações fenotípicas que ocorrem nas fases mais tardias. Completamos esta informação com o estudo da expressão de RQ, indicador do potencial de migração dos LT, e estudamos o perfil funcional, através da sua capacidade para sintetizar citocinas.

Ao integrar estes dados com a análise das populações de LT maioritárias, presentes no SP dos mesmos indivíduos, tentamos extrapolar qual a sequência de alterações que ocorre *in vivo*, nos LT, após contacto antigénico (**Fig. 10 - Cap. 2**).

4.1.3 Caracterização da subpopulação de LT activados (CD27⁺CD28⁺⁺)

Ao longo deste trabalho demonstramos que o processo de activação dos LT pode ser acompanhado fenotipicamente pela expressão dos co-estimuladores CD27 e CD28, demonstrando ainda que a população de LT CD27⁺CD28⁺, previamente considerada como naïve, na realidade compreende duas subpopulações distintas (CD27⁺⁺CD28⁺ e CD27⁺CD28⁺⁺), com fenótipo, reportório de RQ e potencial de produção de citocinas diferente, correspondendo a primeira ao pool circulante de LT naïve, e a segunda a um pool de LT activados.

Demonstramos, pela primeira vez que, a população de LT CD27⁺CD28⁺⁺ tem características muito próprias: para além de ter uma expressão elevada de moléculas de activação, como CD45RO e HLA-DR, parece ser a única capaz de expressar CCR4 e CCR6, expressando também CD62L e CCR7. Esta população é capaz de produzir citocinas do tipo inflamatório, como o IFN- γ , TNF- α e IL-2, sendo a população de LT do SP que apresenta a maior produção de IL-2.

Demonstramos ainda que, apesar da expressão forte e homogénea de CD45RO e a ausência de CD45RA nos LT CD27⁺CD28⁺⁺, esta população não pode ser considerada de memória, conforme a definição amplamente aceite (12), que envolve especificidade e longevidade, analisando esta questão de três perspectivas diferentes:

Em primeiro lugar, pela estimulação *in vitro* dos LT do SP, observamos que a percentagem da população CD27⁺CD28⁺⁺ aumentava rapidamente, sendo o mesmo efeito observado ao estimular LT do SCU.

Em segundo lugar, observamos que esta subpopulação apresentava uma grande variabilidade nos rearranjos do gene que codifica para a cadeia beta do TCR, não tendo sido observadas quaisquer expansões clonais, o que seria de esperar se esta população representasse um pool de células de memória.

É amplamente aceite que o fenómeno de memória implica especificidade na memória secundária (12), pelo que nos parece mais provável que os verdadeiros LT de memória correspondam à população de LT CD27⁻CD28⁻. De facto, a caracterização fenotípica de LT específicos para vírus (13) ou bactérias (14), em indivíduos sem qualquer infecção activa, revela que estes pertencem à população CD27⁻CD28⁻, normalmente com expressão de CD45RO e não à população de células CD27⁺CD28⁺.

Esta linha de raciocínio favorece a hipótese de desenvolvimento progressivo da memória T, em detrimento da hipótese de desenvolvimento divergente (15). Assim sendo, os LT de memória poderão corresponder a LT que, durante uma resposta imunológica,

atingiram o estadio de activação terminal, e escaparam à contracção do clone celular expandido.

Contudo, ao analisar amostras de SP de indivíduos de ambos os sexos e de diferentes idades, demonstramos que a população circulante de LT activados se mantém relativamente constante ao longo do envelhecimento humano, o que levanta outras questões: Qual a função que esta população desempenha no contexto de uma resposta imunológica? Qual ou quais são os estímulos que mantêm um pool relativamente constante de LT CD27⁺CD28⁺⁺ permanentemente activados?

Nesta tese avançamos a hipótese de a população CD27⁺CD28⁺⁺ corresponder a uma primeira linha de resposta linfocitária, actuando mais rápido do que os LT naïve. Esta hipótese é suportada pela mais rápida expressão de CD25, após estimulação *in vitro*, por parte desta população. Também de acordo está a proposta recente, efectuada por Stefanova et. al. (16), de um aumento da sensibilidade do TCR à estimulação antigénica por parte de LT pré-activados por estímulos endógenos, levando a uma expansão clonal mais rápida após estimulação específica.

Por tudo o exposto concluímos que, a compreensão do fenómeno que leva à activação de uma tão grande percentagem de LT, pode ser a chave para a compreensão do fenómeno ao qual chamamos memória imunológica, podendo ainda ser importante para a compreensão de outros fenómenos como a auto-imunidade.

4.1.4 A expressão de RQ ao longo do processo de activação dos LT

Durante o processo de activação dos LT ocorrem alterações na expressão de RQ, tal como foi provado pela observação do aumento de expressão de CCR1 e CCR2 por estimulação *in vitro* com IL-2, e sua diminuição por estimulação com anti-CD3 e/ou anti-CD28 (17), sendo ainda demonstrada a diminuição de expressão de CCR4 e CXCR3, nos LT, por estimulação com alérgenos (18).

Actualmente associa-se a expressão de CCR7 a um estadio naíve dos LT, que precede qualquer estimulação ou polarização por parte destas células. Este RQ está ainda associado a uma subpopulação de LT de memória, a memória central, permitindo a estas células a recirculação entre o SP e o tecido linfóide.

A expressão de CCR5 e CXCR3 por parte dos LT está associada a estadios de activação, nomeadamente ao processo de polarização Th1, enquanto, por contrapartida, a expressão de CCR4 e CCR8 está associada à polarização Th2 (19).

Os RQ CXCR1 e CXCR2 estão associados a fenómenos inflamatórios (20), e especialmente aumentados em casos de sepsis (21), estando a sua expressão, nos LT, associada à população circulante de linfócitos NK-T (22), sendo muitas vezes referidos como marcadores NK dos LT.

Os nossos resultados reflectem esta relação entre a activação e o repertório de RQ.

Pela análise do repertório de RQ dos LT, nos seus diferentes estadios de activação/diferenciação, concluímos que, durante este processo, estes aumentam a expressão de RQ inflamatórios (CCR5, CXCR1, CXCR2 e CXCR3), sendo a expressão de CXCR1 e CXCR2 observada apenas nos estadios mais tardios. Demonstramos que o aumento de expressão de CXCR3 pode ser recriado *in vitro*, por estimulação com Con A + IL-2, não sendo o mesmo verdade para o CCR5, cuja expressão na membrana do LT diminui após estimulação, talvez por falta de co-estimulação.

Já o facto da expressão de CXCR1 e CXCR2, nos LT, após estimulação *in vitro*, se ter demonstrado bastante variável, poderá ser atribuído ao armazenamento destes receptores em vesículas, no citoplasma celular (23), o que introduz uma nova variável na cinética de expressão membranar destes RQ.

Concluímos ainda que a expressão de CCR4 e CCR6, nos LT, ocorre numa fase intermédia do processo de activação, sendo muito superior no caso dos LT CD4⁺. Por estudos *in vitro* demonstramos também que a expressão de CCR4, nos LT (CD4⁺ e

CD8⁺), aumenta, numa fase inicial, após a qual se mantém no caso dos LT CD4⁺, e diminui até se tornar indetectável no caso dos LT CD8⁺.

Estes resultados revestem-se de grande importância para a interpretação dos padrões de expressão de RQ pelas diversas DLP-T.

4.1.5 Homólogos normais dos LT neoplásicos de doentes com DLP-T

A classificação mais recente das DLP-T (1) propõe a existência de populações de LT normais a partir das quais, por transformação neoplásica, se desenvolvem as DLP-T.

Pela elevada semelhança fenotípica, é amplamente aceite que a população de LT CD27⁻CD28⁻ de indivíduos normais corresponde à população homóloga normal dos LT neoplásicos de doentes com LGLL-T (10).

Já no que diz respeito aos LT neoplásicos de doentes com PTCL, devido à sua relativa diversidade fenotípica, é mais difícil definir qual a sua população homóloga normal. Pela comparação entre o fenótipo dos LT neoplásicos destes doentes e as várias populações de LT, presentes no SP de indivíduos normais, propomos que a sua população homóloga normal seja a população de LT activados circulantes, CD27⁺CD28⁺⁺.

4.1.6 Expressão de RQ nas diferentes DLP-T

Um dos principais objectivos deste estudo centrou-se na compreensão da relação entre o padrão de expressão de RQ nos LT neoplásicos e os órgãos e tecidos preferencialmente atingidos em diferentes DLP-T. Para tal, propusemo-nos compreender qual a relação entre o reportório de RQ dos LT neoplásicos das diferentes DLP-T e o mesmo reportório nos seus homólogos normais.

A abordagem a esta questão têm sido pontual, incidindo principalmente na compreensão do tropismo cutâneo por parte de duas entidades muito próximas, o síndrome de Sézary e a micose fungoide (24), tendo-se concluído que este envolve essencialmente o RQ CCR4.

Muito do desconhecimento em relação ao porquê da apresentação predominantemente leucémica ou linfomatosa de determinadas DLP-T, advém precisamente do facto de não ter sido, até à data, estabelecida uma relação clara entre o reportório de RQ de LT neoplásicos e o mesmo reportório nos seus homólogos normais.

Ao debruçarmo-nos sobre esta questão, observamos uma forte relação entre o reportório de RQ dos LT neoplásicos de doentes com LGLL-T e o mesmo reportório nos LT de activação terminal (CD27⁺CD28⁺) de indivíduos normais. Em ambos os casos observamos uma expressão preferencial de RQ inflamatórios (CCR5, CXCR1, CXCR2 e CXCR3), apresentando os LT neoplásicos de doentes com LGLL-T um carácter inflamatório terminal (sobre-expressão de CXCR1 e CXCR2), enquanto os seus homólogos normais apresentam um carácter mais precoce (expressam preferencialmente CCR5 e CXCR3).

A partir desta observação, e de observações anteriores, que demonstraram a produção constitutiva de citocinas pró-inflamatórias (RANTES, MIP-1 β e IL-18) pelas células mononucleares de doentes com LGLL-T (25), concluímos que, as LGLL-T, apresentam um carácter leucémico porque, tal como os LT normais, de onde provem por transformação neoplásica, apresentam um reportório de RQ pró-inflamatório e uma expressão muito reduzida de RQ específicos de migração para órgãos.

É de salientar o papel do CCR5 nesta patologia, estando a diminuição da percentagem de LT neoplásicos CCR5⁺ relacionada com a linfocitose, e, nos casos de LGLL-T CD8⁺, também relacionada com o aparecimento de neutropenia. Estes resultados podem ser interpretados à luz de estudos anteriores que atribuem ao CCR5 um papel na regulação da proliferação e/ou morte de LT, bem como na adesão endotelial e consequente migração para o tecido inflamado (26, 27).

O facto de durante o processo de estimulação *in vitro* dos LT, termos observado uma diminuição da expressão de CCR5, leva-nos a especular que, fisiologicamente, os LT normais, podem responder à estimulação com a diminuição da expressão de CCR5 (entre muitos outros factores), levando esta diminuição, por sua vez, a um aumento da proliferação e consequente expansão celular. Por outro lado, a correlação entre a expressão de CCR5 e a neutropenia poderá dever-se à actividade citolítica dos LT CD8⁺ neoplásicos sobre os neutrófilos.

Concluimos portanto que existe uma relação entre a activação dos LT neoplásicos, a expressão de CCR5 e o aparecimento de neutropenia e linfocitose em doentes com LGLL-T.

Em doentes com PTCL, é frequente observar envolvimento de tecidos linfóides e não linfóides, dos quais se salienta a pele.

Nestas patologias, o envolvimento tecidular pode ser explicado pela maior expressão de RQ específicos de migração para órgãos, por parte dos LT neoplásicos. Na realidade, os LT neoplásicos de doentes com PTCL-CD4 (com ou sem envolvimento cutâneo) apresentam uma expressão significativamente aumentada de CCR4, quando comparada com os seus LT homólogos normais (CD27⁺CD28⁺⁺), o que está de acordo com estudos anteriores que sugerem que o CCR4 é responsável pelo atingimento cutâneo em vários casos de PTCL (28).

Confirmamos ainda os resultados, de estudos anteriores, que demonstram que, LT neoplásicos de doentes com MF e outros PTCL expressam CCR4 em conjunto com os RQ de inflamação recente, CCR5 e CXCR3 (29), suportando a hipótese de estes derivarem de LT activados. Mostramos que os LT neoplásicos de doentes com PTCL apresentam uma menor (e menos frequente) expressão de CCR6 e CCR7, por comparação com os seus LT homólogos normais, mesmo em doentes com adenopatias causada pelo linfoma, o que está de acordo com a diminuição da expressão de CCR7 que ocorreu após estimulação *in vitro* dos LT do SP de indivíduos normais.

Resultados preliminares sugerem ainda que é possível identificar um grupo de doentes com PTCL cujos LT neoplásicos apenas expressam CCR4, um fenótipo exacerbado por comparação com os LT normais homólogos, e que parecem apresentar um comportamento clínico mais agressivo (dados não apresentados, pois exigem confirmação com um maior número de doentes e com tempos de seguimento mais longos).

Por tudo o exposto, concluimos que a análise da expressão de RQ é uma ferramenta importante para o diagnóstico diferencial entre PTCL e LGLL-T, sendo esta

determinante para a apresentação clínica das DLP-T e podendo no futuro desempenhar um papel importante na abordagem terapêutica destas doenças neoplásicas.

4.2 Conclusão geral

Os resultados obtidos neste estudo suportam a tese que propõem a existência de populações de LT no SP de indivíduos normais, representando estádios de activação e com fenótipo semelhante aos LT neoplásicos de doentes com DLP-T, a partir dos quais, por transformação neoplásica, estas patologias têm origem.

Concluimos que a análise do reportório de RQ contribui para um melhor diagnóstico diferencial entre LGLL-T e PTCL: uma expressão preferencial de CXCR1 e CXCR2 sugere LGLL-T, enquanto uma expressão preferencial de RQ específicos de migração para órgãos (CCR4, CCR6 e CCR7), sugere PTCL. Concluimos ainda que não existe relação directa entre a expressão de CCR4 e o atingimento cutâneo, nem entre a expressão de CCR7 e o atingimento ganglionar.

Comparando o reportório de RQ entre os LT neoplásicos de doentes com LGLL-T e PTCL com o dos LT normais homólogos, verificamos que, em ambas as patologias, os LT neoplásicos mantêm a expressão dos mesmos RQ, apresentando contudo um fenótipo mais exacerbado, que se reflecte num aumento de expressão de CXCR1 e/ou CXCR2 nos casos de LGLL-T e de CCR4 e/ou CCR7 nos casos de PTCL.

Verificamos que os LT neoplásicos de doentes com LGLL-T sobre-expressam os RQ de inflamação terminal e sub-expressam os de inflamação precoce, por comparação com os seus homólogos normais, relação esta que, nos doentes com LGLL-T CD8⁺, se relaciona ainda com a expressão de CD11c e CD57, sendo tanto maior quanto mais aberrante for o fenótipo apresentado pelos LT neoplásicos.

Concluimos ainda existir uma relação entre a percentagem de LT neoplásicos CCR5⁺ e a linfocitose, em todas as DLP-T estudadas, no caso das LGLL-T CD8⁺, com a neutropenia.

Por fim concluimos que, a análise do reportório de RQ é útil para a classificação das DLP-T e especialmente importante para uma sólida distinção entre leucemia e linfoma, tornando possível, talvez num futuro próximo, seguir as manifestações clínicas das várias DLP-T e orientar as opções terapêuticas.

4.3 Perspectivas futuras

Este estudo abre novas portas para a compreensão do atingimento tecidular selectivo por parte das DLP-T, bem como para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos destas DLP-T em geral.

São identificados RQ cuja expressão preferencial nestas DLP-T, por comparação com os LT normais, os transforma em possíveis alvos terapêuticos.

A possibilidade de utilizar os RQ como alvo terapêutico surgiu durante a investigação do processo de infecção pelo HIV, tendo sido realizados vários ensaios utilizando o CCR5 e o CXCR4 como potenciais alvos (30), até à data sem sucesso.

Estudos recentes (31-33) sugerem que a utilização de anticorpos anti-RQ na terapia de doenças auto-imunes, como a asma ou a artrite reumatóide, será uma realidade num futuro próximo. Estudos utilizando anticorpos anti-CCR3, anti-CCR4 e anti-CCR8 para o tratamento de asma (34) e anti-CXCR3 para o tratamento de artrite reumatóide (35) e outras doenças auto-imunes (36) estão já em diferentes níveis de desenvolvimento.

A possibilidade de modular o processo de migração celular está ainda a ser investigada em áreas como a infecção, a artérioesclerose e o cancro (36).

Numa tentativa de controlar o processo inflamatório e impedir o desenvolvimento de um quadro de sepsis, estão a ser desenvolvidos antagonistas do CXCR1 e CXCR2 (37, 38), com aparente sucesso na inibição da acumulação de LT citotóxicos, células NK e neutrófilos. Este tipo de abordagem está ainda a ser aplicada a doenças inflamatórias crónicas, como a doença de Crohn (39), onde estão em curso estudos que envolvem o CCR9 como potencial alvo terapêutico, devido à sua relativamente baixa expressão nas várias células imunológicas.

Na área das doenças neoplásicas, está a ser avaliada a acção de anticorpos anti-CXCR4, numa tentativa de inibir o processo de metastização (40), e de anticorpos anti-CCR4 e anti-CCR10 para o tratamento de diversos tumores cutâneos (28, 41-43).

Neste estudo, identificamos o CXCR1 e o CXCR2 como potenciais alvos terapêuticos no caso das LGLL-T, nomeadamente pela utilização de anticorpos anti-RQ, tal como já foi proposto para o tratamento de sepsis. A utilização de anticorpos anti-CXCR1 e/ou anti-CXCR2 acarreta a potencial destruição de outras populações leucocitárias como os neutrófilos ou as células NK, pelo que deverá ser sempre ponderada a relação custo/benefício entre a eliminação ou redução do clone neoplásico e a indução de um estado de imunodeficiência.

Identificamos ainda o CCR4 como alvo preferencial na maior parte dos casos de PTCL, mesmo aqueles que não apresentam envolvimento cutâneo, dada a frequente

sobre-expressão deste receptor. Dada a menor expressão de CCR4 por parte das várias células do sistema imune, consideramos o CCR4 como um alvo promissor para o tratamento destas neoplasias.

Excluimos à partida a utilização do CCR6 e CCR7 como alvos terapêuticos no caso das DLP-T, pois embora possam ser expressos pelos LT neoplásicos em casos particulares de linfomas T, a sua expressão é muito restrita, e frequentemente inferior à dos próprios LT normais.

Pelo estudo mais aprofundado das especificidades do repertório de RQ, e pelo alargamento deste estudo a mais DLP-T ou a outras neoplastias de origem imunológica, talvez possamos, um dia, ir além do mero uso dos RQ como alvos e controlar, pelo uso de agonistas e antagonistas de quimiocinas, o próprio processo de migração celular. Este controlo permitiria reorientar a migração das células neoplásicas, concentrando-as em determinados tecidos, impedindo assim a sua disseminação.

Por todos estes motivos, e pelos resultados aqui apresentados, seria promissor alargar o âmbito destes estudos a outras neoplasias, de origem imune ou não imune, alargando também o estudo a um leque de novos receptores, contra os quais foram surgindo anticorpos monoclonais.

Para além de sugerir novas possibilidades na área do diagnóstico e tratamento das DLP-T, este estudo levanta questões importantes na área da imunologia básica.

No decorrer do estudo do processo de activação e migração dos LT normais, foi identificada uma população de LT activados, com um fenótipo característico e sem restrição clonal do repertório TCR.

Ainda não é clara a função desta população, embora se tenha demonstrado que responde à estimulação de uma forma mais rápida do que a população naïve, pelo que, serão importantes novos estudos funcionais, com o intuito de elucidar a sua função fisiológica. Para tal seria importante caracterizar esta população num modelo animal como o ratinho. Neste sentido foram já efectuados estudos preliminares que permitiram identificar uma população de LT, com fenótipo de activação, em ratinhos aparentemente não infectados.

Através de um modelo animal será possível realizar estudos funcionais, que permitam definir qual o papel desta população no âmbito de uma resposta imunológica específica, e que posteriormente possam ser complementados com estudos *in vitro* que permitam recriar a resposta, dos LT humanos, a microrganismos patogénicos.

Seria ainda importante realizar um estudo que permitisse avaliar o fenótipo dos LT específicos contra os antigénios mais importantes de um painel alargado de bactérias e vírus, em indivíduos saudáveis, que já tiveram contacto com os referidos vírus ou

bactérias. Este estudo sistematizado permitir-nos-ia identificar com clareza qual o fenótipo ou fenótipos dos LT de memória.

Estudos preliminares sugerem ainda que, em indivíduos com doenças auto-imunes como a Trombocitopenia Purpura Auto-imune ou o Lupus Eritematoso Sistémico, a população circulante de LT activados se encontra expandida. Nesse sentido, foi já proposto a financiamento, um projecto, com o intuito de esclarecer qual o papel desta população na etiologia destas doenças auto-imunes. Este esclarecimento poderá passar pela comparação genética e fenotípica, entre os LT activados de indivíduos normais e os LT activados de indivíduos com doenças auto-imunes.

4.4 Bibliografia

1. Swerdlow, S. H., and International Agency for Research on Cancer. 2007. *WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
2. Akbar, A. N., L. Terry, A. Timms, P. C. Beverley, and G. Janossy. 1988. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol* 140:2171-2178.
3. Amyes, E., A. J. McMichael, and M. F. Callan. 2005. Human CD4⁺ T cells are predominantly distributed among six phenotypically and functionally distinct subsets. *J Immunol* 175:5765-5773.
4. Campbell, J. J., K. E. Murphy, E. J. Kunkel, C. E. Brightling, D. Soler, Z. Shen, J. Boisvert, H. B. Greenberg, M. A. Vierra, S. B. Goodman, M. C. Genovese, A. J. Wardlaw, E. C. Butcher, and L. Wu. 2001. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* 166:877-884.
5. Clement, L. T. 1992. Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation. *J Clin Immunol* 12:1-10.
6. Hamann, D., P. A. Baars, M. H. Rep, B. Hooibrink, S. R. Kerkhof-Garde, M. R. Klein, and R. A. van Lier. 1997. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 186:1407-1418.
7. Hendriks, J., Y. Xiao, and J. Borst. 2003. CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J Exp Med* 198:1369-1380.
8. Romero, P., A. Zippelius, I. Kurth, M. J. Pittet, C. Tuvvrey, E. M. Iancu, P. Corthesy, E. Devere, D. E. Speiser, and N. Rufer. 2007. Four Functionally Distinct Populations of Human Effector-Memory CD8⁺ T Lymphocytes. 4112-4119.
9. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
10. Lima, M., J. Almeida, M. dos Anjos Teixeira, M. d. C. Alguero, A. H. Santos, A. Balanzategui, M. L. Queiros, P. Barcena, A. Izarra, S. Fonseca, C. Bueno, B. Justica, M. Gonzalez, J. F. San Miguel, and A. Orfao. 2003. TCR{alpha}{beta}⁺/CD4⁺ Large Granular Lymphocytosis: A New Clonal T-Cell Lymphoproliferative Disorder. *Am J Pathol* 163:763-771.

11. Lima, M., A. Teixeira Mdos, M. L. Queiros, A. H. Santos, C. Goncalves, J. Correia, F. Farinha, F. Mendonca, J. M. Soares, J. Almeida, A. Orfao, and B. Justica. 2003. Immunophenotype and TCR-Vbeta repertoire of peripheral blood T-cells in acute infectious mononucleosis. *Blood Cells Mol Dis* 30:1-12.
12. Sanders, M. E., M. W. Makgoba, S. O. Sharrow, D. Stephany, T. A. Springer, H. A. Young, and S. Shaw. 1988. Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2, and LFA-1) and three other molecules (UCHL1, CDw29, and Pgp-1) and have enhanced IFN-gamma production. *J Immunol* 140:1401-1407.
13. Marchant, A., V. Appay, M. Van Der Sande, N. Dulphy, C. Liesnard, M. Kidd, S. Kaye, O. Ojuola, G. M. Gillespie, A. L. Vargas Cuero, V. Cerundolo, M. Callan, K. P. McAdam, S. L. Rowland-Jones, C. Donner, A. J. McMichael, and H. Whittle. 2003. Mature CD8(+) T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J Clin Invest* 111:1747-1755.
14. Jacobsen, M., A. K. Detjen, H. Mueller, A. Gutschmidt, S. Leitner, U. Wahn, K. Magdorf, and S. H. Kaufmann. 2007. Clonal expansion of CD8+ effector T cells in childhood tuberculosis. *J Immunol* 179:1331-1339.
15. Intlekofer, A. M., E. J. Wherry, and S. L. Reiner. 2006. Not-so-great expectations: re-assessing the essence of T-cell memory. *Immunol Rev* 211:203-213.
16. Stefanova, I., J. R. Dorfman, M. Tsukamoto, and R. N. Germain. 2003. On the role of self-recognition in T cell responses to foreign antigen. *Immunol Rev* 191:97-106.
17. Loetscher, P., M. Seitz, M. Baggiolini, and B. Moser. 1996. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med* 184:569-577.
18. Garcia, G., M. Humbert, F. Capel, A. C. Rimaniol, P. Escourrou, D. Emilie, and V. Godot. 2007. Chemokine receptor expression on allergen-specific T cells in asthma and allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy* 62:170-177.
19. Qin, S., J. B. Rottman, P. Myers, N. Kassam, M. Weinblatt, M. Loetscher, A. E. Koch, B. Moser, and C. R. Mackay. 1998. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 101:746-754.
20. Cohen-Hillel, E., I. Yron, T. Meshel, and A. Ben-Baruch. 2007. Interleukin 8 and cell migration to inflammatory sites: the regulation of focal adhesion kinase under conditions of migratory desensitization. *Isr Med Assoc J* 9:579-583.

21. Kaneider, N. C., A. Agarwal, A. J. Leger, and A. Kuliopulos. 2005. Reversing systemic inflammatory response syndrome with chemokine receptor pepducins. *Nat Med* 11:661-665.
22. Thomas, S. Y., R. Hou, J. E. Boyson, T. K. Means, C. Hess, D. P. Olson, J. L. Strominger, M. B. Brenner, J. E. Gumperz, S. B. Wilson, and A. D. Luster. 2003. CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells. *J Immunol* 171:2571-2580.
23. Gasser, O., A. Missiou, C. Eken, and C. Hess. 2005. Human CD8+ T cells store CXCR1 in a distinct intracellular compartment and up-regulate it rapidly to the cell surface upon activation. *Blood* 106:3718-3724.
24. Fierro, M. T., A. Comessatti, P. Quaglino, M. Ortoncelli, S. Osella Abate, R. Ponti, M. Novelli, and M. G. Bernengo. 2006. Expression pattern of chemokine receptors and chemokine release in inflammatory erythroderma and Sezary syndrome. *Dermatology* 213:284-292.
25. Kothapalli, R., S. B. Nyland, I. Kusmartseva, R. D. Bailey, T. M. McKeown, and T. P. Loughran, Jr. 2005. Constitutive production of proinflammatory cytokines RANTES, MIP-1beta and IL-18 characterizes LGL leukemia. *Int J Oncol* 26:529-535.
26. Aldinucci, D., D. Lorenzon, L. Cattaruzza, A. Pinto, A. Gloghini, A. Carbone, and A. Colombatti. 2008. Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. *Int J Cancer* 122:769-776.
27. Murooka, T. T., M. M. Wong, R. Rahbar, B. Majchrzak-Kita, A. E. Proudfoot, and E. N. Fish. 2006. CCL5-CCR5-mediated apoptosis in T cells: Requirement for glycosaminoglycan binding and CCL5 aggregation. *The Journal of biological chemistry* 281:25184-25194.
28. Ishida, T., and R. Ueda. 2006. CCR4 as a novel molecular target for immunotherapy of cancer. *Cancer Science* 97:1139-1146.
29. Ohshima, K., K. Karube, R. Kawano, T. Tsuchiya, H. Suefuji, T. Yamaguchi, J. Suzumiya, and M. Kikuchii. 2004. Classification of distinct subtypes of peripheral T-cell lymphoma unspecified, identified by chemokine and chemokine receptor expression: Analysis of prognosis. *Int J Oncol* 25:605-613.
30. Mosier, D. E., G. R. Picchio, R. J. Gulizia, R. Sabbe, P. Poignard, L. Picard, R. E. Offord, D. A. Thompson, and J. Wilken. 1999. Highly potent RANTES analogues

either prevent CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 infection in vivo or rapidly select for CXCR4-using variants. *J Virol* 73:3544-3550.

31. Cosmi, L., F. Annunziato, E. Maggi, S. Romagnani, and R. Manetti. 2001. Chemoattractant receptors expressed on type 2 T cells and their role in disease. *Int Arch Allergy Immunol* 125:273-279.
32. Mikhak, Z., M. Fukui, A. Farsidjani, B. D. Medoff, A. M. Tager, and A. D. Luster. 2009. Contribution of CCR4 and CCR8 to antigen-specific T(H)2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 123:67-73 e63.
33. Panina-Bordignon, P., A. Papi, M. Mariani, P. Di Lucia, G. Casoni, C. Bellettato, C. Buonsanti, D. Miotto, C. Mapp, A. Villa, G. Arrigoni, L. M. Fabbri, and F. Sinigaglia. 2001. The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. *J Clin Invest* 107:1357-1364.
34. Caramori, G., K. Ito, and I. M. Adcock. 2004. Targeting Th2 cells in asthmatic airways. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3:243-255.
35. Vital, E. M., and P. Emery. 2008. The development of targeted therapies in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 31:219-227.
36. Houshmand, P., and A. Zlotnik. 2003. Therapeutic applications in the chemokine superfamily. *Curr Opin Chem Biol* 7:457-460.
37. Busch-Petersen, J. 2006. Small molecule antagonists of the CXCR2 and CXCR1 chemokine receptors as therapeutic agents for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Top Med Chem* 6:1345-1352.
38. Bizzarri, C., A. R. Beccari, R. Bertini, M. R. Cavicchia, S. Giorgini, and M. Allegretti. 2006. ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. *Pharmacol Ther* 112:139-149.
39. Saruta, M., Q. T. Yu, A. Avanesyan, P. R. Fleshner, S. R. Targan, and K. A. Papadakis. 2007. Phenotype and effector function of CC chemokine receptor 9-expressing lymphocytes in small intestinal Crohn's disease. *J Immunol* 178:3293-3300.
40. Murphy, P. M. 2001. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med* 345:833-835.
41. Reiss, Y., A. E. Proudfoot, C. A. Power, J. J. Campbell, and E. C. Butcher. 2001. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting

- chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* 194:1541-1547.
42. Homey, B., H. Alenius, A. Muller, H. Soto, E. P. Bowman, W. Yuan, L. McEvoy, A. I. Lauerma, T. Assmann, E. Bunemann, M. Lehto, H. Wolff, D. Yen, H. Marxhausen, W. To, J. Sedgwick, T. Ruzicka, P. Lehmann, and A. Zlotnik. 2002. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med* 8:157-165.
43. Payne, A. S., and L. A. Cornelius. 2002. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *J Invest Dermatol* 118:915-922.

A multidisciplinaridade é mais do que um chavão em Ciência.
É uma forma de em conjunto analisarmos o nosso desconhecimento
sobre a Natureza, e em conjunto perguntarmos “Porquê?”.

João Moura Alves, 2009