

UNIVERSIDAD DE GRANADA



HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III
E INMUNOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO GENOTÍPICO Y MOLECULAR DE GENES HLA Y TCR EN
LINFOCITOSIS LGL CD4/CD8 POSITIVAS**

**M^a DEL PILAR GARRIDO COLLADO
GRANADA, 2007**

D. Francisco Ruiz-Cabello Osuna, Doctor en Farmacia, Jefe de Sección del Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Profesor asociado a tiempo parcial, Área de Inmunología. Universidad de Granada.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “**ESTUDIO GENOTÍPICO Y MOLECULAR DE GENES HLA Y TCR EN LINFOCITOSIS LGL CD4/CD8 POSITIVAS**”, ha sido realizado bajo mi dirección por Dña M^a del Pilar Garrido Collado, para optar al título de Doctor por la Universidad de Granada.

Granada, a 20 de Abril de 2007

Fdo. Dr. Francisco Ruiz-Cabello Osuna

D. José Alberto Orfao de Matos Correia e Vale, Doctor en Medicina y Cirugía,
Profesor titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca.
Director del Servicio de Citometría del Centro de Investigación del Cáncer de
Salamanca.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “**ESTUDIO GENOTÍPICO Y MOLECULAR DE
GENES HLA Y TCR EN LINFOCITOSIS LGL CD4/CD8 POSITIVAS**”, ha sido
realizado bajo mi dirección por Dña M^a del Pilar Garrido Collado, para optar al
título de Doctor por la Universidad de Granada.

Granada, a 20 de Abril de 2007

Fdo. Dr. Alberto Orfao de Matos

Dña Julia Almeida Parra, Doctora en Medicina y Cirugía, Profesora Contratada Doctor Permanente del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado **“ESTUDIO GENOTÍPICO Y MOLECULAR DE GENES HLA Y TCR EN LINFOCITOSIS LGL CD4/CD8 POSITIVAS”**, ha sido realizado bajo mi dirección por Dña. M^a del Pilar Garrido Collado, para optar al título de Doctor por la Universidad de Granada.

Granada, a 20 de Abril de 2007

Fdo. Dra. Julia Almeida Parra

Como resultado de la siguiente tesis doctoral se han llevado acabo las siguientes publicaciones:

Pilar Garrido, Francisco Ruiz-Cabello, Paloma Bárcena, Yorick Sandberg, Julia Cantón, Margarida Lima, Ana Balanzategui, Marcos González, Miguel Angel López-Nevot, Anton W. Langerak, Andrés C. García-Montero, Julia Almeida, Alberto Orfao.

Monoclonal TCR-V β 13.1⁺/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+dim} T-LGL lymphocytosis: evidence for an antigen-driven chronic T-cell stimulation origin.

Blood, 109; 2007 (en prensa).

Pilar Garrido, Julia Almeida, Julia Cantón, Jose María Romero, Yorick Sandberg, Margarida Lima, Anton W. Langerak, Alberto Orfao, Francisco Ruiz-Cabello.

Evaluation of the immunoregulatory functional polymorfisms in patients with monoclonal CD4⁺/CD8^{-/+dim} T- LGL lymphocytosis.

Immunogenetics, 2007 (Sometido a publicación).

Y las siguientes comunicaciones a congresos, publicadas en revistas nacionales e internacionales:

- Garrido P, Almeida J, de Pablos J.M, Lima M, Bárcena P, Ruiz-Cabello F, Orfao A. Análisis clonotípico y molecular de los segmentos VDJ en pacientes con síndromes linfoproliferativos LGL TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4^{+/b}/CD8^{+/d}: un modelo de proceso antígeno dirigido? XLVII Reunión Nacional Asociación Española de Hematología y Hemoterapia.-Haematologica, 90(2): 52. Madrid 2005

- Garrido P, Orfao A, Cantón J, Almeida J, Lima M, Bárcena P, López Nevot M. A, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Restricted T-cell receptor β -chain usage by T cells in HLA-DRB1*0701 patients with LGLs TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺. lymphoproliferative disorders. Genes and Immunity, 6 (S1):46. XIX European Immunogenetics and Histocompatibility Conference. Estambul 2005

- Garrido P, Orfao A, Cantón J, Almeida J, Lima M, Bárcena P, López-Nevot M.A, Garrido F, Ruiz- Cabello F. Identification of a commonly used CDR3 region of LGLs TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ V β 13.1 patients. XI Congreso de la Asociación Europea de Hematología.- Haematológica, 91 (s1): 21. Amsterdam 2006.

- Garrido P, Orfao A, Cantón J, Almeida J, Lima M, Bárcena P, López-Nevot M.A, Garrido, Ruiz-Cabello F. Restricted T-cell receptor beta-chain usage by T cells in HLA-DRB1*0701 patients with LGLs TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ lymphoproliferative disorders. XXXI Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Inmunología, 24 (S1): 160. Córdoba 2006.

- Garrido P, Orfao A, Cantón J, Almeida J, Lima M, Bárcena P, López Nevot M. A, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients HLA- DRB1*0701 with LGLs TCR $\alpha\beta^+$ / CD4 $^+$ lymphoproliferative disorders. First Joint Meeting of European National Societies of Immunology. Pag 292. París 2006.

- Garrido P, Almeida J, Cantón J, López Nevot MA, Sandberg Y, Langerak AW, Garrido F, Orfao A, Ruiz-Cabello F. HLA y marcadores inmunogenéticos en pacientes con LGLs-CD3 $^+$. Inmunología 26 (S1): 54. XXXIII Congreso Sociedad Española de Inmunología. Granada 2007.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Ruiz-Cabello, director de esta tesis, por su ayuda, dedicación, disponibilidad y orientación en la realización de esta tesis doctoral. Por estar siempre ahí y ayudarme en la resolución de las distintas dificultades que han ido surgiendo con optimismo y paciencia.

Al Dr. Orfao, director de esta tesis, por darme la gran oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección. Por todos sus buenos y sabios consejos.

A la Dra. Julia Almeida, directora de esta tesis, por su disponibilidad, cercanía y grandes aportaciones.

A la Dra. Julia Cantón, por sus enseñanzas en mis comienzos en el trabajo de laboratorio. Por su paciencia y dedicación.

A todo el Servicio de Hematología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, en especial al Dr. Manuel Jurado y Dr. José María de Pablos, por haberme facilitado el apoyo necesario para la realización de esta tesis doctoral.

A todo el personal del laboratorio de Inmunología, por su ayuda incondicional.

Al Dr. Jacques J.M. van Dongen, por darme la oportunidad de llevar a cabo parte de este trabajo en el Laboratorio de Inmunología del Erasmus Medical Center de Róterdam. A todos los miembros integrantes de dicho laboratorio, en especial a Yorick, por su gran apoyo y ayuda en mis comienzos, por haberme hecho sentir como uno más.

A todos los investigadores del Laboratorio 11 del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, en especial a Arancha, Paloma, Lili y Martín, por su ayuda durante mi corta estancia, por los buenos ratos pasados.

Al SAS y al FIS por haber financiado la realización de esta tesis mediante los proyectos 05287 y 050399 respectivamente.

A todas las personas que han participado de alguna manera en la realización de esta tesis.

A César

A mis padres y hermanas

A Nines

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AA: Aminoácido

AICD: muerte celular inducida por activación

β_2 -m: beta2-microglobulina

CHOP: Ciclofosmida, Doxorubicina, Vincristina, Prednisona.

CID: Coagulación intravascular diseminada

CMV: Citomegalovirus

CPA: Célula presentadora de antígeno

CTL: Linfocitos T citotóxicos

CTLA-4: Molécula 4 asociada a linfocitos T

EBV: Virus de Epstein-Barr

FASL: Ligando de FAS

FISH: Hibridación in situ fluorescente.

HLA: Antígeno leucocitario humano

HTLV: Virus linfotrópico T humano

ICAM: Moléculas de adhesión de la familia de las integrinas

IL: Interleuquina

IFN- γ : interferón gamma

LGL: Leucemia de linfocitos grandes granulares

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

NCR: Receptor de citotoxicidad natural

NK: Célula asesina natural

NKG2D: Receptor activador de células NK y linfocitos T

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

SLPC: Síndrome linfoproliferativo crónico

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple

TCR: Receptor de la célula T

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TREC: Círculo de excisión del TCR

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	25
1.1 Síndromes linfoproliferativos T crónicos	25
1.2 Características inmunofenotípicas generales de los síndromes linfoproliferativos crónicos	25
1.2.1 Inmunofenotipo de los SLPC-T	28
1.2.1.1 Leucemia prolinfocítica T	29
1.2.1.2 Leucemia/linfoma T del adulto	29
1.2.1.3 Leucemia/linfocitosis clonal de linfocitos T grandes granulares	29
1.2.1.4 Síndrome de Sezary y Micosis fungoide	32
1.2.1.5 Linfadenopatía T angioinmunoblástica	33
1.2.1.6 Linfomas T periféricos NOS ("not otherwise classified")	33
1.2.1.7 Linfoma T extranodal, tipo nasal	33
1.2.1.8 Linfoma T intestinal	34
1.2.1.9 Linfoma T anaplásico de células grandes	34
2. Ontogenia de los SLPC-T	34
3. Leucemia/linfocitosis de linfocitos grandes granulares	38
3.1 Patogenia	38
3.2 Subtipos clínicos de LGL:	39
3.2.1 LGL indolente de células T	39
3.2.2 LGL-T clínicamente agresiva	42
3.2.3 LGL-NK	43
3.2.4 Leucemia agresiva de células NK	44
3.2.5 Linfoma T/NK extranodal, tipo nasal	44
3.2.6 Otras enfermedades linfoproliferativas relacionadas con las LGL	45
3.3 Tratamiento	46

4. El sistema HLA y la presentación antigénica	47
4.1 El complejo mayor de histocompatibilidad	47
4.1.1 Moléculas del MHC	47
4.1.1.1 Moléculas HLA de clase I	50
4.1.1.2 Moléculas HLA de clase II	53
4.2. Genes de la región HLA	54
4.2.1. Genes de la región HLA de clase I	56
4.2.2 Genes de la región HLA de clase II	56
4.2.3 Genes de la región HLA de Clase III	57
4.3 Otras moléculas implicadas en la activación y coestimulación de células T	58
4.4 Células presentadoras de antígeno	58
4.5 Procesamiento antigénico	60
4.5.1 Procesamiento de péptidos antigénicos endógenos	60
4.5.2 Procesamiento de péptidos antigénicos exógenos	62
5. El receptor para antígeno de las células T (TCR)	64
5.1 Estructura del TCR	64
5.2 Genes codificantes del TCR	66
5.3 Mecanismo de recombinación de los genes del TCR	68
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	71
III. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS	75

La descripción de los materiales y métodos empleados, así como los resultados obtenidos, se encuentran reflejados en los artículos originales:

Artículo 1.- Monoclonal TCR-V β 13.1+/CD4 ⁺ /NKa ⁺ /CD8 ^{-/+dim} T-LGL lymphocytosis: evidence for an antigen-driven chronic T-cell stimulation origin. Blood, 2007; 109 (en prensa).	77
Artículo 2.- Evaluation of the immunoregulatory functional polymorfisms in patients with monoclonal CD4 ⁺ /CD8 ^{-/+dim} T-LGL lymphocytosis. Immunogenetics, 2007 (Sometido a publicación).	78
IV. DISCUSIÓN	115
V. CONCLUSIONES	129
VI. BIBLIOGRAFÍA	133

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Síndromes linfoproliferativos crónicos T

Los síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC) T son neoplasias resultantes de la expansión clonal de linfocitos T maduros. Constituyen un grupo amplio y heterogéneo de entidades muy diferentes entre sí (Bartlett et al, 1999; Porcu et al, 2003). Su heterogeneidad clínico-biológica, aún dentro de cada grupo establecido en las últimas clasificaciones (Harris et al, 1997; Willemze et al, 2005), conjuntamente con su baja incidencia (en el mundo occidental representan alrededor del 10-15% de todos los SLPC) y el hecho de que los pacientes presentan un curso clínico con frecuencia indolente, han dificultado su caracterización en profundidad, tanto desde el punto de vista clínico como biológico.

Desde el punto de vista clínico, las dificultades existentes actualmente para una correcta caracterización de estas neoplasias quedan patentes en el hecho de que en los últimos años se han propuesto diferentes clasificaciones para los SLPC-T, ninguna de las cuales ha resultado plenamente satisfactoria. Recientemente se ha universalizado la clasificación REAL ("Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasms") propuesta en 1994 y, posteriormente revisada y actualizada por la OMS en 1997 (Harris et al, 1997); ambas se basan tanto en las características clínicas como en los estudios morfológicos, inmunofenotípicos y genéticos de las células tumorales para clasificar las distintas entidades. Además de su heterogeneidad, otro inconveniente que dificulta el estudio de los SLPC-T desde el punto de vista clínico, es que en muchos casos permanece oscura la naturaleza clonal de la expansión de linfocitos T, difuminándose con frecuencia la frontera entre los procesos reactivos (expansiones policlonales/oligoclonales) y las expansiones monoclonales (Dhodapkar et al, 1994; Kussick et al, 2002), conjuntamente con la carencia de criterios fenotípicos que nos ayuden a descartar o establecer con seguridad el diagnóstico de clonalidad ante una expansión de células T.

En la tabla 1 se recoge a modo de lista los distintos subgrupos de SLPC-T y NK definidos de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (Harris et al, 1997).

Tabla 1. Clasificación de la OMS/WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) de neoplasias linfoides T y NK.

Neoplasias de precursores de células T

- Linfoma/leucemia de precursores linfoblásticos T (leucemia aguda linfoblástica de precursores T)

Neoplasias de células T maduras (periféricas)

- Leucemia prolinfocítica de células T
 - Leucemia/linfocitosis clonal de linfocitos grandes granulares T
 - Leucemia agresiva de células NK
 - Leucemia/linfoma T del adulto (HTLVI+)
 - Linfoma de células NK/T, extranodal de tipo nasal
 - Linfoma intestinal de células T
 - Linfoma Hepatosplénico de células T
 - Linfoma T subcutáneo tipo paniculítico
 - Micosis fungoide/ Síndrome de Sezary
 - Linfoma T/NK anaplásico de células grandes, tipo linfoma T/NK primariamente cutáneo
 - Linfoma T periférico NOS (“not otherwise classified”)
 - Linfoma T angioinmunoblástico
 - Linfoma T/NK anaplásico de células grandes, primariamente sistémico
-

1.2 Características inmunofenotípicas generales de los síndromes linfoproliferativos crónicos

Inicialmente, tras la obtención de los primeros antisueros policlonales y el desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a células neoplásicas linfoides, se buscó con ahínco la identificación de antígenos específicos de tumor. No obstante, estudios posteriores confirmaron que las proteínas identificadas, estaban presentes también, en menor o mayor proporción, en células normales en distintos estadios madurativos (Kohler and Milstein, 1975; Margulies, 2005). Estos hallazgos llevaron al concepto de que desde el punto de vista fenotípico, las células neoplásicas de pacientes con distintas hemopatías malignas, incluidos los SLPC, reflejaban las características de células normales de distintas líneas linfoides, bloqueadas en estadios madurativos concretos (Jennings et al, 1997; Anderson et al, 1984). Así, a partir de entonces, los estudios inmunofenotípicos de SLPC han estado dirigidos a la identificación de aquellas características fenotípicas de las células neoplásicas que, por su similitud con las células normales, permitieran establecer la línea T, B o NK de la célula expandida y su correspondiente estadio madurativo. Más recientemente se ha constatado que, pese a las similitudes fenotípicas existentes respecto a los linfocitos normales, las células neoplásicas con frecuencia muestran alteraciones en los patrones de expresión de proteínas normales -fenotipos aberrantes- (Deneys et al, 2001; Sánchez et al, 2002; Chan et al, 1997 b; Wells et al, 1998). En los SLPC, estas alteraciones fenotípicas consisten habitualmente en: 1) expresión asincrónica de proteínas asociadas a maduración celular (asincronismos madurativos), 2) reactividad anormalmente elevada (sobre-expresión antigénica) o disminuida de un antígeno (sub-expresión antigénica) y/o 3) fenotipos asociados a características alteradas de dispersión de luz (FSC: dispersión frontal de luz o tamaño celular y; SSC: dispersión lateral de luz o complejidad interna de la célula). A diferencia de lo que ocurre en las leucemias agudas, en los SLPC, la expresión en las células neoplásicas de antígenos asociados a una línea celular distinta de la suya, constituye un hallazgo muy poco habitual (Deneys et al, 2001; Rawstron et al, 2001).

Así, en la actualidad la caracterización inmunofenotípica de los SLPC persigue la identificación, no solo de las similitudes existentes entre la célula neoplásica expandida y su contrapartida normal que permitan la identificación de la línea celular y estadio madurativo de la misma, sino también de sus diferencias (Orfao et al, 2004). Estudios recientes en neoplasias de precursores B y algunos subtipos de SLPC-B sugieren que la expresión alterada de antígenos asociados a distintos estadios madurativos en las células de pacientes con SLPC, podría reflejar las alteraciones genéticas subyacentes o anomalías en la comunicación entre la célula expandida y su micromedio ambiente (Orfao et al, 2004). Aunque disponemos de diferentes estrategias metodológicas para el estudio de las características fenotípicas de los SLPC, merece destacar que estas habitualmente proporcionan distinta información (Sanchez et al, 2002; Crotty et al, 1998; Di Giuseppe et al, 1998). Así, mientras que las técnicas de inmunohistoquímica permiten conocer el estado de diferenciación e infiltración tisular por parte de las células neoplásicas mediante su identificación con anticuerpos asociados a las distintas líneas linfoides, el empleo de análisis multiparamétricos por citometría de flujo debe considerarse el método de elección para el estudio de las características fenotípicas a nivel de células individuales, incluso en aquellos SLPC que infiltran de forma exclusiva órganos linfoides secundarios como los ganglios, bazo o la piel, entre otros. A continuación revisaremos de forma individualizada las características fenotípicas más relevantes de los distintos subtipos de SLPC-T siguiendo la clasificación de la OMS.

1.2.1 Inmunofenotipo de los SLPC-T

El conocimiento sobre las características fenotípicas de los SLPC-T, es, en la actualidad, más limitado que el de los SLPC-B. Ello se debe en gran medida a la menor frecuencia de este grupo de enfermedades y su mayor complejidad diagnóstica. A continuación se describen aquellos rasgos fenotípicos más característicos de los SLPC-T, con especial atención a los subgrupos diagnósticos que se asocian con leucemización, donde se dispone de una información mas detallada.

1.2.1.1 Leucemia prolinfocítica T

Los prolinfocitos T se caracterizan por presentar un fenotipo T ($CD2^+$, $CD3^+$, $CD5^+$) maduro (ausencia de expresión de $CD34$, Tdt y $CD1a$ junto a fuerte expresión de $CD45$) asociado de forma habitual a una expresión elevada de $CD7$ (San Miguel et al, 1995; Matutes et al, 1991). Además, estas células T generalmente muestran fenotipo $CD4^{+/-}CD8^{-}$, aunque se han descrito también fenotipos $CD4^{+}/CD8^{+}$ y $CD4^{-}/CD8^{+}$ en aproximadamente uno de cada cuatro y de cada diez casos, respectivamente (San Miguel et al, 1995; Matutes et al, 1991). Estas células muestran también reactividad intensa para $CD52$ (diana terapéutica), positividad débil y variable para $CD25$ y $HLADR$, junto a un fenotipo de linfocito T escasamente diferenciado ($CD28^{+}$).

1.2.1.2 Leucemia/linfoma T del adulto

La leucemia/linfoma T del adulto presenta un fenotipo T maduro correspondiente al de un linfocito T regulador $CD4^{+}/CD25^{++}$ (Harris et al, 1994; Yamaguchi et al, 1993). Junto con la expresión de marcadores pan-T como $CD2$ y $CD5$, con frecuencia las células T neoplásicas muestran expresión débil o incluso negatividad para $CD7$ y en menor medida, para $CD3$ y $TCR\alpha\beta^{+}$ (Shimoyama et al, 1991). El antígeno $CD8$, así como los marcadores asociados a célula citotóxica $CD57$, $CD56$, $CD11b$ y $CD11c$, son habitualmente negativos en las células T clonales de estos pacientes.

1.2.1.3 Leucemia/linfocitosis clonal de linfocitos T grandes granulares

Dentro de las leucemias/linfocitosis clonales de linfocitos T grandes granulares (LLGG-T) se incluye un grupo de entidades relativamente heterogéneas desde el punto de vista fenotípico. Así, mientras que en la mayoría de los pacientes las células T clonales expandidas muestran un

fenotipo $CD3^+/TCR\alpha\beta^+/CD8^+$, en una proporción significativa de casos los LLGG-T expandidos corresponden a células T $CD3^+/TCR\gamma\delta^+/CD4^-$ o a linfocitos T $CD3^+/TCR\alpha\beta^+/CD4^+$ asociado o no a expresión débil de CD8 (**Figura 1**). De forma excepcional se detectan expansiones clonales de células T con aspecto de linfocito grande granular $CD3^+/TCR\alpha\beta^+/CD8^-/CD4^-$ (Orfao et al, 2004).

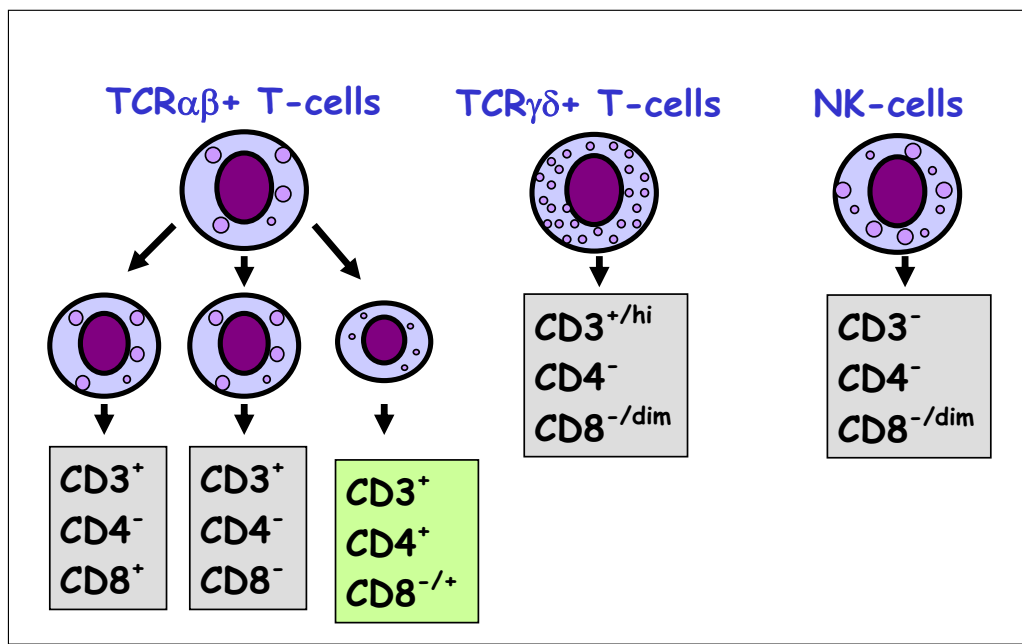


Figura 1. Diferencias en el inmunofenotipo de los distintos tipos de LGL-T

Habitualmente, las células T de pacientes con LGL muestran un fenotipo citotóxico efector, independientemente de su origen en distintas subpoblaciones de células T. Así, generalmente se detecta expresión intracitoplasmática de proteínas citotóxicas como granzima B y perforina, junto a una reactividad variable para las moléculas CD16, CD56, CD57, CD11c y CD94 (Lamy et al, 1998 b); así mismo, estas células habitualmente muestran un fenotipo citotóxico efector con expresión intensa de CD45RA en ausencia de reactividad para CCR7 y CD28, y positividad variable para CD45RO (Herling et al, 2004). Otras moléculas asociadas a células T como CD5, CD7 y CD2,

aunque son habitualmente positivas, muestran una intensidad de expresión variable, detectándose incluso en algunos pacientes dos o más subpoblaciones T patológicas con diferentes niveles de expresión para estos marcadores.

Un análisis más detallado de las características fenotípicas de cada uno de los distintos subgrupos de LGL-T, muestra la existencia de rasgos característicos en cada uno de ellos. Así, a modo de ejemplo, las LGL-T $CD3^+/TCR\alpha\beta^+/CD4^+$ se asocian de forma prácticamente constante con coexpresión de marcadores T como CD2 y CD5 (**Figura 2**), junto con reactividad para los antígenos CD56 y CD57 en ausencia de positividad para otros marcadores asociados a célula citotóxica como CD11c, CD11b, CD161, CD158 y CD94

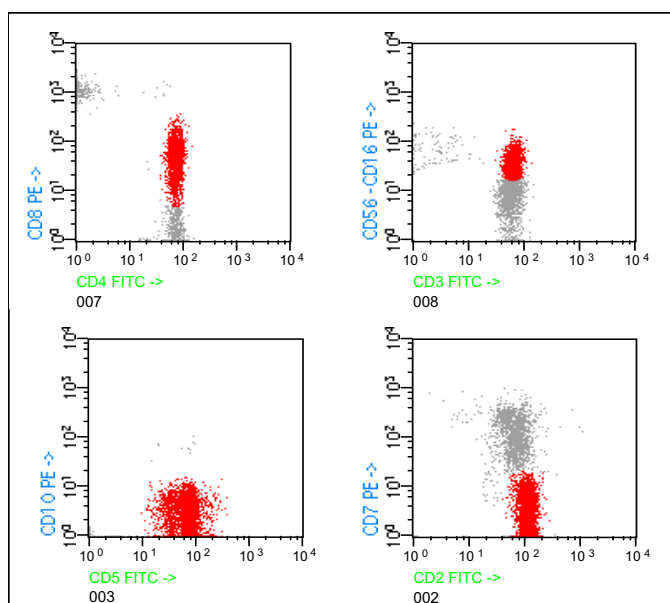


Figura 2. Inmunofenotipo de las expansiones monoclonales LGL-T- $CD4^+$

A su vez, las LLGG-T $CD3^+/TCR\gamma\delta^+/CD4^-$, se caracterizan por mostrar generalmente positividad para marcadores pan-T como CD2, CD5 y CD7 y expresión de intensidad variable para CD8 y CD57, en ausencia de reactividad

para CD16, CD56, CD11b y CD11c; de forma similar a lo que ocurre con las células T $\text{TCR}\gamma\delta^+$ de sangre periférica de adultos sanos, en las LLGG-T $\text{CD3}^+/\text{TCR}\gamma\delta^+$ se observa un predominio de expansiones $\text{TCRV}\gamma 9^+/\text{TCRV}\delta 2^+$ (Sandberg et al, 2006).

Respecto a los casos $\text{CD3}^+/\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD8}^+$, merece destacar que muestran un repertorio de receptores $\text{TCRV}\beta$ que resulta superponible en frecuencia, a la distribución normal de las distintas familias $\text{TCRV}\beta$ en células T CD8^+ (Langerak et al, 2001). Fenotípicamente, estos pacientes muestran expresión de antígenos pan-T habitualmente asociados a expresión variable de CD57, CD11c y CD56. La positividad para CD8 suele ser intensa en ausencia de reactividad para CD4 (Wlodarski et al, 2005).

1.2.1.4 Síndrome de Sezary y micosis fungoide

El linfocito T patológico de los pacientes con síndrome de Sezary y micosis fungoide muestra un fenotipo característico y superponible al de una célula T CD4^+ de memoria central (Lima et al, 2003 b). Generalmente (>95% de los casos), las células de Sezary muestran una expresión anormalmente baja de $\text{TCR}\alpha\beta/\text{CD3}$ (94%), CD4 (94%), CD7 (100%) y/o CD2 (83%) (Catovsky et al, 1995; Rozman et al, 1993). Este fenotipo, constituye un fenotipo aberrante característico de células neoplásicas que estaría ausente en los linfocitos T de pacientes con eritrodermias reactivas. Además, las células de Sezary muestran reactividad para el antígeno CD28^+ , CD45RO^+ , CCR7^+ (fenotipo de memoria central) y CD5^+ , en ausencia de expresión de marcadores asociados a células citotóxicas (CD8^- , CD56^- , CD57^- , CD11b^- , CD11c^- , CD161^- , CD158^- y CD94^- , entre otros). Pese a poseer rasgos fenotípicos característicos, en un mismo paciente, las células de Sezary con frecuencia muestran una importante heterogeneidad fenotípica, asociada muchas veces a la presencia de diferentes subpoblaciones de células T neoplásicas con diferente tamaño y complejidad (FSC y SSC), contenido de ADN (diploide y tetraploide) y fenotipo (por ejemplo: coexistencia de subpoblaciones celulares CD7^- y CD7^+) (Johnson et al, 1985; Limon et al, 1995).

1.2.1.5 Linfadenopatía T angioinmunoblástica

La linfadenopatía angioinmunoblástica T muestra habitualmente un fenotipo característico, similar en sangre periférica y ganglio linfático y caracterizado por la presencia de una o varias subpoblaciones de células T CD4⁺/CD8⁻ con expresión anormalmente disminuida y variable de CD3/TCR $\alpha\beta$ ⁺, asociada o no a una expansión numérica de tipo policlonal de las células B (Jones et al, 2001). De forma característica las células neoplásicas clonales de una importante proporción de estos pacientes muestran positividad para el antígeno CD10 (Baseggio et al, 2006).

1.2.1.6 Linfomas T periféricos NOS ("not otherwise classified")

Este subgrupo de linfomas T periféricos muestra una gran heterogeneidad en relación a la expresión de marcadores T, pudiendo ser positivos o negativos para los antígenos pan-T CD3, CD2, CD5 y CD7. Además, aunque existe un predominio de casos CD4⁺/CD8⁻ sobre los pacientes CD4⁻/CD8⁺, pueden detectarse también fenotipos CD4⁻/CD8⁻ (Lee et al, 2003; Jamal et al, 2001). Finalmente, suelen expresar la isoforma CD45RA del antígeno CD45, en ausencia de CD45RO. Dentro de este subgrupo se incluyen dos subtipos provisionales que se describen a continuación: el linfoma T hepatoesplénico gamma-delta, que se caracteriza por presentar un cuadro fenotípico en general superponible al de las expansiones clonales de linfocitos T $\gamma\delta$ tipo LLGG-T $\gamma\delta$ (CD3⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁺, CD2⁺ y CD7⁺ asociados a una expresión variable de CD5 y CD8) (Ahmad et al, 2005), y el linfoma T subcutáneo, tipo paniculítico.

1.2.1.7.- Linfoma T extranodal, tipo nasal

Tanto desde el punto de vista clínico como histopatológico el linfoma T extranodal, tipo nasal, muestra rasgos superponibles a los del linfoma extranodal tipo nasal de células NK. No obstante, desde el punto de vista

fenotípico las células neoplásicas son de estirpe T coexpresando habitualmente CD3 y TCR $\alpha\beta$ en el contexto de un fenotipo T/NK: CD7⁺, CD2⁺, CD8⁺ y CD56⁺ con coexpresión a nivel citoplasmático de proteínas asociadas a citotoxicidad (granzima⁺, perforina⁺) (Khosravi et al, 2005).

1.2.1.8. Linfoma T intestinal

De forma característica en el linfoma T intestinal se detecta una expansión de linfocitos T CD7⁺, CD3⁺/TCR $\alpha\beta$ ⁺ en ausencia tanto de CD4 como CD8 o con expresión débil de este último marcador (Wright et al, 1997). De forma característica las células T neoplásicas de estos pacientes coexpresan el antígeno CD103 (Yuan et al, 2003; Schmitt-Graff et al, 1996).

1.2.1.9 Linfoma T anaplásico de células grandes

El linfoma T anaplásico sistémico o de piel muestra un fenotipo característicamente CD30⁺, asociado a expresión variable de marcadores T como CD3, CD7, CD2, CD5 y CD25 (Willemze et al, 2003). Así mismo, pueden ser positivos o negativos en estos pacientes los antígenos EMA, CD15, CD43, CD45, CD45RO, en ausencia de CD68 citoplasmático.

2. ONTOGENIA DE LOS SLPC-T

En los últimos años se han logrado importantes avances en el conocimiento de las alteraciones genéticas y de los mecanismos moleculares que contribuyen a determinar el comportamiento clínico y pronóstico de muchas hemopatías malignas (Chen et al, 2002). Sin embargo, los logros alcanzados en la identificación de los factores involucrados en las etapas iniciales de desarrollo de estas enfermedades y en su transformación maligna, son mucho más limitados. Un claro ejemplo de ello son las gammopatías monoclonales de significado incierto (MGUS), en las que, pese a conocerse

desde hace más de 20 años, una proporción significativa de casos (alrededor de 30%) evolucionan a formas malignas de la enfermedad (Kyle, 1984; Kyle et al, 2002), siguen sin identificarse los factores que contribuyen a esa transformación maligna (Kyle et al, 2002). De forma similar, hoy se conoce que las leucemias de linfocitos grandes granulares (LGL) T/NK, pese a presentar un curso clínico indolente (Sokol et al, 2006), en ocasiones pueden asociarse a formas clínicamente agresivas (Sokol et al, 2006) o sufrir una transformación maligna que conlleva un desenlace fatal de la enfermedad (Lima et al, 2004), sin que se hayan podido identificar hasta la fecha los factores que intervienen en esta transformación maligna.

El conocimiento de los factores involucrados en las etapas de selección y expansión clonal que están en el origen de las neoplasias hematológicas y que serían anteriores a la transformación maligna, constituye un paso clave en la identificación de los mecanismos de supervivencia y/o ventaja proliferativa de las células clonales mediante los que éstas adquieren mayor propensión a sufrir una transformación neoplásica y/o evolución hacia un proceso maligno (Muñoz et al, 1997). En general, se sospecha que el desarrollo y transformación del clon neoplásico en estos procesos podría estar relacionado con la coincidencia de combinaciones concretas de factores hereditarios y ambientales, asociados a la ocurrencia de eventos de tipo genético que proporcionarían a la célula unas características alteradas y únicas de supervivencia, proliferación, capacidad de adhesión y diferenciación (Muñoz et al, 1997).

En este sentido, el origen de los síndromes linfoproliferativos crónicos con frecuencia se ha asociado a la participación de agentes infecciosos, especialmente de virus (Jarrett et al, 2006). Así, la leucemia/linfoma T del adulto, constituyó el primer modelo de tumor maligno en el que se identificaba un agente infeccioso, el virus HTLV-I, como agente causal de la enfermedad (Matsuoka et al, 2005). Posteriormente, la infección por otros virus como el virus de Epstein-Barr (EBV) o el virus herpes humano tipo 8 (HHV8), se ha asociado también de forma directa con otras hemopatías linfoides como el linfoma de Burkitt, el linfoma de Hodgkin, los linfomas de pacientes inmunodeprimidos, el linfoma T/NK nasal o tipo nasal y las leucemias agresivas de células NK en regiones geográficas concretas en el caso del EBV (Rickinson

et al, 2001) y los linfomas de cavidades en el caso del HHV8 (Rickinson et al, 2001; Nador et al, 1996). Por otra parte, recientemente se ha sugerido la existencia de una mayor frecuencia de linfomas de bajo grado, tipo linfoma de zona marginal, en sujetos infectados con el virus de la hepatitis C (HCV) (Mazzaro et al, 2005). No obstante, sigue existiendo una gran controversia tanto en relación con esta última asociación (Rickinson et al, 2001), como con la que involucraba al virus SV40 en la patogenia de algunos linfomas no-Hodgkin (Rickinson et al, 2001; Vilchez et al, 2002).

De forma paralela, se han identificado otras asociaciones entre agentes infecciosos y neoplasias linfoides periféricas (maduras) (Parsonnet et al, 2004; Rajkumar et al, 2002), siendo la relación encontrada entre la infección por *Helicobacter pylori* y los linfomas MALT gástricos, la más notoria de todas ellas (Parsonnet et al, 2004). En este caso, se pone de manifiesto la posibilidad de que en la ontogenia de las neoplasias de células linfoides maduras/periféricas se vean implicados complejos mecanismos relacionados con la respuesta inmune frente a microorganismos y/o autoantígenos. Así, hallazgos recientes sugieren que el reclutamiento y activación de linfocitos T específicos de *Helicobacter pylori* a los tejidos infectados (p.ej.: mucosa gástrica) (Hussell et al, 1996) proporcionaría las señales necesarias para la expansión de linfocitos B activados presentes en el entorno y específicos de distintos antígenos propios de la mucosa gástrica (Hussell et al, 1993); la cronificación de este proceso a nivel local conduciría a una selección y expansión clonal de linfocitos B, como paso previo a la adquisición de las lesiones genéticas características del linfoma MALT (Parsonnet et al, 2004; Isaacson et al, 2005). No obstante, hallazgos recientes en pacientes con linfoma de zona marginal esplénica, sugieren la existencia de una asociación entre la selección en las células B clonales de algunas familias IgVH (VH1-02) y el HLA del individuo (HLADR15) (Little et al, 2006), indicando que la expansión B y la respuesta T podrían estar directamente vinculadas entre ellas, a través de un estímulo antigénico relacionado. De acuerdo con esta hipótesis, merece destacar que en diferentes síndromes linfoproliferativos crónicos B como la leucemia linfática crónica B (LLC-B) (Stamatopoulos et al, 2007; Hamblin et al, 1999), con frecuencia se observa un uso estereotipado o restringido de familias IgVH, asociado a la existencia de cambios puntuales en la secuencia de aminoácidos de la región

de reconocimiento antigénico del receptor de célula B para antígeno (BCR), debidos a fenómenos de hipermutación somática. En su conjunto, estos hallazgos apoyarían la hipótesis de que el origen de estas neoplasias podría estar asociado a un reconocimiento y respuesta anómala/persistente a estímulos antigénicos, mediados por el BCR.

En el caso de las LGL-T/NK, siguen sin identificarse los mecanismos implicados en la ontogenia de la enfermedad. Algunos estudios han sugerido la posibilidad de que, al igual que sucede en otras neoplasias T y NK (Kanavaros et al, 1995), pudiera existir también una asociación con infecciones víricas (Sokol et al, 2006; Loughran et al, 1992), aunque esto no ha podido ser confirmado de forma definitiva (Sokol et al, 2006; Loughran et al, 1996). Así mismo, en la actualidad se desconoce la posible existencia de otros factores genéticos y/o ambientales que pudieran favorecer el desarrollo y/o transformación de este grupo de neoplasias (Sokol et al, 2006). No obstante, teniendo en cuenta el papel clave que desarrollan las células T en la respuesta frente a agentes extraños, desde hace tiempo se ha postulado que una estimulación antigénica crónica podría constituir una circunstancia básica que favoreciera la emergencia y expansión de un clon de células T (Wlodarski et al, 2005). De acuerdo con ello, estudios previos han implicado la estimulación crónica ejercida por superantígenos bacterianos de algunos microorganismos como el estafilococo, en la patogenia de algunos síndromes linfoproliferativos crónicos T, como la micosis fungoide y el síndrome de Sezary (Tokura et al, 1995; Linnemann et al, 2004). Más recientemente, se ha sugerido la posibilidad de que en el origen de las LGL-T CD8⁺ estuvieran implicados antígenos propios (Porcu et al, 2003), lo que podría contribuir a explicar la asociación de esta entidad con neutropenia, artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes (Sokol et al, 2006); de acuerdo con ello, en algunos pacientes con LGL-T CD8⁺ asociada a enfermedad de Graves o tiroiditis de Hashimoto, se ha evidenciado la existencia de infiltrados de linfocitos grandes y granulares en el tiroides, aunque no se ha establecido de forma definitiva su naturaleza clonal (Dhodapkar et al, 1994).

3. Leucemia/linfocitosis de linfocitos grandes granulares

La leucemia de linfocitos grandes granulares (LGL) es un tipo de expansión clonal linfoproliferativa derivada tanto de células Natural Killer (NK) como de células T, descrita por primera vez hace más de 20 años (Loughran et al, 1985) e incluida recientemente en la clasificación de tumores hematopoyéticos de tejidos linfoides de la Organización Mundial de la Salud (WHO) (Epling-Burnette et al, 2003) como una entidad clínico-patológica bien definida y distinta de otros síndromes linfoproliferativos crónicos. No obstante, hoy sabemos que las LGL constituyen un grupo de SLPC clínica y ontogénicamente heterogéneo donde se incluyen formas indolentes y agresivas de LGL de células T y NK (Aleksun et al, 2007 a).

3.1 Patogenia

En la actualidad la etiología de las LGL, sigue siendo poco conocida. Entre otros factores se ha sugerido la posible implicación de estímulos antigénicos crónicos derivados de agentes exógenos como el virus linfotrófico T humano (HTLV) o autoantígenos endógenos, pudieran ser los responsables de inducir la activación de linfocitos grandes granulares CD8⁺ efectoras (Chan et al, 2001). Esta hipótesis estaría apoyada por hallazgos recientes basados en la caracterización de la región CDR3 de la cadena β del TCR, que sugieren la posible existencia de una selección clonal de las células neoplásicas en pacientes con Leucemia LGL de células T mediada por un estímulo antigénico común (Wlodarski et al, 2005). Este estímulo, sería en definitiva clave en la expansión de las células neoplásicas. El papel exacto de las infecciones retrovirales como agente etiológico en las LGL sigue sin poder establecerse de forma definitiva (Loughran et al, 1992,1994 ,1998; Aleksun et al, 2007 a). Así en la actualidad se conoce que la mayoría de los pacientes con LGL de células T no están infectados ni con HTLV-I ni con HTLV-II, si bien con frecuencia presentan reactividad seroindeterminada frente a pequeños péptidos derivados de la proteína p21e del HTLV-I (Loughran et al, 1998). Hasta la fecha, sólo se han descrito dos pacientes en los que se detectaron secuencias de HTLV-II. A diferencia de lo que ocurre en la LGL, en la leucemia agresiva de

células NK sí parece existir una asociación clara entre la expansión maligna y el virus de Epstein-Barr (EBV), al menos en Asia, habiéndose postulado éste, como un factor clave en el desarrollo de esta enfermedad.

Otro posible mecanismo implicado en la patogénesis de las LGL indolentes de células T, es la inhibición de la apoptosis asociada a un aumento de la supervivencia y acumulación de células leucémicas (Epling-Burnette et al, 2003). En el proceso normal de eliminación células T citotóxicas éstas mueren habitualmente por apoptosis mediada por Fas (Liu et al, 2000). Las células leucémicas de las LGL expresan niveles elevados tanto de Fas como del ligando de Fas, junto a una concentración incrementada en suero de Fas soluble (Epling-Burnette et al, 2001). Distintos estudios sugieren que la producción de una elevada concentración de Fas soluble por parte de las células leucémicas, podría bloquear la apoptosis mediada por Fas de las células neoplásicas y contribuir a su acúmulo, actuando como un factor patogénico de estos trastornos. En este sentido diferentes autores han demostrado la existencia de una correlación entre la actividad de la enfermedad y los niveles de ligando de Fas, que disminuyen notablemente en pacientes tratados con éxito con inmunosupresores (Liu et al, 2000; Saitoh et al, 2000) (Lamy et al, 1998 a; Schade et al, 2006 a).

En este apartado de la introducción revisaremos los aspectos más relevantes de las LGL-T agrupadas de acuerdo a su comportamiento diverso, independientemente del tipo de célula T implicada en su ontogenia. Así mismo comentaremos los aspectos más relevantes de las LGL-NK, la leucemia agresiva NK, el linfoma T/NK extranodal tipo nasal y otros SLPC relacionados.

3.2 Subtipos clínicos de LGL

3.2.1 LGL indolente de células T

Aunque la mayoría de los casos de LGL presentan un comportamiento clínico indolente, aproximadamente el 60% de los pacientes se vuelven sintomáticos y requieren una actitud terapéutica activa, a lo largo del curso evolutivo de la enfermedad (Pandolfi et al, 1990; Lamy et al, 2003). Desde el

punto de vista hematológico la mayor parte de los pacientes presentan un conteo absoluto de linfocitos LGL superior a 2×10^9 /L (rango normal: $0.2-0.4 \times 10^9$ /L), junto con neutropenia (80%) que puede ser severa ($< 0.5 \times 10^9$ /L) en casi la mitad de los casos ($\approx 45\%$). Los casos de neutropenia en una proporción significativa de se asocian a otras citopenias (anemias y trombopenias) observándose incluso aplasia pura de células rojas en un pequeño porcentaje de casos.

Como consecuencia de las neutropenias son comunes las infecciones recurrentes como manifestación clínica inicial de la enfermedad. Se trata habitualmente de infecciones bacterianas mucocutáneas, siendo poco frecuente el desarrollo de infecciones por gérmenes oportunistas.

Así mismo, la presencia de esplenomegalia se detectó en una proporción variable de casos (20-50%) (Sokol et al, 2006; Lamy et al, 1998 b). Las enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, ocurren en el 25-35% de estos pacientes mientras que otros trastornos autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico, la tiroiditis de Hashimoto se presentan con menor frecuencia (Starkebaum et al, 2002). De forma similar anomalías serológicas inmunes como la existencia de factor reumatoide, anticuerpos antinucleares e inmunocomplejos circulantes se detectan en 40-60% de los pacientes (Lamy et al, 1998 b). Una posible disregulación en el funcionamiento de las células B, asociado a la presencia de LGL y a la producción de citoquinas proapoptóticas y proinflamatorias se postula como el probable responsable del incremento de la autoinmunidad en estos pacientes (Bassan et al, 1989; Kothapalli et al, 2005).

El diagnóstico de las formas indolentes de LGL se basa habitualmente en hallazgos de laboratorio: presencia de linfocitosis a expensas de células LGL con inmunofenotipo característico y reordenamiento clonal de los genes TCR β y γ (Sokol et al, 2006). Morfológicamente, las células neoplásicas muestran un tamaño intermedio-grande con abundante citoplasma y gránulos azurófilos y núcleo excéntrico (**Figura 3**). Característicamente estas células coexpresan los marcadores CD3⁺, CD8⁺, CD57⁺, junto a TCR de tipo $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$), o menos frecuentemente $\gamma\delta$. No obstante algunos casos presentan coexpresión de otros fenotipos menos habituales consistentes en CD3⁺, CD4⁺,

CD8⁺, CD57⁺ y TCR $\alpha\beta$, positividad simultánea para CD3⁺, CD4⁺, CD57⁺ TCR $\alpha\beta$, en ausencia de CD8. (Lamy et al, 1998 b; Sandberg et al, 2006; Semenzato et al, 1997). Clásicamente para el estudio de clonalidad T se han empleado técnicas moleculares. Así se utilizan técnicas de Southern blott para el estudio de genes TCR β , PCR para el estudio de reordenamientos TCR γ y la reacción de la transcriptasa inversa seguida de PCR (RT-PCR) para el análisis del repertorio V β . Recientemente se ha demostrado que los límites de detección (sensibilidad) de estas técnicas oscila, siendo menor para las de Southern blott (5-10%) respecto a las técnicas de PCR (1-5%). Otros estudios (Sandberg et al, 2006; Langerak et al, 2001; Lima et al, 2001) demuestran la utilidad del análisis inmunofenotípico del repertorio TCRV β y TCR V γ /V δ en la identificación de clonalidad en distintos procesos asociados a linfocitosis T, incluidas las expansiones LGL. La sensibilidad de esta nueva aproximación al estudio de clonalidad se incrementa de forma notable cuando el análisis del repertorio TCR se lleva a cabo de forma específica sobre poblaciones fenotípicamente aberrantes (Langerak et al, 2001).

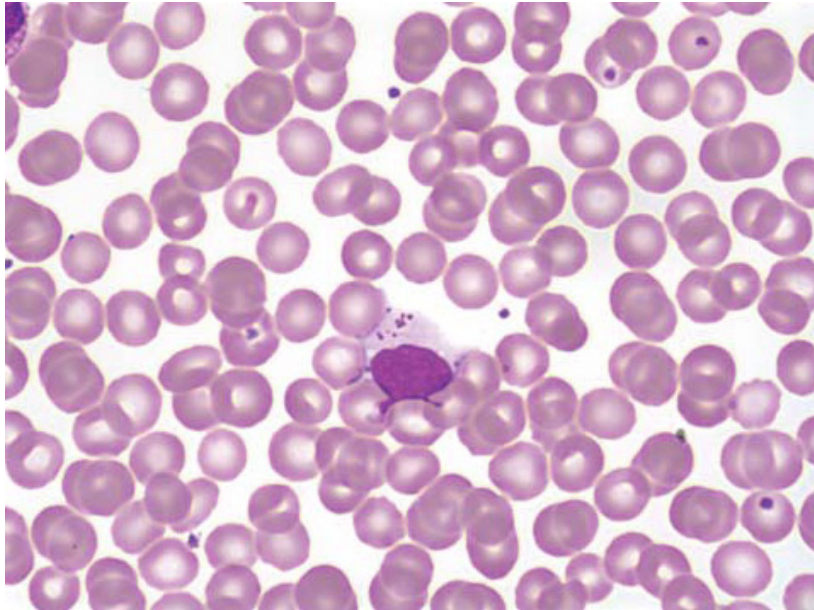


Figura 3. Extensión de sangre periférica (x 1000) teñida con Giemsa donde se ilustra el aspecto morfológico característico de un linfocito grande granular en sujetos con leucemia LGL -T.

3.2.2 LGL-T clínicamente agresiva

Las formas de LGL-T clínicamente agresivas constituyen una entidad rara que se diferencian de la forma indolente en el comportamiento clínico y pronóstico de la enfermedad, requiriendo habitualmente una actitud terapéutica distinta (Alekhshun et al, 2007 b). Esta entidad afecta a adultos jóvenes, con una mediana de edad de 41 años (rango de 9 a 64 años), sin predilección aparente por etnia alguna. Dada su escasa frecuencia y el reducido número de casos descritos esta entidad no ha sido reconocida aún por la clasificación de la WHO como una neoplasia linfoproliferativa independiente (Gentile et al, 1994; Passetto et al, 2000).

De forma similar a lo que ocurre en las formas indolentes, la patogénesis de la LLG-T agresiva sigue siendo desconocida. Se ha especulado que podría tratarse de la evolución de algunas formas indolentes de la enfermedad (Tordjman et al, 1996), aunque la mayoría de los casos descritos son formas de

novo. Clínicamente se caracteriza por presentar síntomas B progresivamente más manifiestos, tales como hepatoesplenomegalia asociada a linfadenopatías, linfocitosis con grado variable de anemia y trombocitopenia. El pronóstico de estos pacientes en general es malo, con una supervivencia global que habitualmente oscila entre unos pocos meses a 2 años.

El diagnóstico se establece en base al inmunofenotipo característico ($CD3^+$, $CD8^+$, $CD56^+$, $TCR\alpha\beta^+$) de la mayor parte de estos pacientes y la demostración de la existencia de reordenamientos clonales de $TCR\beta$ y/o $TCR\gamma$ en el contexto de un cuadro clínico característico en el se observan síntomas B, hepatoesplenomegalia, citopenias periféricas y linfadenopatías (Alekhshun et al, 2007). En contraposición a las formas indolentes de LGL-T, que generalmente carecen de expresión de $CD56$, las células neoplásicas de estos pacientes muestran un inmunofenotipo $CD56^+$. El pronóstico es en general malo, con escasa respuesta al tratamiento quimioterápico.

3.2.3 LGL-NK

Aproximadamente el 5% de las LGL son de origen NK, conociéndose también este subtipo de LGL como linfocitosis crónica de células NK o linfocitosis LGL de células NK. Afecta a personas con una edad media en torno a los 50 años y con una mayor predilección por varones aunque la etiología y patogenia de la LGL-NK sigue siendo incierta, se ha postulado un posible origen viral (Loughran et al, 1997; Zambello et al, 1995).

Desde el punto de vista clínico, se manifiesta por elevaciones persistentes de LGL asociadas a fiebre, hepatoesplenomegalia y/o linfadenopatías. Las citopenias son menos frecuentes que en la LGL-T y suelen ser leves o moderadas (Tefferi et al, 1994). No obstante, el diagnóstico definitivo de LGL-NK, puede ser difícil de establecer debido a la ausencia en la mayoría de los casos de marcadores de clonalidad. En este sentido la expresión alterada de tres familias de antígenos diferentes incluidos los receptores KIR (receptor similar a killer-immunoglobulin), los receptores de lectina tipo C y los receptores de citotoxicidad natural (NCR) ha sido observada en algunos de estos pacientes respecto a la observada en subpoblaciones NK normales (Epling-Burnette et al, 2004; Zambello et al, 2003). Así, el uso de un panel de anticuerpos frente a algunos subtipos de estos receptores podría ser

útil para diferenciar entre verdaderas LGL-NK y una linfocitosis NK reactiva. Así mismo, recientemente se ha demostrado la naturaleza clonal de las linfocitosis crónicas NK en las que las células expandidas muestran un fenotipo aberrante asociado a una expresión anormalmente descendida de CD56 (Lima et al, 2004). En ausencia de un marcador universal de clonalidad la persistencia de una linfocitosis de NK durante más de 6 meses se ha establecido como criterio arbitrario para el diagnóstico de una linfocitosis crónica NK (Lamy et al, 1998 b).

3.2.4 Leucemia agresiva de células NK

La leucemia agresiva de células NK es una neoplasia a expensas de células CD3⁻ NK con muy mal pronóstico y un comportamiento clínico agresivo, incluso fulminante. Se trata de un proceso más frecuente en pacientes jóvenes, especialmente en Asia, con una edad media de presentación de 39 años y con una distribución similar en varones y mujeres (Chan et al, 1992).

Estudios recientes demuestran una clara relación entre esta enfermedad y el virus de Epstein-Barr (EBV), pudiendo éste estar implicado en la patogénesis de la enfermedad (Chan et al, 2001).

Clínicamente se manifiestan de forma aguda con síntomas B, organomegalias y citopenias, a veces acompañadas de fallo multiorgánico y coagulación intravascular diseminada (CID). Las células neoplásicas muestran un fenotipo NK característico CD2⁺, CD3⁻, CD56⁺, perforina⁺, granzima⁺, en ausencia de expresión de CD57, que suele infiltrar de forma difusa la médula ósea. La quimioterapia sistémica suele ser inefectiva en estos pacientes.

3.2.5 Linfoma T/NK extranodal, tipo nasal

El linfoma extranodal nasal/tipo nasal de células NK, representa una entidad rara en nuestro entorno, asociada en la mayoría de los casos a infección por virus de Epstein-Barr (EBV) (Khosravi et al, 2005; Ho et al, 1990; Chim et al, 2004; Lee et al, 2005). Histológicamente se observa un infiltrado

pleomórfico a nivel de la lesión tumoral con destrucción vascular y necrosis asociada (Khosravi et al, 2005; Ho et al, 1990; Chim et al, 2004; Lee et al, 2005). Fenotípicamente, las células NK neoplásicas muestran rasgos típicos de células NK, tanto a nivel citoplasmático (TIA1⁺, granzima⁺, perforina⁺) como de membrana (CD56⁺, CD16^{-/+}, CD7⁺, CD2⁺, CD3⁻) asociado o no a expresión de CD30, habitualmente en ausencia de reactividad para CD57 (Kwong et al, 2005; Gniadecki et al, 2004).

Tanto desde el punto de vista clínico como histopatológico el linfoma T extranodal tipo nasal muestra rasgos superponibles a los del linfoma NK extranodal tipo nasal de células NK, como se describe brevemente más adelante. No obstante, desde el punto de vista fenotípico las células neoplásicas son de estirpe T coexpresando habitualmente CD3 y TCR $\alpha\beta$ en el contexto de un fenotipo T/NK: CD7⁺, CD2⁺, CD8⁺ y CD56⁺ con coexpresión a nivel citoplasmático de proteínas asociadas a citotoxicidad (granzima⁺, perforina⁺) (Khosravi et al, 2005).

3.2.6 Otras enfermedades linfoproliferativas relacionadas con las LGL

Con relativa frecuencia la realización de un trasplante, va seguida del desarrollo y expansión de desórdenes linfoproliferativos. La mayoría de los desórdenes linfoproliferativos que tienen lugar tras un trasplante de progenitores hemopoyéticos u órgano sólido son neoplasias de células B asociadas con infección por EBV. De los trastornos linfoproliferativos T/NK descritos, la mayoría son neoplasias NK malignas, falleciendo casi todos los pacientes en un corto período de tiempo pese al tratamiento quimioterápico. No obstante en distintas series se ha descrito la existencia de expansiones LGL tras un trasplante de progenitores hemopoyéticos. Habitualmente, estas expansiones son de tipo oligoclonal y presentan un comportamiento clínico benigno (Gorochov et al, 1994; Dolstra et al, 1995). Según Mohty y colaboradores las expansiones LGL serían más frecuentes en pacientes que han recibido regímenes de acondicionamiento de baja intensidad, y se asociarían con infecciones virales recurrentes, especialmente CMV, y una mayor tasa de remisiones completas en pacientes con neoplasias

hematológicas malignas (Mohty et al, 2002); además podrían estar asociados también con el desarrollo de citopenias autoinmunes.

A su vez en pacientes que han recibido un trasplante renal (Gentile et al, 1998) y hepático (Feher et al, 1995) se ha constatado también la aparición de desórdenes linfoproliferativos asociados a expansiones indolentes de LGL y terapias inmunosupresoras. Especial mención merece la observación de Gentile y colaboradores al constatar el desarrollo de expansiones LGL monoclonales tras alotrasplante renal en tres de sus pacientes, ninguno de los cuales requirió tratamiento para su trastorno linfoproliferativo (Gentile et al, 1998).

3.3 Tratamiento

Habitualmente, un tercio de los pacientes con LGL no requieren terapia y sólo precisan un seguimiento periódico (Pandolfi et al, 1990). En las restantes LGL, los requerimientos terapéuticos están habitualmente relacionados con las complicaciones de la enfermedad derivadas de las citopenias como infecciones, anemia sintomática o trombocitopenia, y la aparición de síntomas B severos. Aunque sigue sin existir un protocolo de tratamiento estandarizado, en los últimos años se han puesto en marcha algunos ensayos clínicos con el objeto de evaluar la eficacia de diferentes fármacos y protocolos terapéuticos. Como primera línea puede emplearse metotrexate a bajas dosis (10 mg/m² a la semana), ciclofosfamida (50-100 mg oral/diario) o ciclosporina A (5-10 mg/kg/diario). Se recomienda un mínimo de 4 meses de tratamiento antes de decidir interrumpir el tratamiento o cambiar a una segunda línea. La monoterapia con prednisona (1mg/kg/día) no es eficaz, y se usa asociada a las terapias antes descritas.

En caso de fracaso terapéutico se emplean como segunda línea análogos de nucleótidos como la fludarabina, 2-deoxicoformicina y 2-cloroxiadenosina, o bien terapia con anticuerpos anti CD52 (Mercieca et al, 1994; Osuji et al, 2005).

El trasplante autólogo o alogénico de progenitores hemopoyéticos se ha empleado de forma esporádica en pacientes jóvenes en casos refractarios a la quimioterapia convencional. En el caso de la leucemia agresiva de células NK,

la quimioterapia tipo CHOP ha demostrado ser ineficaz, habiéndose empleado otras líneas más agresivas como la usada en la leucemia aguda linfoblástica acompañada de profilaxis del sistema nervioso central, con escasas respuestas.

4. EL SISTEMA HLA Y LA PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA

4.1 El complejo mayor de histocompatibilidad

Las moléculas asociadas a la presentación antigénica están constituidas por sistemas polimórficos y poligénicos de los que las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) también denominadas antígenos leucocitarios humanos o HLA, son las más conocidas. El descubrimiento de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) data de principios de los años 50 y fueron descritos en el hombre por la reacción de leucoaglutinación que tenía lugar al enfrentar el suero de pacientes politrasfundidos con leucocitos extraños. Las moléculas del MHC son glicoproteínas que aparecen en la membrana de la mayoría de las células nucleadas de todos los vertebrados. Su expresión en superficie en combinación con el antígeno permite su reconocimiento por los linfocitos T.

4.1.1. Moléculas del MHC

En humanos estas moléculas reciben la denominación de moléculas HLA (Human Leukocyte Antigen). Distintos ensayos celulares y serológicos han permitido describir la existencia de dos grandes grupos de moléculas HLA: HLA de clase I y HLA de clase II. El primero de ellos, HLA de clase I, está representado en el hombre por las moléculas clásicas HLA-A, -B, -C (**Figura 4a**); el segundo, HLA de clase II, incluye las moléculas HLA -DP, -DQ, -DR (**Figura 4b**).

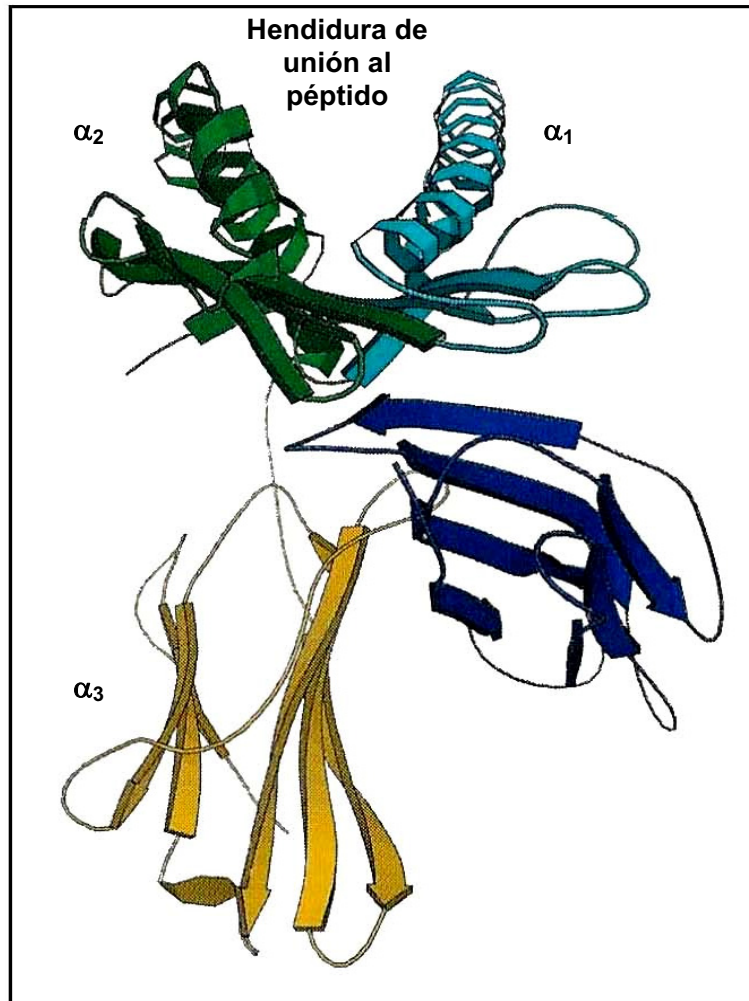


Figura 4a.- Estructura de la molécula HLA de clase I.

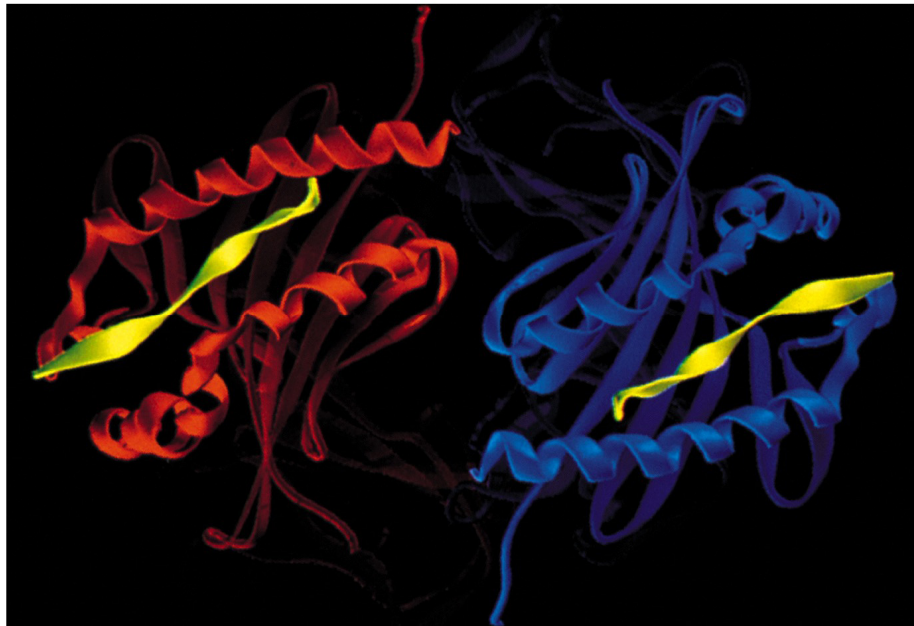


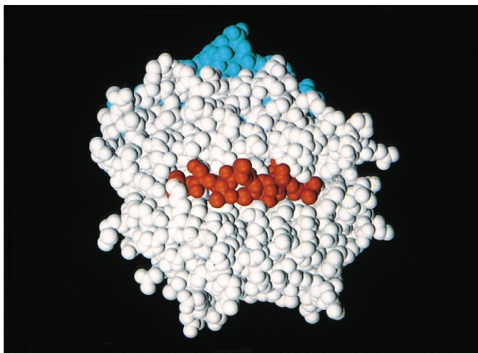
Figura 4b.- Estructura de la molécula HLA de clase II.

4.1.1.1 Moléculas HLA de clase I

Los antígenos de histocompatibilidad de clase I comprenden las moléculas clásicas (clase Ia) HLA-A, -B, -C (Bjorkman and Parham, 1990) y las no clásicas (clase Ib) HLA-E, -F, -G (Shawar et al, 1994). Todas son glicoproteínas de la superficie celular de dos subunidades asociadas de forma no covalente (Cresswell et al, 1973); se componen de una cadena transmembrana y polimórfica de 45 KD (cadena pesada o cadena α) y de una proteína no polimórfica de 12 KD, la β_2 -microglobulina (β_2 -m), no anclada a la membrana celular. El péptido antigénico se ensambla con esta estructura, formándose así el complejo HLA de clase I.

La cadena pesada contiene aproximadamente 340 aminoácidos organizados en tres regiones: extracelular, transmembrana e intracitoplásmica. La región extracelular se divide en tres dominios (α_1 , α_2 y α_3) de aproximadamente 90 aminoácidos cada uno. El polimorfismo en la cadena pesada reside en los dominios α_1 y α_2 , cada uno de los cuales contiene una región altamente polimórfica, estas dos regiones unidas forman la gruta de unión al péptido antigénico (**Figura 5**).

(a) **Class I MHC**



(b) **Class II MHC**

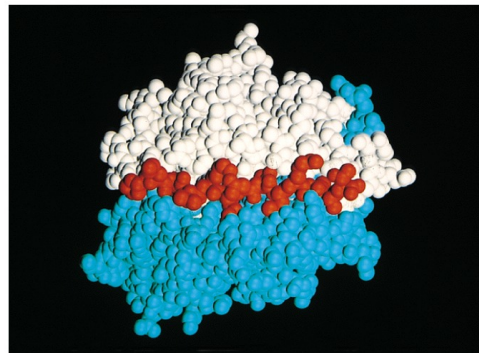


Figura 5. Estructura tridimensional de los complejos moleculares péptido/HLA de clase I (a) y II (b).

El otro componente de las moléculas HLA de clase I, lo constituye la proteína β_2 -microglobulina, que es un polipéptido soluble de unos 12 KD. En contraste con la cadena α , β_2 -m no exhibe polimorfismos dentro de la especie humana o incluso entre especies. La cadena β_2 -m es una proteína extracelular, asociánda de forma no covalente con el dominio α_3 de HLA-I. β_2 -m no tiene zona de unión al péptido transmembrana, o una región citoplásmica propia, y no contacta con la superficie celular. La considerable homología de los dominios β_2 -m y α_3 les permite emparejarse para mantener la conformación global de la molécula del MHC de clase I. β_2 -m también realiza contactos con determinadas regiones de los dominios α_1 y α_2 que son importantes para la estabilidad de la molécula MHC. Además β_2 -m tiene importantes funciones en el transporte intracelular de las moléculas del MHC de clase I. La asociación temprana de la cadena β_2 -m a la cadena α en el retículo endoplásmico tras su síntesis, constituye un evento esencial en el transporte del heterodímero completo a la superficie celular. Diversos estudios han puesto de manifiesto cómo en ausencia de la cadena β_2 -m, aunque el gen de la cadena α se transcriba, sólo un pequeño número de moléculas MHC de clase I son capaces de alcanzar a expresarse en la superficie celular.

El péptido, formado por unos 8-10 aminoácidos, participa en el ensamblaje de la molécula de HLA de clase I y proporciona estabilidad al conjunto, de manera que las moléculas HLA de clase I vacías son inestables (Elliot et al, 1991). Así, la gruta formada por los dominios α_1 y α_2 , donde se anclará el péptido, será la zona reconocida por el receptor de las células T (TCR).

La zona de unión al péptido en la molécula MHC de clase I (**Figura 6**) es una gruta en la cual se acomoda un péptido de unos 8-10 aminoácidos. El anclaje permite a su porción media anclarse hacia el exterior de la molécula HLA-I. Esta gruta está constituida por yuxtaposición e interacción de los dominios α_1 y α_2 . El fondo de dicha gruta es una región relativamente plana constituido por ocho fragmentos antiparalelos de α_1 y α_2 , mientras que los extremos están constituidos de dos α hélices paralelas, una de las cuales deriva de α_1 y la otra de α_2 . El dominio α_3 puede ser proteolíticamente degradado sin afectar a la gruta de unión al péptido, lo que indica que no juega

un papel en la unión peptídica propiamente dicha. Aunque primariamente interacciona con el dominio $\alpha 3$, $\beta 2$ -m también interacciona con los aminoácidos de $\alpha 1$ y $\alpha 2$ que forman el fondo de la gruta de unión peptídica. De hecho, estas uniones son más estrechas cuando la gruta está ocupada por un péptido, estabilizando aún más la estructura global del MHC.

El péptido es sostenido en la gruta mediante interacciones entre los residuos de la molécula MHC de clase I y los extremos terminales del péptido N y C. Pequeños bolsillos de unión se unen a determinados residuos anclados en los extremos del péptido para sostenerlo dentro del surco. Los residuos anclados del péptido, habitualmente los dos primeros y los dos últimos aminoácidos, se localizan entre las hélices de $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Existe un cierto grado de flexibilidad conformacional que permite que variaciones relativamente amplias en la secuencia de aminoácidos entre los anclajes de los residuos puede encajar en la gruta, confiriéndole una amplia variedad al surco de unión del MHC. Los extremos del surco del MHC de clase I están cerrados, lo que significa que péptidos con un tamaño superior a 8-10 aminoácidos sólo encajan si sus residuos centrales pueden protuir dentro de la gruta. Es esta protusión central de los residuos la que determina el grado de afinidad con el cual el TCR se une al complejo péptido-MHC.

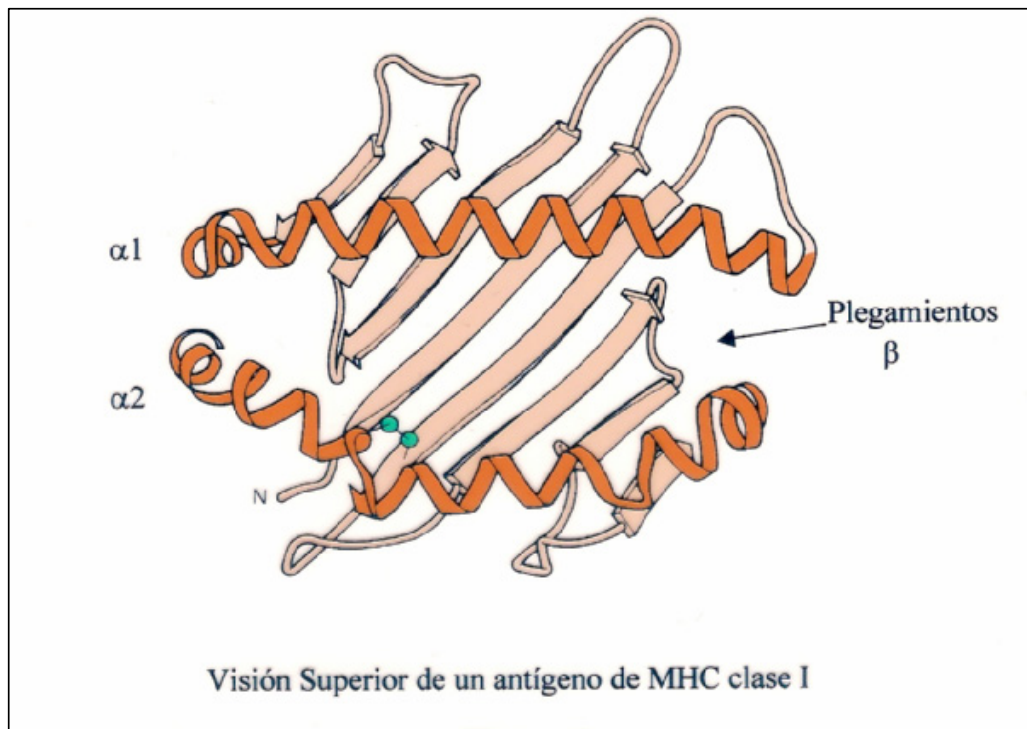


Figura 6. Estructura de las moléculas MHC de clase I: gruta de unión al péptido.

4.1.1.2 Moléculas HLA de clase II

El MHC de clase II se expresa de forma constitutiva fundamentalmente en la membrana de células presentadoras de antígeno profesionales, como las células dendríticas, células del sistema monocito/macrófago y células B. El TCR de las células T CD4 reconoce a antígenos peptídicos unidos a moléculas del MHC de clase II.

La estructura tridimensional de la molécula de clase II fue descrita aplicando técnicas de difracción de rayos X (Brown et al, 1993). Las moléculas de clase II son heterodímeros compuestos por dos subunidades glicoproteicas, una cadena α de 33-35 Kd, y una cadena β de 25-30 kD, asociadas de forma no covalente (Kappes and Strominger, 1988). Cada una de ellas consta de 3 regiones: una región extracelular, una porción transmembrana y un segmento intracitoplasmático. En la cadena α , el extremo N-terminal polimórfico del dominio $\alpha 1$ está formado por unos 90 residuos de aminoácidos que constituyen

la mitad del surco de unión peptídico. El dominio $\alpha 2$ contiene un puente disulfuro interno que constituye un dominio globular de unos 90 aminoácidos. El dominio $\alpha 2$ no contribuye a formar parte del surco de unión peptídico. La cadena α es glicosilada tanto en el dominio $\alpha 1$ como en el dominio globular del $\alpha 2$. La cadena β a su vez se divide en dos dominios ($\beta 1$ y $\beta 2$). El dominio $\beta 1$ (de unos 90 aminoácidos) contribuye en la formación de la otra mitad del surco de unión peptídico. A su vez contiene puentes disulfuro internos que sustentan la zona de glicosilación de la cadena β . Mientras que el MHC de clase I tiene una cadena transmembrana más el dominio extracelular de la cadena $\beta 2$ -m, ambas cadenas del MHC de clase II tienen secuencias transmembrana y de esta manera están anclados en la membrana celular.

La gruta de unión peptídica es similar a la del MHC de clase I, pero aquí lo constituyen tanto las cadenas α como β . Otra diferencia importante es que los extremos de la gruta no se cierran como las moléculas de clase I. Estos extremos abiertos permiten la unión de péptidos de mayor tamaño (Rudensky et al, 1991), que aunque pueden alcanzar hasta 30 aminoácidos, habitualmente constan de entre 13 y 18 aminoácidos. La unión a la gruta no depende de la presencia de residuos de anclaje conservados en los extremos amino-terminal y carboxilo-terminal del péptido. La afinidad de unión al surco depende de la afinidad de los enlaces de hidrógeno y de los residuos de los extremos de ciertos aminoácidos. Los péptidos antigénicos que se enclavan en el fondo de la gruta poseen una estructura secundaria particular conservada en la porción del péptido que se alinea con los residuos críticos del MHC. El polimorfismo evidente en las MHC de clase II se concentra en los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ en las áreas que forman el fondo y los extremos de la gruta. Mientras que el esqueleto del péptido está envuelto en la unión al MHC, la especificidad antigénica la confiere la interacción de los lados de la cadena del péptido que protuyen fuera de la gruta en las proximidades de las regiones de unión al TCR.

4.2 Genes de la región HLA

Los genes de la región HLA de clase I están localizados en el brazo corto del cromosoma 6, en la porción distal de la banda 6p21.3, en un espacio de aproximadamente unos 4 Mpb (Campbell and Trowsdale, 1993).

El sistema HLA es una región génica que se organiza en diferentes subregiones estrechamente ligadas entre sí, cuya herencia es mendeliana con expresión codominante. Este sistema constituye el más polimórfico de los conocidos en humanos debido a la enorme cantidad de alelos para cada uno de los genes; ensayos serológicos y celulares permitieron diferenciar unos 150 alelos distintos, y el tipaje genómico ha multiplicado esta cifra. Esta región contiene múltiples genes y pseudogenes ordenados en tres grupos (Aguado and Campbell, 1999; Stewart et al. 2004); la región de clase I, la región de clase II y la región de clase III (Figura 7).

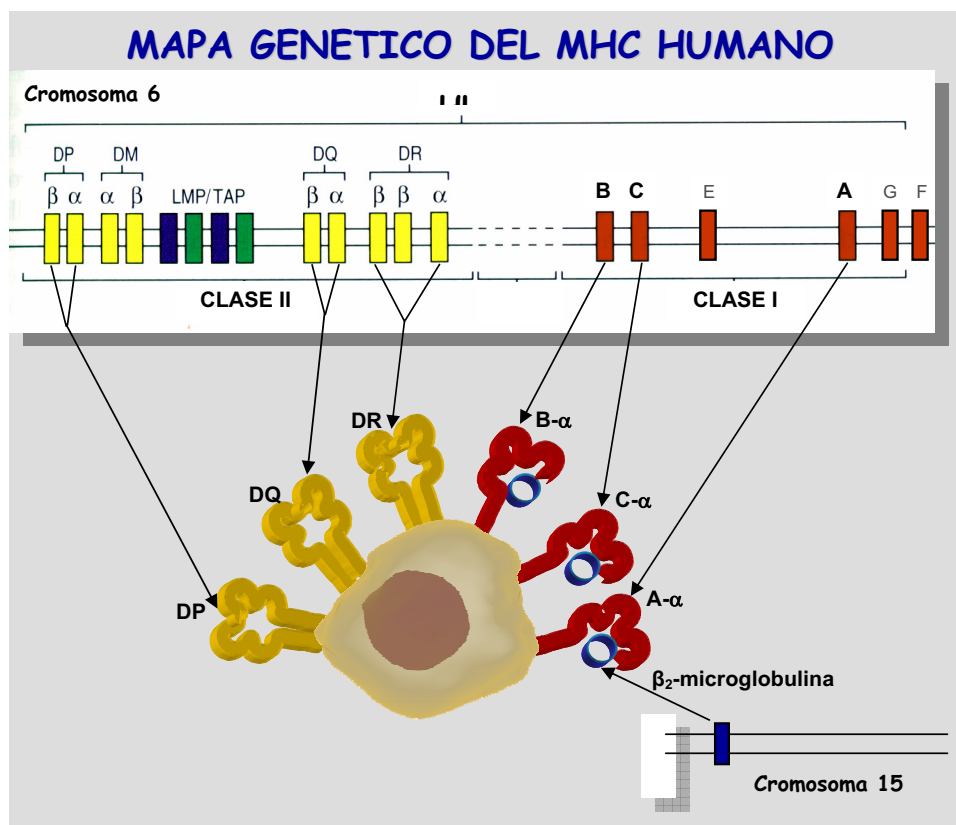


Figura 7. Esquema representativo de la organización de los genes que codifican para las moléculas MHC de clase I y II así como para la cadena β₂-m.

4.2.1. Genes de la región HLA de clase I

Los genes que codifican para la cadena pesada de la molécula HLA de clase I están situados en esta región, mientras que el gen de la β_2 -m se ubica en el cromosoma 15 y es por tanto independiente del complejo MHC (Goodfellow et al, 1975).

Dentro de la región de clase I están los genes llamados clásicos (HLA-A,-B,-C), otros 3 no clásicos (HLA-E, -F, -G) (Geraghty, 1993) y al menos veintinueve elementos génicos entre los que figuran pseudogenes (HLA-H, J, K, L, X), genes incompletos o truncados y genes de significado incierto (Bodmer et al.1994; Stewart et al, 2004).

Cada uno de los loci HLA-A, -B y -C procedentes de cada uno de los cromosomas de los progenitores, codifican una cadena α que se combina con la β_2 -m para constituir el heterodímero α - β_2 -m y formar la molécula del MHC de clase I completa, que puede ser expresada codominantemente por la mayoría de las células del organismo. A pesar de poseer el gen, del 20-50% de los humanos no expresan proteínas funcionales de HLA-C para uno de los dos alelos presentes en el locus HLA-C.

4.2.2 Genes de la región HLA de Clase II

Las dos subunidades polipeptídicas de los antígenos de clase II, α y β , están codificadas por genes pertenecientes a esta región, la cual se subdivide en tres regiones funcionales, que ordenadas por su proximidad al centrómero, se denominan: HLA-DP, DQ y DR (Bell et al, 1986). En esta región se localizan también los genes que codifican para HLA-DM y HLA-DO, que regulan la unión del péptido antigénico a la gruta de la molécula HLA de clase II.

La familia DR es única, de forma que no todos los individuos portan el mismo número de locus DRB en sus cromosomas. La cadena DR α está codificada por un gen designado como DRA. Este gen es funcional y lo presenta cada individuo. En contraste, entre la población humana han sido identificados 9 locus diferentes que codifican para la cadena β , designados como DRB1 a DRB9. El locus DRB1 es mucho más polimórfico que los demás.

Mientras que todos los individuos poseen los locus DRB1 y DRB9, los genes DRB2-DRB8 están presentes únicamente en algunos individuos. De todas formas, de los genes DRB, sólo DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5 son funcionales; DRB9 es un fragmento de gen, y DRB2, DRB6, DRB7 y DRB8 son pseudogenes. Debido a estas variaciones estructurales y funcionales, algunos sujetos expresan cadenas funcionales β de dos genes β en la región DR de cada cromosoma, por ejemplo: HLA-DRA/DRB1 y HLA-DRA/DRB4.

La región HLA-DP contiene dos genes, DPA1 y DPA2, que codifican para cadenas α , y otros dos genes, DPB1 y DPB2, que codifican para cadenas β , pero sólo DPA1 y DPB1 parecen ser funcionales.

La familia DQ contiene los genes DQA1 y DQA2, que codifican para cadenas α , y los genes DQB1, -B2 y -B3, que codifican para cadenas β ; de todos estos, sólo DQA1 (25 alelos) y DQB1 (más de 50 alelos) son funcionales.

Otros elementos identificados dentro de la región de clase II son los genes TAP1 y TAP2 (Trowsdale et al, 1990) que codifican las proteínas transportadoras de los péptidos de las moléculas de clase I. Además, se encuentran aquí los genes LMP2 y LMP7, que codifican subunidades proteolíticas del proteosoma inducibles por $\text{INF}\gamma$ y que una vez incorporadas al proteosoma aumentan la variedad de péptidos producidos, formando el llamado inmunoproteosoma (Boes et al, 1994) (Glynne et al. 1991).

4.2.3 Genes de la región HLA de Clase III

La región de clase III no contiene genes que codifiquen para moléculas HLA, pero sí contiene genes que codifican proteínas con importantes funciones relacionadas con el sistema inmune, como proteínas del sistema del complemento (Factor B, C2 y C4) y citoquinas (TNF y linfotoxina) (Aguado and Campbell, 1999).

4.3. Otras moléculas implicadas en la activación y coestimulación de células T

Además de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, las células presentadoras de antígeno (CPA) poseen otras moléculas necesarias para una correcta interacción con los linfocitos T, capaz de desencadenar una respuesta inmune adecuada. Cabe destacar por su relevancia, las moléculas de adhesión de la familia de las integrinas ICAM -1 (CD54), ICAM-2 (CD102) e ICAM-3 (CD50), que enlazan con sus respectivos ligandos –LFA-1 (CD11a) – en los linfocitos T, favoreciendo la formación de un “cluster” supramolecular de activación (SMAC) entre ambas células (De Fougères et al, 1994), (Monks et al, 1998).

Otras moléculas con relevancia en la adhesión física y estabilización temporal del complejo CPA-linfocito T son los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas LFA-3 (CD58) y B7.1 (CD80)/B7.2 (CD86) y sus receptores CD2 y CD28, respectivamente (Dustin and Chan, 2000). Estas proteínas de membrana también actúan como moléculas coestimuladoras para inducir una activación óptima de la célula T, pudiendo conducir a la respuesta frente al estímulo antigénico por parte de la célula T y/o, en su ausencia, a la generación de tolerancia (Baxter and Hodgkin, 2002).

4.4. Células presentadoras de antígeno

La presentación antigénica es una función no restringida a un tipo celular concreto y que podría ser llevado a cabo por cualquier célula capaz de expresar en su superficie moléculas presentadoras de antígeno. El estímulo antigénico puede localizarse en cualquier parte del organismo, teniendo que ser reconocido específicamente por clones de linfocitos T que circulan por el torrente sanguíneo y linfático en muy baja frecuencia (< 1 linfocito entre 10^{4-5} linfocitos T) (Parkin et al, 2001; Chaplin, 2003). Así existe un grupo de CPA, las células dendríticas, cuya principal función es la presentación antigénica. Las células dendríticas constan de varias subpoblaciones celulares distintas, todas ellas con capacidad para estimular la respuesta de linfocitos T vírgenes frente a los antígenos que presentan (Banchereau et al, 2000), (Jenkins et al, 2001).

Las células dendríticas se localizan en la mayoría de los tejidos del organismo, en donde capturan y procesan antígenos en cuya superficie presentan complejos péptido-HLA junto con moléculas coestimuladoras (Banchereau et al, 1998). Estas células están dotadas de gran capacidad de migración para poder llegar a los órganos linfoides secundarios como el bazo y los ganglios linfáticos, por donde recirculan los linfocitos T vírgenes atraídos por factores quimiotácticos como quimioquinas y citoquinas secretadas por las células dendríticas como respuesta a diferentes estímulos (Adema et al, 1997).

Se sabe que las CPA, incluyendo a las células dendríticas y a los monocitos/macrófagos, expresan en su superficie un grupo de receptores denominados de forma genérica PRR ("pattern recognition receptors"), capaces de reconocer patrones moleculares concretos ("PAMP" o "pathogen-associated molecular patterns") altamente conservados dentro de los individuos que integran una clase de microorganismo (Heine et al, 2005). Funcionalmente, los PRR están asociados a un abanico de respuestas que abarcan desde la fagocitosis hasta la activación de las proteínas del sistema del complemento (Werling et al, 2003). Entre los PRR de los mamíferos se han identificado diez miembros de la familia de receptores TLR ("toll-like receptors") que reconocen distintos componentes bacterianos (p.ej: lipopolisacárido- LPS-, lipoproteínas, péptidoglicanos o ácidos lipoteicos) y víricos (p.ej. islotes CpG) (Medzhitov et al, 2001). En algunas situaciones el reconocimiento realizado por estos receptores depende de la colaboración de otras moléculas accesorias. Así por ejemplo, la activación de TLR4 en los monocitos requiere de la unión del LPS bacteriano a la proteína LBP ("LPS binding protein") soluble en plasma y de su transporte hasta el receptor CD14 en la superficie celular, siendo finalmente CD14 el encargado de transferir el LPS al receptor TLR4 (Guha et al, 2001). La activación de receptores TLR en CPA es indispensable para desencadenar la respuesta T frente a antígenos microbianos puesto que sus rutas de señalización estimulan la secreción de citoquinas inflamatorias y activan genes que inducen la sobreexpresión de moléculas de histocompatibilidad y coestimuladoras de la superficie celular (Schnare et al, 2001), (Fearon et al, 1996).

Las células dendríticas son el compartimento celular con mayor capacidad de interactuar y activar linfocitos T vírgenes y seleccionarlos

positivamente como células T específicas de antígeno, capaces a su vez de activar a otras células como los linfocitos B o los macrófagos, o anularlas funcionalmente. Conocida esta función existen ensayos clínicos que tratan de explotar esta doble funcionalidad, utilizando las células dendríticas tanto como coadyuvantes de antígenos tumorales en vacunas que buscan la inducción de respuestas T citotóxicas específicas frente a un tumor (Schuler et al, 1997; Song et al, 1997; Specht et al, 1997) o como inductores de tolerancia en procesos alérgicos y autoinmunes (Akbari and Umetsu, 2005; Morel et al, 2003).

4.5 Procesamiento antigénico

La maquinaria del procesamiento antigénico comprende las proteínas con actividad enzimática o transportadora involucradas tanto en la producción de los péptidos antigénicos como su transporte, correcto plegamiento y ensamblaje de los componentes del MHC. El fallo en estos mecanismos puede conllevar una pérdida de presentación de antígenos en la superficie celular; por este motivo revisaremos estos aspectos con más detalle.

4.5.1 Procesamiento de péptidos antigénicos endógenos

Los antígenos, que inicialmente se encuentran en el citosol, son degradados por enzimas proteolíticas a fragmentos de corta longitud, de 8-11 residuos de aminoácidos (Falk et al, 1991; Van Bleek and Nathenson, 1990). Varios estudios indican que la principal fuente de péptidos presentados por MHC-I son proteínas recién sintetizadas (Jones, 1997; Zaks et al, 1999) que son rápidamente degradadas. Estos sustratos han sido denominados productos defectivos ribosomales (DRiPs), y representan polipéptidos que no tienen la longitud correcta o están mal plegados y que generan una fuente rica de péptidos para la presentación antigénica por parte de moléculas del MHC de clase I, ya sea de productos de péptidos/proteínas normales, virales o tumorales que pueden unirse a ubiquitina para ser degradados por el proteosoma.

El proteosoma está compuesto por un núcleo central proteolítico unido a unos complejos reguladores 19s (PA700) y PA28; el proteosoma genera la principal fuente de péptidos presentados por moléculas del MHC de clase I (Pamer and Cresswell, 1998). Esta función fue claramente demostrada con el empleo de inhibidores específicos que interaccionan con los centros catalíticos del proteosoma (Reits et al, 2000).

El proteosoma es un complejo constituido por 28 subunidades con estructura cilíndrica que se ordenan en cuatro anillos apilados, con un núcleo hueco recubierto por los centros activos de las unidades catalíticas (Schubert et al 2000). Tres subunidades constitutivas, y sus correspondientes subunidades inducibles por $\text{INF}\gamma$, constituyen los centros catalíticos del proteosoma. Las subunidades inducibles LMP2 y LMP7 están codificadas en la región del MHC-II cerca de los genes TAP. La sustitución de las unidades constitutivas por las inducibles cambia la especificidad del proteosoma hacia sus sustratos, generándose péptidos más adecuados para su transporte al retículo endoplásmico y presentación por moléculas MHC-I.

Seguidamente, los péptidos son trasladados hacia el retículo endoplásmico por la acción de los transportadores TAP-1 y TAP -2 (Monaco, 1992; Shepherd et al, 1993). Estas proteínas transportadoras presentan homología con una variedad de enzimas de transporte dependientes de ATP que se conocen como familia ABC ("ATP-Bind Casette") (Trowsdale et al, 1990).

En el lumen del retículo endoplásmico cada péptido interactúa con una cadena pesada de la molécula HLA de clase I y participa en su ensamblaje confiriendo estabilidad al heterodímero cadena pesada/ $\beta_2\text{-m}$ (Elliot et al, 1991). En el ensamblaje de la cadena pesada con la $\beta_2\text{-m}$ y el péptido están implicadas una gran variedad de chaperonas tales como calnexina, calreticulina, ERp57 y tapasina (Lehner and Trowsdale, 1998). La tapasina controla el ensamblaje de las moléculas HLA con péptidos de alta afinidad que estabilizan el complejo (Grande and Van Kaer, 2001; Purcell et al, 2001). La molécula HLA de clase I es así conducida a través del aparato de Golgi a la superficie de la célula (**Figura 8**).

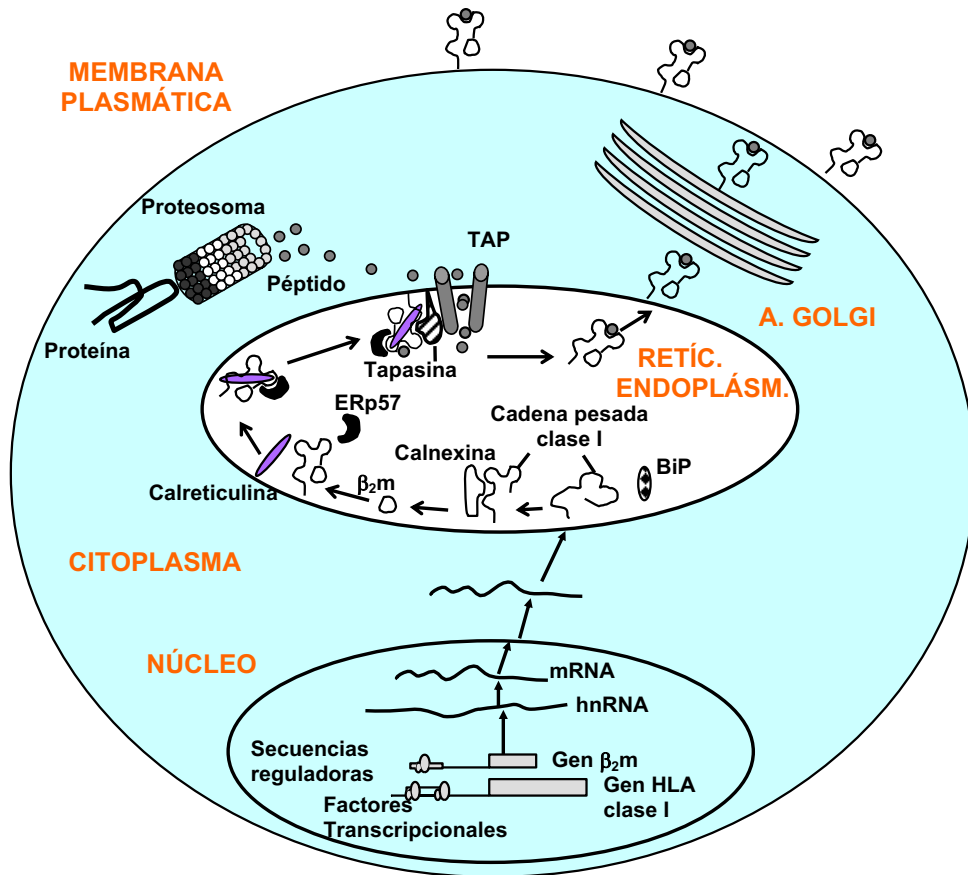


Figura 8. Esquema representativo de la producción y ensamblaje de péptidos para ser presentados por moléculas HLA de clase I.

Estudios de secuenciación han puesto de manifiesto que los péptidos afines a cada uno de los alelos HLA de clase I muestran una estructura común en lo que respecta a la conservación de residuos que coinciden espacialmente con los bolsillos de la gruta donde se ancla el péptido (Falk et al, 1991).

4.5.2 Procesamiento de péptidos antigénicos exógenos

El proceso de síntesis y ensamblaje de moléculas HLA de clase II empieza en el retículo endoplásmico con la producción de un complejo compuesto por tres dímeros de subunidades α , β y un trímero de cadenas invariables (Ii). En el retículo endoplásmico hay péptidos transportados a su

interior y péptidos de proteínas que están siendo sintetizadas. Para evitar que las moléculas de clase II se unan a ellos, la cadena invariable sella la gruta de unión al péptido, la parte de li que bloquea la gruta de unión al péptido es también llamada CLIP. El ensamblaje del nonámero está mediado por calnexina; cuando el nonámero se ha formado, se libera la calnexina (Cresswell et al, 1994). La cadena li dirige el complejo al aparato de Golgi, donde se glicosila (Cresswell et al, 1994); después llega al sistema endosomal a través de vesículas del aparato de Golgi (Peters et al, 1991). El sistema endosomal/lisosomal está constituido por compartimentos proteolíticos en los cuales se procesan los antígenos externos capturados en la superficie de la célula, que se transforman en péptidos mediante hidrólisis ácida (Watts, 2001) y se cargan sobre las moléculas HLA de clase II. En el interior de las vesículas endosómicas, el pH ácido produce la degradación de la cadena invariable por la peptidasa catepsina S, quedando sólo el péptido CLIP unido en la gruta de HLA-II. Es ahora cuando se une el péptido antigénico a la molécula de clase II, por desplazamiento del péptido CLIP en la gruta de unión, este proceso asegura la unión a péptidos de alta afinidad. La unión está catalizada por el dímero HLA-DM, que facilita la salida del péptido CLIP y la entrada de otros péptidos hasta que finalmente entra uno lo suficientemente estable. Otra molécula, llamada HLA-DO, también controla este proceso pero de forma negativa, es decir, inhibiendo la función de HLA-DM; esta molécula no es inducible por INF- γ mientras que HLA-DM sí lo es. Por tanto, en estados de activación del sistema inmune, la presentación de péptidos a través de HLA de clase II se verá facilitada (Van Ham et al, 2000; Van Ham et al, 1997).

Finalmente el complejo se transporta a la superficie celular para cumplir su función (Brocke and Kunz, 2002).

5. El receptor para antígeno de las células T (TCR)

Los linfocitos T se originan en la médula ósea, y tras su paso por el timo sufren un proceso selectivo de maduración expresando el receptor de célula T (TCR) y conformándose su repertorio en función del HLA del individuo (Sebzda et al, 1999).

5.1 Estructura del TCR

El TCR está compuesto por dos glicoproteínas unidas por puentes disulfuro (Alam et al, 2003), que en la mayoría de los casos constituyen un heterodímero $\alpha\beta$ (**Figura 9**). Entre un 5-10% de las células T de sangre periférica presentan otra variante del heterodímero de TCR llamada $\gamma\delta$ (Chaplin et al, 2003). Ambos heterodímeros, TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$, constituyen las cadenas variables y se asocian con el complejo CD3, compuesto por 5 subunidades (una cadena $\gamma,\delta,\varepsilon$ y dos cadenas ζ), que constituyen las cadenas invariables, y participan en la transducción de la señal del TCR desde la membrana al citoplasma del linfocito T.

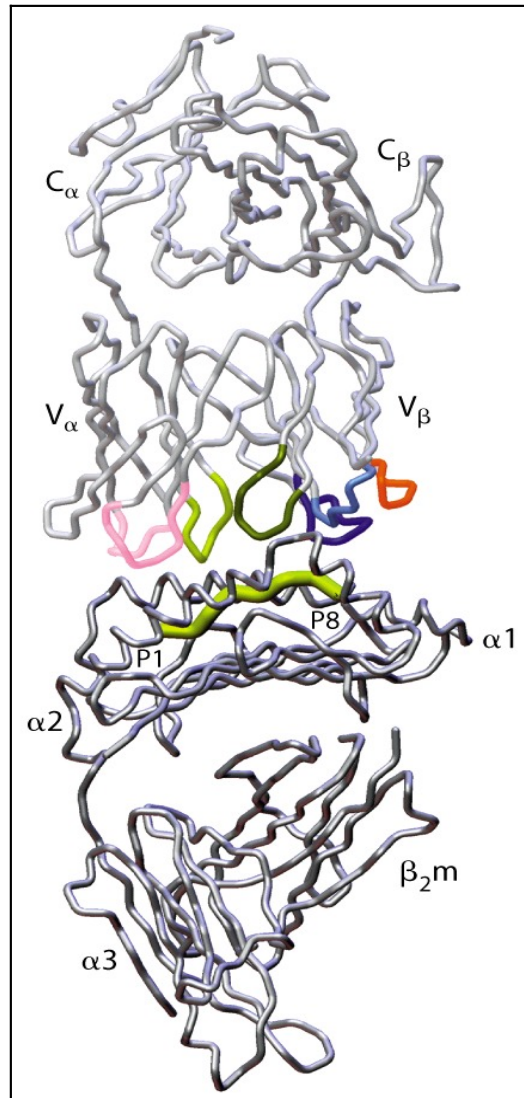


Figura 9. Esquema ilustrativo de la interacción entre la molécula HLA de clase I y el TCR.

5.2 Genes codificantes del TCR

Los genes que codifican las proteínas que forman parte del TCR están compuestos de exones constantes y variables. Los exones variables del TCR se ensamblan a nivel del DNA por la recombinación V (D) J de los segmentos de genes variables (V), de unión (J), y de diversidad (D), si está presente (Allison, 1987). Los exones constantes están constituidos por tres a cuatro sub-exones, que codifican la región C, y los dominios transmembrana y citoplásmicos.

En humanos, los genes que codifican la cadena α del TCR se localizan en el brazo largo del cromosoma 14 y contienen alrededor de 42 segmentos de genes funcionales V_α . Cada uno de los genes funcionales V_α está compuesto de una secuencia líder que codifica un péptido de 20 aminoácidos (aa), un primer V_α sub-exón que codifica para 15 aa, un intrón de 100 pares de bases, y un segundo sub-exón V_α que codifica 98 aa (Sim et al, 1984). Estos genes están seguidos directamente por 61 segmentos de la región J_α , cada uno de los cuales codifica para 17-21 aa (Koyasu et al, 1997). A continuación se encuentra el exon simple C_α , compuesto de cuatro subexones y tres intrones. Siguiendo a este último exón, existen dos regiones que regulan la transcripción de los genes del TCR_α : una región silenciadora α (represora de la transcripción de genes), y una región potenciadora α (de la transcripción). No existen genes del segmento D_α (**Figura 10**).

La cadena TCR β está codificada en el brazo largo del cromosoma 7. Contiene 48 segmentos de genes $V\beta$ junto a los cuales hay dos grupos de segmentos de genes $D\beta$ y $J\beta$, seguidos por un exon constante $C\beta$ (García et al, 1996). Estas dos agrupaciones son del tipo $D\beta1/J\beta1$ y $D\beta2/J\beta2$. Tras el reordenamiento $V\beta-D\beta1/J\beta1$, los exones $C\beta1$ y $C\beta2$ permanecen, pudiendo transcribirse ambos. Pero cuando se produce el reordenamiento $V\beta-D\beta2/J\beta2$ se produce una pérdida del exon $C\beta1$, de forma que sólo puede transcribirse $C\beta2$ (**Figura 10**).

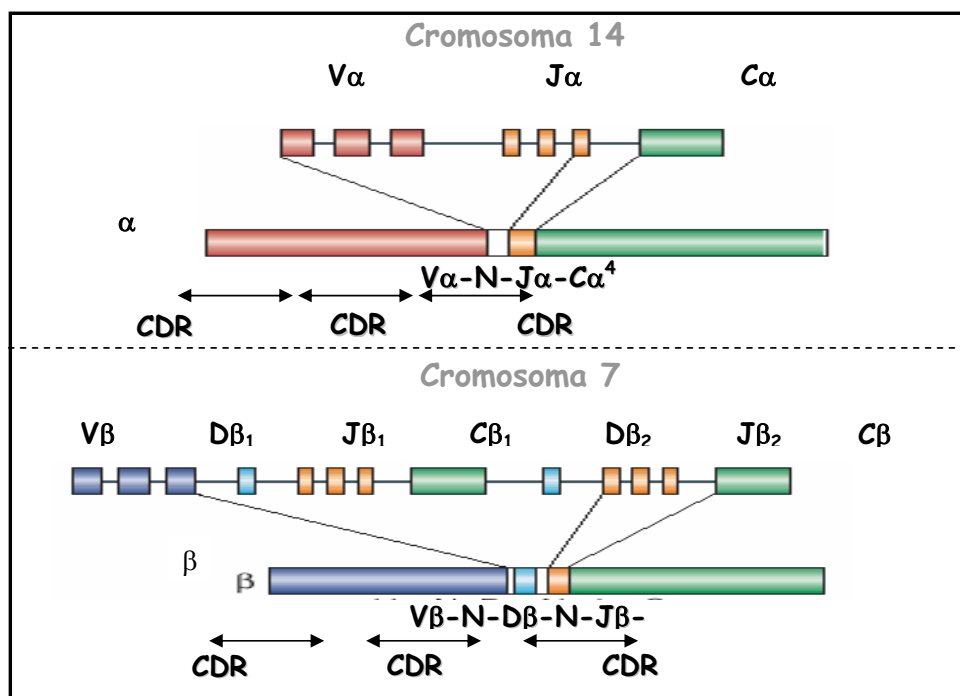


Figura 10. Esquema representativo de la estructura de los genes codificantes del TCR $\alpha\beta^+$.

Los genes que codifican la cadena TCR γ se localizan en el brazo corto del cromosoma 7. Aunque existen 14 segmentos de genes $V\gamma$, sólo seis son funcionales ($V\gamma 2$ – $V\gamma 5$, $V\gamma 9$ y $V\gamma 11$) (Fremont et al, 1996). A continuación se sitúan dos grupos (clusters) de $J\gamma$: los clusters $J\gamma 1$ contienen tres segmentos de $J\gamma 1$ que se acompañan del exon $C\gamma 1$ mientras que el cluster $J\gamma 2$ contiene dos segmentos de genes $J\gamma$ y se acompaña del exon $C\gamma 2$.

Los genes que codifican la cadena TCR δ constan de al menos diez segmentos $V\delta$ (cinco de ellos funcionales) tres $D\delta$ y tres $J\delta$ y de un exon $C\gamma$.

5.3. Mecanismo de recombinación de los genes del TCR

Los segmentos de los genes V, D y J del TCR sufren un proceso de reordenamiento durante las etapas más tempranas de la diferenciación linfocitaria T (Tonegawa et al, 1983; Davis et al, 1988). Estos reordenamientos están mediados por complejos de la enzima recombinasa, en los cuales, las proteínas RAG1 y RAG2 juegan un papel clave en el reconocimiento y corte del DNA en las zonas de la señal de secuencia de la recombinación (RSS), que se localizan más allá de los genes del segmento V, a ambos lados de los genes del segmento D y por delante de los genes del segmento J. Señales inapropiadas de RSS reducen o previenen por completo el reordenamiento de los genes TCR.

El proceso de reordenamiento generalmente comienza con la unión de D con J seguido de la unión de V con D-J en el caso de genes de TCR β (Malissen et al, 1992) y TCR δ o directamente con el reordenamiento de V con J en el caso de genes TCR α y TCR γ . Las secuencias existentes entre los genes de reordenamiento son generalmente eliminadas en forma de productos de excisión circular, también llamado círculo de excisión del TCR (TREC) (**Figura 11**).

Las diferentes combinaciones de los genes V, D y J se calcula pueden generar alrededor de 3×10^6 variantes para las moléculas TCR $\alpha\beta$ y 5×10^3 para las moléculas TCR $\gamma\delta$.

El locus del TCR β contiene alrededor de 65 V β elementos de genes, que siguiendo la nomenclatura de Arden y colaboradores (Arden et al, 1995) agrupan a los genes V β en 34 familias. Las familias más grandes, como V β 5, V β 6, V β 8 y V β 13, alcanzan un tamaño de 7, 9, 5 y 8 miembros, respectivamente; a su vez 12 familias V β presentan solamente un miembro. Ambos segmentos de genes C β (C β 1 y C β 2), están precedidas por el gen de D β (D β 1 y D β 2) y por el cluster J β , que comprende seis (J β 1.1- J β 1.6) y siete (J β 2.1- J β 2.7) segmentos funcionales J β .

La inserción y/o eliminación de nucleótidos en las zonas de unión de los segmentos de los genes V, D, J que ocurren durante el proceso de reordenamiento, incrementan notablemente la diversidad de las zonas de unión

lo que contribuye notablemente a que el repertorio total de moléculas de TCR se incremente estimándose pueda ser superior a 10^{12} (Van Dongen et al, 2002). Los nucleótidos insertados pueden ser de dos tipos: 1) tipo P, resultado de uniones imprecisas durante el proceso de reordenamiento, y/o 2) tipo N, nucleótidos insertados al azar en las zonas de unión VDJ por la enzima TdT. Estos nucleótidos son los responsables de la aparición de aminoácidos en la cadena de TCR que no estaban codificados en la línea germinal. Asumiendo que se insertan una media de 6 nucleótidos en las cadenas α y γ , las cadenas $TCR\alpha$ y $TCR\gamma$ contendrían de media dos aminoácidos en la unión VJ mientras que la cadena $TCR\beta$ contendría cuatro aminoácidos en la unión VDJ. Así la cadena $TCR\delta$ contendrá 4, 6 o 8 aminoácidos dependiendo de si la unión es del tipo VDJ, VDDJ o VDDDJ. Dado que cualquiera de estos residuos extra puede estar constituido por cualquiera de los 20 aminoácidos existentes, la diversidad en las uniones prevé al menos $20 \times 20 \times 20 \times 20$ posibles combinaciones para cada punto de unión además de la posibilidad de 20×20 añadida para cada segmento D adicional incluido. En otras palabras, la diversidad de uniones de la cadena $TCR\alpha$ tiene una media de 20^4 combinaciones posibles, y en el caso de la cadena $TCR\delta$, la contribución puede ser tan alta como de 20^8 posibles combinaciones.

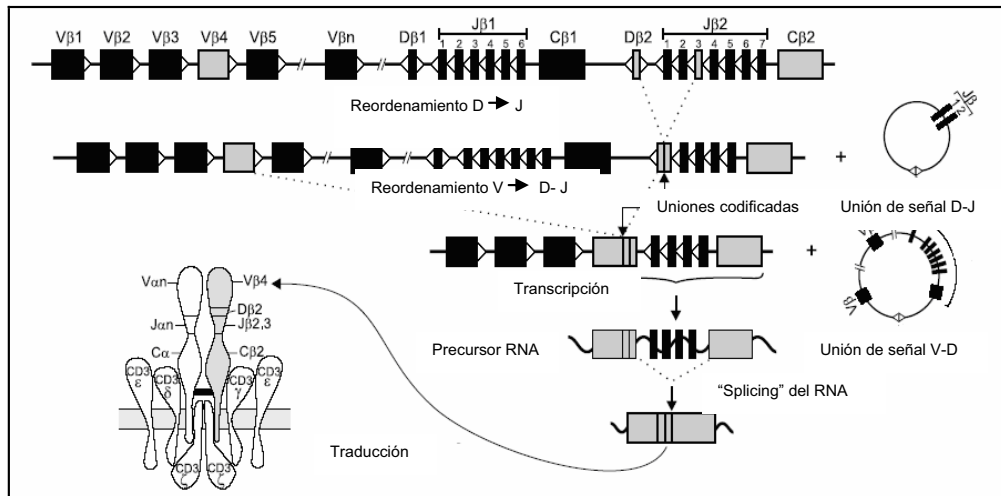


Figura 11. Diagrama esquemático de los pasos más relevantes del proceso de reordenamiento, transcripción y traducción del gen TCR β.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Las LGL-T/NK constituyen un grupo de neoplasias de curso clínico indolente, aunque potencialmente maligno. A diferencia de otras neoplasias de células T/NK, en las LGL-T/NK no se ha podido demostrar una relación directa con agentes infecciosos que afecten a la célula tumoral (p.ej.: EBV). No obstante, se conoce su asociación con neutropenia y enfermedades auto-inmunes, lo que sugiere que, al igual que en otros SLPC-T y B, en la ontogenia de las LGL-T/NK podrían estar involucrados antígenos (exógenos y/o propios) reconocidos por la célula neoplásica, cuyo origen y naturaleza siguen sin conocerse.

OBJETIVOS:

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente trabajo nos hemos propuesto como **OBJETIVOS GENERALES:**

- 1.- Establecer las características clínicas, biológicas y fenotípicas de las linfocitosis monoclonales de LGL.
- 2.- Profundizar en el conocimiento de los posibles mecanismos involucrados en la expansión clonal y la transformación neoplásica de las células T clonales expandidas en estos pacientes.

Aunque se ha sugerido que en su conjunto, las linfocitosis clonales de LGL muestran un comportamiento clínico-biológico similar, hoy se sabe que desde el punto de vista ontogénico en estas neoplasias se ven involucradas un grupo heterogéneo de células T, además de células NK. Así, en la actualidad se reconoce la existencia de al menos cinco subgrupos distintos de LGL, entre los que se incluyen: LGL-T $\gamma\delta$, LGL-T $\alpha\beta$ /CD4⁺/CD8^{-/+}, LGL-T $\alpha\beta$ /CD8⁺, LGL-T $\alpha\beta$ /CD4⁺/CD8⁻ y LGL-NK. Desde el punto de vista práctico, la probabilidad de detección de posibles estímulos antigénicos involucrados en el proceso de selección y expansión clonal T, se ve incrementada notablemente en aquellos casos en los que el reconocimiento antigénico requiere de la presentación de péptidos a través del sistema HLA (LGL-T $\alpha\beta$ CD4⁺ y LGL-T $\alpha\beta$ /CD8⁺). Así

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

mismo, a la hora de evaluar una respuesta T específica de antígeno resulta metodológicamente menos complejo, la selección de un modelo en el que la presentación de antígenos a las células T se realiza a través de moléculas HLA de clase II (p.ej.: LGL-T CD4⁺).

Por todo ello, nuestro trabajo se centra en las linfocitosis monoclonales de LGL-T $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺, planteándonos los siguientes **OBJETIVOS CONCRETOS**:

1.- Determinar la frecuencia de las linfocitosis clonales de LGL-T CD4⁺, dentro del conjunto de las neoplasias de LGL-T y conocer sus características clínicas, biológicas y fenotípicas más relevantes.

2.- Caracterizar el TCR de las células clonales expandidas de pacientes con LGL-T CD4⁺, con el fin de determinar la posible implicación de estímulos antigénicos comunes en el origen de la expansión de las células T clonales.

3.- Analizar el posible papel de los polimorfismos de genes que codifican para moléculas implicadas en el reconocimiento y respuesta frente a antígenos por parte de células citotóxicas (HLA, IFN- γ , CTL-A4, IL-10, TNF α , FASL y NKG2D) en el origen y desarrollo de las linfocitosis monoclonales de LGL-T CD4⁺.

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

La descripción de los materiales y métodos empleados, así como de los resultados obtenidos, se encuentran reflejados en los artículos originales publicados en relación con cada uno de los objetivos planteados y que han sido incluidos en esta sección. Cada uno de ellos, va precedido por un breve resumen que pretende facilitar una revisión rápida de la información más relevante contenida en los mismos. Las publicaciones científicas realizadas fruto de este trabajo incluyen:

- *En relación con la determinación de la frecuencia y las características clínicas, biológicas y fenotípicas más relevantes de las linfocitosis clonales de LGL-T CD4⁺, dentro del conjunto de las neoplasias de LGL-T (Objetivo 1) y con*

- *Con la caracterización del TCR de las células clonales expandidas de pacientes con LGL-T CD4⁺, al objeto de determinar la posible implicación de estímulos antigénicos comunes en el origen de la expansión de las células T clonales (Objetivo 2):*

1.- Monoclonal TCR-V β 13.1+/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+dim} T-LGL lymphocytosis: evidence for an antigen-driven chronic T-cell stimulation origin.

Pilar Garrido, Francisco Ruiz-Cabello, Paloma Bárcena, Yorick Sandberg, Julia Cantón, Margarida Lima, Ana Balanzategui, Marcos González, Miguel Angel López-Nevot, Anton W. Langerak, Andrés C. García-Montero, Julia Almeida, Alberto Orfao.

Blood, 109; 2007 (en prensa).

- *En relación con el análisis del posible papel de los polimorfismos de genes que codifican para moléculas implicadas en el reconocimiento y respuesta frente a antígenos por parte de células citotóxicas (HLA, IFN- γ , CTL-A4, IL-10, TNF α , FASL y NKG2D) en el origen y desarrollo de las linfocitosis monoclonales de LGL-T CD4⁺ (Objetivo 3):*

2.- Evaluation of the immunoregulatory functional polymorphisms in patients with monoclonal CD4⁺/CD8^{-/+dim} T-LGL lymphocytosis.

Immunogenetics, 2007 (Sometido a publicación).

Pilar Garrido, Julia Almeida, Julia Cantón, Jose María Romero, Yorick Sandberg, Margarida Lima, Anton W. Langerak, Alberto Orfao, Francisco Ruiz-Cabello.

1.- Linfocitosis monoclonal LGL-T TCR-V β 13.1+/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+dim}: evidencia de un origen asociado a estimulación crónica T dirigida por antígeno .

INTRODUCCIÓN: Durante décadas el diagnóstico y tratamiento de las leucemias/linfomas de células T y de así las linfocitosis clonales crónicas de células T se ha visto dificultado por su baja frecuencia, comportamiento clínico heterogéneo, la escasez de marcadores de clonalidad de fácil aplicación y su solapamiento con procesos inflamatorios de tipo reactivo. Aunque la patogenia de estos procesos sigue siendo incierta, existe al menos en algunos subgrupos diagnósticos evidencia de la implicación de diferentes virus (p.ej.: CMV, EBV, HTLV-I y superantígenos bacterianos (p.ej.: de estafilococo) en su ontogenia, bien porque infectan directamente a las células tumorales o porque inducen una expansión antígeno-dirigida de las células T neoplásicas. En esta última situación el evento oncogénico, podría estar precedido, por una expansión T dirigida por antígeno que a su vez produciría un uso restringido monoclonal del TCR. De acuerdo con esta hipótesis las leucemias LGL-T TCR $\alpha\beta^+$ /CD8⁺ a menudo ocurren en el contexto de enfermedades autoinmunes, y alrededor de un tercio de las LGL-T TCR $\alpha\beta^+$ /CD4⁺ muestran un uso preferencial de la familia TCR-V β 13.1. A su vez, el análisis de la región hipervariable CDR3 del TCR se ha asociado con resultados aparentemente contrapuestos. Así, mientras que las secuencias del CDR3 en las LGL-T CD8⁺ aparentemente no muestran homología, en la mitad de las neoplasias LGL TCR $\gamma\delta^+$, los clones de células T expresan la misma familia V δ /V γ y comparten secuencias comunes en su TCR. Estas aparentes discrepancias podrían deberse a que los procesos dirigidos por antígeno no dependen sólo de la región CDR3, sino también del haplotipo HLA expresado por las células del individuo y que varía entre los casos descritos en la literatura.

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

OBJETIVO: En este apartado del estudio se analizan 36 pacientes con linfocitosis monoclonales TCR $\alpha\beta^+$ /CD4⁺ agrupados de acuerdo al uso o no de TCR-V β 13.1⁺. Además de describir las frecuencias y características de estos procesos, nuestro interés se centró en analizar las posibles asociaciones existentes entre la familia TCR-V β expandida, las secuencias de la región hipervariable del TCR (CDR3) y el genotipo HLA expresado.

MATERIAL Y MÉTODOS: En conjunto estudiamos un total de 161 pacientes con LGL-T, de los cuales 36 presentaban linfocitosis monoclonales TCRV β^+ /CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+dim}. Para el análisis del inmunofenotipo de los pacientes con linfocitosis LGL TCR-V β CD4⁺/ CD8^{-/+dim} se empleó un panel de 24 anticuerpos monoclonales dirigidos frente a 21 familias TCR- V β diferentes, teñidos en cuatro colores. La caracterización fenotípica se realizó usando combinación cuádruple de anticuerpos Monoclonales. Para la adquisición y análisis de datos se empleó un citómetro de flujo FACSCalibur y los programas informáticos CellQUEST y PAINT-A-GATE PRO. El tipaje HLA se realizó a partir de DNA extraído de células de sangre periférica, empleando, tanto para clase I como para clase II técnicas de genotipado por PCR-SSPO. La amplificación de las secuencias diana por PCR se realizó a partir de ADN, siguiendo los protocolos convencionales. El análisis de la secuencia de nucleótidos del TCR se realizó a partir de muestras de ADN amplificado empleando una mezcla de cebadores en “sentido”, que reconocen la secuencia de TCR-V β 13, junto con cebadores en “anti-sentido”, complementarios de la región J; posteriormente, la mayoría de los productos clonados fueron secuenciados y analizados empleando un secuenciador automático de ADN. Las secuencias obtenidas se correlacionaron empleando las bases de datos BLAST y IMGT. Para los análisis estadísticos se empleó el programa informático SPSS utilizando los tests de Fisher, Pearson y Mann-Whitney U no paramétrico para establecer la significación estadística de las diferencias observadas entre distintos grupos de muestras/individuos.

RESULTADOS: Las linfocitosis clonales T TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ representan un porcentaje significativo (34%) de todas las LGL-T analizadas. Desde el punto de vista fenotípico las células clonales expandidas de las LGL-T TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ mostraron características comunes (TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ /NKa $^+$ /CD8 $^{-/+dim}$) asociadas a célula T citotóxica activada (granzima B $^+$, CD56 $^+$, CD57 $^+$, CD11b $^{+/-}$) con fenotipo de célula de memoria/efectora (CD2 $^{+bright}$, CD7 $^{-/+d}$, CD11a $^{+bright}$, CD28 $^-$, CD62L $^-$, HLADR $^+$); en la mitad de los casos se observó coexpresión de CD45RA y CD45RO mientras que en los demás pacientes las células T expandidas coexpresaban un fenotipo CD45RA $^+$ /CD45RO $^-$. El análisis del repertorio TCR V β confirmó la existencia de una expansión monoclonal en todos los casos analizados. En 27 casos la familia TCR V β expandida fue identificada con el panel de anticuerpos monoclonales utilizados, correspondiendo 15 casos a TCR V β 13.1, dos a TCR V β 2, dos a TCR V β 3.1, dos a TCR V β 8.1 y TCR-V β 8.2, dos a TCR V β 17.1, dos a TCR V β 22 y un caso a TCR V β 11 y TCR V β 14.1. En 9 pacientes, la familia TCR- V β no pudo ser identificada. En cuanto a la asociación con el haplotipo HLA, los 15 pacientes que mostraban expansión TCR V β 13.1/CD4 $^+$ eran HLA DRB1*0701. El análisis del segmento CDR3 de estos sujetos mostró un uso preferencial de la región J1.1, y una gran homología tanto en la longitud del segmento CDR3 como en su secuencia, con una distancia entre las secuencias consenso CASS y FG constante de 9 codones, y una secuencia idéntica de dos aminoácidos QG compartida en todos los casos. Merece destacar que no hemos podido detectar esta configuración de CDR3 en clones de linfocitos T CD4 $^+$ y CD8 $^+$ de sujetos sanos HLA DRB1*0701 $^+$ o HLA DRB1*0701 $^-$.

CONCLUSIONES: La asociación observada entre la expansión monoclonal de linfocitos T grandes granulares TCR V β 13.1 $^+$ y el genotipo HLA DRB1*0701, junto con la constatación de la existencia del motivo XQGX común en la secuencia del CDR3, sugiere la implicación de un antígeno exógeno común en la ontogenia de la expansión clonal observada en estos pacientes. Dado que el genotipo HLA DRB1*0701 es relativamente frecuente en la población general y que estas expansiones clonales están presentes en una minoría de la población, la ocurrencia del reordenamiento XQGX de CDR3 (ausente en

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

células T de sujetos sanos) podría estar en el origen de una posible disregulación del sistema inmune responsable de la perpetuación de la expansión clonal T.

Monoclonal TCR-V β 13.1⁺/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+dim} T-LGL lymphocytosis: evidence for an antigen-driven chronic T-cell stimulation origin

Pilar Garrido,¹ Francisco Ruiz-Cabello,² Paloma Bárcena,^{3,4} Yorick Sandberg,⁵ Julia Cantón,¹ Margarida Lima,⁶ Ana Balanzategui,^{4,7} Marcos González,^{4,7} Miguel Angel López-Nevot,¹ Anton W. Langerak,⁵ Andrés C. García-Montero,^{3,4} Julia Almeida,^{3,4} and Alberto Orfao^{3,4}

¹Servicio de Hematología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain; ²Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain; ³Servicio de Citometría & Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Spain; ⁴Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer/IBMCC (CSIC-USAL), Salamanca, Spain; ⁵Department of Immunology, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands; ⁶Servicio de Hematología, Hospital Geral de Santo António, Porto, Portugal; ⁷Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Spain

Monoclonal TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺ T-large granular lymphocyte (T-LGL) lymphocytosis is a T-cell disorder with a restricted TCR-V β repertoire. In the present study we explored the potential association between the expanded TCR-V β families, the CDR3 sequences of the TCR-V β gene, and the HLA genotype of patients with monoclonal TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺ T-LGL lymphocytosis. For that purpose, 36 patients with monoclonal TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺ T-LGL lymphocytosis (15 TCR-V β 13.1 versus 21 non-TCR-V β 13.1) were selected. For each patient,

both the HLA (class I and II) genotype and the DNA sequences of the VDJ-rearranged TCR-V β were analyzed. Our results show a clear association between the TCR-V β repertoire and the HLA genotype, all TCR-V β 13.1⁺ cases being HLA-DRB1*0701 ($P = .004$). Interestingly, the HLA-DR7/TCR-V β 13.1-restricted T-cell expansions displayed a highly homogeneous and strikingly similar TCR arising from the use of common TCR-V β gene segments, which shared (1) unique CDR3 structural features with a constantly short

length, (2) similar combinatorial gene rearrangements with frequent usage of the J β 1.1 gene, and (3) a homolog consensus protein sequence at recombination junctions. Overall, these findings strongly support the existence of a common antigen-driven origin for monoclonal CD4⁺ T-LGL lymphocytosis, with the identification of the exact peptides presented to the expanded T cells deserving further investigations. (Blood. 2007;109:000-000)

© 2007 by The American Society of Hematology

Introduction

Monoclonal chronic T-cell lymphocytosis and T-cell leukemias/lymphomas are a heterogeneous group of disorders whose diagnosis and classification have been hampered by their relatively low frequency and variable clinical and histopathological behavior,^{1,4} the lack of easily applicable clonality markers for T cells, and the substantial clinical overlap with nonmalignant inflammatory disorders.^{1,5,6} Although the pathogenetic mechanisms involved in the development of clonal T-cell disorders remain largely unknown, in recent years significant advances have been made in this regard.^{7,9} Among other observations, an association between chronic inflammatory and infectious processes and the occurrence of (mono)clonal expansions of lymphoid cells has recurrently been reported, particularly for chronic B-cell malignancies¹⁰ but also for mature T-cell neoplasias.^{1,8-9} Accordingly, different viruses (eg, human T-cell lymphotropic virus type I [HTLV-I], Epstein-Barr virus [EBV], and cytomegalovirus [CMV]) and bacterial superantigens (ie, staphylococci-derived superantigens) have been associated with the pathogenesis of specific mature T-cell malignancies, either because they infect tumor cells¹¹⁻¹⁴ or because they could induce an antigen-driven expansion of neoplastic T cells.^{9,15,16} In line with the latter hypothesis, recent reports suggest that T-cell receptor (TCR)-associated signals could contribute to tumor development, particularly in T-cell large granular lymphocyte (T-LGL) leukemia.^{5,9} In these cases, antigen-driven expansions of cytotoxic T lymphocyte

(CTL) clones could precede the occurrence of oncogenic events leading to neoplastic transformation and/or dysregulation of growth/apoptosis resulting in T-LGL leukemia⁹ with a restricted TCR-V β /V α usage.¹⁷ This notion is supported by the observation that TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD8⁺ T-LGL leukemia often occurs in the context of specific autoimmune diseases^{9,16} and that in about one third of cases TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺ T-LGL leukemia/lymphocytosis is associated with neoplasias other than the T-LGL and a preferential usage of the TCR-V β 13.1 family.¹⁸ In addition, the reactive versus neoplastic nature of some (mono)clonal expansions of T-LGL remains a matter of debate,¹⁵ particularly in cases where it is associated with viral infection, severe immune disturbances, or in the elderly.^{19,20} In this regard, the search for the potential involvement of common antigens in driving the development of monoclonal T-cell disorders through the analysis of complementary determining region 3 (CDR3) sequences of TCR genes has provided controversial findings. Accordingly, while CDR3 sequences from CD8⁺ T-LGL leukemia did not show any apparent structural homology,^{21,22} in nearly half of all TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-LGL neoplasias, clonal T cells express the same TCR-V δ /V γ family members (TCR-V γ 9/V δ 2) and share common TCR sequences, as reflected by the systematic presence of the antigen-selected invariant T nucleotide in the first codon of the V δ 2-J δ 1 junctional region from all patients.²³ Such apparent discrepancy could be related to the fact

Submitted May 11, 2006; accepted February 12, 2007. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, February 15, 2007; DOI 10.1182/blood-2006-05-022277.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge

payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2007 by The American Society of Hematology

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

2 GARRIDO et al

BLOOD, 1 JUNE 2007 • VOLUME 109, NUMBER 11

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of monoclonal TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ LGL lymphocytosis according to the type of TCR-V β family expressed (V β 13.1 versus non-V β 13.1) compared with monoclonal TCR $\alpha\beta^+$ /CD8 $^+$ LGL lymphocytosis

Characteristic	Monoclonal TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ LGL lymphocytosis			Monoclonal TCR $\alpha\beta^+$ /CD8 $^+$ LGL lymphocytosis	P
	TCR-V β 13.1	Non-TCR-V β 13.1	Total cases		
No. of patients	15	21	36	24	
Mean age \pm 1 SD, y (range)	64 \pm 8 (52-80)	61 \pm 13 (36-81)	63 \pm 12 (36-81)	56 \pm 15 (31-79)	NS
% male/% female	25/75	61/39	47/53	37/63	NS
Reason for consulting, %					
Routine blood analysis	100	83	90	83	NS
Skin lesions	0	11	7	0	NS
Abdominal distension	0	6	3	0	NS
Fever	0	0	0	4	NS
General symptoms	0	0	0	13	NS
Physical examination, %					
Adenomegalies	11	6	7	0	NS
Hepatomegalv	0	0	0	4	NS
Splenomegalv	0	6	3	4	NS
Skin lesions	0	11	7	0	NS
Associated neoplasias, %	25	22	23	26	NS
Associated autoimmune diseases, %	18	0	13	33	.05
Laboratory parameters, %					
Leukocytosis, WBC count more than $10 \times 10^9/L$	64	61	63	25	.01
Lymphocytosis, lymphocyte count more than $5 \times 10^9/L$	70	67	68	42	.09
Neutropenia, neutrophil count less than $1.5 \times 10^9/L$	14	0	3	61	<.001
Anemia, hemoglobin level less than 10 g/dL	0	0	0	29	.003
Thrombocytopenia, platelet count less than $100 \times 10^9/L$	10	0	3	8	NS
Increased lactic dehydrogenase level, more than 480 U/L	10	0	3	22	NS
Increased β_2 -microglobulin level, more than 2 mg/dL	0	7	3	63	.001
Cases requiring treatment because of lymphocytosis or the associated autoimmune disease, %	0	0	0	37	.001
Outcome: stable disease, %	100	100	100	87	NS
Total deaths, %	10	18	15	8	NS
Deaths related to the TCR $\alpha\beta^+$ LGL lymphocytosis, %	0	0	0	4	NS
Mean follow-up \pm 1 SD, mo (range)	68 \pm 48 (13-136)	74 \pm 56 (10-233)	72 \pm 53 (10-233)	44 \pm 40 (1-152)	.03

P value corresponds to comparisons between monoclonal TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ LGL and TCR $\alpha\beta^+$ /CD8 $^+$ LGL lymphocytosis; NS indicates no statistically significant differences; $P > .1$. No statistically significant differences ($P > .05$) were found between TCR-V β 13.1 and non-TCR-V β 13.1 clonal CD4 $^+$ LGL lymphocytosis. A detailed description of the clinical characteristics of patients with monoclonal TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ LGL lymphocytosis is provided by Lima et al.¹⁸

that antigen-driven TCR $\alpha\beta^+$ /CD8 $^+$ T-LGL leukemias would depend not only on the complementary sequences and specific binding of the TCR to the antigen but also on the individual HLA haplotypes, while for TCR $\gamma\delta^+$ T cells this HLA restriction would not apply.

In the present study, we have analyzed a large series of 36 patients with monoclonal TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ T-LGL lymphocytosis grouped according to TCR-V β 13.1 $^+$ usage versus other TCR-V β families. Our aim was to explore the potential existence of an association in these patients between the expanded TCR-V β families, the CDR3 sequences of the TCR-V β gene, and the HLA genotype. Our results indicate that all patients with monoclonal expansions of TCR-V β 13.1 $^+$ /CD4 $^+$ T cells display a common HLA-DRB0701 $^+$ genotype and express identical motifs in the CDR3-TCR-V β sequence, suggesting a common antigen-driven origin.

Patients, materials, and methods

Peripheral blood (PB) samples from human patients were obtained after informed consent was given by the patients (all of them more than 18 years old), in accordance with the local ethics committee of the University Hospital of Salamanca and the Declaration of Helsinki.

Patients and samples

A total of 161 T-LGL cases were referred to the Cytometry Service of the University Hospital of Salamanca (63 TCR $\alpha\beta^+$ /CD8 $^+$ /CD4 $^-$, 55 TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ /NKa $^+$ /CD8 $^{-/+dim}$, 40 TCR $\gamma\delta^+$, and 3 TCR $\alpha\beta^+$ /CD8 $^-$ /CD4 $^-$ cases) between September 1999 and March 2006. From them, 36 individuals with monoclonal TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ /NKa $^+$ /CD8 $^{-/+dim}$ lymphocytosis (19 males and 17 females; mean age, 63 \pm 12 years, ranging from 36 to 81 years) were selected and included in this study. In all these latter cases, PB samples were collected into tubes containing K3-EDTA, according to the local ethics committees. The major clinical and laboratory features of this group of patients, according to the type of TCR-V β family expressed (TCR-V β 13.1 versus non-TCR-V β 13.1), are shown in Table 1 in comparison with those of a randomly selected series of 24 patients with monoclonal TCR $\alpha\beta^+$ /CD8 $^+$ /CD4 $^-$ lymphocytosis. At the close of the study, the median follow-up of the patients with monoclonal TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ /NKa $^+$ /CD8 $^{-/+dim}$ lymphocytosis was 72 months (range, 10 to 233 months).

A total of 930 PB samples from unrelated healthy subjects were used as controls to establish the frequency of the different HLA haplotypes in the healthy population, while PB samples from 15 adult individuals (older than 50 years) were used as controls to establish the TCR-V β repertoire usage in TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ T cells.

Immunophenotypic studies

For the analysis of the TCR-V β repertoire of CD4 $^+$ /CD8 $^{-/+dim}$ LGL T lymphocytes, a panel of 24 monoclonal antibodies (MAbs) directed against

an identical number of members of 21 different TCR-V β families (TCR-V β repertoire Kit; Immunotech, Marseille, France) was used in 4-color stainings. Further phenotypic characterization of CD4⁺/CD8^{-/+dim} LGL T cells was performed using the following 4-color combinations of MABs: fluorescein isothiocyanate (FITC)/phycoerythrin (PE)/PE–cyanin 5 (PC5) or peridinin chlorophyll protein (PerCP)/allophycocyanin (APC): CD2/CD7/CD4/CD8, CD5/CD7/CD4/CD8, CD38/CD11b/CD4/CD8, CD57/CD11c/CD4/CD8, CD16/CD56/CD4/CD8, CD122/CD25/CD4/CD8, CD45RA/CD45RO/CD4/CD8, CD62L/CD28/CD4/CD8, CD11a/HLA-DR/CD4/CD8, CD16/NK1.1/CD4/CD8, CD158a/CD161/CD4/CD8, CD57/CD8/CD56/CD4, and cytoplasmic (Cy) perforin/Cy granzyme B/CD56/CD4. The source and specificity of each MAB reagent used has been previously described in detail.¹⁸

Cell staining was performed using a whole blood "stain-and-then-lyse" method (FACS lysing solution; Becton Dickinson Biosciences [BDB], San Jose, CA) and a direct immunofluorescence technique, as previously reported in detail.¹⁸ For the cytoplasmic staining, the Fix & Perm reagent kit (Caltag Laboratories, San Francisco, CA) was used according to the recommendations of the manufacturer.

Data acquisition was performed immediately after completion of sample preparation in a FACSCalibur flow cytometer (BDB) using the CellQUEST software program (BDB). The Paint-A-Gate Pro software program (BDB) was used for data analysis. In each case, the aberrant T-cell population was defined as CD4⁺/CD8^{-/+dim} and/or CD4⁺/CD56⁺ large granular—intermediate side ward light scatter (SSC^{intermediate})—events (Figure 1) for its further phenotypic characterization.

Preparation of DNA and HLA typing

High molecular weight DNA was prepared from 200 μ L PB using the QIAGEN bloodmicro kit (Qiagen, Hilden, Germany). HLA genotyping for HLA-ABC and both HLA-DRB1 and HLA-DQB1 was performed by sequence-specific oligonucleotide–polymerase chain reaction (SSPO-PCR) techniques using the Dynal Reli SSO kit (DYNAL Biotech, Bromborough, United Kingdom). Ambiguous results were resolved by sequence-based typing (SBT). DNA samples were amplified by PCR using the Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequencing was performed on an ABI 377 DNA sequencer (Applied Biosystems), and the data obtained were analyzed using the Match Tools v 1.0 Sequencing Analysis software program (Applied Biosystems). The ancestral haplotypes are putative because it was not possible to verify their segregation from family studies.

PCR amplification and nucleotide sequence analysis of TCR

High molecular weight DNA was prepared from freshly frozen PB samples using standard protocols including proteinase K treatment. In addition, total RNA was isolated from fluorescence-activated cell sorter (FACS)-sorted CD4⁺ and CD8⁺ T-cell populations (purity more than 95%) from pooled PB mononuclear cells (MNCs) of 5 non-HLA-DR*0701 adult healthy donors and from PB MNCs of 1 HLA-DR*0701 healthy individual and reverse transcribed into cDNA. TCR V β 13.1 gene family–specific PCR was performed using specific primers as previously described.²⁴ PCR products were cloned into pGEM-T easy vector, and single-colony PCR was performed on positive clones. Single-colony PCR products were directly sequenced.

DNA was amplified using a mixture of sense primers annealing to the TCR-V β 13 sequence in conjunction with a mixture of antisense primers complementary to the germ-line J regions as previously reported in detail.²⁴ In most samples, clonal products from the V β gene PCR were sequenced directly using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit. In fact, the amplified sequences exhibited identical rearranged monoclonal TCR sequences, even in the VDJ junctional hypervariable regions, indicating that these expanded regions were clonal. To confirm the validity of the sequences obtained (thereby avoiding the possibility of either contamination or sequencing mistakes), a more detailed analysis of the sequences obtained was performed in some cases. For that purpose, PCR products were inserted into the PCR2.1-TOPO vector (Invitrogen, Barcelona, Spain),

which was followed by transformation into competent *Escherichia coli* cells; on average, 5 colonies were randomly selected for sequencing using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit. A total of 98 V β 13.1 clones (69 from the non-HLA-DR*0701 donors and 29 from the HLA-DR*0701 donor) in the CD4⁺ T-cell fraction and 53 V β 13.1 clones (38 from the non-HLA-DR*0701 donors and 15 from the HLA-DR*0701 donor) in the CD8⁺ T-cell fraction were sequenced and analyzed. All sequence reactions were analyzed using an automated DNA sequencer (ABI 377; Applied Biosystems).

Database searches

Sequences obtained were aligned using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) and ImMunoGeneTics (IMGT) databases.

Statistical methods

For all clinical and laboratory parameters included in Table 1, mean, standard deviation, and range were calculated using the SPSS program (SPSS 12.0, Chicago, IL). To establish the statistical significance of the differences observed between groups, either the Pearson χ^2 test or Fisher exact test was used for categorical variables, and the Mann-Whitney *U* nonparametric test was used (SPSS 12.0) for continuous variables. *P* values below .05 were considered to be associated with statistical significance.

AQ: 13

Results

Immunophenotype of the expanded CD4⁺ LGL T cells

In all cases studied, expanded CD4⁺ LGL T cells showed relatively high SSC features as compared with normal PB CD4⁺ T lymphocytes and common phenotypic characteristics consisting of TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/CD8^{-/+dim} cells with a typical cytotoxic (granzyme B⁺, CD56⁺, CD57⁺, CD11b^{+/+}) activated, memory/effector T-cell phenotype (CD2^{bright}, CD7^{-/+d}, CD11a^{bright}, CD28⁻, CD62L⁻, HLA-DR⁺) (Figure 1). In about half (47%) of the cases, clonal T cells coexpressed CD45RA and CD45RO, while in the other cases they had a CD45RA⁺/CD45RO⁻ phenotype. Other NKA markers (CD11c, CD16, CD94, CD158a, CD161, and NK1.1) and T-cell activation-related antigens (CD25, CD38, and CD122) were absent on the CD4⁺ LGL T cells. Overall, these cells represented 47% \pm 23% of all PB lymphocytes, with a mean (\pm 1 SD) absolute number of $6.6 \times 10^9 \pm 3.3 \times 10^9$ PB TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+dim} T lymphocytes per liter.

AQ: 14

F1

Flow cytometric analysis of the TCR-V β repertoire of CD4⁺/CD8^{-/+dim} LGL T cells was consistent with a (mono)clonal expansion in all cases studied, which accounted for 72% \pm 21% of all PB CD4⁺ T cells. In 27 cases the expanded TCR-V β family was identified with the panel of TCR-V β reagents used, corresponding to TCR-V β 13.1 in 15 cases (42%), TCR-V β 2.1 in 2 (5.6%), TCR-V β 3.1 in 2 (5.6%), TCR-V β 8.1 + V β 8.2 in 2 (5.6%), TCR-V β 17.1 in 2 (5.6%), TCR-V β 22 in 2 (5.6%), and TCR-V β 11 or TCR-V β 14.1 in 1 case each (2.8%). In the remaining 9 patients, the expanded TCR-V β family was not identified (25%) with the panel of MABs used. Figure 2 shows the nominal size of the TCR-V β expansion present in each patient (as percentage of the total PB CD4⁺ T cells) in comparison with the size of the corresponding TCR-V β family observed in a cohort of age-matched healthy subjects; the proportion of TCR-V β 13.1⁺ cells represented 6.7% \pm 2.5% of total PB CD4⁺ T cells from healthy subjects, while in the patient group it represented between 12.5% and 94.1% (median, 75%).

F2

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

4 GARRIDO et al

BLOOD, 1 JUNE 2007 • VOLUME 109, NUMBER 11

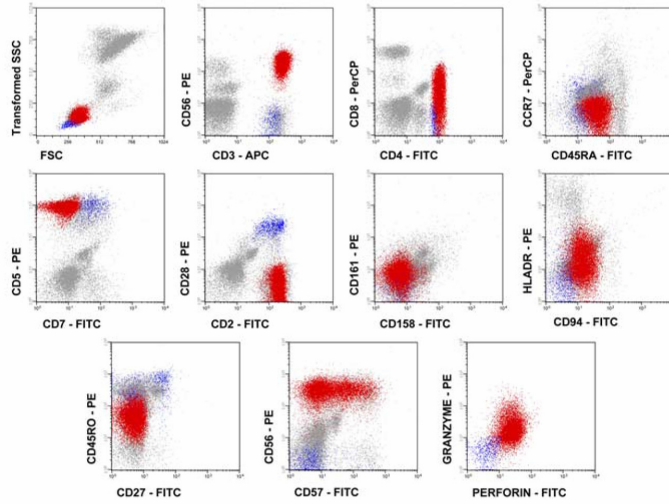


Figure 1. Immunophenotypic features of monoclonal TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/NK α ⁺/CD8⁻ T-LGL. Representative dot plots illustrate the phenotypic patterns shown by monoclonal TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/NK α ⁺/CD8⁻ T-LGL. Red dots correspond to monoclonal TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/NK α ⁺/CD8⁻ T-LGL, blue dots correspond to normal residual non-LGL CD4⁺ T cells, while gray dots correspond to PB leukocytes other than CD4⁺ T cells.

Association between the HLA haplotypes and the TCR-V β repertoire of clonal TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/NK α ⁺/CD8⁻ T-LGL

A significant association ($P = .004$) was found between the TCR-V β repertoire and the HLA genotype of the studied cases (Table 2). Accordingly, all 15 patients who showed expansion of TCR-V β 13.1⁺ CD4⁺ T cells were HLA-DRB1*0701⁺ (Figure 3). In turn, the frequency of the HLA-Cw*0401 allele was slightly higher among those patients in whom the expanded TCR-V β family was not contained in the panel of MAb reagents used than among both

TCR-V β 13.1⁺ patients and cases expressing a known TCR-V β other than 13.1 (67% versus 33%; $P = .1$). In addition, the frequency of cases with an HLA-DRB1*03 and HLA-DRB1*04 genotype was lower among CD4⁺ T-LGL patients than in the control group (14% versus 29% and 6% versus 22%, respectively; $P \leq .04$).²⁵ Interestingly, 4 of the 15 HLA-DRB1*0701 cases included the 44.2 ancestral haplotype (HLA-A*2902, B*4403, C*1601, DRB1*0701, and DQB1*0202) (cases 7, 9, 11, and 14) (Table 2). Another 2 cases (cases 2 and 10) were related to the 57.1

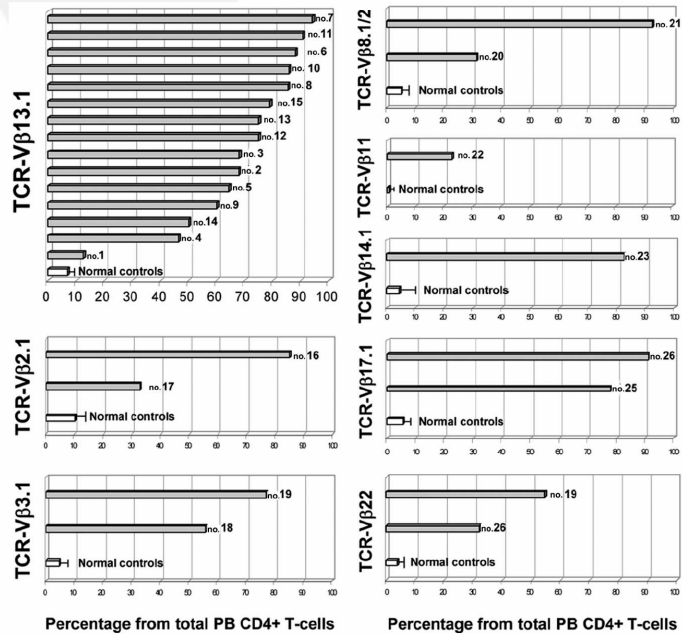


Figure 2. Illustrative representation of the size of the actual identifiable TCR-V β expansion present in each patient (as percentage of total PB CD4⁺ T cells) in comparison with the size of the corresponding TCR-V β family observed in a cohort of age-matched healthy subjects ($n = 15$). Gray bars correspond to patients, each one identified by the corresponding case number, while white bars and horizontal lines correspond to the mean value and 1 SD found in healthy controls, respectively.

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

BLOOD, 1 JUNE 2007 • VOLUME 109, NUMBER 11

CLONAL TCR-V β 13.1+/CD4+ T-LGL LYMPHOCYTOSIS: AN AN 5

Table 2. HLA genotype of patients with clonal TCR $\alpha\beta$ + /CD4+ expansions

Case no.	Expanded TCR-V β family	HLA-DRB	HLA-DQB	HLA-A	HLA-B	HLA-C
1	13.1	0701/1103	0301/0303	2301/3201	3501/5002	0401/0401
2	13.1	0701/1404	0202/0503	0101/2601	1401/5701	0602/0802
3	13.1	0701/0102	0303/0501	0201/0201	5101/5701	0102/0701
4	13.1	0701/1401	0303/0503	0201/2402	4402/5701	0501/0701
5	13.1	0701/0101	0202/0501	0201/0201	3501/4901	0401/0701
6	13.1	0701/0101	0202/0501	0301/0301	1302/3501	0401/0602
7	13.1	0701/0401	0202/0301	2601/2902	4402/4403	0501/1601
8	13.1	0701/0701	0202/0202	0101/2402	1801/5001	0501/0602
9	13.1	0701/0101	0202/0501	0101/2902	1401/4403	0802/1601
10	13.1	0701/1501	0303/0602	0201/0201	0702/5701	0602/0702
11	13.1	0701/0301	0201/0202	0301/2902	1801/4403	0501/1601
12	13.1	0701/0301	0201/0202	0101/2301	0801/4403	0401/0701
13	13.1	0701/0301	0201/0202	2301/3002	1801/5801	0501/0701
14	13.1	0701/0101	0201/0501	1101/2902	3501/4403	0401/1601
15	13.1	0701/1501	0202/0602	2902/3002	0702/4101	0701/1701
16	2.1	0301/1317	0201/0603	2402/2402	0801/3508	0401/0701
17	2.1	0701/1301	0202/0609	3002/6801	4403/5101	0701/1402
18	3.1	0403/1501	0302/0602	0301/3202	0702/3501	0401/0702
19	3.1	1501/1602	0502/0602	0201/0201	3701/4402	0501/0602
20	8.1 + 8.2	1101/1101	0301/0301	0201/6901	1801/3508	0701/1203
21	8.1 + 8.2	0301/1501	0201/0602	0201/0201	1518/3501	0401/0704
22	11	1101/1601	0301/0502	0101/0201	3701/4002	0602/1204
23	14.1	0701/0701	0202/0303	0103/2902	4403/5701	0701/1601
24	17.1	0802/1101	0301/0402	0102/2301	1401/3501	0701/0801
25	17.1	0701/1401	0202/0503	0201/2902	4403/5101	1502/1601
26	22	0102/0801	0402/0501	2402/3301	1402/3503	0401/0802
27	22	1103/1301	0301/0603	0201/3201	1509/4002	0202/0704
28	NI	0701/1104	0201/0301	1101/2902	4001/4403	0304/1601
29	NI	0701/1101	0201/0301	0201/0301	3503/5001	0401/0501
30	NI	0701/1301	0202/0604	3201/6801	1401/5301	0401/0802
31	NI	0701/1602	0202/0502	0301/2402	0702/3801	0702/1203
32	NI	1101/1401	0301/0503	0201/2603	4002/3501	0401/0501
33	NI	0101/1301	0501/0604	1101/1101	4004/5601	0102/0202
34	NI	0101/1101	0301/0501	0201/2402	1801/3501	0401/1203
35	NI	0101/1301	0501/0604	1101/3101	3501/5101	0401/0501
36	NI	1302/1305	0301/0604	0201/0205	3508/4101	0401/0701

Extended/ancestral haplotypes are underlined.
NI indicates TCR-V β family not identified by immunophenotyping.

ancestral haplotype (HLA-A*01, B*5701, C*0602, DRB1*0701, and DQB1*0303). The ancestral haplotypes 35.2 (HLA-A*1101, B*3501, C*0401, DRB1*0101, DQB1*0501) and 35.1 (HLA-C*0401, B*3501, DRB1*11, DQB1*0301) were also found in 3 (cases 5, 6, and 14) and 1 patients (case 1), respectively; however,

among these patients, only case 14 showed a complete 35.2 haplotype, with a 4-locus haplotype being detected in the other 3 cases. Cases 8, 13, and 15 were not considered to be related with ancestral haplotypes, although they showed haplotypes that are frequently present in the Spanish population.²⁶

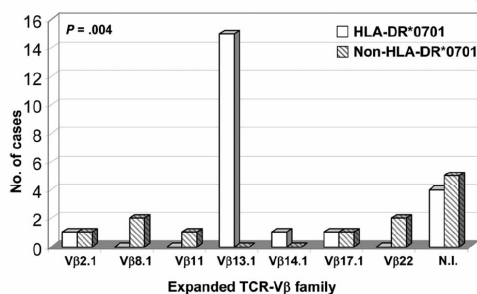


Figure 3. Frequency of the HLA-DRB1*0701 genotype in patients with monoclonal TCR $\alpha\beta$ + /CD4+ /NK α + /CD8 $^{-/-}$ T-LGL lymphocytosis grouped according to the expanded TCR-V β family. NI indicates that the exact TCR-V β family expanded was not identified with the panel of anti-TCR-V β MAbs used.

Expanded clonal CD4+ /CD8 $^{-/+dim}$ T cells from HLA-DRB1*0701 patients exhibit conserved TCR β chain motifs

Molecular analysis of the length of CDR3 of CD4+ /CD8 $^{-/+dim}$ T cells from those cases expressing TCR-V β 13.1 showed a pattern consistent with monoclonality based on both TCR-V β usage and CDR3 length (Table 3). Further comparison of CDR3 size distribution in clonal CD4+ /CD8 $^{-/+dim}$ T cells from the same patients showed a highly restricted usage of V β D β J β gene segments and shared CDR3 configurations. Accordingly, 11 of 13 patients used the same J1.1 and V segments, and they had highly similar CDR3 configurations (Table 3). Although 3 different J segments were used in the clonal expansions derived from CD4+ /CD8 $^{-/+dim}$ T lymphocytes, similar VDJ junctional region sequences were found (Table 4). Remarkably, in 5 of the 11 V β 13.1-D β 1-J β 1.1 cases, the combinatorial process involved the deletion of 1 to 3 nucleotides

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

Table 3. VDJ protein sequences of clonally expanded TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ T-LGL

Case no.	V-J usage	CDR2	3' end of V β	CDR3: N-D β 1-N	5' end of J β
1	V β 13S1-J1.1	SVGAGI	CASS	KQGV	TEAFFG
2	V β 13S1-J1.1	SVGAGI	CASS	KQGA	TEAFFG
3	V β 13S1-J1.1	SVGAGI	CAS	RKQGA	TEAFFG
4	V β 13S1-J1.1	SVGAGI	CASS	YQGA	TEAFFG
5	V β 13S1-J1.1	SVGAGI	CASS	SQGT	TEAFFG
6	V β 13S1-J1.1	SVGAGI	CAS	RHQGS	TEAFFG
7	V β 13S1-J1.2	SVGAGI	CASS	HQGA	NGYTFG
8	V β 13S1-J1.5	SVGAGI	CASS	YQGA	QPQHFG
9	V β 13S1-J1.5	SVGAGI	CASS	YQGS	QPQHFG
10	V β 13S1-J1.1	SVGAGI	CAS	RRQGY	TEAFFG
12	V β 13S1-J1.1	SVGAGI	CASS	YQGA	TEAFFG
13	V β 13S1-J1.1	SVGAGI	CAS	RRQGA	TEAFFG
14	V β 13S1-J1.1	SVGAGI	CAS	NLQGS	TEAFFG
15	V β 13S1-J1.1	SVGAGI	CASS	YQGSA	EAFFG
10*	V β 13S1-J1.1	ND	CASS	Y	NTEAFFG
52*	V β 13S1-J1.1	ND	CASS	WQGV	TEAFFG
29*†	V β 13S1-J1.1	ND	CAS	NRGLY	TEAFFG

Comparison of the CDR2 and CDR3 of clonal TCR V β 13S1 gene rearrangements from 14 CD4 $^+$ T-LGL cases (this analysis could not be performed in case 11 due to sample shortage). Segments are aligned according to the conserved motifs (CASS for the V β and FG for the J β segment). Nucleotide sequences were aligned to TCR sequences according to the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and ImMunoGeneTics (IMGT) databases.

ND indicates not determined.

*VDJ protein sequence of the 3 of 98 clones using the J β 1.1 segment found among PB V β 13.1 $^+$ CD4 $^+$ T cells from adult healthy donors.

†This clone corresponds to an HLA-DR*0701 donor.

from the 5' end of V β 13.1 gene and the insertion of a variable number of nontemplate nucleotides (Table 4). Accordingly, in all cases analyzed (n = 14) the mean length of CDR3 was considerably shortened (4 or 5 codons), the distance between the CASS and FG motifs constantly being of 9 codons. Interestingly, shared motifs consisting of at least 2 identical amino acids were found within the VDJ junctional regions of the expanded CD4 $^+$ T cells derived from different patients, a consensus XQGX motif being shared by all cases (Table 3). For 7 cases the GGG codon yielded a glycine; in contrast, in 2 other cases the glycine was generated by the GGT and in another case by a GGA codon. In turn, glutamine (Q) was yielded in all cases by the CAG codon. One of the motifs (YQGA) was identical among the clonally expanded CD4 $^+$ /CD8 $^{-/+dim}$ T cells derived from 3 patients, and the XQGA motif was detected in 7 individuals. In contrast, only 2 (2.9%), 8 (11.6%), and 2 (2.9%) of 69 clones of PB CD4 $^+$ T cells from non-HLA-DR*0701 healthy adults were found to use

the J β 1.1, J β 1.2, and J β 1.5 gene segments, respectively; similarly, from the 29 clones of CD4 $^+$ T cells sequenced from the HLA-DR*0701 adult healthy donor, only 1 (3.4%) and 3 (10%) of them were found to use J β 1.1 and J β 1.2 gene segments, respectively. Interestingly, of these 16 clones of CD4 $^+$ T cells, only 1 of those 3 clones using the J β 1.1 gene segment was highly similar in the CDR3 configuration to those detected in the patients analyzed (Tables 3-4); this clone was sequenced from the pooled non-HLA-DR*0701 MNCs. In addition, the XQGX configuration could not be detected in other clones of PB CD8 $^+$ T cells from healthy adults using the J β 1.1, J β 1.2, and J β 1.5 gene segments (0 of 9 clones from the 38 CD8 $^+$ T-cell clones sequenced from non-HLA-DR*0701 donors and 0 of 3 from the 15 CD8 $^+$ T-cell clones sequenced from the HLA-DR*0701 donor). Finally, we searched GenBank for VDJ rearrangements with similar XQGX amino acid sequences, but no TCR close matches were found.

Table 4. Sequence of the VDJ junctional TCR β regions of the clonally expanded TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ T-LGL showing V β 13S1-J1.1

Case no.	V-J usage	3' end of V β 13.1	N	D β 1	N	5' end of J β
1	V β 13S1-J1.1	AGCAGT	AA	gggACAGGggc	AGT	aaCACTGAAGCTTTC
2	V β 13S1-J1.1	AGCAGT	AA	gggACAGGGGc		aaCACTGAAGCTTTC
3	V β 13S1-J1.1	AGCAG	AAA	gggACAGGGGGc		aaCACTGAAGCTTTC
4	V β 13S1-J1.1	AGCAGT	TAC	gggaCAGGGGc	CG	aaCACTGAAGCTTTC
5	V β 13S1-J1.1	AGCAGT	TCC	gggaCAGGGGc	AC	aaCACTGAAGCTTTC
6	V β 13S1-J1.1	AGCAG	ACAT	gggaCAGGggc	TAG	aaCACTGAAGCTTTC
10	V β 13S1-J1.1	AGC	CGGC	ggGACAGGGGc	AAA	aaCACTGAAGCTTTC
12	V β 13S1-J1.1	AGCAGT	TAT	gggaCAGGGGGc		aCACTGAAGCTTTC
13	V β 13S1-J1.1	AGCAG	GC	ggGACAGGGGGc		aaCACTGAAGCTTTC
14	V β 13S1-J1.1	AGCA	ATCT	gggACAGGggc	TAG	aaCACTGAAGCTTTC
15	V β 13S1-J1.1	AGCAGT		TACCAAGGCTCGG		aaCACTGAAGCTTTC
10*	V β 13S1-J1.1	AGCAGTTAC	—	—	—	AACACTGAAGCTTTC
52*	V β 13S1-J1.1	AGCAGTT	GG	gggaCAGGGGc	TGG	aaCACTGAAGCTTTC
29*†	V β 13S1-J1.1	AGCA	—	gggACAGGGGc	TTGT	aaCACTGAAGCTTTC

— indicates —.

*Sequence of the 3 clones using the J β 1.1 segment found among PB V β 13.1 $^+$ CD4 $^+$ T cells from adult healthy donors.

†This clone corresponds to an HLA-DR*0701 donor.

Discussion

Monoclonal TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+d} T-LGL lymphocytosis is a subgroup of monoclonal LGL lymphoproliferative disorders, different from both the CD8⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-LGL, TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-LGL, and natural killer (NK) cell-type LGL leukemias.¹⁸ Noteworthy, in the present study, the former subgroup of clonal T-LGL lymphocytosis was found at a higher frequency than both TCR $\gamma\delta$ and NK-LGL leukemias, whereas it was slightly less common than TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD8⁺ T-LGL. In contrast to TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD8⁺ T-LGL, monoclonal TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+d} T-LGL cases have been only sporadically reported in the literature, while they were relatively frequent in our series. According to the present study, such discrepancy might be related to the fact that TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+d} T-LGL cases usually display a more indolent clinical course—although rare cases associated with aggressive disease have also been reported in the literature—associated with a significantly lower frequency of neutropenia, anemia, and other associated autoimmune diseases, in addition to a lower percentage of cases requiring treatment, in comparison with TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD8⁺ T-LGL lymphocytosis. However, the apparently high frequency of CD4⁺ LGL cases found in our series could also be due to the fact that we actively searched for these cases. Recently, we showed that in patients with monoclonal TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+d} T-LGL lymphocytosis the expanded clonal T cells display a restricted usage of a limited number of TCR-V β families,¹⁸ from which TCR-V β 13.1 was particularly overrepresented in comparison with its frequency in the PB counterpart of these cells from healthy individuals.²⁷ These observations suggest the potential involvement of a common antigen in driving the expansion of clonal T cells in these patients. In such a situation, shared HLA haplotypes, as well as common motifs in the CDR3 sequences of the TCR-V β genes, could be expected. Upon comparing TCR-V β 13.1⁺ cases with all non-TCR-V β 13.1 individuals, a clear association was found between the expanded TCR-V β family and the HLA genotype, all TCR-V β 13.1⁺ cases displaying an HLA-DRB1*0701 allele. The random chance that both events coincide is about 2%, versus 42% in our patients. In line with these observations, it has recently been reported²⁸ that most CD4⁺ T cells from an HIV-1⁺/CMV⁺-infected patient with lytic granules containing cytotoxic proteins (such as granzymes and perforin) displayed a clear HLA class II- and not class I-restricted lytic activity. Accordingly, after specifically blocking of HLA class II, CMV-specific CD4⁺ LGL T cells from this patient resulted completely inhibited in their *in vitro* ability to produce cytokines. In addition to the strong association between the expanded TCR-V β and HLA class II, all (unrelated) HLA-DRB1*0701⁺ patients showing TCR-V β 13.1 expansions had a common CDR3 amino acid motif (XQGX) in the expanded T lymphocytes. Interestingly, this common "XQGX" CDR3 amino acid motif could not be found among the TCR-V β 13.1 sequences of T lymphocytes from healthy individuals deposited in GenBank, and it was detected only at very low frequencies among the few clones using the J β 1.1, J β 1.2, and J β 1.5 gene segments identified in both purified CD4⁺ (1 of 16 clones) and CD8⁺ (0 of 12 clones) PB T cells from healthy adults. In addition, in a normal T-cell repertoire, different T cells have distinct CDR3 lengths that result in a gaussian distribution, while in our series virtually all expanded monoclonal CD4⁺ T-LGL cases expressing TCR-V β 13.1 showed the presence of TCR β chains characterized by a unique CDR3 length. Altogether, the association between monoclonal expansions of TCR-V β 13.1 T-LGL, the

HLA-DRB1*0701 genotype, and a common XQGX motif in the CDR3 sequence strongly suggests that monoclonal TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+d} T-LGL from these unrelated patients has been selected by a specific common antigen and that they could be the result of a chronic, long-term, antigen-driven process, as previously reported for TCR $\gamma\delta$ LGL leukemias²³ and B-cell chronic lymphocytic leukemias using the VH3-21 gene, based on their CDR3 homology.²⁹ Because the expanded CD4⁺/CD8^{-/+d} T-LGL clones expressed TCR-V β 13.1 with restricted antigen-binding sites in the context of HLA-DR*0701, it could be suggested that they result from an exogenous peptide-driven T-cell stimulation. Furthermore, if this selection involves antigen binding and triggering through the TCR, the antigenic epitope would most likely be restricted in its nature and structure,³⁰ although some differences in the amino acid sequences of the CDR3 region were noted. The overlapping phenotypes of the expanded cells between different (unrelated) patients would further reinforce an underlying common pathogenesis. As previously reported,¹⁸ monoclonal TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+d} T-LGL cases show a remarkably uniform cytotoxic T-cell phenotype, as reflected by a common pattern of expression of NKa surface markers and cytotoxic proteins (CD56⁺, CD57⁺, Cy granzyme B⁺) in the absence of expression of other (CD16⁻, CD94⁻, CD158a⁻, CD161⁻, NKb1⁻) NK-associated receptors.

Recent reports provide strong accumulating evidence for a role of chronic antigen stimulation in clonal selection and progression of B-cell lymphomas¹⁰ as well as T-LGL leukemias.^{9,22,23} Although identical TCR gene rearrangement are typically identified in LGL leukemia, indicating a (mono)clonal proliferative disease, demonstration of monoclonality does not necessarily imply either neoplastic or malignant transformation.^{9,23} In fact, in the present study we were unable to demonstrate the presence of any genetic alteration in the patients studied, either by conventional karyotyping or by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (data not shown). Accordingly, the most probable pathogenetic mechanism leading to an increased survival and/or proliferation of specific T cell clones in CD4⁺ T-LGL patients could be more probably related to chronic antigenic stimulation than to a cytogenetic-associated neoplastic transformation. TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+d} T cells have been found in increased proportions in humans in different disease conditions where chronic antigen stimulation may occur, such as neoplasias, chronic viral infections, autoimmune disorders, and allografts.^{28,31-34} Unfortunately, no study has been reported in which CDR3 sequences of the expanded cells have been analyzed in such disease conditions; an exception would be graft versus host disease (GVHD) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), where the expanded CTL clones (including both CD4⁺ and CD8⁺ T cells) have been clonotyped.^{35,36} Accordingly, a variable but frequently high degree of CDR3 homology within a given V β family has been reported in patients undergoing allo-HSCT³⁵ whereby the extent of the alteration of the T-cell repertoire is significantly higher in PBMCs from patients with acute GVHD than it is in cases without GVHD.³⁶ Based on these results, it has been hypothesized that such abnormalities could reflect multiple antigen-driven T-cell clonal expansions against alloantigens. Altogether, the evidence of oligoclonal expansions of TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+d} T cells in several pathological conditions, interpreted as a specific T-cell response against tumor cells, virus, and autoantigens or alloantigens, clearly suggests that clonal TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+d} T-LGL lymphocytosis represents a dysregulated reaction to exogenous antigens. As a result, a wide and complex spectrum consisting of different clinical entities (from transient immune reaction to LGL leukemia) could be

AQ: 22

AQ: 21

AQ: 23

expected, similar to that described for clonal TCR $\alpha\beta^+$ /CD8 $^{++}$ T-LGL lymphocytosis.⁹ Although the exact identity of such antigen(s) remains unknown, based on our results we may conclude that monoclonal TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ /NK α^+ /CD8 $^{-/+d}$ T-LGL lymphocytosis cases are not random, because they do not reflect the expected V β -J physiological frequencies. In addition, the diverse geographic origin of our patients would suggest that the potential antigen involved in these processes is widely distributed. We can also rule out the involvement of a superantigen, due to the clear major histocompatibility complex (MHC)–TCRV β –restricted association here observed.³⁷ Finally, the HLA-II restriction found for these clonal expansions of CD4 $^+$ T cells supports the involvement of a peptide with an exogenous origin leading to a repetitive and chronic engagement of the TCR of the expanded CD4 $^+$ T-LGL.

Another interesting observation is that monoclonal expansions of CD4 $^+$ T-LGL have only rarely been reported in the literature¹⁸ despite the fact that HLA-DRB1*0701 is frequently observed in the Caucasian population (about 30%).²⁵ These observations further support the role of factors other than the HLA genotype in leading to the dysregulation of the immune response and clonal expansion of CD4 $^+$ T-LGL. In this sense, the presence of common extended haplotypes among the TCR-V β 13.1 $^+$ patients suggests that a genetic influence cannot be ruled out. In particular, polymorphisms in genes within the MHC (ie, MICA, cytokines) should be considered with regard to dysregulation of CD4 $^+$ cytotoxic T cells.

In summary, in the present study we show that patients with monoclonal expansions of TCR-V β 13.1 $^+$ /CD4 $^+$ T-LGL display a common HLA-DRB1*0701 genotype and express identical motifs in a constantly shorter-length CDR3-TCR-V β sequence, supporting a common antigen-driven origin for these T-cell disorders. Further identification of the short peptides bound to HLA molecules preferentially expressed by clonal TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ T-LGL would provide new insight into the pathogenesis of the disease; at the same time it could facilitate the identification and establishment of novel preventive and/or therapeutic strategies in individuals with monoclonal CD4 $^+$ T-LGL lymphocytosis at risk for transformation.

References

- Porcu P, Baiocchi RA, Magro C. Recent developments in the biology and therapy of T-cell and natural killer-cell lymphomas. *Curr Opin Oncol*. 2003;15:353-362.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84:1361-1392.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting—Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*. 1999;17:3835-3849.
- Willemze R, Jaffe ES, Burg G, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005;105:3768-3785.
- Dhodapkar MV, Li CY, Lust JA, Tefferi A, Philylyk RL. Clinical spectrum of clonal proliferations of T-large granular lymphocytes: a T-cell clonopathy of undetermined significance? *Blood*. 1994;84:1620-1627.
- Kussick SJ, Wood BL, Sabath DE. Mature T cell leukemias which cannot be adequately classified under the new WHO classification of lymphoid neoplasms. *Leukemia*. 2002;16:2457-2458.
- Burg G, Kempf W, Haeflner A, et al. From inflammation to neoplasia: new concepts in the pathogenesis of cutaneous lymphomas. *Recent Results Cancer Res*. 2002;160:271-280.
- Kanchan K, Loughran TP Jr. Antigen-driven clonal T cell expansion in disorders of hematopoiesis. *Leuk Res*. 2003;27:291-292.
- Wlodarski MW, O'Keefe CO, Howe EC, et al. Pathological clonal cytotoxic T cell responses—non-random nature of the T-cell receptor restriction in large granular lymphocyte leukaemia. *Blood*. 2005;106:2769-2780.
- Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:251-262.
- Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:2031-2035.
- Yin CC, Medeiros LJ, Abruzzo LV, Jones D, Farhood AI, Thomazy VA. EBV-associated B and T-cell posttransplant lymphoproliferative disorders following primary EBV infection in a kidney transplant recipient. *Am J Clin Pathol*. 2005;123:222-228.
- Tokura Y, Yagi H, Ohshima A, et al. Cutaneous colonization with staphylococci influences the disease activity of Sezary syndrome: a potential role for bacterial superantigens. *Br J Dermatol*. 1995;133:6-12.
- Linnemann T, Gellrich S, Lukowsky A, et al. Polyclonal expansion of T cells with the TCR V beta type of the tumour cell in lesions of cutaneous T-cell lymphoma: evidence for possible superantigen involvement. *Br J Dermatol*. 2004;150:1013-1017.
- Wong KF, Yip SF, So CC, Lau GTC, Yeung YM. Cytomegalovirus infection associated with clonal proliferation of T-cell large granular lymphocytes: causal or casual? *Cancer Genet Cytogenet*. 2003;142:77-79.
- Lamy T, Loughran TP Jr. Current concepts: large granular lymphocyte leukemia. *Rev Med Interne*. 2001;22:452-459.
- Melenhorst JJ, Eniafe R, Follmann D, et al. T-cell large granular lymphocyte leukemia is characterized by massive TCRBV-restricted clonal CD8 expansion and a generalized overexpression of the effector marker CD57. *Hematol J*. 2003;4:18-25.
- Lima M, Almeida J, Teixeira MA, et al. TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ large granular lymphocytosis: a new clonal T-cell lymphoproliferative disorder. *Am J Pathol*. 2003;163:763-771.
- Lafarge X, Merville P, Cazin MC, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating $\gamma\delta$ T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis*. 2001;184:533-541.
- Hadrup SR, Strindhall J, Kollgaard T, et al. Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality

Acknowledgments

The authors thank Prof Federico Garrido (Department of Análisis Clínicos, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain) for his helpful discussions and support. We also thank the members of the Hematology Services from the following hospitals for their assistance in the sample and data collection: Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada, Spain), Hospital Universitario de Salamanca (Spain), Hospital Rio Hortega (Valladolid, Spain), Hospital General Yagüe (Burgos, Spain), Clínica San Miguel (Pamplona, Spain), Hospital de Navarra (Pamplona, Spain), Hospital del Bierzo (Ponferrada, Spain), Hospital General de Segovia (Spain), Hospital de León (Spain), Hospital Virgen de la Concha (Zamora, Spain), Hospital Miguel Servet (Zaragoza, Spain), Hospital Virgen de la Victoria (Málaga, Spain), Hospital Santo António (Porto, Portugal), Centro Hospitalar de Coimbra (Portugal), Instituto Português de Oncologia (Lisbon, Portugal), Hospital São João (Porto, Portugal), and Hospital Egas Moniz (Lisbon, Portugal).

Authorship

Contribution: P.G., Y.S., M.L., A.B., M.G., M.A.L.-N., A.W.L., and A.C.G.-M. performed research and analyzed data; F.R.-C. designed research, analyzed data, and wrote the paper; P.B. performed research and collected and analyzed data; J.C. performed research; and J.A. and A.O. designed research, collected data, analyzed data, and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

P.G. and F.R.-C. contributed equally to this work, and J.A. and A.O. contributed equally to this work.

Correspondence: Alberto Orfao, Servicio General de Citometría, Centro de Investigación del Cáncer, Campus Miguel de Unamuno, 37007-Salamanca, Spain; e-mail: orfao@usal.es.

AQ: 26

AQ: 27

- and an increased number of dysfunctional cytomegalovirus-specific T-cells in the very elderly. *J Immunol.* 2006;176:2645-2653.
21. Davey MP, Starkebaum G, Loughran TP Jr. CD3⁺ leukemic large granular lymphocytes utilize diverse T-cell receptor V beta genes. *Blood.* 1995;85:146-150.
 22. O'Keefe CL, Plasilova M, Wlodarski M, et al. Molecular analysis of TCR clonotypes in LGL: a clonal model for polyclonal responses. *J Immunol.* 2004;172:1960-1969.
 23. Sandberg Y, Almeida J, Gonzalez M, et al. TCR $\gamma\delta^+$ large granular lymphocyte leukemias reflect the spectrum of normal antigen-selected TCR $\gamma\delta^+$ T-cells. *Leukemia.* 2006;20:505-513.
 24. Van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations. Report of BIOMED-2 concerted action BMH4CT98-3936. *Leukemia.* 2003;17:2257-2317.
 25. Ramal LM, de Pablo R, Guadix MJ, et al. HLA class II allele distribution in the Gypsy community of Andalusia, southern Spain. *Tissue Antigens.* 2001;57:138-143.
 26. Flores-Villanueva PO, Hendel H, Caillat-Zuerman S, et al. Associations of MHC ancestral haplotypes with resistance susceptibility to AIDS disease development. *J Immunol.* 2003;170:1925-1929.
 27. Van den Beemd R, Boor PP, van Lochem EG, et al. Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls. *Cytometry.* 2000;40:336-354.
 28. Zaunders JJ, Wayne BD, Wang B, et al. Identification of circulating antigen-specific CD4⁺ T lymphocytes with a CCR5⁺, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term non-progressor and in CMV infection. *Blood.* 2004;103:2238-2247.
 29. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted V λ 2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood.* 2003;101:4952-4957.
 30. Stewart-Jones GB, McMichael AJ, Bell JI, Stuart DJ, Jones EY. A structural basis for immunodominant human T cell receptor recognition. *Nat Immunol.* 2003;4:649-650.
 31. Pérez-Andrés M, Almeida J, Martín-Ayuso M, et al. Characterization of bone marrow T cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and plasma cell leukemia demonstrates increased infiltration by cytotoxic/Th1 T cells demonstrating a skewed TCR-Vbeta repertoire. *Cancer.* 2006;106:1296-305.
 32. Porakishvili N, Kardava L, Jewell AP, et al. Cytotoxic CD4⁺ T cells in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia kill via perforin-mediated pathway. *Haematologica.* 2004;89:435-443.
 33. Legendre CM, Forbes RD, Loertscher R, Guttman RD, Legendre CM. CD4⁺/Leu-7⁺ large granular lymphocytes in long-term renal allograft recipients. A subset of atypical T cells. *Transplantation.* 1989;47:964-971.
 34. Namekawa T, Snyder MR, Yen JH, et al. Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4⁺CD28^{int} T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2000;165:1138-1145.
 35. O'Keefe CL, Sobecks RM, Wlodarski M, et al. Molecular TCR diagnostics can be used to identify shared clonotypes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2004;32:1010-1022.
 36. Liu C, He M, Rooney B, Kepler TB, Chao NJ. Longitudinal analysis of T-cell receptor variable beta chain repertoire in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12:335-345.
 37. Petersson K, Forsberg G, Walse B. Interplay between superantigens and immunoreceptors. *Scand J Immunol.* 2004;59:345-355.



2.- Evaluación de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) de genes que codifican para moléculas inmunoregulatoras en pacientes con linfocitosis T monoclonales de células grandes granulares CD4⁺/CD8^{-/+dim}

INTRODUCCIÓN: la linfocitosis clonal de linfocitos grandes granulares es un trastorno linfoproliferativo que surge de células maduras T (CD3⁺) o NK (CD3⁺). Ambos subtipos se manifiestan de forma heterogénea, bien de forma indolente o bien de forma agresiva. En el 80% de los casos las células LGL-T tienen un inmunofenotipo maduro del tipo CD3⁺, TCR $\alpha\beta$ ⁺, CD4⁻, CD8⁺, habiéndose sugerido que podría representar un desorden autoinmune causado por un estímulo antigénico crónico que habría producido sólo la expansión de la clona de células T citotóxicas CD8⁺. Esta hipótesis estaría sustentada por la asociación existente entre la leucemia LGL de células T y diferentes trastornos autoinmunes. Las linfocitosis monoclonales LGL – T CD4⁺ son menos comunes que las CD8⁺ (expresan niveles variable de CD8, CD8^{+dim}), presentan marcadores citotóxicos típicos (granzima B⁺, perforina⁺), CD56⁺, CD57⁺, y un inmunofenotipo altamente diferenciado CD27⁻, CD28⁻. En contraste, presentan un curso clínico con ausencia de citopenias, artritis o síntomas directamente atribuibles a la clásica LGL-T CD8⁺.

La patogénesis aún permanece incierta, aunque una de las hipótesis más extendidas es la de activación crónica de células T bien por un autoantígeno o un antígeno viral. En este sentido hay varios ejemplos, como la clara asociación entre el repertorio TCR-V β y el genotipo HLA, descrito en LGL-T CD4⁺. Dado el extenso repertorio del TCR, se ha postulado que el desarrollo de estas clonas no se desarrolla al azar, sino en el contexto de una respuesta inmune inicial oligoclonal/policlonal frente a dianas antigénicas idénticas o similares. Otro posible mecanismo patogénico implicado es la inhibición de la apoptosis con la acumulación de células leucémicas LGL. La disregulación y la expansión T clonal podría ser el resultado de una persistente activación del sistema inmune y la prevención de AICD. De hecho, la pérdida de la expresión de CD27 y CD28 es el resultado del fisiológico del envejecimiento crónico o de la activación crónica inmune en síndromes autoinmunes inflamatorios y persistencia de infecciones (VIH; CMV; EBV).

OBJETIVO: La identificación de diferencias en polimorfismos genéticos de citoquinas puede tener importantes implicaciones en la resistencia del huésped, a determinados patógenos o en enfermedades autoinmunes. Nuestra hipótesis es que algunos factores inmunogenéticos que regulan la intensidad, tipo de respuesta inmunológica y la homeostasis de la respuesta inmunitaria pueden explicar la aparición de expansiones clonales como las observadas en nuestros pacientes. Para investigar esta hipótesis hemos analizado diversos polimorfismos genéticos, (IL-10, TNF- α , IFN- γ , CTL-4, NKG2D y FASL) que han sido relacionados con procesos autoinmunes, y en la disregulación inmunológica que sigue a una infección viral persistente.

MATERIAL Y MÉTODOS: en conjunto han sido estudiados un total de 78 casos de LGL-T remitidos al servicio de Citometría del Hospital Universitario de Salamanca. El diagnóstico se basó en criterios clínicos y biológicos: 41 LGL-T presentaban expresión de marcadores CD3⁺, CD8⁺, CD57⁺ y la mayoría expresaban el receptor TCR tipo α/β (edad media de 68 ± 7 años, rango de 6 a 73 años), y 37 expresaban linfocitosis monoclonales TCR $\alpha\beta/CD4^+/NKa^+/CD8^{-/+dim}$ (34 hombres y 34 mujeres; edad media de 63 ± 12 años, rango de 36 a 81 años) fueron seleccionados e incluidos en este estudio. En todos los casos, las muestras de sangre periférica fueron recogidas en tubos que contenían K3-EDTA. La confirmación del diagnóstico de clonalidad se realizó usando los estudios de reordenamiento de los genes TCR-V β . La media de seguimiento de los pacientes con linfocitosis monoclonales TCR $\alpha\beta/CD4^+/NKa^+/CD8^{-/+dim}$ fue de 72 meses (rango de 10 a 233 meses).

174 pacientes fueron incluidos como controles, seleccionándose sujetos con el mismo rango de edad de nuestros pacientes (rango de 59.5 ± 4 años). Todos ellos eran caucasianos y fueron reclutados de la población general: donantes de sangre del Registro Español de donantes de médula ósea de la misma región geográfica.

Para el análisis del inmunofenotipo de los pacientes con linfocitosis LGL TCR-V β CD4⁺/CD8^{-/+dim} se empleó un panel de 24 anticuerpos monoclonales dirigidos frente a 21 familias TCR-V β diferentes, teñidos en cuatro colores. La

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

caracterización fenotípica se realizó usando combinación cuádruple de anticuerpos Monoclonales. Para la adquisición y análisis de datos se empleó un citómetro de flujo FACSCalibur y los programas informáticos CellQUEST y PAINT-A-GATE PRO.

El DNA genómico se purificó a partir de 200µl de sangre total usando el kit de aislamiento de extracción Magpure. El genotipado se realizó mediante ensayos de discriminación alélica con sondas Taqman marcadas con los fluorocromos VIC y FAM y obtenidas de Applied Biosystems, Foster City, CA, USA (Custom TaqMan SNP Genotyping Assay method). El análisis de los polimorfismos se realizó empleando el software de análisis SDS versión 1.3.1. Se tiparon los siguientes polimorfismos (SNPs): IL10-1082A>G (rs1800896), IL10-592A>C (rs1800872), IL10-819 C>T (rs1800871), CTLA-4 CT60 A>G (rs3087243), CTLA-4/ +49 A>G (rs231775), TNF- α -308 G>A (rs1800629), FASL -844T>C (rs763110), NKC-3 (rs1049174) y NKC-9 (rs2246809) con NKG2D. La reacción de PCR fue realizada a partir de 10 ng de DNA en 25 µl de reacción que contenía 12.5 µl de mezcla de PCR Taqman universal master-mix, 300 nM de primers y 200 nM de las sondas. Las condiciones de amplificación consistieron en una preincubación a 50°C, 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de ciclos consistentes en una incubación 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60 °C.

Las frecuencias alélicas de los SNPs fueron analizadas. Para calcular la Odds Ratios en el grupo de tumores y grupo control se emplearon tablas 2X2, siendo cada genotipo comparado con los otros dos genotipos en todos los genes estudiados. Las frecuencias genotípicas fueron comparadas entre pacientes y controles usando el test de Pearson χ^2 en tablas 2X2 o el test de exacto de Fisher. El test de Pearson se empleó para el análisis en tablas 3X3. El análisis multivariante de regresión logística fue realizado para obtener la Odds Ratio y el intervalo de confianza del 95%. Un valor de probabilidad < 0.05% se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 12.0.

RESULTADOS: 78 pacientes con LGL-T y 174 controles se incluyeron en el estudio. Comparamos los dos grupos de LGL y la prevalencia de SNP de varias citoquinas involucradas en la regulación inmune (CTLA-4 CT60, A>G, TNF- α

308G/A), IL-10-1082 G/A, IFN- γ IFN- γ , (FasL -844C), inductor de la muerte de activación celular (FasL -844C) y dos polimorfismos de NKG2D asociados con la actividad citotóxica de células NK. El análisis genómico de los polimorfismos se realizó con éxito en la mayoría de los casos aunque en algunos casos falló el genotipado por problemas en la amplificación de la PCR con algunos DNA y polimorfismos específicos. Por esta razón el número de casos no es exactamente el mismo en los grupos estudiados. Los resultados revelaron que la distribución del genotipo del polimorfismo de TNF-308 (G/A) era estadísticamente significativa entre los pacientes LGL-CD8⁺ y los controles. Dado que sólo tres casos de LGL y un caso del grupo control eran homocigotos (AA) para el polimorfismo de TNF-308, homocigotos y heterocigotos (GA) fueron combinados para el análisis estadístico de la distribución genotípica. En el grupo de las LGL-CD4⁺, se observó una ligera mayor frecuencia del genotipo AA/AG, pero el resultado no llegó a ser estadísticamente significativo. El análisis de los polimorfismos de CTLA-4, IL10 y las frecuencias alélicas de IFN- γ en pacientes y controles no reveló diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica para esos locus. Finalmente también estudiamos los dos SNP dentro de la región génica de NKC que se correlacionaban con alta (NKC-3 GG/NKC-9 AA) y baja actividad citotóxica natural (NKC-3 CC/NKC-9 GG). Ambos genotipos de los dos grupos de LGL-T no presentaron diferencias significativas al compararlos con los controles.

CONCLUSIONES: No se ha encontrado relación estadísticamente significativa que relacione los polimorfismos estudiados con la mayor o menor susceptibilidad a desarrollar LGL-CD4⁺. Por el contrario, confirmamos una asociación entre el genotipo AA/AG de TNF- α (-308) y el desarrollo de LGL-CD8.

Evaluation of functional SNP of different genes coding for the immunoregulatory molecules in patients with CD4+ monoclonal large granular lymphocyte (LGL) lymphocytosis

Pilar Garrido¹, Julia Almeida^{2,3}, Julia Cantón⁴, Jose María Romero⁴, Yorick Sandberg⁵ Margarida Lima⁶, Anton W. Langerak⁵, Alberto Orfao^{2,3}, Francisco Ruiz-Cabello⁴

¹Servicio de Hematología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain; ²Servicio de Citometría & Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Spain; ³Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer/IBMCC (CSIC-USAL), Salamanca, Spain ⁴Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain; ⁵Department of Immunology, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands ⁶Servicio de Hematología, Hospital Geral de Santo António, Porto, Portugal.

Keywords: polymorphism, monoclonal expansions, LGL lymphocytosis.

Abstract

Monoclonal $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD4}^+$ T-LGL lymphocytosis is a subgroup of monoclonal T-LGL lymphoproliferative disorders, different from both the CD8^+ $\text{TCR}\alpha\beta$ T-LGL, $\text{TCR}\gamma\delta$ T-LGL, and natural killer (NK) cell-type LGL leukemias. Although the etiology of $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD4}^+$ T-LGL still remains to be fully elucidated; an increasing evidence support the involvement of a common antigen-driven mechanism on the non-random clonal selection and the existence of clonal T cells expressing highly homologous complementarity-determining region 3 (CDR3) motifs. The progressive accumulation of clonal CD4^+ T-LGL cells could also be related to a defective regulation of activation-induced cell death signalling pathways. In the present study, we tested several polymorphic markers associated with chronic viral infections and autoimmune diseases, including CTLA-4, TNF- α , IL-10, IFN- γ , FasL and NKG2D, to investigate the potential association of these immunogenetic factors with the development of T-LGL. Overall, 37 patients with CD4^+ T-LGL were analyzed and compared to a group of both $\text{CD8}^+/\text{TCR}\alpha\beta^+$ T-LGL patients (n=41) and to a group of 176 control subjects from the same geographic region as the patients. Our results did not show any clear association between the different single-nucleotide polymorphisms (SNP) analyzed and development of $\text{CD4}^+/\text{TCR}\alpha\beta^+$ T-LGL. On the other hand, an increase in the frequency of -380 (AA/GA) TNF- α genotype associated with a greater production of this cytokine was found among CD8^+ T-LGLs cases in comparison to both the CD4^+ LGL and the control group. Although we can not exclude the role of other genetic polymorphisms, our results suggest that the frequency of SNP of the genes coding for the studied immunoregulatory molecules analyzed are not associated with the development of $\text{CD4}^+/\text{TCR}\alpha\beta^+$ T-LGL.

Introduction

Clonal disorders associated with large granular lymphocytes (LGL) are relatively infrequent lymphoproliferative diseases that arise from either mature T lymphocytes (CD3^+) or natural killer (NK)-cells (CD3^-). Both T-LGL and NK-

LGL include a biologically heterogeneous group of both clinically indolent and aggressive disorders (Sokol and Loughran, 2006). T-LGL clonal cells typically display T-cell immunophenotype which in 80% of cases represents CD3⁺, TCRαβ⁺, CD4⁻,CD8⁺ T-cells. From the clinical point of view CD8⁺/TCRαβ⁺ T-LGL is frequently associated with cytopenias and other autoimmune disorders (Loughran et al, 1985), which has lead to the hypothesis that chronic antigenic stimulation by endogenous/autologous antigens is responsible for the most typical clinical complications of the disease, leading to implication of a specific therapy in around 60% of the cases. In contrast, monoclonal CD4⁺ T-LGL is less common than CD8⁺ T-LGL and is typically associated with an indolent clinical course, without cytopenia, and without autoimmune disorders typical for the classical CD8⁺ TLGL.

The pathogenesis of the development of clonal T-cell disorders still remain largely unknown. However, in the recent years an increasing amount of evidence have accumulated indicating the potential involvement of both endogenous and exogenous antigens on the development of this group of LGL clonal T-cell disorders. Accordingly, at present it is well established that both CD8⁺ and CD4⁺ T-LGL display a phenotype which is characteristic of antigen-activated and terminally differentiated memory/effector cytotoxic T-lymphocytes (Melenhorst et al, 2001). According to the most extended hypothesis chronic activation of T cells by either autoantigens or viral antigens could be the cause of the clonal selection and initial expansion of clonal cells in T-LGL (Zambello et al, 1995; Epling-Burnette et al, 2003). In this context, nonrandom clonal selection of neoplastic T-Lymphocytes in patients with T-LGL was recently detected by sequencing the Vβ-chain complementarity-determining region 3 (CDR3) of the clonally expanded cells (Wlodarski et al, 2005). Similarly, a clear association between the TCR-Vβ repertoire and the HLA genotype have been also described in monoclonal CD4⁺ T-LGL lymphocytosis (Garrido et al 2007). Based on the extent of the TCR repertoire, it has been proposed that the neoplastic clones do not evolve randomly but in turn, they could be selected after an oligoclonal/polyclonal immune response directed against identical or highly similar antigenic targets (Nearman et al, 2006; Garrido et al, 2007). A mechanism that could be involved in the pathogenesis of T-LGL is the inhibition of apoptosis leading to the accumulation

of neoplastic T-lymphocytes. Such dysregulation and clonal expansion of T-cells could, therefore, be the result of a persistent immune activation possibly associated with a prevention of the activation induced cell death (AICD) (Vallejo et al, 2000). In fact, the loss of CD28 and CD27 expression on T cells observed in T-LGL (Lima et al, 2003; Garrido et al, 2007) may be the result of normal chronological aging or it can be induced by chronic immune activation in autoimmune/inflammatory syndromes and persistent infections (HIV, CMV, EBV) (Vallejo et al, 2000; Appay et al, 2002; Garnadia et al, 2003; Appay, 2004). Taken together, these observations suggest an existence of differences in specific SNP of genes coding for different cytokines (Shin et al, 2003; Brooks et al, 2006; Thio et al, 2004), cytotoxic receptors (Hayashi et al, 2006), and apoptosis-associated molecules (Zhang et al, 2006). The immunogenetic background may predispose to such alterations in the regulation of the apoptosis in patients under specific chronic antigen stimulatory conditions. In the present study, we analyze the genetic polymorphisms of cytokines (IL10, TNF- α , IFN- γ), FASL, CTLA-4, and NKG2D receptor, which may modulate cytokine secretion, T-cell activation, and AICD as well as natural cytotoxic activity in conditions associated with autoimmunity and functional immune dysregulation following persistent viral infection.

Materials and methods

Patients and control samples

A total of 78 T-LGL cases were referred to the Cytometry Service of the University Hospital of Salamanca. In all cases, diagnosis of T-LGL was based on both clinical and haematological criteria. 41 patients correspond to CD8⁺/TCR $\alpha\beta$ ⁺T-LGL (mean age 68 \pm 7 years, ranging from 61 to 73 years), and 37 were TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+dim} T LGL with a mean age of 63 \pm 12 years, ranging from 36 to 81 years. In all CD4⁺/TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-LGL cases, peripheral blood samples were collected into tubes containing K3-EDTA. Informed consent for sample collection was signed by the individuals according to the recommendations of the Local Ethics Committee. Confirmation of clonality was obtained by

performing TCR- β gene rearrangement studies. By the end of the study, the median follow-up of the patients with monoclonal TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ /NKa $^+$ /CD8 $^{-/+dim}$ T-LGL was 72 months (range: 10 to 233 months). Immunophenotypic and TCR- β CDR3 configurations of the majority of these patients has been reported earlier (Garrido et al 2007).

As a control group we selected 176 caucasian subjects, not related to each other and age matched to the patients analyzed (mean age 60 \pm 4 years). These individuals were recruited from the group of blood donors of the Spanish Bone Marrow Donor Registry of the same geographic region.

Immunophenotypic studies

A panel of 24 monoclonal antibodies (MAb) directed against an identical number of members of 21 different TCR-V β families (TCR-V β repertoire Kit, Immunotech, Marseille, France) was used in four-color staining for the analysis of the TCR-V β repertoire of CD4 $^+$ /CD8 $^{-/+dim}$ LGL T-lymphocytes. Further phenotypic characterization of CD4 $^+$ /CD8 $^{-/+dim}$ LGL T-cells was performed using the following 4-color combinations of monoclonal antibodies (MAb) fluorescein isothiocyanate (FITC)/phycoerythrin (PE)/PE-cyanin 5 (PC5) or peridinin chlorophyll protein (PerCP)/allophycocyanin (APC): CD2/CD7/CD4/CD8, CD5/CD7/CD4/CD8, CD38/CD11b/CD4/CD8, CD57/CD11c/CD4/CD8, CD16/CD56/CD4/CD8, CD122/CD25/CD4/CD8, CD45RA/CD45RO/CD4/CD8, CD62L/CD28/CD4/CD8, CD11a/HLA-DR/CD4/CD8, CD16/NKB1/CD4/CD8, CD158a/CD161/CD4/CD8, CD57/CD8/CD56/CD4 and cytoplasmic (cy) perforin/cy granzyme B/CD56/CD4. The source and specificity of each MAb has been previously described in detail (Lima et al, 2003). Cell staining was performed using a whole blood stain-and-then-lyse method (FACS lysing solution; Becton/Dickinson Biosciences – BDB – San Jose, CA) and a direct immunofluorescence technique, as previously reported (Lima et al, 2003). For the cytoplasmic stainings, the Fix & Perm reagent kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used, according to the recommendations of the manufacturer.

Data acquisition was performed immediately after completion of sample preparation, in a FACSCalibur flow cytometer (BDB), using the CellQUEST™ software program (BDB). The Paint-A-Gate Pro™ software program (BDB) was used for data analysis. In each case, the clonal T-cell population was defined as CD4⁺/CD8^{-/+dim} and/or CD4⁺/CD56⁺ large granular – intermediate sideward light scatter (SSCintermediate) - events (Figure 1) for its further phenotypic characterization.

Genotypic studies

Genomic DNA was purified from 200 µl of the same human whole PB samples as those used for the immunophenotypic analyses using the MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) in an automated extractor MagNA Pure LC (Roche Diagnostics). Genotyping was performed by a TaqMan 5' allelic discrimination assay. The following single-nucleotide polymorphism SNPs were typed: IL10-1082A>G (rs1800896), IL10-592A>C (rs1800872), IL10-819 C>T (rs1800871), CTLA-4 CT60 A>G (rs3087243), CTLA-4/ +49 A>G (rs231775), TNF-α-308 G>A (rs1800629), and FASL -844T>C (rs763110); in addition, the NKC-3 (rs1049174) and NKC-9 (rs2246809) within the NKG2D gene that have been associated with the natural cytotoxic activity of individual subjects, were also analyzed (Hayashi et al 2006). SNP genotyping was carried out using a Custom TaqMan SNP Genotyping Assay method (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Minor groove binding probes were labeled with the VIC and FAM fluorescent dyes. TaqMan® based allelic discrimination was performed using 10 ng of sample DNA in 25 µL of reaction solution containing 12.5 µL of the TaqMan® Universal PCR Mix (Applied Biosystems), 300 nM primers, and 200 nM TaqMan® MGB probes (Applied Biosystems). Reaction conditions consisted of preincubation at 50°C for 2 min, and at 95°C for 10 min, and followed by 40 cycles of 95°C, 15 s; 60°C, 1 min. Amplifications were performed in an ABI Prism 7750 machine (Applied Biosystems) for continuous fluorescence monitoring. SNP of IFN-γ were assayed as previously reported (Saha et al

2005). Briefly, polymerase chain reactions were carried out with 50 ng of genomic DNA with the following primers

F 5'-CAGACATTCACAATTGATTTTATTC-3' and R 5'-CTGTGCCTTCCTGTAGGGTA-3', which was labeled at the 5' end with 6-FAM. To determine the number of (CA) repetitions, 0.5 μ l of amplicons were added to 3 μ l of formamide and 0.5 μ l of internal size standard. Samples were analyzed in denaturing gels and sized using the Genescan™ 672 software (Applied Biosystems).

Statistical analyses

SNPs` allele frequencies were tested against departure from Hardy-Weinberg equilibrium, before analysis. To calculate Odd Ratios (OR) for both the LGL and control groups 2x2 tables were used each genotype being compared to the other two genotypes obtained all SNPs of all studied genes. Genotype frequencies were compared between patients and controls using either the Yates corrected Pearson's χ^2 test or the Fisher's exact test, when appropriate. ORs and their corresponding 95% confidence intervals (CI) were calculated. The Pearson's test was used for analysis of 3x3 tables; in addition, in this case, multivariate logistic regression analysis was also performed to obtain OR and 95% CI. A p-value of <0.05% was considered to be associated with statistical significance. For all statistical analyses described, the statistical software package SPSS (v. 12.0) was used. The power of the study to detect the effect of a polymorphism in disease susceptibility was estimated using the Granmo 5.0 software.

Results

Immunophenotypic characteristics of the expanded CD4⁺ and CD8⁺ T-LGL cells

The majority of patients with CD8⁺ T-LGL showed CD3⁺, CD4⁻ and CD57⁺ immunophenotypic analysis of the TCRV β repertoire showed clonal TCR

expansions and in all, but seven cases the specific expanded TCRV β family was identified. On the other hand, all CD4⁺ T-LGL cases analyzed showed relatively high SSC features as compared to normal PB CD4⁺ T lymphocytes with common phenotypic characteristics, representing TCR $\alpha\beta$ ⁺/CD4⁺/CD8^{-/+dim} cells with a typical cytotoxic (granzyme B⁺, CD56⁺, CD57⁺, CD11b^{+/-}) activated memory/effector T-cell phenotype (CD2^{+bright}, CD7^{-/+d}, CD11a^{+bright}, CD28⁻, CD27⁻, CD62L⁻, HLADR⁺). In around half (47%) of the cases, clonal T-cells co-expressed CD45RA and CD45RO, while in other cases they had a CD45RA⁺/CD45RO⁻ phenotype. Other NKa markers (CD11c, CD16, CD94, CD158a, CD161 and NKB1) and T-cell activation-related antigens (CD25, CD38 and CD122) were constantly absent on the surface of CD4⁺ clonal T- LGL cells.

Overall, these cells represented 47% \pm 23% of all PB lymphocytes, with a mean (\pm one standard deviation) absolute number of 6.6 \pm 3.3 \times 10⁹ PB TCR α/β ⁺/CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+dim} T-lymphocytes/L. Flow cytometric analysis of the TCR-V β repertoire of CD4⁺/T LGL T-cells was consistent with a (mono)clonal expansion in all cases studied, which accounted for 72% \pm 21% of all PB CD4⁺ T-cells.

Genotypic analysis of SNPs of the immunoregulatory protein genes

The relative frequencies of the different SNPs analyzed are shown in Tables 3-4 for both the T-LGL and the control groups. Overall, the observed genotypes were within the Hardy-Weinberg equilibrium, both for the patient and control groups. Despite this, a more detailed analysis of patient group showed that the genotypic distribution of the TNF α -308 (G/A) polymorphism was statistically different between CD8⁺ T- LGL patients and control subjects ($p < 0.001$). Due to low frequency of the AA genotype, we combined the AA and GA genotypes and compared this group with the GG genotype groups. In contrast, CD4⁺ T-LGL patients showed a similar distribution of the TNF α genotypes to the control subjects (table 3a,b). We did not find any statistically significant differences between the groups of T-LGL patients and the controls for the SNPs of the other genes CTL-A, IL10, and NK C IFN- γ analyzed (Tables 3-4).

Discussion

In the present study we investigated the potential association of several immunogenetic factors with the development of clonal CD4⁺/ T-LGL lymphocytosis. Previous reports from our laboratory has shown that a substantial group of these patients shared similar sequences in the CDR3 of the TCRV β gene, in association with the HLA-DRB1*0701 allele, supporting a role of a common antigen in driving the expansion of clonal CD4⁺ T-cells (Garrido et al 2007). However, additional evidence suggests that the polymorphisms of several genes coding for molecules that play an active role in both immunoregulation and cell death by apoptosis could also contribute to the predisposition to and the outcome of T-LGL in these individuals. First of all, the phenotype of these cells is consistent with an end-stage differentiation (CD28⁻ CD27⁻) of the clonally expanded cells resulting from chronic antigen-driven stimulation (Vallejo et al, 2000, Appay et al 2002; Garnadia et al 2003; Appay, 2004). Accordingly, expansions of cytotoxic (granzyme⁺, perforin⁺) CD4⁺ T-lymphocytes/CTL have been described during chronic viral infections, in HIV-1, EBV, and CMV infected patients (Appay et al. 2002) as well as in patients diagnosed with rheumatoid arthritis (Namekawa et al. 1998). In addition, the clonal outgrowth and in vivo maintenance of these expansions, could be the result of an altered response to apoptosis-inducing signals (Vallejo et al 2000). Lack of homeostatic apoptosis has been reported as a remarkable feature of this disease in which an increased activity of the PI3K-AKT signaling axis in CD8⁺ T-LGL cells appears to operate in conjunction with or parallel to an increased activation of the STAT3 pathway (Shade et al 2006). CD4⁺ T-LGL is a rare lymphoproliferative disorder even among caucasian population, associated with a relatively high frequency of HLA-DR B1*0701 genotype.

In the present study we confirm and extend our earlier findings showing that in patients with monoclonal CD4⁺/ T-LGL the expanded clonal T cells display a restricted usage of a limited number of TCR-V β families, from which TCR-V β 13.1 is particularly overrepresented in comparison to the CD8⁺ T- LGL patient group (Table 1). The clear association observed between HLA-

DRB1*0701 and the TCR V β 13.1⁺ CD4⁺ T-LGL could not be observed among CD8⁺ LGL patients suggesting a wider variation in the nature of the putative antigen involved in this latter subgroup of T-LGL. In fact, the repertoire of the V β families used by the expanded clonal T-cells in CD8⁺ LGLs was rather variable as also found in a larger cohort of CD8⁺ T-LGL patients by others (Wlodarsky et al 2006). In this study, only few patients shared identical immunodominant CDR3 configurations and HLA alleles.

In order to expand our knowledge of the immunopathogenesis of LGL, we have investigated the potential association of various SNPs of different immunoregulatory genes with both subtypes of LGL, including SNP of immunoregulating genes which have been related to a number of autoimmune disorders (Nearman et al. 2006). Overall, our results show a statistically significant increase in the A/A TNF- α -308 in CD8⁺ T-LGL patients. We did not see any correlation between the rest of the studied SNP polymorphisms and both CD4⁺ and CD8⁺ LGLs. Overall, these results indicate the absence of an association between the different SNP analyzed and both subtypes of T-LGL except for the A/A genotype of TNF α at the 308 position, that was related to CD8⁺ but not CD4⁺ T-LGL cases. The presence of the A/A genotype at the TNF- α -308 position has been associated with an increase in TNF- α transcriptional activity (Kroeger 1997) and higher levels of TNF- α which is known to play a critical role in rheumatoid arthritis (Feldmann, 2002), a disease strongly associated with CD8⁺ T-LGL, but not with CD4⁺ T-LGL cases. Similarly, there is no clear association of CD4⁺ T-LGL with autoimmune processes (Lima et al 2004),

Monoclonal/oligoclonal CD4⁺ T-LGL expansions of CD4⁺ CTL have also been related to chronic antigen-stimulating processes (viral infections) (Appay et al, 2004). Accordingly, it has been hypothesized that oligoclonal expansions of CD4⁺ CTL may play a role in controlling viruses such as HIV, EBV and CMV, which can downregulate MHC-class I expression and escape immune recognition by CD8⁺ T-cells. For these reasons we analyzed a SNP of the IFN- γ , (Saha et al 2005), a cytokine that regulates the differentiation of cytotoxic CD8⁺ T- and NK-cells. In addition, we also studied an NKG2D polymorphism, involved in the activation of NK-cells. As mentioned above no clear association was observed between these polymorphisms and both CD4⁺ and CD8⁺ T-LGL

patients. Finally, we investigated the potential association of FASL-844C ASL polymorphism with the development of LGL, since FASL-mediated AICD is directly regulated by FASL expression levels (Kabelitz et al 1993), the 844C ASL polymorphism is related to an increased activation-induced T cell death (Sun et al 2005). In fact, a dysregulation in this apoptotic pathways in CD4⁺CD28⁻ T cells has been previously reported (Vallejo 2000). Despite this, in the present study we did not find any association between the 844C- FASL polymorphism and neither CD4⁺ nor CD8⁺ T-LGL cases.

In summary, although we can not exclude the potential contribution of other genetic polymorphisms, our results suggest that the SNP markers of genes coding for the immunoregulatory molecules analyzed are not associated with the development of CD4⁺/TCRαβ⁺ T-LGL.

Acknowledgments

This work has been partially supported by the following grants: FIS 02/1244 and FIS 05/0399, from the Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain; SA103/03, from the Consejería de Educación y Cultura, Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain; and 05/287, from the Consejería de Salud, Junta de Andalucía, Sevilla, Spain.

The authors thank Prof. Federico Garrido (Dept. Análisis Clínicos, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain) for his helpful discussions and support.

We also thank the members of the Hematology Services from the following hospitals: Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada), Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca), Hospital Rio Hortega (Valladolid), Hospital General Yagüe (Burgos), Clínica San Miguel (Pamplona), Hospital de Navarra (Pamplona), Hospital del Bierzo (Ponferrada), Hospital General de Segovia (Segovia), Hospital de León (Leon), Hospital Virgen de la Concha (Zamora), Hospital Miguel Servet (Zaragoza) and Hospital Virgen de la Victoria, (Málaga) from Spain and Hospital Santo António (Porto), Centro Hospitalar de Coimbra (Coimbra), Instituto Português de Oncologia (Lisboa), Hospital São João (Porto) and Hospital Egas Moniz, (Lisboa) from Portugal and

from the Department of Immunology, Erasmus MC, Rotterdam (The Netherlands), for their assistance in sample and data collection.

References

- Appay V (2004) The physiological role of cytotoxic CD4(+) T-cells: the holy grail? *Clin Exp Immunol* 138:10-13
- Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A, Easterbrook P, Grey P, Smith D, McMichael AJ, Cooper DA, Rowland-Jones SL, Kelleher AD (2002) Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol* 168:5954-5958
- Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, Teyton L, McGavern DB, Oldstone MB (2006) Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* 12:1301-1309
- Epling-Burnette PK, Loughran TP (2003) Survival signals in leukemic large granular lymphocytes. *Semin Hematol* 40:213-220
- Feldmann M (2002) Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology* 2:364-371
- Gamadia LE, Remmerswaal EBM, Weel JF, Bemelman F, van Lier RAW, Ten Berge IJM (2003) Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN- γ -producing CD4+T cells in protection against CMV disease. *Blood* 101:2686-2692
- Garrido P, Ruiz-Cabello F, Bárcena P, Cantón J, Lima M, Balanzategu M, González M, López-Nevot MA, Almeida J, Orfao A (2007) Monoclonal TCR-VB13.1 CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+dim} T-LGL lymphocytosis: evidence for an antigen-driven chronic T-cell stimulation origin. *Blood* [Epub ahead of print] PMID: 17303697
- Hayashi T, Imai K, Morishita Y, Hayashi I, Kusonoki Y, Nakachi K (2006) Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res* 66:563-570
- Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ (1997) The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 34:391-399
- Lima M, Almeida J, Dos Anjos Teixeira MC, Santos AH, Quiros ML, Barcena P, Izarra A, Fonseca S, Bueno C, Justicia B, Gonzalez M, San Miguel JF, Orfao A (2003) TCR α beta⁺/CD4⁺ large granular lymphocytosis: a new clonal T-cell lymphoproliferative disorder. *Am J Pathol* 163:763-771
- Loughran TP Jr, Kadin ME, Starkebaum G, Abkowitz JL, Clark EA, Disteche C, Lum LG, Slichter SJ (1985) Leukemia of large granular lymphocytes: association with clonal chromosomal abnormalities and autoimmune neutropenia, thrombocytopenia, and hemolytic anemia. *Ann Intern Med* 102:169-175
- Melenhorst JJ, Sorbara L, Kirby M, Hensel NF, Barrett AJ (2001) Large granular lymphocyte leukaemia is characterized by a clonal T-cell receptor rearrangement in both memory and effector CD8(+) lymphocyte populations. *Br J Haematol* 112:189-194
- Namekawa T, Wagner UG, Goronzy JJ, Weyand CM (1998) Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 41:2108-2116
- Nearman ZP, Wlodarski M, Jankowska AM, Howe E, Narvaez Y, Ball E, Maciejewski JP (2007) Immunogenetic factors determining the evolution of T-cell large granular lymphocyte leukaemia and associated cytopenias. *Br J Haematol* 136:237-248
- O'Keefe CL, Plasilova M, Wlodarski, Risitano AM, Rodriguez AR, Howe E, Young NS, Eric His E, Maciejewski JP (2004) Molecular analysis of TCR clonotypes in LGL: a clonal model for polyclonal responses. *J Immunol* 172:1960-1969
- Rodríguez T, Méndez R, Del Campo A, Aptsiauri N, Martín J, Orozco G, Pawelec G, Schadendorf D, Ruiz-Cabello F, Garrido F (2007) Patterns of constitutive and IFN- γ inducible expression of HLA class II molecules in human melanoma cell lines. *Immunogenetics* 59:123-133
- Saha A, Dhir A, Ranjan A, Gupta V, Bairwa N, Bamezai R (2005) Functional IFNG polymorphism in intron 1 in association with an increased risk to promote sporadic breast cancer. *Immunogenetics* 57:165-171
- Schade AE, Wlodarski MW, Maciejewski JP (2006) Pathophysiology defined by altered signal transduction pathways: the role of JAK-STAT and PI3K signaling in leukemic large granular lymphocytes. *Cell Cycle* 5:2571-2574

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

- Shin HD, Park BL, Kim YH, Cheong HS, Lee IH, Park SK (2005) Common interleukin 10 polymorphism associated with decreased risk of tuberculosis. *Exp Mol Med* 37:128-132
- Sokol L, Loughran TP (2006) Large granular lymphocyte leukemia. *Oncologist* 11:263-273
- Sun T, Zhou Y, Li H, Han X, Shi Y, Wang L, Miao X, Tan W, Zhao D, Zhang X, Guo Y, Lin D (2005) FASL -844C polymorphism is associated with increased activation-induced T cell death and risk of cervical cancer. *J Exp Med* 202:967-974
- Thio CL, Mosbrugger TL, Kaslow RA, Karp CL, Strthdee SA, Vlahov D, O'Brien SJ, Astemborski J, Thomas DL (2004) Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene and recovery from hepatitis B virus infection. *J Virol* 78:11258-11262
- Torres B, Aguilar F, Franco E, Sanchez E, Sanchez-Roman J, Jimenez Alonso J, Nuñez -Roldan A, Martin J, Gonzalez-Escribano MF (2004) Association of the CT60 marker of the CTLA4 gene with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50:2211-2215
- Vallejo AN, Schirmer M, Weyand CM, Goronzy JJ (2000) Clonality and longevity of CD4+CD28null T cells are associated with defects in apoptotic pathways. *J Immunol* 165:6301-6307
- Wlodarski MW, O'Keefe C, Howe EC, Risitano AM, Rodriguez A, Warshawsky I, Loughran TP, Maciejewski JP (2005) Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 106:2769-2780
- Zambello R, Trentin L, Facco M (1995) Analysis of the T cell receptor in the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: superantigen activation of clonal CD3+ granular lymphocytes. *Cancer Res* 55:6140-6145
- Zhang Z, Wang LE, Sturgis EM, El-Naggar AK, Hong WK, Amos CL, Spitz MR (2006) Polymorphisms of FAS and FAS ligand genes involved in the death pathway and risk and progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 12:5596-5602

Table 1: HLA genotype of patients with clonal TCR $\alpha\beta^+$ /CD4 $^+$ LGLs expansions

N. of case	Expanded TCRVβ family	HLA-DRB	HLA-DQB	HLA-A	HLA-B	HLA-C
1	2.1	301,1317	201,0603	2402,2402	801,3508	401,0701
2	2.1	701,1301	202,0609	3002,6801	4403,5101	701,1402
3	2.1	1301,1101	301,0603	201,2402	1801,4402	501,0701
4	3.1	403,1501	302,0602	301,3202	702,3501	401,0702
5	3.1	1501,1602	502,0602	201,0201	3701,4402	501,0602
6	8.1+8.2	1101,1101	301,0301	201,6901	1801,3508	701,1203
7	8.1+8.2	301,1501	201,0602	201,0201	1518,3501	401,0704
8	11	1101,1601	301,0502	101,0201	3701,4002	602,1204
9	13.1	701,1103	301,0303	2301,3201	3501,5002	401,0401
10	13.1	701,1404	202,0503	101,2601	1401,5701	602,0802
11	13.1	701,0102	303,0501	201,0201	5101,5701	102,0701
12	13.1	701,1401	303,0503	201,2402	4402,5701	501,0701
13	13.1	701,0101	202,0501	201,0201	3501,4901	401,0701
14	13.1	701,0101	202,0501	301,0301	1302,3501	401,0602
15	13.1	701,0401	202,0301	2601,2902	4402,4403	501,1601
16	13.1	701,0701	202,0202	101,2402	1801,5001	501,0602
17	13.1	701,0101	202,0501	101,2902	1401,4403	802,1601
18	13.1	701,1501	303,0602	201,0201	702,5701	602,0702
19	13.1	701,0301	201,0202	301,2902	1801,4403	501,1601
20	13.1	701,0301	201,0202	101,2301	801,4403	401,0701
21	13.1	701,0301	201,0202	2301,3002	1801,5801	501,0701
22	13.1	701,0101	201,0501	1101,2902	3501,4403	401,1601
23	13.1	701,1501	202,0602	2902,3002	702,4101	701,1701
24	13.1	701	202	201	1801,51002	701,0202
25	13.1	701	202	2901,3201	4403	1601
26	14.1	701,0701	202,0303	103,2902	4403,5701	701,1601
27	17.1	802,1101	301,0402	102,2301	1401,3501	701,0801
28	22	1103,1301	301,0603	201,3201	1509,4002	202,0704
29	N.I.	701,1104	201,0301	1101,2902	4001,4403	304,1601
30	N.I.	701,1101	201,0301	201,0301	3503,5001	401,0501
31	N.I.	701,1602	202,0502	301,2402	702,3801	702,1203
32	N.I.	1101,1401	301,0503	201,2603	4002,3501	401,0501
33	N.I.	101,1101	301,0501	201,2402	1801,3501	401,1203
34	N.I.	101,1301	501,0604	1101,3101	3501,5101	401,0501
35	N.I.	1302,1305	301,0604	201,0205	3508,4101	401,0701
36	N.I.	101,1302	501,0604	1101,1101	4004,5601	102,0202
37	NI	101,1101	301,0501	201,1101	3501,4001	304,0401
38		701,1502	303,0601	201,2402	1301,5701	403,0602

Table 2: HLA genotype of patients with clonal TCR $\alpha\beta^+$ /CD8 $^+$ LGL expansions

N. of case	Expanded TCRV β family	HLA-DRB	HLA-DQB	HLA-A	HLA-B	HLA-C
1	1	701,1401	202,0503	2,11	35,5	401,0602
2	2	401	302	1,24	8,18	501,0701
3	5	101,0403	302,0501	2,02	15,35	304,0401
4	5	301,0401	201,0301	ND,	ND	501,0701
5	5,J β 1.1	404,1101	301,0302	2407,3101	3502,4001	304,0401
6	5,J β 1.2	102,0405	302,0501	101,2901	7,14	802,1505
7	5.1					
8	5.1	701,1101	202,0301	301,2907	3502,4403	401,1601
9	7.1	301,1302	201,0604	1,24	8,4	304,0701
10	8.1/8.2	1302	604	2,02	40,4	304
11	12	1101,1302	301,0604	2,68	40,44	304,0704
12	12/V β 15	401,1301	302,0603	ND	ND	304,0701
13	13	401,0403	301,0304	24,29	45,49	602,0701
14	13	701,1501	202,0602	1,11	27,35	202,0401
15	13.1	301,1501	201,0602	1,02	8,08	701
16	13.2	301,1401	201,0501	201,3002	801,1801	501,0701
17	13.2	401,0405	301	201,0301	1402,4402	501,0802
18	13.J β 1.1	301,0402				
19	14	101,0301	201,0501	2,03	8,35	401,0702
20	16	301,1101	201,0301	2,03	18,51	501,1402
21	17	301,0701	201,0303	1,02	8,41	701
22	17	401,1303	301,0302	3,32	41,55	303,1701
23	22	301,1501	201,0602	1,25	7,08	304,0701
24	23	101,0701	303,0501	2,02	13,05	304,1203
25	AB8	1301,1501	602,0603	1,26	38,44	501,1203
26	ND	301,1502	301,0401	ND	ND	701,1202
27	NI	404,1101	301,0302	2402,3001	3502,4001	304,0401
28	NI	1301,1502	602,0603	205,3002	801,5002	602,0701
29	NI					
30	No reactivity	301	201	2,02	8,08	701
31	V β 6	101	501	2,31	27,58	202,0701
32	(V β 6/V β 12)	101	501	2,03	7,27	102,0702
33		802,1301	402,0603	101,0201	4402,5801	
34		901,1501	303,0602	201,2301	4402,4403	401,0501
35		301,1102	201,0301	202,3002	1801,4101	501,1701
36	V β 11	1101,1301	301,0603	301,6802	8,53	401,0701
37		1301,1501	602,0603	201,0204	5101,5201	202,1202
38		701,1301	202,0301	101,6801	3801,5701	1203,1202
39						
40		301,1501	201,0602	302,3002	1801,5101	501,1502
41	V β 5.1	401,1101	301,0302	201,2402	2705,3502	202,0401
42		401,1403	302,0503	2501,2901	1801,4403	1203,1601
43		301	603	301,2402	3801,5101	1202,1203

Table 3a. SNP analysis in LGL CD8⁺ patients

Genotipe	LGL CD8+	Controls	Chi square significance
<u>IL-10 1082</u>			
AA	9 (21,4%)	58 (33,1%)	0,22
AG	27 (64,3%)	87 (49,7%)	
GG	6 (14,3%)	30 (17,1%)	
<u>IL-10 819</u>			
CC	23 (54,8%)	98 (56%)	0,71
CT	17 (40,5%)	63 (36%)	
TT	2 (4,8%)	14 (8%)	
<u>FASL</u>			
CC	13 (31,7%)	58 (33,3%)	0,29
CT	23 (56,1%)	78 (44,8%)	
TT	5 (12,2%)	38 (21,8%)	
<u>TNF-α</u>			
AA+AG	16 (39%)	26 (14,8%)	0,001
GG	25 (61,0 %)	150 (85,2%)	
<u>CTLA-4/CT60</u>			
AA	8 (19%)	40 (22,9%)	0,35
AG	18 (42,9%)	88 (50,3%)	
GG	16 (38,1%)	47 (26,9%)	
<u>NKC3 (NKG2D)</u>			
CC	18 (45%)	86 (48,9%)	0,87
CG	17 (42,5%)	67 (38,1%)	
GG	5 (12,5%)	23 (13,1%)	
<u>NKC9 (NKG2D)</u>			
AA	2 (5,0%)	12 (6,8%)	0,75
AG	15 (37,5%)	56 (31,8%)	
GG	23 (57,5%)	108 (61,4%)	

Table 3b. SNP analysis in LGL CD4⁺/CD8⁺ patients

Genotipe	LGL CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Controls	Chi square significance
<u>IL-10 1082</u>			
AA	14 (37,8%)	58 (33,1%)	0,80
AG	18 (48,6%)	87 (49,7%)	
GG	5 (13,5%)	30 (17,1%)	
<u>IL-10 819</u>			
CC	21 (55,3%)	98 (56%)	0,99
CT	14 (36,8%)	63 (36%)	
TT	3 (7,9%)	14 (8%)	
<u>FASL</u>			
CC	12 (33,3%)	58 (33,3%)	0.52
CT	19 (52,8%)	78 (44,8%)	
TT	5 (13,9%)	38 (21,8%)	
<u>TNF-α</u>			
AA+AG	8 (22,9%)	26 (14,8%)	0.24
GG	27 (77,1%)	150 (85,2%)	
<u>CTLA-4/CT60</u>			
AA	8 (24,2%)	40 (22,9%)	0.98
AG	16 (48,5%)	88 (50,3%)	
GG	9 (27,3%)	47 (26,9%)	
<u>NKC3 (NKG2D)</u>			
CC	18 (50%)	86 (48,9%)	0,95
CG	14 (38,9%)	67 (38,1%)	
GG	4 (11,1%)	23 (13,1%)	
<u>NKC9 (NKG2D)</u>			
AA	2 (5,7%)	12 (6,8%)	0,89
AG	10 (28,6%)	56 (31,8%)	
GG	23 (65,7%)	108 (61,4%)	

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

Table 4. Allele frequencies of (CA)_n repeats in INF- γ intron 1 region in LGL CD8⁺ patients

	LGL CD8+ Patients (n=84)	Controls (n=178)	Chi square significance	Odds ratio (control/case) at 95% C.I.
Allele				
(CA) ₁₁₋₁₂	35 (41,7%)	86 (48,3%)	0,32	1,31 (0,77-2,21)
(CA) ₁₃	37 (44,0%)	69 (38,8%)	0,42	0,80 (0,47-1,36)
(CA) ₁₄	9 (10,7%)	14 (7,9%)	0,48	0,71 (0,29-1,72)
(CA) ₁₅₋₁₆	3 (3,6%)	9 (5,1%)	0,76 ^a	1,44 (0,38-5,45)

^aCalculated by means of Fisher exact test. C.I: confidence interval

Table 5. Allele frequencies of (CA)_n repeats in INF- γ intron 1 region in LGL CD4⁺/CD8⁺ patients

	LGL CD4/CD8+ Patients (n=72)	Controls (n=178)	Chi square significance	Odds ratio (control/case) at 95% C.I.
Allele				
(CA) ₁₁₋₁₂	36 (50,0%)	86 (48,3%)	0,81	0,93 (0,54-1,62)
(CA) ₁₃	29 (40,3%)	69 (38,8%)	0,82	0,94 (0,53-1,64)
(CA) ₁₄	6 (8,3%)	14 (7,9%)	0,92	0,94 (0,35-2,55)
(CA) ₁₅₋₁₆	1 (1,4%)	9 (5,1%)	0,29 ^a	3,78 (0,47-30,4)

^aCalculated by means of Fisher exact test. C.I: confidence interval

DISCUSIÓN

Las linfocitosis monoclonales T-LGL a expensas de linfocitos TCR- $\alpha\beta^+$ /CD4⁺/NKa⁺/CD8^{-/+dim} constituyen un subgrupo de síndromes linfoproliferativos crónicos diferentes de las LGL-T TCR $\alpha\beta^+$ /CD8⁺, TCR $\gamma\delta$ y las LGL-NK. En términos globales, merece destacar que los pacientes con LGL-T CD4⁺/TCR $\alpha\beta^+$ /NKa⁺/CD8^{-/+dim} presentan un curso clínico indolente en ausencia de citopenias periféricas asociado a un fenotipo de célula T activada de memoria/efectora con características citotóxicas, de acuerdo con observaciones previas (Lima et al, 2003 a). En nuestra serie, las LGL-T CD4⁺ constituyeron, tras las LGL-T CD8⁺/TCR $\alpha\beta^+$, el subgrupo más frecuente de LGL, por delante de las LGL-T TCR $\gamma\delta^+$ y de las LGL-NK. Este hallazgo resulta particularmente interesante si tenemos en cuenta que, a diferencia de lo que ocurre con las LGL-T CD8⁺, casos de LGL-T CD4⁺ únicamente se han descrito de forma esporádica en la literatura, contrastando con la relativamente elevada frecuencia encontrada en nuestra serie. Esta discrepancia podría estar relacionada con el comportamiento habitualmente indolente en ausencia de citopenias de estos pacientes, respecto a otras LGL-T. No obstante, esta mayor frecuencia podría ser debida también, al menos en parte, a que de forma activa seleccionamos para el estudio casos de LGL-T CD4⁺. Los pacientes con LGL-T CD4⁺/TCR $\alpha\beta^+$ /NKa⁺/CD8^{-/+dim} presentan un uso restringido de un número limitado de familias TCR-V β (Lima et al, 2003 a), de las cuales V β 13.1 se encuentra significativamente sobrerrepresentada en comparación con la frecuencia que se detecta en sangre periférica de adultos sanos (Van der Beemd et al, 2000).

Dado el patrón de distribución de frecuencias TCR V β tan particular encontrado entre los pacientes con linfocitosis clonales LGL-T CD4⁺, nuestro interés se centró inicialmente en investigar si estas expansiones clonales pudieran ser dirigidas por antígeno. De nuestros resultados se desprende claramente que estas expansiones podrían no ser originadas aleatoriamente, sino que deberían de interpretarse en el contexto de una respuesta inmune pre-existente. De hecho ha sido propuesto, que el evento inicial en la génesis de las neoplasias T/NK de tipo LGL podría involucrar un estímulo antigénico de naturaleza tanto exógena como endógena. Es muy probable que, con anterioridad a la sobreexpresión de un clon inmunodominante, en las etapas

DISCUSIÓN

iniciales de la respuesta inmune, esta tenga una naturaleza oligo o policlonal. La evidencia clínica de esta hipótesis sería la constatación de que una proporción significativa de las LGL-T y NK, con frecuencia ocurren en el contexto de enfermedades autoinmunes (Lamy et al, 2003; Kwong et al, 1998)

Debido a la diversidad del procesamiento peptídico y del polimorfismo HLA responsable de la presentación antigénica, los patrones clonales utilizados por las células expandidas han de ser de naturaleza compleja. La proliferación individual de un clon de células T puede ser difícil de identificar en el contexto de expansiones oligo/policlonales simultáneas; no obstante, en ocasiones, como durante infecciones virales, se han descrito respuestas altamente polarizadas. Consecuentemente, bajo determinadas circunstancias, una expansión clonal inmunodominante puede ser tan significativa que sea posible detectarla pese a la existencia simultánea de un trasfondo oligo/policlonal. Esto puede resultar en una sobre-representación del correspondiente TCR y de una familia determinada de genes TCRV β y TCRV α . La región complementaria CDR3 de la cadena TCR V β prácticamente es única en cada linfocito T y puede ser utilizada como marcador individual de clones de células T y como medida de la diversidad del repertorio de células T. Sería por tanto posible que en pacientes con una misma subfamilia TCRV β expandida y que compartan alelos HLA, pudiera encontrarse una alta homología clonotípica en CDR3. Dada la estimación fisiológica de la variabilidad de la región CDR3 dentro de la cadena TCRV β , dicha posibilidad sería un fenómeno excepcional pero probaría que el origen de la transformación clonal en las LGL-T podría ser el mismo.

En nuestros pacientes el estudio del alelos genómicos HLA, reveló la presencia constante del alelo DRB1*0701. Todos los pacientes HLA DRB1*0701 que mostraban expansiones clonales TCRV β 13.1 tenían en la región CDR3 motivos que incluían aminoácidos comunes (XQGX) en la población de linfocitos T clonales expandidos. Se ha comprobado que durante el desarrollo de los linfocitos T no se usan todos los segmentos de los genes germinales TCRV β con la misma frecuencia. Considerando además de la diversidad combinacional, las uniones imprecisas, inserciones y deleciones de nucleótidos, la probabilidad de encontrar selectivamente en una enfermedad, al azar y aisladamente, clones con una alta similitud en los reordenamientos en

la region CDR3 es extremadamente excepcional. Además, en nuestros pacientes, el tamaño de la región CDR3 fue idéntico, como lo demuestra el número exacto de aminoácidos codificados entre los motivos conservados CAS y FG. Si se tiene en cuenta que esta región contiene los residuos más relevantes para la unión antigénica, puede deducirse que los TCR deban de unirse al mismo epítipo antigénico. No obstante, dado que existen algunas diferencias en los aminoácidos presentes en las uniones VDJ, esta consideración requiere de una demostración definitiva.

Sin embargo, si tenemos en cuenta la clara asociación existente entre la expansión monoclonal TCRV β 13.1, el genotipo HLA DRB1*0701 y el motivo común XQGX en la secuencia de CDR3 podríamos decir que, existe una evidencia importante que sugiere que en estos pacientes se han seleccionado clonas similares de células CD4⁺ granulares presumiblemente como resultado de un proceso crónico dirigido por algún antígeno, como ha sido descrito previamente en leucemias TCR $\gamma\delta$ (Sandberg et al, 2006) y en leucemias linfáticas crónicas B que utilizan el gen VH3-21, basándose en la homología detectada en CDR3 (Tobin et al, 2003). Así mismo, merece destacar que esta estructura del TCR no se ha identificado en una cohorte de clones TCRV β 13.1 de la base de datos Gene Bank (Tabla 1D), o en clones TCRV β 13.1 de otros SLPC-T estudiados (Tabla 2D), estando presente únicamente en uno de 69 clones de linfocitos T CD4⁺ TCRV β 13.1 de donantes sanos (Garrido et al, 2007). Esto indica que esta estructura de TCR está sobre-representada en LGL-T CD4⁺ TCRV β 13.1 mientras que estará ausente o será poco frecuente en otros SLPC-T, y en la mayoría de las células normales CD4⁺/TCR V β 13.1 de individuos sanos.

DISCUSIÓN

Tabla 1D. Secuencias de la región CDR3 en clones de células T TCRV β 13.1⁺ registradas en la base de datos GeneBank.

REGIÓN CDR3	SECUENCIA DE CDR3
13.1	SLQGVNSPLHF
13.1	GGRF
13.1	EAGGAETQYF
13.1	PPSGGGKLAGELFF
13.1	SEVRETQYF
13.1	EKVTGGETQYF
13.1	GRGAQETQYF
13.1	GGQTYF
13.1	EQGLLSTDTQYF
13.1	ETPGQGAGELFF
13.1	DTAGSTDTQYF
13.1	EVASGTDQYF

Tabla 2D. Relación entre el haplotipo HLA de clase II, HLA-DR y la cadena VDJ expresada en SLPC-T no LGL-T.

CASO DIAGNÓSTICO	HAPLOTIPO HLA DRB	FAMILIA TCR V β	SECUENCIA DE AA DE CDR3	FAMILIA TCR J β
1 LGL- T CD4 ⁺	0404/0801	13.1	ISVE	2.1
2 LGL-CD8 ⁺	0301/0402	13.1	SQGT	1.1
3 LLTA	0302/1101	13.1	LMDP	2.1
4 LPL-T CD4 ⁺	0403/0902	13.1	PQGSS	2.7
5 LGL-CD8 ⁺	0404/1101	5	LGPD	1.1
6 LGL-CD8 ⁺	0102/0405	5	FVPGV	2.1
7 LPL-T CD4 ⁺	0801/1501	6	PART	2.1

LPL: leucemia prolinfocítica; LGL: leucemia de linfocitos grandes granulares;
LLTA: leucemia/linfoma T del adulto.

Estudios recientes sugieren que la estimulación antigénica crónica podría estar en la base de la selección clonal y progresión de distintos subtipos de neoplasias maduras de células B así como de las LGL-T (Wlodarski et al, 2005; O`Keefe et al, 2004; Sandberg et al, 2006). No obstante, merece destacar que, de acuerdo con ello, la demostración de monoclonalidad no necesariamente implica la ocurrencia de una transformación maligna o incluso de una transformación neoplásica (Wlodarski et al, 2005; Sandberg et al, 2006). De hecho, en el presente estudio hemos sido incapaces de demostrar la presencia de cualquier alteración genética, bien por FISH o mediante cariotipo convencional (datos no mostrados) en los pacientes con LGL-T CD4⁺, no habiendo hasta la fecha requerido tratamiento específico para su LGL-T ninguno de los casos analizados. Aunque de forma indirecta estos hallazgos sugieren que el mecanismo patogénico que con mayor probabilidad llevaría a incrementar la supervivencia y/o proliferación de los clones de células T clonales en pacientes con LGL-T CD4⁺ estaría probablemente relacionado más con una estimulación antigénica crónica que con una transformación

DISCUSIÓN

citogenética/neoplásica. La constatación de la presencia de células $\text{TCR}\alpha\beta^+/\text{CD4}^+/\text{NK}\alpha^+/\text{CD8}^{-/+dim}$ oligo/policlonales en el hombre se ha referido previamente en la literatura y se ha asociado con diferentes condiciones patológicas en donde un estímulo crónico podría tener lugar, como neoplasias, infecciones víricas, enfermedades autoinmunes y alotrasplantes (Zaunders et al, 2004; Pérez-Andrés et al, 2006; Porakishvili et al, 2004).

En conclusión nuestros hallazgos sugieren que determinadas clones de células T CD4^+ con una importante homología en su capacidad de reconocimiento antigénico a través de su TCR, y por tanto genéticamente determinadas, serían más susceptibles de desarrollar alteraciones en los mecanismos de regulación de la homeostasis apoptótica. Alternativamente estas expansiones seleccionadas por antígenos concretos tras un estímulo crónico, adecuado y persistente llevarían a una respuesta clonal, no necesariamente neoplásica, muy probablemente por eliminación del resto de clones reactivos por el fenómeno de agotamiento de la respuesta T ("T cell exhaustion"). Finalmente, otros autores sugieren que estas linfocitosis podrían desarrollarse como resultado de una reacción alterada y posiblemente anómala a un antígeno externo concreto, pudiendo esperarse como resultado de este fenómeno, un amplio espectro de diferentes entidades clínicas de forma similar a lo descrito en las linfocitosis LGL-T $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD8}^+$ (Wlodarski et al, 2005). Aunque la naturaleza del antígeno sigue siendo incierta, estas expansiones no serían un proceso al azar, dado que no reflejan las frecuencias $\text{TCRV}\beta\text{-J}$ fisiológicas esperadas, como se demuestra en nuestro estudio.

Dada la elevada frecuencia entre la población del entorno geográfico de nuestros pacientes del haplotipo DRB1^*0701 , cabría esperar, si este fuese un factor genético determinante en el desarrollo de las LGL-T CD4^+ , que la frecuencia de estos desórdenes linfoproliferativos fuese mucho más elevada. Dado que esto no es así y que las LGL-T CD4^+ constituyen una entidad relativamente rara (Lima et al, 2003 a), deberían de existir otros factores genéticos de predisposición a padecer una LGL-T CD4^+ , siempre que el antígeno desencadenante de la estimulación crónica T sea un antígeno frecuente en nuestro entorno, como así parece ocurrir. Por todo ello, nuestro último objetivo se centró en investigar el posible papel de otros factores

genéticos que pudieran ocasionar una mayor predisposición a desarrollar este tipo de linfocitosis. En este sentido, es probable que estas linfocitosis, aunque dirigidas por antígeno, requieran de la aparición de defectos en el control y regulación de la respuesta inmune para que se manifiesten de forma persistente. De hecho, este fenotipo CD4⁺ CTL efector (CD27⁻, CD28⁻), ha sido propuesto como asociado a estímulos crónicos continuados, particularmente tras exposición a infecciones por virus capaces de generar estados de latencia en las células infectadas (Appay et al, 2002; Vallejo et al, 2000, Gamadia et al, 2003; Appay 2004). En particular, se ha descrito la presencia de células T CD4⁺ citotóxicas (granzima⁺, perforina⁺) en infecciones víricas crónicas asociadas, entre otros virus a HIV-1, EBV y CMV (Appay et al, 2002) y en pacientes diagnosticados de artritis reumatoide (Namekawa et al, 1998). En conjunto, estas observaciones sugieren que la presencia de dichas células T CD4⁺ citotóxicas podrían estar asociadas, en general, con procesos inflamatorios crónicos. Bajo estas condiciones de inflamación crónica, el incremento de células T CD4⁺ puede sufrir una diferenciación progresiva, durante la cual las células pierden la expresión de las moléculas coestimuladoras CD28 y CD27 y adquieren de gránulos citotóxicos a nivel citoplasmático, como ocurre en las células T CD8⁺ (Hamann et al, 1997; Laouar et al, 2000). Una posible explicación al incremento del número de células T CD4⁺ citotóxicas podría radicar en que los mismos factores que conducen a la diferenciación de las células T CD8⁺, podrían producir incremento de estas células CD4⁺/perforina⁺ particularmente cuando el virus o estímulo antigénico fuese capaz de eludir el reconocimiento T a través de HLA de clase I. Así, nuestra hipótesis se basa en que la evolución de las LGL-T CD4⁺ podría estar directa o indirectamente asociada con la presencia de determinados factores inmunogenéticos, los cuales podrían predisponer y/o alterar el curso clínico de esta enfermedad.

En términos generales, actualmente se conoce que son varios los factores determinados genéticamente que pueden modificar el tipo de respuesta inmune fisiológica o patológica, y que por tanto, podrían jugar un papel importante en el desarrollo de las LGL-T CD4⁺. Entre los factores inmunogenéticos que podrían estar implicados en este fenómeno, se incluyen además del genotipo HLA, ciertos polimorfismos genéticos de citoquinas y

DISCUSIÓN

de otros genes implicados en la regulación de respuestas citotóxicas. En este sentido, estudios previos han demostrado que algunos polimorfismos genéticos (SNPs) en los promotores de citoquinas, están asociados con la susceptibilidad a fenómenos autoinmunes. A modo de ejemplo, se ha constatado que los SNPs localizados en la región del promotor de la IL-18 son un factor de riesgo conocido, asociado con la diabetes mellitus tipo I (Kretowski et al, 2002). Por otra parte, polimorfismos genéticos en el receptor del TNF y del promotor del gen del TNF- α han sido implicados en el desarrollo de determinados desórdenes autoinmunes, incluyendo la artritis reumatoide (McDermott et al, 1999; Aguillon et al, 2006). De forma similar, se han asociado determinados polimorfismos genéticos implicados en la regulación de la producción de proteínas que frenan o modulan las respuestas citotóxicas frente a virus con fenómenos asociados a la persistencia viral. Tal es el caso de algunos SNPs de citoquinas producidas por las células T colaboradoras tipo Th2, IL-10, IL-4 y que inhiben de forma más acentuada respuestas mediadas por células T citotóxicas; en este sentido se ha observado que la frecuencia de determinados haplotipos en el promotor de IL-10 se asocian con la persistencia de la infección por HBV y el desarrollo de carcinoma hepatocelular (Yiin et al, 2003). En la misma línea SNPs de CTLA-4, un receptor expresado por los linfocitos T que actúa como regulador negativo universal de la respuesta T, podrían explicar algunas de las diferencias interindividuales observadas en la recuperación tras infecciones por HBV (Thio et al, 2004).

En este trabajo seleccionamos algunos de estos polimorfismos de citoquinas y receptores que se ha descrito podrían jugar un papel relevante en diferentes procesos, autoinmunes e infecciones víricas crónicas. Los resultados obtenidos los hemos comparado con un grupo de LGL-T CD3⁺/CD8⁺ asociados a desórdenes autoinmunes y evolución maligna (Nearman et al, 2006), además de con un grupo de individuos representativo de la población control de referencia.

Nuestros resultados mostraron la ausencia de correlaciones significativas entre los polimorfismos genéticos analizados en la población de referencia respecto a ambos grupos de pacientes con LGL-T CD4⁺ y CD8⁺, excepto para el polimorfismo de TNF- α en el grupo de las LGL-T CD8⁺; en estos individuos y de acuerdo con los hallazgos previos de Nearman y

colaboradores (Nearman et al, 2006) observamos un predominio significativo del genotipo A/A para el polimorfismo -308 de TNF α ; por el contrario, a diferencia de lo descrito por estos mismos autores, no encontramos asociación entre el polimorfismo 1082 de IL-10 y la presencia de LGL-T CD8⁺. Más aún, según nuestro estudio, el genotipo AA en el polimorfismo de IL10 -1082, estaba menos representado en ambos grupos de LGL-T con respecto al grupo control, sin que las diferencias observadas alcanzasen significación estadística. La presencia de una A en la posición -308 del gen de TNF- α es la responsable de un incremento de la actividad transcripcional comparada de esta citoquina respecto a la presencia del alelo G (Kroeger 1997), jugando este incremento de los niveles de TNF- α un papel crítico en la artritis reumatoide (Feldmann, 2002), una enfermedad estrechamente relacionada con la LGL-T CD8⁺, pero no con la LGL-T CD4⁺ como demuestran nuestros resultados. El hecho de que en este último grupo de pacientes con LGL-T CD4⁺ tampoco se encontrara asociación significativa con los polimorfismos de IL-10, y CTLA-4, estaría de acuerdo con la ausencia de una asociación clara entre estas LGL-T y procesos autoinmunes.

El IFN- γ actúa como molécula efectora activando tanto células T como NK, capaces de eliminar células tumorales infectadas por virus. Por este motivo en nuestro estudio incluimos el análisis de un polimorfismo de este gen, asociado con la tasa de producción de esta citoquina (Saha et al, 2005). Sin embargo, nuestros resultados no revelaron diferencias significativas con respecto al grupo control en la frecuencia de los diferentes alelos asociados a este polimorfismo en ninguno de los grupos de LGL-T analizados.

De forma paralela, hemos analizado también la frecuencia de dos alelos de NKG2D, que se ha relacionado con una mayor o menor actividad NK. Las células NK pueden reconocer e inducir la lisis/apoptosis de células que sobreexpresan los ligandos de NKG2D, un receptor activador de células NK (Wu and Lanier, 2003). Las funciones de las células efectoras NK están reguladas por un fino equilibrio entre las señales transmitidas por receptores inhibidores específicos para MHC de clase I y receptores activadores, pudiendo las señales mediadas por de NKG2D ser capaces de superar el umbral de activación determinado por las señales inhibitorias mediadas por MHC de clase

DISCUSIÓN

I (Cerwenka et al, 2001). Claramente, estos dos mecanismos inmunológicos son complementarios y actúan en diferentes estadios de la interacción con la célula reconocida como extraña, suministrando señales necesarias a la protección “in vivo” frente a la persistencia de diferentes tipos de infecciones víricas. La inclusión en nuestro estudio del análisis de polimorfismos de NKG2D, se llevó a cabo además por el hecho de estudios recientes han demostrado que la estimulación “in vitro” de células mononucleadas de sangre periférica de individuos sanos seropositivos para CMV promueven expansiones variables de linfocitos $CD4^+NKG2D^+$ que coexpresan perforina y carecen de CD28 (Saez Borderias et al, 2006), siendo este fenotipo coincidente con el de las expansiones clonales observadas en nuestros pacientes. No obstante, el estudio de la distribución de haplotipos de NKG2D relacionados con alta y baja actividad NK (Hayashi et al, 2006), no reveló diferencias significativas con respecto al grupo control, ni entre las LGL-T $CD4^+$ ni tampoco entre los pacientes con LGL- $CD8^+$.

La selección y expansión clonal así como el mantenimiento “in vivo” de estas linfocitosis T a expensas de linfocitos grandes granulares podría ser también el reflejo de la existencia de anomalías en las señales que regulan la apoptosis y la homeostasis de las células T efectoras del sistema inmune. De hecho, la persistencia “in vivo” de células T $CD4^+CD28^-$ en procesos inflamatorios crónicos así lo sugiere (Vallejo et al, 2000). En el sistema inmune normal, la AICD (muerte celular inducida por activación) constituye un mecanismo fisiológico encaminado a la eliminación de las células T activadas, una vez se ha resuelto la respuesta dirigida frente a un antígeno o grupos de antígenos concretos. Tras la activación, el ligando de Fas regula la supervivencia de las células T, interaccionando el Fas ligando producido por estas células con el receptor de Fas en la misma o en células T vecinas. La interacción Fas-FasL genera una señal de apoptosis por la vía de fosforilación del receptor Fas lo que resulta en la inducción de activación de las caspasas (caspasas 2 y 8) que finalmente llevan a la muerte celular por apoptosis (Krammer, 1999). En este contexto, la ausencia de apoptosis homeostática ha sido descrita como una característica destacable en las LGL-T $CD8^+$ en las que se ha observado la existencia de activación de la vía PI3K-AKT que parece operar en conjunción o en paralelo con incremento de las señales de

activación mediadas por STAT3 (Schade et al, 2006 b). Dado que la AICD está directamente regulada por los niveles de expresión del ligando de Fas o FasL y que tanto este ligando (Nagata et al, 1995) como su polimorfismo FASL-844-C están asociados con el incremento de las señales inductoras de muerte de células T (Sun et al, 2004), en el presente trabajo hemos investigado además la posible existencia de una asociación entre este polimorfismo y la susceptibilidad de padecer una LGL-T. Nuestros resultados sin embargo evidenciaron una distribución del polimorfismo de FasL analizado, similar a la de la población control estudiada, tanto en las LGL-T CD4⁺ como en las LGL-T CD8⁺.

En resumen, pese a que no podemos descartar la posible implicación de otros polimorfismos genéticos en el desarrollo y evolución de las LGL-T, es posible que la aparición de estas expansiones pueda estar genéticamente determinada, más que por variaciones inmunogenéticas heredables asociadas a una mayor susceptibilidad por la selección aleatoria o no de células T, con una estructura de la región CDR3 de TCR β restringida y concreta en el contexto de individuos que presentan determinados alelos HLA comunes. Además, como queda demostrado por este trabajo, estas expansiones no ocurren al azar, y lo hacen en el contexto de una respuesta inmune pre-existente, que por el momento sigue siendo de naturaleza desconocida. No obstante, aunque los mecanismos implicados en la expansión y acúmulo de estas células en los pacientes con LGL-T CD4⁺ siguen siendo desconocidos, necesariamente deben incluir el bloqueo de las vías fisiológicas inductoras de apoptosis homeostática. En este sentido, es probable que un estímulo crónico del sistema inmune conduzca a la aparición y expansión de clones de células T en las que se hayan podido adquirir alguna característica que confiera una alteración en la regulación de la apoptosis. De acuerdo con esta hipótesis, se ha observado un incremento en la actividad del eje PI3K-AKT en células clonales de pacientes con LGL-T CD8⁺, que podría condicionar la fosforilación permanente de STAT3, para inhibir el programa de apoptosis (Shade et al, 2006 b). En la actualidad, la posible existencia o no de un mecanismo similar en el caso de las expansiones clonales de tipo LGL-T CD4⁺ es algo que queda por demostrar.

CONCLUSIONES

- En relación con el primer objetivo, centrado en determinar la frecuencia y características clínicas, biológicas y fenotípicas de las linfocitosis monoclonales de LGL-T CD4⁺:

1.- Las LGL-T CD4⁺ constituyen un subgrupo relativamente frecuente de LGL-T, caracterizado por un curso clínico indolente asociado a linfocitosis moderada y otras neoplasias, en ausencia de citopenias periféricas y enfermedades autoinmunes; estos hallazgos, en principio descartarían la implicación de antígenos propios en el origen y expansión de las células T clonales en estos pacientes.

- En relación con el segundo objetivo, que perseguía analizar las características fenotípicas y moleculares del receptor para antígeno (TCR) de los linfocitos T clonales expandidos de pacientes con LGL-T CD4⁺, y la posible implicación de estímulos antigénicos comunes en su origen:

2.- En las LGL-T CD4⁺, las células T clonales expandidas muestran un uso preferencial de algunas familias TCRVβ, destacando la presencia de TCRVβ 13.1 en más de un tercio de los casos analizados. Además, el análisis de las secuencias CDR3 del gen de la cadena β del TCR en estos pacientes mostró un elevado grado de homología, lo que sugiere la implicación de un estímulo antigénico común en su origen.

3.- Los reordenamientos TCRVβ13.1 que comparten secuencias de CDR3 de 9 aminoácidos (entre las secuencias consenso CAS de Vβ y FG de Jβ) que incluyen los aminoácidos Q y G en las posiciones 108 y 109 de TCRVβ son característicos de las LGL-T CD4⁺; por el contrario, no se detectaron entre los linfocitos T CD4⁺ de sujetos sanos, lo que sugiere podrían estar relacionados con la ontogenia de las LGL-T CD4⁺.

- En relación con el tercer objetivo, centrado en explorar la posible asociación de polimorfismos de los genes de distintas moléculas

CONCLUSIONES

implicadas en el reconocimiento y respuesta frente a antígenos por parte de células citotóxicas, en el origen y desarrollo de las linfocitosis monoclonales de LGL-T CD4⁺:

4.- En las LGL-T CD4⁺ existe una asociación significativa entre la versión V β del receptor para antígeno de las células T clonales y el haplotipo HLA de los pacientes, compartiendo todos los casos TCRV β 13.1 analizados el alelo HLA-DRB1*0701. Esta asociación TCRV β /HLA proporciona una evidencia más si cabe, de la implicación de estímulos antigénicos compartidos en la ontogenia de las LGL-T CD4⁺.

5.- Ninguno de los demás marcadores genéticos analizados (IFN- γ , CTLA-4, IL-10, TNF α , FasL y NKG2D) mostró una asociación significativa con las LGL-T CD4⁺, en contraposición con lo observado en las LGL-T CD8⁺ donde el genotipo AA/AG del promotor del TNF α -308 estaba significativamente incrementado, lo que podría contribuir a explicar la distinta frecuencia de procesos autoinmunes en ambos subtipos de LGL-T.

BIBLIOGRAFÍA

- Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, de Vries E, Marland G, Menon S, Foster J, Xu Y, Nooyen P, McClanahan T, Bacon KB, Figdor CG. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*, 1997; 387: 713-7.
- Aguado B, Campbell R D: Characterization of a human MHC class III region gene product with S-thioesterase activity. *Biochem J*, 1999; 341: 679-89.
- Aguillon JC, Cruzat A, Aravena O, Salazar L, Llanos C, Cuchacovich M. Could single-nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting the tumour necrosis factor promoter be considered as part of rheumatoid arthritis evolution? *Immunobiology*, 2006; 211: 75–84.
- Ahmad E, Kingma DW, Jaffe ES, Schrager JA, Janik J, Wilson W, Stetler-Stevenson M. Flow cytometric immunophenotypic profiles of mature gamma delta T-cell malignancies involving peripheral blood and bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom*, 2005; 67: 6-12.
- Akbari O, Umetsu DT. Role of regulatory dendritic cells in allergy and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2005; 5: 56-61.
- Alam R, Gorska M. 3. Lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*, 2003; 111; 476-85.
- Alekshun TJ, Sokol L. Diseases of Large Granular Lymphocytes. *Cancer Control*, 2007; 14: 141-50.
- Alekshun TJ, Tao J, Sokol L. Aggressive T-cell large granular lymphocyte leukemia: a case report and review of the literature. *Am J Hematol*, 2007. En prensa.
- Allison J.P. Structure, function, and serology of the T-cell antigen receptor complex. *Ann Rev Immunol*, 1987; 5: 503-40.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson KC, Bates MP, Slaughenhoupt BL, Pinkus GS, Schlossman SF, Nadler LM. Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood*, 1984; 63: 1424-33.
- Appay V, Zaunders J. J, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A, Easterbrook P, Grey P, Smith D, McMichael A. J, Cooper D, Rowland-Jones S, Kelleher A. D. Characterization of CD4⁺ CTLs Ex Vivo. *The Journal of Immunology*, 2002; 168: 5954-58.
- Appay V. The physiological role of cytotoxic CD4⁺ T-cells: the holy grail? *Clin Exp Immunol*, 2004; 138:10–3.
- Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics*, 1995; 42: 455–500.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998; 392: 245-52.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2000; 18: 767-811.
- Bartlett NL and Longo DL. T-small lymphocyte disorders. *Semin Hematol*, 1999; 36: 164-70.
- Bassan R, Pronesti M, Buzzetti M, Allavena P, Rambaldi A, Mantovani A, Barbui T. Autoimmunity and B-cell dysfunction in chronic proliferative disorders of large granular lymphocytes/natural killer cells. *Cancer*, 1989; 63: 90-5.
- Baseggio L, Berger F, Morel D, Delfau-Larue MH, Goedert G, Salles G et al. Identification of circulating CD10 positive T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leukemia*, 2006; 20: 296-303.

- Baxter AG, Hodgkin PD. Activation rules: the two-signal theories of immune activation. *Nat Rev Immunol*, 2002; 2: 439-46.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, and Sacks DL. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature*, 2002; 420: 502–507.
- Bell JI, Denney D, Foster L, Lee BS, Hardy D, McDevitt HO. Molecular biology of the class II region of the human major histocompatibility complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986; 51: 75-82.
- Bjorkman, PJ, Parham P: Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem*, 1990; 59: 253-88.
- Bodmer J.G, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T. Nomenclature for factors of the HLA system, 1994. *Eur J Immunogenet*, 1994; 21: 485-517.
- Boes B, Hengel H, Ruppert T, Multhaup G, Koszinowski UH, Kloetzel PM. Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med*, 1994; 179: 901-9.
- Brocke C, Kunz H. Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens. Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens. *Bioorg Med Chem*, 2002; 10: 3085-112.
- Brown JH, Jardetzkiy TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, and Wiley DC. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*, 1993; 364: 33-9.

BIBLIOGRAFÍA

- Burg G, Kempf W, Haeffner A, Dobbeling U, Nestle FO, Boni R, Kadin M, Dummer R. From inflammation to neoplasia: new concepts in the pathogenesis of cutaneous lymphomas. *Recent Results Cancer Res*, 2002; 160: 271-80.
- Campbell RD and Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol Today*, 1993; 14: 349-52.
- Catovsky D. Chronic lymphoproliferative disorders. *Curr Opin Oncol*, 1995; 7:3-11.
- Cerwenka A, Baron J, Lanier L. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 11521-6.
- Chan WC, Gu LB, Masih A, Nicholson J, Vogler WR, Yu G, Nasr S. Large granular lymphocyte proliferation with the natural killer-cell phenotype. *Am J Clin Pathol*, 1992; 97: 353-8.
- Chan JK, Sin VC, Wong KF, Ng CS, Tsang WY, Chan CH, Cheung MM, Lau WH. Nonnasal lymphoma expressing the natural killer cell marker CD56: a clinicopathologic study of 49 cases of an uncommon aggressive neoplasm. *Blood*, 1997 a; 89: 4501-13.
- Chan LC, Lam CK, Yeung TC, Chu RW, Ng M, Chow EY, Wickham N, Matutes E. The spectrum of chronic lymphoproliferative disorders in Hong Kong. A prospective study. *Leukemia*, 1997 b; 11: 1964-72.
- Chan WC, Catovsky D, Foucar K, et al. Aggressive NK-cell leukaemia. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. *Pathology and Genetics of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, 2001. Vol 3.

- Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 2003; 111: S442-59.
- Chen Z, Sandberg AA. Molecular cytogenetic aspects of hematological malignancies: clinical implications. *Am J Med Genet*, 2002; 115: 130-41.
- Chen Q, Smith M, Nguyen T, Maher DW, Hersey P. T cell recognition of melanoma antigens in association with HLA-A1 on allogeneic melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother*, 1994; 6: 385-93.
- Chim CS, Ma SY, Au WY, Choy C, Lie AK, Liang R, Yau CC, Kwong YL. Primary nasal natural killer cell lymphoma: long-term treatment outcome and relationship with the International Prognostic Index. *Blood*, 2004; 103: 216-221.
- Cresswell P, Turner MJ and Strominger JL: Papain-solubilized HLA antigens from cultured human lymphocytes contain two peptide fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973; 70: 1603-7.
- Cresswell P, Androlewicz MJ, Ortmann B. Assembly and transport of class I MHC-peptide complexes. *Proceedings of the Ciba Found Symp*, 1994; 187: 150-62.
- Crotty PL, Smith BR, Tallini G. Morphologic, immunophenotypic, and molecular evaluation of bone marrow involvement in non-Hodgkin's lymphoma. *Diagn Mol Pathol* 1998; 7: 90-5.
- Davis MM, Björkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, 1988; 334: 395-402.
- De Fougères AR, Qin X, Springer TA. Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *J Exp Med*, 1994; 179: 619-29.

BIBLIOGRAFÍA

- Deneys V, Mazzon AM, Marques JL, Benoit H, De Bruyere M. Reference values for peripheral blood B-lymphocyte subpopulations: a basis for multiparametric immunophenotyping of abnormal lymphocytes. *J Immunol Meth*, 2001; 253: 23-36.
- Di Giuseppe JA BM. Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias. *Seminars in Oncology*, 1998; 25: 6-10.
- Dhodapkar MV, Li CY, Lust JA, Tefferi A, Phyliky RL. Clinical spectrum of clonal proliferations of T-large granular lymphocytes: a T-cell clonopathy of undetermined significance? *Blood*, 1994; 84: 1620-7.
- Dolstra H, Preijers F, Van de Wiel-van Kemenade E, Schattenberg A, Galama J, de Witte T. Expansion of CD8+CD57+ T cells after allogeneic BMT is related with a low incidence of relapse and with cytomegalovirus infection. *Br J Haematol*, 1995; 90: 300-7.
- Doo SH, Park BL, Kim LH, Jung JH, Kim JY, Yoon JH, Kim YJ, Le H-S. *Human Molecular Genetics*, 2003; 12: 901-6.
- Doyle C, Strominger JL. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature*, 1987; 330: 256-9.
- Dustin ML, Chan AC. Signaling takes shape in the immune system. *Cell*, 2000; 103: 283-94.
- Elliot T, Cerundolo V, Elvin J, Townsend A. Peptide-induced conformational change of the class I heavy chain. *Nature*, 1991; 351: 402-6.
- Epling-Burnette PK, Loughran TP Jr. Survival signals in leukemic large granular lymphocytes. *Semin Hematol*, 2003; 40: 213-20.

- Epling-Burnette PK, Painter JS, Chaurasia P, Bai F, Wei S, Djeu JY, Loughran TP Jr. Dysregulated NK receptor expression in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood*, 2004; 103: 3431-9.
- Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, Turkson J, Oshiro M, Kothapalli R, Li Y, Wang JM, Yang-Yen HF, Karras J, Jove R, Loughran TP Jr. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest*, 2001; 107: 351-62.
- Ergas D, Tsimanis A, Shtalrid M, Duskin C, Berrebi A. T-gamma large granular lymphocyte leukemia associated with amegakaryocytic thrombocytopenic purpura, Sjogren's syndrome, and polyglandular autoimmune syndrome type II, with subsequent development of pure red cell aplasia. *Am J Hematol*, 2002; 69: 132- 4.
- Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 1991; 351: 290-6.
- Fearon DT and Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 1996; 272: 50-3.
- Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nature Rev Immunol*, 2002; 2: 364–71.
- Feher O, Barilla D, Locker J, Oliveri D, Melhem M, Winkelstein A. T-cell large granular lymphocytic leukaemia following orthotopic liver transplantation. *A J Hematol*, 1995; 49: 216-20.
- Fremont D H, Rees W A, Kozono H. Biophysical studies of T-cell receptors and their ligands. *Current Opinion in Immunol*, 1996; 8: 93-100.

BIBLIOGRAFÍA

- Gamadia LE, Remmerswaal EB, Weel JF, Bemelman F, van Lier RA, Berge IJ
Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-
gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease.
Blood, 2003; 101: 2686-92.
- Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA,
Teyton L, Wilson IA. An alpha/beta T cell receptor structure at 2.5 Å
and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science*, 1996; 274: 209-
19.
- Garrido P, Ruiz-Cabello F, Barcena P, Sandberg Y, Canton J, Lima M,
Balanzategui A, Gonzalez M, Lopez-Nevot MA, Langerak AW, Garcia-
Montero AC, Almeida J, Orfao A. Monoclonal TCR-Vbeta
13.1+/CD4+/NKa+/CD8-/dim T-LGL lymphocytosis: evidence for an
antigen-driven chronic T-cell stimulation origin. *Blood*, 2007; 109 (en
prensa).
- Gentile TC, Uner AH, Hutchison RE, Wright J, Ben-Ezra J, Russell EC,
Loughran TP Jr. CD3+, CD56+ aggressive variant of large granular
lymphocyte leukemia. *Blood*, 1994; 84: 2315-21.
- Gentile TC, Hadlock KG, Uner AH, Delal B, Squiers E, Crowley S, Woodman
RC, Fong SK, Poiesz BJ, Loughran TP Jr. Large granular lymphocyte
leukaemia occurring after renal transplantation. *Br J Haematol*, 1998;
101: 507-512.
- Geraghty D. Structure of the HLA class I region and expression of its resident
genes. *Curr Opin Immunol*, 1993; 5: 3-7.
- Glynne R, Powis SH, Beck S, Kelly A, Kerr LA, Trowsdale J. A proteasome-
related gene between the two ABC transporter loci in the class II region
of the human MHC. *Nature*, 1991; 353: 357-60.

- Gniadecki R, Rossen K, Ralfkier E, Thomsen K, Skovgaard GL, Jonsson V. CD56+ lymphoma with skin involvement: clinicopathologic features and classification. *Arch Dermatol*, 2004; 140: 427-36.
- Grande AG 3rd, Van Kaer L. Tapasin: an ER chaperone that controls MHC class I assembly with peptide. *Trends Immunol*, 2001. 22: 194-9.
- Green PH, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet*, 2003; 362: 383-91.
- Goodfellow P N, Jones E A, Van Heyningen V, Solomon E, Bobrow M, Miggiano V, and Bodmer W F: The beta2-microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region. *Nature*, 1975; 254: 267-9.
- Gorochov G, Debre P, Leblond V, Sadat-Sowti B, Sigaux F, Aufran B. Oligoclonal expansion of CD8+ CD57+ T cells with restricted T-cell receptor beta chain variability after bone marrow transplantation. *Blood*, 1994; 83: 587-95.
- Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*, 2001; 13: 85-94.
- Hamann D, Baars PA, Rep M H, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, and van Lier RA. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. *J Exp Med*, 1997; 186: 1407-18.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1999; 94: 1848-54.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia. *J Clin Oncol*, 1997; 17: 3835-49.

BIBLIOGRAFÍA

- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 1994; 84: 1361-92.
- Hayashi T, Imai K, Morishita Y, Hayashi I, Kusunoki Y and Nakachi K. Identification of the NKG2D Haplotypes Associated with Natural Cytotoxic Activity of Peripheral Blood Lymphocytes and Cancer Immunosurveillance. *Cancer Res*, 2006; 66: 563-70.
- Heine H, Ulmer AJ. Recognition of bacterial products by toll-like receptors. *Chem Immunol Allergy*, 2005; 86: 99-119.
- Herling M, Khoury JD, Washington LT, Duvic M, Keating MJ, Jones D. A systematic approach to diagnosis of mature T-cell leukemias reveals heterogeneity among WHO categories. *Blood*, 2004; 104: 328-35.
- Ho FC, Srivastava G, Loke SL, Fu KH, Leung BP, Liang R, Choy D. Presence of Epstein- Barr virus DNA in nasal lymphomas of B and 'T' cell type. *Hematol Oncol*, 1990; 8: 271-81.
- Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Dogan A, Spencer J. Immunoglobulin specificity of low-grade B cell gastrointestinal lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) type. *Am J Pathol*, 1993; 142: 285-92.
- Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J. Helicobacter pylori-specific tumour-infiltrating T cells provide contact dependent help for growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *J Pathol*, 1996; 178: 122-7.
- Isaacson PG. Update on MALT lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2005; 18: 57-68.

- Jamal S, Picker LJ, Aquino DB, McKenna RW, Dawson DB, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of peripheral T-cell neoplasms. A multiparameter flow cytometric approach. *Am J Clin Pathol*, 2001; 116: 512-26.
- Jarrett RF. Viruses and lymphoma/leukaemia. *J Pathol*, 2006; 208: 176-86.
- Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, McSorley SJ, Reinhardt RL, Itano A, Pape KA. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol*, 2001; 19: 23-45.
- Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*, 1997; 90: 2863-92.
- Johnson GA, Dewald GW, Strand WR, Winkelmann RK. Chromosome studies in 17 patients with the Sezary syndrome. *Cancer* 1985; 55: 2426-33.
- Jones D, Dorfman DM. Phenotypic characterization of subsets of T cell lymphoma: towards a functional classification of T cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 2001; 40: 449-59.
- Jones EY. MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol*, 1997; 1: 75-9.
- Kanavaros P, de Bruin PC, Briere J, Meijer CJ, Gaulard P. Epstein-Barr virus (EBV) in extra-nodal T-cell non-Hodgkin's lymphomas (T-NHL). Identification of nasal T-NHL as a distinct clinicopathological entity associated with EBV. *Leuk Lymphoma*, 1995; 18: 27-34.
- Kappes D, Strominger JL. Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Annu Rev Biochem*, 1988; 57: 991-1028.

BIBLIOGRAFÍA

- Khosravi SP, Diaz Munoz de la Espada VM. Extranodal T/NK-cell lymphoma, nasal type: a case report and review of the literature. *Anales Medicina Interna*, 2005; 22: 597-600.
- Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975; 256: 495-7.
- Kothapalli R, Nyland SB, Kusmartseva I, Bailey RD, McKeown TM, Loughran TP Jr. Constitutive production of proinflammatory cytokines RANTES, MIP-1beta and IL-18 characterizes LGL leukemia. *Int J Oncol*, 2005; 26: 529-35.
- Koyasu S, Clayton LK, Lerner A, Heiken H, Parkes A, Reinherz EL. Pre-TCR signalling components trigger transcriptional activation of rearranged TCR alpha gene locus and silencing of the pre-TCR alpha locus: implications for intrathymic differentiation. *International Immunology*, 1997; 9: 1475-80.
- Krammer PH. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol*, 1999; 71: 163-210.
- Kretowski A, Mironczuk K, Karpinska A, Bojaryn U, Kinalski M, Puchalski Z, Kinalska I. Interleukin-18 promoter polymorphisms in type 1 diabetes. *Diabetes*, 2002; 51, 3347-9.
- Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The 308 tumor necrosis factor-promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*, 1997; 34: 391-9.
- Kussick SJ, Wood BL, Sabath DE. Mature T cell leukemias which cannot be adequately classified under the new WHO classification of lymphoid neoplasms. *Leukemia*, 2002; 16: 2457-8.
- Kwong YL, Wong KF. Association of pure red cell aplasia with T large granular lymphocyte leukaemia. *J Clin Pathol*, 1998; 51: 672-5.

- Kwong YL. Natural killer-cell malignancies: diagnosis and treatment. *Leukemia*, 2005; 19: 2186-94.
- Kyle RA. "Benign" monoclonal gammopathy. A misnomer? *JAMA*, 1984; 251: 1849-54.
- Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Oxford JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Eng J Med*, 2002; 346: 564-9.
- Lamy T, Liu JH, Landowski TH, Dalton WS, Loughran TP Jr. Dysregulation of CD95/CD95 ligand-apoptotic pathway in CD3+ large granular lymphocyte leukemia. *Blood*, 1998 a ; 92: 4771-7.
- Lamy T, Loughran TP. Large granular lymphocyte leukemia. *Cancer Control*, 1998 b; 5: 25-33.
- Lamy T, Loughran TP Jr. Clinical features of large granular lymphocyte leukaemia. *Semin Hematol*, 2003; 40: 185-95.
- Langerak AW, van Den Beemd R, Wolvers-Tettero IL, Boor PP, van Lochem EG, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCR alphabeta T- cell proliferations. *Blood*, 2001; 98: 165-73.
- Laouar Y, Crispe IN. Functional flexibility in T cells: independent regulation of CD4⁺ T cell proliferation and effector function in vivo. *Immunity*, 2000; 13: 291-301.
- Lee SS, Rudiger T, Odenwald T, Roth S, Starostik P, Muller-Hermelink HK. Angioimmunoblastic T cell lymphoma is derived from mature T-helper cells with varying expression and loss of detectable CD4. *Int J Cancer*, 2003; 103: 12-20.

BIBLIOGRAFÍA

- Lee J, Kim WS, Park YH, Park SH, Park KW, Kang JH, Lee SS, Lee SI, Lee SH, Kim K, Jung CW, Ahn YC, Ko YH, Park K. Nasal-type NK/T cell lymphoma: clinical features and treatment outcome. *Br J Cancer*, 2005; 92: 1226-30.
- Lehner PJ, Trowsdale J. Antigen presentation: coming out gracefully. *Curr Biol*, 1998; 8: 605-8.
- Lima M, Almeida J, Santos AH, dos Anjos Teixeira M, Alguero MC, Queiros ML, Balanzategui A, Justica B, Gonzalez M, San Miguel JF, Orfao A: Immunophenotypic analysis of the TCR-V β repertoire in 98 persistent expansions of CD3⁺/TCR $\alpha\beta$ ⁺ large granular lymphocytes: utility in assessing clonality and insights into the pathogenesis of the disease. *Am J Pathol*, 2001; 159: 1861–8.
- Lima M, Almeida J, Garcia-Montero A, Teixeira MA, Quieros ML, Santos AH, Balanzategui A, Estevinho A, Alguero MC, Barcena P, Fonseca S, Amorim ML, Cabeda JM, Pinho L, Gonzalez M, San Miguel J, Justiça B, Orfao A: Clinicobiological, immunophenotypic and molecular characteristics of monoclonal CD56-/±dim chronic natural-killer cell large granular lymphocytosis. *Am J Pathol*, 2004; 165: 1117- 27.
- Lima M, Almeida J, Dos Anjos Teixeira M, Alguero Md Mdel C, Santos AH, Balanzategui A, Queiros ML, Barcena P, Izarra A, Fonseca S, Bueno C, Justica B, Gonzalez M, San Miguel JF, Orfao A. TCR α beta⁺/CD4⁺ large granular lymphocytosis: a new clonal T-cell lymphoproliferative disorder. *Am J Pathol* 2003 a; 163: 763-71.
- Lima M, Almeida J, dos Anjos Teixeira M, Queiros ML, Santos AH, Fonseca S, Balanzategui A, Justica B, Orfao A. Utility of flow cytometry immunophenotyping and DNA ploidy studies for diagnosis and characterization of blood involvement in CD4⁺ Sezary's syndrome. *Haematologica* 2003 b; 88: 874-87.

- Limon J, Nedoszytko B, Brozek I, Hellmann A, Zajaczek S, Lubinski J, Mrozek K. Chromosome aberrations, spontaneous SCE, and growth kinetics in PHA-stimulated lymphocytes of five cases with Sezary syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 83: 75-81.
- Linnemann T, Gellrich S, Lukowski A, Mielke A, Audring H, Sterry W, Walden P. Polyclonal expansion of T-cells with the TCRVbeta type of the tumour cell in lesions of cutaneous T-cell lymphoma: evidence for possible superantigen involvement. *Br J Dermatol*, 2004; 150: 1013-7.
- Little AM, Davis Z, Fowles F, Richards J, Oscier DG, Devereux S. Restricted MHC penotypes in lymphoproliferative disorders with non-random immunoglobulin variable gene usage: evidence for antigen-specific interactions between tumour and microenvironment. *Blood*, 2006; 108: 2818.
- Liu JH, Wei S, Lamy T, Epling-Burnette PK, Starkebaum G, Djeu JY, Loughran TP. Chronic neutropenia mediated by fas ligand. *Blood*, 2000; 95: 3219-22.
- Loughran TP Jr, Kadin ME, Starkebaum G, Abkowitz JL, Clark EA, Disteché C, Lum LG, Slichter SJ. Leukemia of large granular lymphocytes: association with clonal chromosomal abnormalities and autoimmune neutropenia, thrombocytopenia, and hemolytic anemia. *Ann Intern Med*, 1985; 102: 169-75.
- Loughran TP Jr, Coyle T, Sherman MP, Starkebaum G, Ehrlich GD, Ruscetti FW, Poiesz BJ. Detection of human Tcell leukemia/lymphoma virus, type II, in a patient with large granular lymphocyte leukemia. *Blood*, 1992; 80: 1116-9.
- Loughran TP Jr, Sherman MP, Ruscetti FW, Frey S, Coyle T, Montagna RA, Jones B, Starkebaum G, Poiesz BJ. Prototypical HTLVII infection is rare in LGL leukemia. *Leuk Res*, 1994; 18: 423-9.

BIBLIOGRAFÍA

- Loughran TP. HTLV infection and hematologic malignancies. *Leuk Res*, 1996; 20: 457-8.
- Loughran TP Jr, Hadlock KG, Yang Q, Perzova R, Zambello R, Semenzato G, Fong SK, Poiesz BJ. Seroreactivity to an envelope protein of human T-cell leukemia/lymphoma virus in patients with CD3(natural killer) lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood*, 1997; 90: 1977-81.
- Loughran TP Jr, Hadlock KG, Perzova R, Gentile TC, Yang Q, Fong SK, Poiesz BJ. Epitope mapping of HTLV envelope seroreactivity in LGL leukaemia. *Br J Haematol*, 1998; 101: 318-24.
- McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, Mansfield E, Gadina M, Karenko L, Pettersson T, McCarthy J, Frucht DM, Aringer M, Torosyan Y, Teppo AM, Wilson M, Karaarslan HM, Wan Y, Todd I, Wood G, Schlimgen R, Kumarajeewa TR, Cooper SM, Vella, JP, Amos CI, Mulley J, Quane KA, Molloy MG, Ranki A, Powell RJ, Hitman GA, O'Shea JJ, Kastner DL. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell*, 1999; 97: 133-44.
- Malissen M, Trucy J, Jouvin-Marche E, Cazenave PA, Scollay R, Malissen B. Regulation of TCR a and b gene allelic exclusion during T cell development. *Immunology today*, 1992; 13: 315-22.
- Margulies DH. Monoclonal antibodies: producing magic bullets by somatic cell hybridization. *J Immunol* 2005; 174: 2451-2.
- Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). *Retrovirology*, 2005; 2: 27.

- Matutes E, Brito-Babapulle V, Swansbury J, Ellis J, Morilla R, Dearden C, Sempere A, Catovsky D. Clinical and laboratory features of 78 cases of T-prolymphocytic leukemia. *Blood*, 1991; 78: 3269-74.
- Mazzaro C, Tirelli U, Pozzato G. Hepatitis C virus and non-Hodgkin's lymphoma 10 years later. *Dig Liver Dis*, 2005; 37: 219-26.
- Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 2001; 1: 135-45.
- Mercieca J, Matutes E, Dearden C, MacLennan K, Catovsky D. The role of pentostatin in the treatment of T-cell malignancies: analysis of response rate in 145 patients according to disease subtype. *J Clin Oncol*, 1994; 12: 2588-93.
- Mohty M, Faucher C, Vey N et al. Features of large granular lymphocytes (LGL) expansion following allogeneic stem cell transplantation: a long-term analysis. *Leukemia*, 2002; 16: 2129-33.
- Monaco JJ. A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunol Today*, 1992; 13: 173-9.
- Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, 1998; 395: 82-6.
- Morel PA, Feili-Hariri M, Coates PT, Thomson AW. Dendritic cells, T cell tolerance and therapy of adverse immune reactions. *Clin Exp Immunol*, 2003; 133: 1-10.
- Muñoz Terol A. Que es el cancer: origen y causas del cancer. En "Cancer, genes y nuevas terapias". Editorial Hélice, 1997; 1-33.

BIBLIOGRAFÍA

- Nador RG, Cesarman E, Chadburn A, Dawson DB, Ansari MQ, Sald J, Knowles DM. Primary effusion lymphoma: a distinct clinico-pathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. *Blood*, 1996; 88: 645-56.
- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*, 1995; 267:1449–56.
- Namekawa T, Wagner UG, Goronzy JJ, Weyand CM. Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum*, 1998; 41: 2108-16.
- Nearman Z, Wlodarski M, Jankowska AM, Howe E, Narvaez Y, Ball E, Maciejewski JP. Immunogenetic factors determining the evolution of T-cell large granular lymphocyte leukaemia and associated cytopenias. *Bri J of Haematol*, 2006; 136: 237–48.
- Nicot C. Current views in HTL-I associated adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Am J Hematol*, 2005; 78: 232-9.
- O'Keefe CL, Plasilova M, Wlodarski M, Risitano AM, Rodriguez AR, Howe E, Young NS, Hsi E, Maciejewski JP. Molecular analysis of TCR clonotypes in LGL: a clonal model for polyclonal responses. *J. Immunol*, 2004; 172: 1960-9.
- Orfao A, Almeida J, Sanchez ML, San Miguel JF. Immunophenotypic diagnosis of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders other than chronic lymphocytic leukemia. En: *Chronic Lymphocytic Leukemia: Molecular genetics, biology diagnosis and management*. Faguet G(ed). Human press, 2004; 173-90.
- Osuji N, Del Giudice I, Matutes E, Morilla A, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Dunlop A, Catovsky D. CD52 expression in T-cell large granular lymphocyte leukemia--implications for treatment with alemtuzumab. *Leuk Lymphoma*, 2005; 46: 723–7.

- Pamer and Cresswell. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol*, 1998; 16: 323-58.
- Pandolfi F, Loughran TP Jr, Starkebaum G, Chisesi T, Barbui T, Chan WC, Brouet JC, De Rossi G, McKenna RW, Salsano F. Clinical course and prognosis of the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. A multicenter study. *Cancer*, 1990; 65: 341-48.
- Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*, 2001; 357: 1777-89.
- Parsonnet J, Isaacson P. Bacterial infection and MALT lymphoma. *N Eng J Med*, 2004; 350: 213-5.
- Passetto Falcao R, Pinto Simoes B, Garcia AB, Fonseca BA, Terra Filho J. Aggressive variant of morphologically typical T large granular lymphocyte leukemia/lymphoma lacking NK cell markers. *Acta Haematol*, 2000; 104: 110-4.
- Perez-Andres M, Almeida J, Martin-Ayuso M, Moro MJ, Martin-Nunez G, Galende J, Hernandez J, Mateo G, San Miguel JF, Orfao A; Spanish Network on Multiple Myeloma; Spanish Network of Cancer Research Centers. Characterization of bone marrow T cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and plasma cell leukemia demonstrates increased infiltration by cytotoxic/Th1 T cells demonstrating a skewed TCR-Vbeta repertoire. *Cancer*, 2006; 106: 1296-305.
- Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature*, 1991; 349: 669-76.

BIBLIOGRAFÍA

- Porakishvili N, Kardava L, Jewell AP, Yong K, Glennie MJ, Akbar A, Lydyard PM. Cytotoxic CD4+ T cells in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia kill via perforin-mediated pathway. *Haematologica*, 2004; 89: 435-43.
- Porcu P, Baiocchi RA, Magro C. Recent developments in the biology and therapy of T-cell and natural killer-cell lymphomas. *Curr Opin Oncol*, 2003; 15: 353-62.
- Purcell AW, Gorman JJ, Garcia-Peydro M, Paradelo A, Burrows SR, Talbo GH, Laham N, Peh CA, Reynolds EC, Lopez De Castro JA, McCluskey J. Quantitative and qualitative influences of tapasin on the class I peptide repertoire. *J Immunol*, 2001; 166, 1016-27.
- Rajkumar SV, Kyle RA, Plevak MF, Murray JA, Therneau TM. Helicobacter pylori infection and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol*, 2002; 119: 706-8.
- Ravandi F, O'Brien S: Chronic lymphoid leukemias other than chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*, 2005; 80: 1660-74.
- Rawstron AC, Kennedy B, Evans PA, Davies FE, Richards SJ, Haynes AP, Russell NH, Hale G, Morgan GJ, Jack AS, Hillmen P. Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood*, 2001; 98: 29-35.
- Reits EA, Vos JC, Gromme M, Neefjes J. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature*, 2000; 404: 774-8.
- Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In "Fields Virology" (4^a Ed.) Knipe DN, Howley PM (eds). Lippincott Williams & Wilkins: Filadelfia, 2001; 2575-627.

- Rozman C.(ed). Chronic lymphocytic leukemia and related disorders. Baillière's Clin Haematol, 1993; 6: 757-919.
- Ryan DK, Alexander HD, Morris TC: Routine diagnosis of large granular lymphocytic leukaemia by Southern blot and polymerase chain reaction analysis of clonal T cell receptor gene rearrangement. Mol Pathol, 1997; 50: 77–81.
- Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A and Janeway CA Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. Nature, 1991; 353: 622-7.
- Sáez-Borderías A, Gumá M, Ana Angulo A, Bellosillo B, Pende D and López-Botet M. Expression and function of NKG2D in CD4+ T cells specific for human cytomegalovirus. Eur J Immunol, 2006; 36: 3198–206.
- Saha A, Dhir A, Ranjan A, Gupta V, Bajrwa N, Bamezai R. Functional IFN γ polymorphism in intron 1 in association with an increased risk to promote sporadic breast cancer. Immunogenetics, 2005; 57: 165-71.
- Sanchez ML, Almeida J, Vidriales B, Lopez-Berges MC, Garcia-Marcos MA, Moro MJ, Corrales A, Calmuntia MJ, San Miguel JF, Orfao A. Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. Leukemia, 2002; 16: 1460-9.
- Saitoh T, Karasawa M, Sakuraya M, Norio N, Junko T, Shirakawa K, Matsushima T, Tsukamoto N, Nojima Y, Murakami H. Improvement of extrathymic T cell type of large granular lymphocyte (LGL) leukemia by cyclosporin A: the serum level of Fas ligand is a marker of LGL leukemia activity. Eur J Haematol, 2000; 65: 272-5.

BIBLIOGRAFÍA

- Sandberg Y, Almeida J, Gonzalez M, Lima M, Barcena P, Szczepanski T, van Gastel-Mol EJ, Wind H, Balanzategui A, van Dongen JJ, Miguel JF, Orfao A, Langerak AW. TCRgamma delta+ large granular lymphocyte leukemias reflect the spectrum of normal antigen-selected TCRgammadelta+ T-cells. *Leukemia*, 2006; 20: 505-13.
- San Miguel JF GMOAyc. En: Tratado de Alergología e Inmunología Clínica. Vol II: Inmunopatología General. Ed Sociedad Española de Inmunología Clínica (Ed) Luzan 5 Madrid, 1995; 157-80.
- Schade AE, Powers JJ, Wlodarski MW, Maciejewski JP. Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase pathway activation protects leukemic large granular lymphocytes from undergoing homeostatic apoptosis. *Blood*, 2006 a; 107: 4834-40.
- Schade AE, Wlodarski MW, Maciejewski JP. Pathophysiology defined by altered signal transduction pathways: the role of JAK-STAT and PI3K signaling in leukemic large granular lymphocytes. *Cell Cycle*, 2006 b; 5: 2571-4.
- Schmitt-Graff A, Hummel M, Zemlin M, Schneider T, Ullrich R, Heise W et al. Intestinal T-cell lymphoma: a reassessment of cytomorphological and phenotypic features in relation to patterns of small bowel remodelling. *Virchows Arch*, 1996; 429: 27-36.
- Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 2001; 2: 947-50.
- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bannink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 2000; 404: 770-4.
- Schuler G, Steinman RM. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J Exp Med*, 1997; 186: 1183-7.

- Sebzda E, Mariathasan S, Ohteki T, Jones R, Bachmann MF, Ohashi PS.
Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol*, 1999; 17: 829-74.
- Semenzato G, Zambello R, Starkebaum G, Oshimi K, Loughran TP Jr. The
lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria
for diagnosis. *Blood*, 1997; 89: 256-60.
- Shawar SM, Vyas JM, Rodgers JR, Rich RR. Antigen presentation by major
histocompatibility complex class-I-B molecules. *Annu Rev Immunology*,
1994; 12: 839-80.
- Shepherd JC, Schumacher TN, Ashton-Rickardt PG, Imaeda S, Ploegh HL,
Janeway CA Jr, Tonegawa S. TAP1-dependent peptide translocation in
vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell*, 1993; 74: 577-84.
- Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult
T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group
(1984-87). *Br J Haematol*, 1991; 79: 428-37.
- Sim GK, Yague J, Nelson J, Marrack P, Palmer E, Augustin A, Kappler J.
Primary structure of human T-cell receptor alpha- chain. *Nature*, 1984;
312: 771-5.
- Sokol L, Loughran TP. Large granular lymphocyte leukemia. *Oncologist*, 2006;
11: 263-73.
- Sokol L, Agrawal D, Loughran TP Jr. Characterization of HTLV envelope
seroreactivity in large granular lymphocyte leukemia. *Leuk Res*, 2005;
29: 381-7.
- Song W, Kong HL, Carpenter H, Torii H, Granstein R, Rafii S, Moore MA,
Crystal RG. Dendritic cells genetically modified with an adenovirus
vector encoding the cDNA for a model antigen induce protective and
therapeutic antitumor immunity. *J Exp Med*, 1997; 186: 1247-56.

BIBLIOGRAFÍA

- Specht JM, Wang G, Do MT, Lam JS, Royal RE, Reeves ME, Rosenberg SA, Hwu P. Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases. *J Exp Med*, 1997; 186: 1213-21.
- Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, Belhoul L, Stella S, Stavroyianni N, Crespo M, Hadzidimitriou A, Sutton L, Bosch F, Laoutaris N, Aagnostopoulos A, Montserrat E, Fassas A, Dighiero G, Caligaris-Cappio F, Merle-Beral H, Ghia P, Davi F. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukaemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*, 2007; 109: 259-70.
- Starkebaum G. Chronic neutropenia associated with autoimmune disease
Semin Hematol, 2002; 39: 121-7.
- Stewart CA, Horton R, Allcock RJ, Ashurst JL, Atrazhev AM, Coggill P, Dunham I, Forbes S, Halls K, Howson JM, Humphray SJ, Hunt S, Mungall AJ, Osoegawa K, Palmer S, Roberts AN, Rogers J, Sims S, Wang Y, Wilming LG, Elliott JF, de Jong PJ, Sawcer S, Todd JA, Trowsdale J, Beck S. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome Res*, 2004; 14: 1176-87.
- Sun T, Miao X, Zhang X, Tan W, Xiong P, Lin D. Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL in esophageal squamous-cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 2004; 7: 1030-6.
- Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT. CD4⁺CD25⁺ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8⁺ T cell responses. *J Exp Med*, 2003; 98: 889–901.

- Tefferi A, Li CY, Witzig TE, Dhodapkar MV, Okuno SH, Phyliky RL. Chronic natural killer cell lymphocytosis: a descriptive clinical study. *Blood*, 1994; 84: 2721-5.
- Thio CL, Mosbrugger T, Kaslow R, Karp CL, Strathdee S, Vlahov D, O'Brien S, Astemborski J, and Thomas DL. Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 Gene and Recovery from Hepatitis B Virus Infection. *J Virol*, 2004; 78: 11258–62.
- Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Eriksson I, Soderberg O, Karlsson K, Merup M, Juliusson G, Vilpo J, Enblad G, Sundstrom C, Roos G, Rosenquist R. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted V λ 2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood*, 2003; 101: 4952-7.
- Tokura Y, Yagi H, Ohshima A, Kuroawa S, Wakita H, Yokote R, Shirahama S, Furukawa F, Takigawa M. Cutaneous colonization with staphylococci influences the disease activity of Sezary syndrome: a potential role for bacterial superantigens. *Br J Dermatol*, 1995; 133: 6-12.
- Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 1983; 302: 575–81.
- Tordjman R, Macintyre E, Emile JF, Valensi F, Ribrag V, Burtin ML, Varet B, Brousse N, Hermine O. Aggressive acute CD3+, CD56- T cell large granular lymphocyte leukemia with two stages of maturation arrest. *Leukemia*, 1996; 10: 1514-19.
- Townsend A, Bastin J, Bodmer H, Brownlee G, Davey J, Gotch F, Gould K, Jones I, Mcmichael A, Rothbard J. Recognition of influenzae virus proteins by cytotoxic T lymphocytes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1989; 323: 527-33.

BIBLIOGRAFÍA

- Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, and Kelly A. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the "ABC" superefamily of transporters. *Nature*, 1990; 348: 741-4.
- Unanue, ER, Allen PM: The basis for immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*, 1987; 236: 551-7.
- Vallejo AN, Schirmer M, Weyand CM, Goronzy JJ. Clonality and longevity of CD4+CD28null T cells are associated with defects in apoptotic pathways. *J Immunol*, 2000; 165: 6301-7.
- Van Bleek GM, Nathenson SG. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2Kb molecule. *Nature*, 1990; 348: 213-6.
- Van den Beemd R, Boor PP, van Lochem EG, Hop WC, Langerak AW, Wolvers-Tettero IL, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls. *Cytometry*, 2000; 40: 336-54.
- Van Dongen JJM, Szczepanski T, Adriaansen HJ. Immunobiology of leukemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF (eds). *Leukemia*; Philadelphia: WB Saunders Company, 2002; 85–129.
- Van Ham SM, Tjin EP, Lillemeier BF, Gruneberg U, van Meijgaarden KE, Pastoors L, Verwoerd D, Tulp A, Canas B, Rahman D, Ottenhoff TH, Neefjes J. HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol*, 1997; 7: 950-7.
- Van Ham M, van Lith M, Lillemeier B, Tjin E, Gruneberg U, Rahman D, Pastoors L, van Meijgaarden K, Roucard C, Trowsdale J, Ottenhoff T, Pappin D, Neefjes J. Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. *J Exp Med*, 2000; 191: 1127-36.

- Vilchez RA, Madden CR, Kozinetz CA, Halvorson SJ, White ZS, Jorgensen JL, Finch CJ, Batel JS. Association between simian virus 40 and non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*, 2002; 359: 817-23.
- Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol*, 1999; 17: 19-49.
- Watts C. Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol*, 2001; 13: 26-31.
- Wells DA, Hall MC, Shulman HM, Loken MR. Occult B cell malignancies can be detected by three-color flow cytometry in patients with cytopenias. *Leukemia*, 1998; 12: 2015-23.
- Werling D, Jungi TW. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003. 91: 1-12.
- Willemze R, Meijer CJ. Primary cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorders. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2003; 17:1319-32.
- Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, Ralfkiaer E, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Duncan LM, Grange F, Harris NL, Kempf W, Kerl H, Kurrer M, Knobler R, Pimpinelli N, Sander C, Santucci M, Sterry W, Vermeer MH, Wechsler J, Whittaker S, Meijer CJ. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*, 2005; 105: 3768-85.
- Wlodarski MW, O'Keefe C, Howe EC, Risitano AM, Rodriguez A, Warshawsky I, Loughran TP Jr, Maciejewski JP. Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell-receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia. *Blood*, 2005; 106: 2769-80.

BIBLIOGRAFÍA

- Wright DH. Enteropathy associated T cell lymphoma. *Cancer Surv*, 1997; 30: 249- 61.
- Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 2003; 90: 127–56.
- Yamaguchi K, Takatsuki K. Adult T cell leukaemia-lymphoma. *Baillieres Clin Haematol*, 1993; 6: 899-915.
- Yin CC, Medeiros LJ, Abruzzo LV, Jones D, Farhood AI, Thomazy VA. EBV-associated B and T-cell posttransplant lymphoproliferative disorders following primary EBV infection in a kidney transplant recipient. *Am J Clin Pathol*, 2005; 123: 222-8.
- Yuan CM, Stein S, Glick JH, Wasik MA. Natural killer-like T-cell lymphoma of the small intestine with a distinct immunophenotype and lack of association with gluten-sensitive enteropathy. *Arch Pathol Lab Med*, 2003; 127: e142-e146.
- Zambello R, Loughran TP Jr, Trentin L, Pontisso P, Battistella L, Raimondi R, Facco M, Sancetta R, Agostini C, Pizzolo G. Serologic and molecular evidence for a possible pathogenetic role of viral infection in CD3-negative natural killer-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Leukemia*, 1995; 9: 1207-11.
- Zambello R, Semenzato G. Natural killer receptors in patients with lymphoproliferative diseases of granular lymphocytes. *Semin Hematol*, 2003; 40: 201-12.
- Zaks TZ, Chappell DB, Rosenberg SA, Restifo NP. Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J Immunol*, 1999; 162: 3273-9.

Zaunders JJ, Dyer WB, Wang B, Munier ML, Miranda-Saksena M, Newton R, Moore J, Mackay CR, Cooper DA, Saksena NK, Kelleher AD. Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term non-progressor and in CMV infection. *Blood*, 2004; 103: 2238-47.