PATRÍCIA APARECIDA FERREIRA DE OLIVEIRA

**Estudo do perfil morfológico e imunofenotípico
dos linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores
de micose fungóide nas fases precoce e avançada**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Sanches Junior

São Paulo

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Patrícia Aparecida Ferreira de

**Estudo do perfil morfológico e imunofenotípico dos linfócitos do sangue
periférico de pacientes portadores de micose fungóide nas fases precoce e
avançada** / Patrícia Aparecida Ferreira de Oliveira -- São Paulo, 2005.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Dermatologia.

Área de concentração: Dermatologia.

Orientador: José Antonio Sanches Junior.

Descritores: 1.MICOSE FUNGÓIDE/diagnóstico 2.MICOSE FUNGÓIDE/sangue
3.IMUNOFENOTIPAGEM 4.LINFÓCITOS/sangue 5.LINFÓCITOS/citologia

USP/FM/SBD-233/05

Dedico este trabalho a:

Deus, que me permitiu fazer parte de uma família tão maravilhosa e percorrer o caminho do aprendizado e das conquistas para a realização deste trabalho.

Meus pais Manoel e Luzia que com muito amor me ensinaram a conhecê-Lo e amá-Lo em todas as coisas, e me orientaram para que eu pudesse seguir o caminho para a busca permanente da verdade.

Minha irmã Gisele que me mostrou o quanto pode haver de amor nas diferenças e possibilitou conviver com seu filho tão querido, Pedro José.

Alexandre, meu grande companheiro, que com muito amor e abnegação adiou projetos e momentos de sua vida, passou por situações únicas com nosso bebê para a realização deste trabalho.

Meu querido filho João Guilherme que, com a pureza de seu amor, a cada dia me mostra, na forma mais perfeita, a existência de Deus.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Antonio Sanches Jr, uma pessoa repleta dos melhores princípios de vida e exemplo de dedicação e envolvimento que jamais serão esquecidos, agradeço pela orientação na realização deste trabalho e pela sua preocupação não somente com minha formação técnico-científica mas também com meu desenvolvimento pessoal.

Ao Serviço de Hematologia, Citologia e Genética da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas, especialmente ao Dr. Marcos Antônio Gonçalves Munhoz, pelo acolhimento. Ciente de minha intenção no desenvolvimento de projeto para pós-graduação, consolidou os laços de amizade atados desde minha seleção como sua “aprimorada em hematologia” no Instituto Adolfo Lutz.

À Profa. Dra. Leila Antonangelo, que contribuiu para este estudo na obtenção dos dados morfológicos e das imagens aqui apresentadas e pelas sugestões sobre questões técnicas e estatísticas.

À Dra. Maria Mirtes Sales, que com dedicação e interesse pela implantação de nova tecnologia no Laboratório Central, foi responsável pela minha iniciação no conhecimento da citometria de fluxo, dando-me oportunidade para desenvolver esse trabalho.

À biomédica Leila Jaldim Borracha Gonçalves, que além de me auxiliar na padronização morfológica contribuiu de uma maneira maior. Ofereceu-me sua amizade e incentivou-me a prosseguir a despeito das grandes dificuldades enfrentadas em nossas carreiras. Ensinou-me que o mais importante é a busca de nossos objetivos com a certeza de que o caminho trilhado, apesar de tortuoso, será sempre lembrado como “um caminho limpo e suavemente perfumado”.

À farmacêutica e estatística Tatiana Kovach Hayashida, que por amizade e dedicação ajudou-me prontamente na resolução de questões estatísticas essenciais para a finalização deste trabalho.

Às biomédicas Maria Lucia Raquel Beirigo e Cecília Ana Konecsni que com boa vontade acumularam tarefas no laboratório, para que eu pudesse me ausentar em momentos decisivos durante a execução deste trabalho.

À equipe da Secretaria do Laboratório de Hematologia, principalmente às Sras. Deliete de Fátima Jácomo Cunha e Maria do Socorro da Silva Santos pelo carinho e auxílio na condução dos pacientes para obtenção das amostras e no levantamento de resultados.

Ao Departamento de Dermatologia, especialmente ao Prof. Dr. Cyro Festa Neto da Clínica de Doenças Linfoproliferativas da Pele, pela colaboração na seleção dos pacientes e à secretária Sra. Eli Maria de Freitas Ferreira, pelo apoio constante.

À Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini pela sua disponibilidade em discutir e orientar questões técnicas com dedicação e delicadeza.

Aos doadores de sangue e voluntários que compreenderam a importância e grandiosidade do ato da doação e contribuíram para a obtenção dos dados aqui estudados.

A todos os amigos que conviveram comigo durante este período, e que de modo sincero se alegram com esta minha conquista.

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1.INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos clínicos, evolutivos e diagnósticos da micose fungóide e síndrome de Sézary	2
1.2. Maturação dos linfócitos T.....	4
1.3. A pele como órgão imunológico.....	6
1.4. Origem imunológica da micose fungóide e síndrome de Sézary.....	7
1.5. Presença de células de Sézary no sangue periférico	8
1.6. Aspectos da imunofenotipagem por citometria de fluxo no sangue periférico	12
2. OBJETIVOS	13
3. MÉTODOS	15
3.1. Casuística	16
3.2. Métodos	17
3.2.1. Análise do hemograma e da morfologia dos linfócitos	17
3.2.2. Análise por citometria de fluxo	19
3.2.3. Aspectos éticos e legais	25
3.2.4. Análise estatística	25
4. RESULTADOS	27
4.1. Valores de referência.....	28

4.2. Hemograma e esfregaços de sangue periférico: análise morfológica dos linfócitos	29
4.3. Análise por citometria de fluxo	31
4.3.1. Alterações quantitativas: percentual dos linfócitos imunofenotipicamente marcados no sangue periférico	31
4.3.1.1. Expansão de população linfocitária	31
4.3.1.2. Relação CD4:CD8	32
4.3.1.3. Presença de população duplamente marcada CD4 ⁺ CD8 ⁺	32
4.3.1.4. População de células T maduras expressando CLA e CD25	32
4.3.1.5. Expansão da população de células NK e B	33
4.3.1.6. Redução de população linfocitária	33
4.3.1.7. Perda da expressão de marcadores de células T	34
4.3.1.8. Perda da expressão da molécula CD4	34
4.3.1.9. Perda da expressão da molécula CD7	35
4.3.2. Análise das variações de intensidade de fluorescência nas populações linfocitárias.....	35
4.3.3. Análise do tamanho da população linfocitária	36
4.4. Dados consolidados das anormalidades morfológicas e imunofenotípicas dos linfócitos	38
4.4.1. Correlação entre os valores de linfócitos, presença de células de Sézary e de linfócitos pleomórficos com as alterações evidenciadas pela citometria de fluxo.....	38

5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES.....	51
7. ANEXOS	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

Oliveira PAF. *Estudo do perfil morfológico e imunofenotípico dos linfócitos no sangue periférico de pacientes portadores de micose fungóide nas fases precoce e avançada* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 105p.

INTRODUÇÃO: Micose fungóide (MF) e síndrome de Sézary (SS) são linfomas cutâneos epidermotrópicos de células T “helper” maduras. Na sua evolução, habitualmente, acometem linfonodos, vísceras e sangue periférico. A SS é variante leucêmica que se apresenta clinicamente desde o início com eritrodermia, linfadenomegalia e células de Sézary (CS) circulantes. O acometimento hematológico desse grupo de linfomas pode ter repercussão prognóstica e a detecção e quantificação dos linfócitos anômalos circulantes (CS) é tecnicamente de difícil padronização. A citometria de fluxo (CMF) é tecnologia que permite análise multi-paramétrica de células em suspensão possibilitando a avaliação dos marcadores imunofenotípicos dos linfócitos do sangue periférico. A aplicação desta metodologia nos linfomas cutâneos de células T acrescentou conhecimentos importantes para a compreensão da sua imunopatogênese e vem se tornando exame complementar contributivo no diagnóstico da disseminação da doença. Frente às dificuldades técnicas para o diagnóstico de envolvimento do sangue periférico através da identificação morfológica de CS, o presente estudo propôs avaliar as alterações quantitativas e qualitativas dos linfócitos do sangue periférico, nas fases precoce e avançada da doença, através da CMF, comparativamente aos achados de alterações morfológicas linfocitárias. **MÉTODOS:** Hemograma com contagem de CS e linfócitos pleomórficos (LP) e imunofenotipagem de linfócitos, por CMF, utilizando anticorpos anti-CD3, CD2, CD5, CD7, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, CD19, CD16, CD56, CD69, CD25 e CLA, pela técnica de marcação direta e “lyse-wash” foram realizados no sangue periférico de 25 doentes com MF restrita à pele, de 15 doentes com eritrodermia e/ou acometimento linfonodal e/ou visceral e de 26 controles. **RESULTADOS:** Contagens de CS acima de 7% e de LP acima de 24% foram observadas apenas na MF, sendo achados mais freqüentes no grupo com doença avançada. Alterações quantitativas, como expansão ou redução de população linfocitária e perda de marcadores imunofenotípicos, na CMF, foram observadas na doença precoce e na avançada. Alterações qualitativas, como variação na intensidade de fluorescência dos marcadores imunofenotípicos, e presença de populações linfocitárias com tamanhos distintos, na CMF, foram mais freqüentemente observadas nos doentes. **CONCLUSÃO:** Alterações imunofenotípicas na CMF estiveram presentes na micose fungóide em fase precoce e avançada, sendo observadas mais precocemente que as numéricas e morfológicas do hemograma.

DESCRITORES: Micose Fungóide/diagnóstico, Micose Fungóide/sangue, Imunofenotipagem, Linfócitos/sangue, Linfócitos/citologia

Oliveira PAF. *Study of morphologic and immunophenotypic profile of lymphocytes on peripheral blood from patients with mycosis fungoides in early and advanced stages* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 105p.

INTRODUCTION: Mycosis fungoides (MF) and Sézary syndrome (SS) are epidermotropic cutaneous lymphomas of mature T-helper cells. In its evolution, usually, lymph nodes, viscera and peripheral blood may become involved. SS is the leukemic variant that presents clinically with erythroderma, lymphadenopathy and circulating Sézary cells (SC). The hematological involvement from this group of lymphomas may have prognostical repercussion and the circulating anomalous lymphocytes (SC) detection and quantification have technically hard standardization. The flow cytometry (FCM) is the technique that permits the multiparametrical analysis of suspension cells, which makes possible the peripheral blood lymphocytes immunophenotypic markers evaluation. The application of this technology in T-cell cutaneous lymphomas has contributed with important knowledge to the understanding of immunopathogenesis, and has become a contributive complementary exam in the diagnosis of the disease dissemination. Facing the technical difficulties for the diagnosis of the involvement of the peripheral blood through the morphological identification of SC, the present study aims at evaluating the quantitative and qualitative changes of the peripheral blood lymphocytes, in the early and advanced stages of the disease, through the FCM compared to the findings of the lymphocytes' morphological changes.

METHODS: Hemogram with SC and pleomorphic lymphocyte (PL) counts and lymphocytes' immunophenotyping by FCM, using antibodies anti-CD3, CD2, CD5, CD7, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, CD19, CD16, CD56, CD69, CD25 and CLA by "stain-lyse-wash" technique were performed in the peripheral blood of 25 patients with MF restricted to the skin, of 15 patients with erythroderma and or lymph nodal and or visceral involvement, and of 26 healthy volunteers.

RESULTS: Percentages of SC above 7 and PL above 24 were observed only in MF, being more frequently found in the group with advanced stages. Quantitative changes as expansion or reduction of lymphocytic population and loss of immunophenotypic markers in the FCM, were observed in the early and advanced stages of the disease. Qualitative changes like variation in the fluorescence intensity of the immunophenotypical markers, and presence of lymphocytic populations of different sizes in the FCM were more frequently observed in the patients.

CONCLUSION: Immunophenotypical changes in the FCM were present in the mycosis fungoides in early and advanced stages being observed earlier than the numerical and morphological changes in the hemogram.

Key words: Mycosis Fungoides/diagnosis, Mycosis Fungoides/blood, Immunophenotyping, Lymphocytes/blood, Lymphocytes/cytology.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos clínicos, evolutivos e diagnósticos da micose fungóide e síndrome de Sézary

Micose fungóide (MF) e síndrome de Sézary (SS) são linfomas cutâneos epidermotrópicos com imunofenótipo de células T maduras de memória ($CD3^+CD4^+TCR\alpha\beta^+CD45RO^+CD8^-$), raramente originando-se de linfócitos $CD8^+$ (Willenze et al, 2005). Percentual significativo dos linfócitos malignos nos linfomas cutâneos de células T (LCCT) expressam o receptor do antígeno linfocitário cutâneo (CLA), explicando em parte a afinidade destas células T pela pele (Ferenczi et al, 2002).

A micose fungóide segue curso crônico, indolente, com lesões cutâneas não infiltradas e/ou placas localizadas que evoluem com formação de tumores comprometendo grandes extensões da pele (Willenze et al, 2005). No seu curso natural, habitualmente, ocorre envolvimento dos linfonodos, vísceras e sangue periférico com presença de linfócitos clonais circulantes de aspecto nuclear cerebriforme, denominados de células de Sézary (CS) (Van der Loo et al, 1981; Lamberg et al, 1984). A SS é variante

clínica leucêmica da MF, na qual os pacientes apresentam-se desde o início com eritrodermia, linfadenomegalia e presença de CS circulantes (Wieselthier et al, 1990; Vonderheid et al, 2002). O estadiamento clínico da MF e da SS baseia-se no tipo e extensão do envolvimento cutâneo (T), no estado linfonodal (N) e visceral (M) (tabela 1) (Lamberg et al, 1984) do doente.

Tabela1 - Estadiamento para micose fungóide

<i>EC</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>
IA	1	0	0
IB	2	0	0
IIA	1-2	1	0
IIB	3	0-1	0
IIIA	4	0	0
IIIB	4	1	0
IVA	1-4	2-3	0
IVB	1-4	0-3	1

T1: lesões não infiltradas e/ou placas envolvendo < 10% da superfície cutânea; T2: lesões não infiltradas e/ou placas envolvendo ≥ 10% da superfície cutânea; T3: um ou mais tumores; T4: eritrodermia; N0: sem envolvimento clínico linfonodal; N1: linfonodos clinicamente aumentados, mas histologicamente normais; N2: linfonodos clinicamente não aumentados, mas histologicamente comprometidos; N3: linfonodos clinicamente aumentados e histologicamente comprometidos; M0: sem doença visceral; M1: com doença visceral

O sistema TNM tem implicações definidas em estudos prévios: pacientes com doença cutânea limitada têm melhor prognóstico, enquanto que a ocorrência de tumores, de eritrodermia, de doença extracutânea são determinantes de prognóstico desfavorável (Kim et al, 1995). O aumento da carga tumoral no sangue periférico também está associado com pior prognóstico (Scarlsbrick et al, 2001).

Os pacientes que se apresentam com estágio precoce (ECI/II) da doença muitas vezes sobrevivem por décadas, e aqueles com doença avançada (ECIII/IV) têm sobrevida abreviada. O óbito habitualmente é resultado de “sepsis” bacteriana (microrganismos mais freqüentemente

isolados: *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) atribuída à imunodeficiência (Diamandidou et al, 1998; Sanches, 1998). Perfil Th2 das células malignas com exacerbação de resposta humoral e diminuição de resposta celular T a antígenos, diminuição da citotoxicidade da célula T, bem como exigüidade relativa de linfócitos T normais, têm sido aventadas como hipóteses explicativas para esta imunodeficiência (Yawalkar et al, 2003).

O diagnóstico histopatológico da MF é baseado na presença de epidermotropismo de linfócitos atípicos, com contorno nuclear convoluto cerebriforme, maiores que os linfócitos presentes na derme, grandes linfócitos hipercromáticos, com halos claros, enfileirados nas camadas basal e parabasal da epiderme e folículo piloso e presença de microabcessos de Pautrier (Willenze et al, 2005). Nos estágios precoces e nos casos com eritrodermia, inclusive na SS, freqüentemente os aspectos histopatológicos são inespecíficos (Trotter et al, 1997). Avaliação imuno-histoquímica pode ajudar na distinção entre MF/SS e condições benignas da pele. Na MF, pode haver perda do antígeno pan-T CD7 nas células CD3⁺CD4⁺ do infiltrado tumoral (Wood et al, 1990).

1.2. Maturação dos linfócitos T

As células T derivam de células-tronco da medula óssea, mas de modo diferente dos linfócitos B, não se diferenciam na medula; migram em um estágio ainda muito precoce para o timo. Este órgão linfóide central possui o micro-ambiente especializado para a ocorrência do reordenamento

gênico e da maturação destas células. As células que chegam ao timo estão comprometidas com a diferenciação para linhagem T por expressarem, já neste estágio, o antígeno CD7 na membrana e o antígeno CD3 no citoplasma.

Estas células progenitoras, no timo, podem transformar-se em células dendríticas intra-tímicas assim como em timócitos $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$. Interações com o estroma tímico levam à diferenciação e proliferação celular com expressão dos marcadores específicos da linhagem T. No córtex tímico, reordenamentos gênicos levam à expressão da molécula CD1a e síntese da enzima “terminal deoxi-nucleotidil transferase” (TdT), características de células imaturas. Os timócitos imaturos ainda não apresentam nenhum dos três marcadores que os definem como células T maduras: - o complexo receptor de células T (TCR) e os co-receptores CD4 ou CD8, deste modo são chamados timócitos duplamente negativos. Entretanto, a molécula CD2 já está expressa, na superfície celular, em estágio precoce da maturação. O estágio de timócito duplamente negativo ($CD4^-CD8^-$) pode ser subdividido com base na expressão da molécula de adesão CD44 e posteriormente da cadeia α do receptor de interleucina IL-2, CD25. As células $CD44^+CD25^+$ reordenam seus genes de cadeia β do TCR e se tornam $CD44^{“low”}$. Permanecem neste estágio $CD44^{“low”}CD25^+$ até que se complete o reordenamento dos genes da cadeia β , o pareamento com a cadeia α substitutiva (pré-célula T α) e a expressão destas cadeias (α substitutiva e β) na superfície celular. Passam, então, a expressar a molécula CD3 na membrana celular, tornando-se duplamente positivas para CD4 e CD8

(CD4⁺CD8⁺), e também o antígeno CD5. Ao mesmo tempo, ocorre o reordenamento das cadeias γ e δ do TCR. Cessando a proliferação, inicia-se o reordenamento dos genes da cadeia α definitiva. Nesta etapa, na região medular do timo, as células T apresentam-se prontas para serem selecionadas. As células que reagem com antígenos próprios são destruídas (seleção negativa). Aquelas com capacidade para reconhecer antígenos estranhos são selecionadas positivamente. Estes linfócitos T maduros TCR $\gamma\delta$ ⁺CD3⁺CD7⁺CD2⁺CD4⁻CD8⁻, TCR $\alpha\beta$ ⁺CD3⁺CD5⁺CD2⁺CD7⁺CD4⁺ ou TCR $\alpha\beta$ ⁺CD3⁺CD5⁺CD2⁺CD7⁺CD8⁺, deixam o timo, entram na circulação e migram para os órgãos linfóides secundários (Robey & Fowlkes, 1994).

1.3. A pele como órgão imunológico

Na agressão cutânea por agentes infecciosos ou ambientais ocorre liberação de citocinas pelos queratinócitos e desencadeamento de resposta imune inata a partir de células dendríticas, mastócitos e macrófagos residentes na pele. Esta resposta é habitualmente desencadeada por componentes de patógenos que são reconhecidos por receptores-padrão, especialmente os receptores “Toll-like”. As respostas pró-inflamatórias, via super-regulação do gene NF- κ B, além de atuarem diretamente nos patógenos, recrutam e induzem a migração de células apresentadoras de antígenos ativadas (APC) para linfonodos localizados próximos a área de pele lesada. A apresentação de antígeno, pelas células APC, às células T “naives” nos linfonodos, desencadeia uma resposta imune adaptativa. As células T tornam-se células efectoras / de memória e adquirem habilidade

para migrarem para o local original de inflamação, a pele. Ocorre geração de células T de memória antígeno-específicas que circulam através dos linfonodos para prover reservatório duradouro adequado para a vigilância imune específica. Estas células T efectoras / de memória expressam, na sua superfície, o antígeno linfocitário cutâneo (CLA) que é capaz de endereçá-las para a pele. As células T CLA⁺ estão capacitadas para interagir com o receptor E-selectina nas vênulas pós-capilares da derme e co-expressam o receptor de quimoquina CCR4, que se liga aos ligantes de quimoquinas produzidas na pele, CCL17 (também conhecido como TARC) e CCL22 (também conhecido com MDC), entre outros. Essas relações são cruciais para a interação entre célula e endotélio com efetiva passagem das células T para a derme e epiderme. Há evidências de que as células T de memória que migram para a pele tornam-se residentes constitucionais desse órgão. É possível que várias doenças cutâneas, inclusive os LCCT, possam decorrer de desbalanço na resposta imune (Kupper & Fuhlbrigge, 2004).

1.4. Origem imunológica da micose fungóide e síndrome de Sézary

Existem evidências de que as células neoplásicas da MF/SS provêm de linfócitos maduros CD4 de memória (CD45RO⁺) do arsenal de vigilância imune da pele (Kim et al, 2005). São linfócitos T que, habitualmente, não expressam certos marcadores de superfície como o CD7 e o CD26 (Wood et al, 1990, Bernengo et al, 2001).

Nos últimos anos anticorpos monoclonais tornaram possível, além da avaliação de moléculas características da diferenciação celular T (TCR,

CD3, CD2, CD5, CD7, CD4 e CD8), a caracterização de moléculas responsáveis por interações celulares como o antígeno linfocitário cutâneo (CLA) que contribui para as propriedades de endereçamento (“homing”) dos linfócitos para a pele. As células malignas da MF/SS exibem fenótipo Th2 que se exacerba com a evolução da doença. A proliferação descontrolada destas células resulta em acentuada diminuição do infiltrado linfocitário reativo T CD8⁺ e diminuição da resposta Th1 (Kamarashev et al, 1998; Kim et al, 2005). Estas propriedades explicam, até certo ponto, o tropismo cutâneo e as anormalidades imunológicas encontradas na SS, que incluem elevados níveis séricos de IgE e eosinofilia periférica com progressiva deterioração da resposta imunológica (Vonderheid et al. 2001).

1.5. Presença de células de Sézary no sangue periférico

O acometimento hematológico na micose fungóide é ainda motivo de controvérsia, tanto sua definição como sua importância prognóstica. Estudos de biologia molecular evidenciam células T clonais circulantes idênticas às do envolvimento cutâneo em todas as fases da doença, inclusive nos estágios muito precoces (Veelken et al, 1995). Presença de células de Sézary circulantes tem sido descrita em aproximadamente 10% dos pacientes com placas generalizadas, em 25% dos pacientes com tumores cutâneos e na maioria dos pacientes com eritrodermia, mas seu encontro tem sido também relatado em doenças cutâneas inflamatórias (Lutzner et al, 1971; Guccion et al, 1979; Payne et al, 1991), e até mesmo em indivíduos normais (Meijer et al, 1977; Matutes et al, 1983). Linfócitos normais

estimulados através do complexo CD3⁺ adquirem formato cerebriforme indistinguíveis de pequenas células de Sézary (Reinhold et al, 1994). Sua identificação, quantificação e distinção de linfócitos reativos através da morfologia nos esfregaços de sangue periférico, por microscopia óptica, não são fáceis e o uso da microscopia eletrônica, que incrementa a identificação das células de Sézary é impraticável na rotina diagnóstica. (Lutzner & Jordan, 1968; Flaxman et al, 1971; Winkelman & Hoagland, 1980; Kamarashev et al, 1998; Washington et al, 2002). Apesar da freqüente circulação de células de Sézary na periferia, a medula óssea é habitualmente poupada, com exceção das fases muito avançadas da doença com altos percentuais de células anômalas circulantes (Edelson et al, 1974). As CS podem ser agrupadas em três categorias: -linfócitos pequenos (8 –11 µm), de tamanho semelhante ao dos linfócitos normais não ativados, porém com núcleos convolutos; - linfócitos grandes (≥ 12 µm) com núcleos convolutos, hipercromáticos, contornados por fina camada de citoplasma contendo numerosas vesículas dispostas como um fio e marcadas por PAS; e – células blastóides (≥ 14 µm) que possuem núcleo cerebriforme e citoplasma granular abundante com ou sem vesículas e nucléolo proeminente presentes, habitualmente, nos estágios avançados da doença (Miale, 1978; Stolz et al, 1983; Van Fletcher et al, 1984; Vonderheid et al, 2002). A especificidade diagnóstica das contagens de CS pode ser melhorada considerando-se o tamanho das células em adição ao formato nuclear, pois CS ≥ 12 µm são mais indicativas de malignidade (Litovitz & Lutzner, 1974) e CS prototípicas muito grandes (> 14 µm) não são

observadas em doenças benignas mas apenas em uma minoria de pacientes com SS (Winkelman & Peters, 1981; Vonderheid et al, 1985). As reações citoquímicas são auxiliares, porém não patognomônicas. A reação mais característica é a do ácido periódico de Schiff (PAS) para o glicogênio, entretanto nem todas as CS são PAS positivas. As CS são fortemente positivas para atividade da β -glicuronidase, padrão granular, como nos linfócitos normais. São fosfatase ácida positivas (reação inibida pelo tartarato) e peroxidase negativas (Miale, 1978). A quantificação das CS, no sangue periférico, como auxílio diagnóstico da SS é controversa. Valores de CS $\geq 5\%$ em esfregaço de sangue periférico (Bunn & Lamberg, 1979), CS ≥ 10 na contagem leucocitária (Winkelman, 1973), CS $\geq 15\%$ nos esfregaços de sangue periférico (Winkelman, 1974; Vonderheid et al, 1985) e CS $\geq 20\%$ nos esfregaços de sangue periférico (Willenze et al, 1983; Schechter et al, 1987; Sausville et al, 1988) têm sido propostos como pontos ideais de corte. Entretanto, valores de CS $\geq 20\%$ são encontrados em pacientes com eritrodermias reativas, particularmente no reticulóide actínico (Chu et al, 1986) e nos pseudolinfomas induzidos por drogas (Rosenthal et al, 1982; D'Incan et al, 1992).

Consenso da “International Society for Cutaneous Lymphoma” (ISCL) normatiza como envolvimento hematológico *tipo B1*, para os linfomas cutâneos, evidência citológica de: - $\geq 20\%$ de linfócitos anormais (células de Sézary) nos esfregaços de sangue, ou - $\geq 5\%$ de linfócitos anormais (células de Sézary) associadas à evidência de clone de células T no sangue periférico por PCR ou outra metodologia. Como diagnóstico do envolvimento

leucêmico do sangue periférico *tipo B2*, necessário para a caracterização da síndrome de Sézary, considera: - contagem absoluta mínima de 1000 células de Sézary / mm³; ou - aumento da relação CD4:CD8 ≥ 10 decorrente do aumento de células T CD3⁺ ou CD4⁺ circulantes por CMF; ou - expressão aberrante de marcadores T (CD2⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD5⁺) por CMF; ou - expressão deficiente de CD7 nas células T (ou expansão de células CD4⁺CD7⁻ $\geq 40\%$) por CMF (critério ainda provisório); ou - aumento da contagem linfocitária com evidência de um clone de células T no sangue periférico por técnica de “Southern blot” ou PCR ou clone de células T cromossomicamente anormal. Caso o diagnóstico de LCCT não tenha sido confirmado no exame histopatológico de pele ou de linfonodo são necessárias evidências adicionais de diagnóstico de malignidade, como: - a presença de grandes CS (> 14 μ m) em esfregaços de sangue periférico; ou - evidência de células T com expressão aberrante de marcadores de células T ou células anormalmente grandes pela CMF; ou - demonstração de clone de células T idêntico na pele e no sangue periférico por método de “Southern blot” ou PCR (Vonderheid et al, 2002).

1.6. Aspectos da imunofenotipagem por citometria de fluxo no sangue periférico

A imunofenotipagem por citometria de fluxo (CMF) consagrou-se como ferramenta metodológica indispensável para a classificação e avaliação prognóstica das leucemias agudas e para a investigação das linfadenopatias e linfocitoses do sangue periférico. A CMF é tecnologia que

permite a medida simultânea de múltiplas características físicas celulares e de expressão antigênica. Nos linfomas cutâneos de células T (LCCT), a CFM tem demonstrado que a maioria dos linfócitos anômalos circulantes no sangue periférico, em linfonodos e outros tecidos, é expansão clonal de células T maduras circulantes $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD2}^+\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD5}^+\text{CD8}^-$. Menos freqüentemente, tem-se verificado casos com expressão de $\text{CD8}^+\text{CD4}^-$, co-expressão de $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$, perda de CD2, de CD3, de CD4 ou de CD5 (Economidou et al, 1985; Lima et al, 2003). A expressão de CD7, que ocorre normalmente em cerca de 90% das células T CD4^+ é deficiente nas células T malignas circulantes ($\text{CD4}^+\text{CD7}^-$) em aproximadamente 60 - 70% dos casos de SS (Jakob et al, 1996; Harmon et al, 1996; Bernengo et al, 1998; Laetsch et al, 2000). Embora a diminuição dessa expressão de CD7 seja uma característica comum das CS, também define um subtipo de células de memória normais, $\text{CD4}^+\text{CD45RO}^+\text{CD7}^-$, que podem estar aumentadas em pacientes com doenças cutâneas benignas ou malignas (Haynes et al, 1981; Labastide et al, 1990). Níveis alterados da expressão de CD3 ou CD4 ($\text{CD3}^{\text{"low"}}$, $\text{CD4}^{\text{"low"}}$) têm sido observadas nas CS, assim como subpopulações $\text{CD7}^-\text{CD62L}^-$ e $\text{CD4}^+\text{CD26}^-$ (Bernengo et al, 2001).

2. OBJETIVOS

Frente às dificuldades técnicas para o diagnóstico de envolvimento do sangue periférico através da identificação morfológica de células de Sézary, propôs-se estudo para avaliação de alterações quantitativas e qualitativas dos linfócitos do sangue periférico, através da técnica de citometria de fluxo, comparativamente aos achados de alterações morfológicas linfocitárias, em esfregaços de sangue periférico, nas fases precoce e avançada da micose fungóide.

3. MÉTODOS

3.1. Casuística

Quarenta pacientes com diagnóstico de micose fungóide (22 mulheres e 18 homens; média das idades de 53,1 anos) (anexos A e B), sem tratamentos específicos para a doença há pelo menos 2 meses, e soronegativos para HIV e HTLV I/II, foram selecionados consecutivamente da Clínica de Doenças Linfoproliferativas da Pele da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Vinte e cinco pacientes foram classificados como portadores de MF com doença precoce exclusivamente cutânea (ECI/II) e 15 como portadores de MF com doença avançada, isto é, com eritrodermia e/ou envolvimento linfonodal e/ou visceral (ECIII/IV) (anexos C – E). No grupo com doença avançada, três pacientes tiveram diagnóstico de SS, segundo critérios adotados pelo ISCL (Vonderheid et al, 2002). O grupo controle (14 mulheres e 12 homens; média das idades de 42,5 anos) ficou constituído por 19 doadores voluntários do Banco de Sangue da Divisão de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, por duas funcionárias da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo

e por cinco pacientes ambulatoriais com idades acima da permitida para doação de sangue, sem doenças infecciosas ou linfoproliferativas, do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (anexos A e B). Estes últimos sete voluntários foram selecionados para proporcionar média de idades mais próxima do grupo doente.

3.2. Métodos

3.2.1. Análise do hemograma e da morfologia dos linfócitos

Para todas as amostras foi realizado hemograma em aparelho hematológico automatizado e posteriormente realizadas lâminas de esfregaço de sangue periférico para avaliação morfológica, seguidas de coloração automatizada com corante tipo Leishman e contagem diferencial de cem leucócitos, em objetiva de imersão com aumento de mil vezes. Após a avaliação diferencial do hemograma, efetuou-se também, por um observador experiente e sem conhecimento da origem dos esfregaços, a contagem de cem linfócitos em cada lâmina, sendo estes divididos em linfócitos normais, linfócitos com pleomorfismo nuclear (definidos como linfócitos com alterações morfológicas nucleares inespecíficas), células de Sézary pequenas e células de Sézary grandes (figuras 1 A - F).

Figura 1. Esfregaços de sangue periférico corados pelo método de Leishman (1000X). A: linfócito normal, B: linfócito pleomórfico, C e D: células de Sézary pequenas, E e F: células de Sézary grandes

3.2.2. Análise por citometria de fluxo

A avaliação por citometria de fluxo (CMF) foi realizada em amostras de sangue periférico, obtidas através de punção venosa, utilizando anticoagulante EDTA-K3 (ácido etileno-diamino tetracético) 1,5 +/- 0,15 mg/mL preparadas por técnica de marcação direta e “lyse/wash”. A análise por CMF foi realizada através da utilização de seis parâmetros: tamanho celular (FSC), complexidade interna (SSC) e quatro fluorescências: FITC, PE, PerCP ou CY-CHROME e APC. O painel de anticorpos monoclonais incluiu os seguintes marcadores: - antígenos T associados: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, TCR $\alpha\beta$ e TCR $\gamma\delta$; - receptor de interleucina-2: CD25; - marcador de ativação: CD69; - antígeno linfocitário cutâneo: CLA; - antígeno B: CD19; - antígenos NK: CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺ e - controles isotípicos. Todos os resultados dos hemogramas e das imunofenotipagens por CMF dos pacientes encontram-se no sistema informatizado HCLab do Hospital das Clínicas da FMUSP.

A aquisição e análise dos dados foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCalibur™, programa CellQuest, equipado com um laser de 488 nm e outro de 625 nm. Pela análise gráfica de tamanho e complexidade interna, avaliou-se a população leucocitária total, como demonstrado na figura 2, onde R1 corresponde à população de linfócitos, R2 corresponde à população de monócitos e R3 à de granulócitos.

Figura 2. Distribuição gráfica das populações celulares segundo os parâmetros de tamanho (Forward Scatter) e de complexidade interna das células (Side Scatter) onde R1 corresponde à população de linfócitos, R2 corresponde à população de monócitos e R3 corresponde à população de granulócitos

A população de interesse (linfócitos) foi selecionada sob a forma de “gate” como mostrado na figura 3, e analisada nos gráficos do tipo “dot plot”, procurando-se correlacionar todas as fluorescências entre si. Esta análise possibilitou o maior número possível de informações para cada marcador imunofenotípico, como exemplificado nos gráficos das figuras 4 e 5, onde foram obtidos resultados em números percentuais para cada marcador imunofenotípico correspondente à localização das populações devidamente marcadas nos quadrantes dos gráficos do tipo “dot plot”. Estes valores percentuais foram obtidos de tabelas de análise estatística para os respectivos quadrantes através do programa CellQuest.

Figura 3. Distribuição gráfica das populações celulares segundo os parâmetros de tamanho (Forward Scatter) e de complexidade interna das células (Side Scatter) mostrando em vermelho a população de linfócitos, selecionada sob a forma de “gate”

Figura 4. Gráfico do tipo “dot plot” mostrando no quadrante superior à esquerda a população positiva para CD3 e negativa para CD4, no quadrante superior à direita a população duplamente positiva para CD3 e CD4 e no quadrante inferior à esquerda a população duplamente negativa para CD3 e CD4

Figura 5. Gráfico do tipo “dot plot” mostrando no quadrante superior à esquerda a população positiva para CD3 e negativa para CD25, no quadrante superior à direita a população duplamente positiva para CD3 e CD25 e no quadrante inferior à esquerda a população duplamente negativa para CD3 e CD25

Os valores percentuais dos marcadores linfocitários (CD3, CD2, CD5, TCR $\alpha\beta$) dos grupos com doença em fase precoce e fase avançada foram considerados *expandidos* quando se apresentaram acima do limite superior do intervalo de referência estabelecido para o grupo controle; da mesma forma foram considerados *reduzidos* os valores que estiveram abaixo do limite inferior estabelecido.

Considerou-se *perda de expressão* de determinado marcador imunofenotípico de células T maduras (CD3, CD2, CD5 ou TCR $\alpha\beta$) quando se observou evidente diminuição de seu valor percentual em relação aos outros marcadores de células T maduras para o mesmo caso. Para o marcador CD4 considerou-se *perda de expressão* quando seu valor percentual esteve reduzido abaixo do valor mínimo de referência estabelecido para o grupo controle, a soma deste valor com o valor percentual de células T CD8⁺ e de células TCR $\gamma\delta$ ⁺ foi inferior ao valor

percentual total de linfócitos $CD3^+$ ($\%CD4^+ + \%CD8^+ + \%TCR\gamma\delta^+ < \%CD3^+$).

Para o CD7, considerou-se *perda de expressão* quando seu valor apresentou resultado nulo.

Seguindo a análise dos dados por CMF, analisamos e comparamos a população linfocitária dos pacientes em relação ao grupo controle. Deste modo, no gráfico que relaciona FSC (tamanho) e SSC (complexidade interna), consideramos a população compreendida entre os números 200 e 400 da escala numérica como a população linfocitária de tamanho normal, e outras populações que estivessem além destes valores como populações de maior tamanho celular, conforme exemplificado nas figuras 6 e 7.

Figura 6 e 7. Distribuição gráfica das populações celulares segundo os parâmetros de tamanho (Forward Scatter) e de complexidade interna das células (Side Scatter) mostrando duas (vermelho e laranja) e três (vermelho, laranja e rosa) populações linfocitárias de tamanhos distintos selecionadas sob a forma de "gate"

As populações linfocitárias foram também analisadas considerando-se as características antigênicas em relação à intensidade de fluorescência dos marcadores. A intensidade de fluorescência das populações celulares foi observada analisando-se os gráficos dos marcadores antigênicos. Na escala gráfica, quanto mais distante da região negativa maior a intensidade

de fluorescência para o antígeno pesquisado, que é diretamente proporcional ao número de epítopos antigênicos expressos na membrana celular.

Foram considerados como “dim” as populações que apresentavam intensidades de fluorescência menores que a mesma população encontrada no grupo controle e “bright” as populações que apresentavam maior brilho ou intensidade de fluorescência, também quando comparadas para a mesma população do grupo controle. A figura 8 mostra duas populações celulares positivas para o CD3 e CD2, uma com maior e outra com menor intensidade de fluorescência.

Figura 8. Gráfico do tipo “dot plot” mostrando no quadrante superior à direita duas populações duplamente positivas para CD3 e CD2 populações com intensidades diferentes de fluorescência

Foi realizada a revisão de todos os casos em que a análise pela CMF evidenciou populações de linfócitos com tamanhos distintos no detector FSC, uma vez que este dado poderia ser indicativo da presença de população anômala. A reavaliação incluiu a análise do perfil imunofenotípico de cada região de linfócitos separadamente com o objetivo de identificar

diferenças nos valores percentuais das populações independentes quando comparados aos valores percentuais da população de menor tamanho. Também foram re-analisadas as características de expressão de intensidade de fluorescência no intuito de se identificar diferenças quando comparadas às características encontradas para a população de menor tamanho.

3.2.3. Aspectos éticos e legais

O protocolo da presente pesquisa, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, apresentados e aprovados pelo Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pela Comissão de Ética da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os doadores foram esclarecidos sobre o protocolo de pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2.4. Análise estatística

Para todas as variáveis, demográficas, morfológicas e imunofenotípicas, foram descritas a média, a mediana e o desvio-padrão. A condição de normalidade de distribuição das variáveis foi verificada pelo teste de Ryan-Joiner (Anexo P). Os valores de referência, para as variáveis que satisfizeram a condição de normalidade, foram obtidos a partir do intervalo de confiança pelo cálculo da diferença e soma de duas vezes o

valor do desvio padrão sobre a média ($\mu \pm 2DP$) do grupo controle; para as variáveis que não satisfizeram a condição de normalidade, os valores de referência foram obtidos a partir do intervalo de tolerância de 86% para a mediana, coincidindo com os valores mínimos e máximos encontrados para o grupo controle. Na análise das tabelas de contingência (comparação entre o grupo controle e os grupos com doença) foram utilizados o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, estabelecendo-se nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Valores de referência

Os valores de referência, obtidos a partir do sangue periférico do grupo controle, para o número de linfócitos, análise morfológica e marcadores imunofenotípicos dos linfócitos podem ser observados nos quadros 1 e 2.

Quadro 1. Valores de referência para contagens linfocitárias e morfologia dos linfócitos no sangue periférico para o grupo controle

<i>Variável</i>	<i>Valores de referência</i>
Linfócitos (células / mm ³)	691 - 2722
Número absoluto de CS (células / mm ³)	< 1000
% Células de Sézary (CS)	0 – 7
% Células de Sézary grandes	0
% Linfócitos pleomórficos	0 – 24

Quadro 2. Valores de referência para os marcadores imunofenotípicos dos linfócitos do sangue periférico analisados pela CMF para o grupo controle

<i>Variável</i>	<i>Valores de referência</i>
% CD3 ⁺	60 – 86
% CD3 ⁺ CD2 ⁺	55 – 81,5
% CD3 ⁺ CD5 ⁺	57 – 81
% CD3 ⁺ TCRαβ ⁺	51 – 78
% CD3 ⁺ CD4 ⁺	31 – 60
% CD3 ⁺ CD8 ⁺	11 – 38
Relação CD4:CD8	0,4 – 3,6
% CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	0 – 2,4
% CD3 ⁺ CD7 ⁺	42 – 76
% CD3 ⁺ CD7 ⁻	3 – 32
% CD3 ⁺ CLA ⁺	0 – 7
% CD3 ⁺ CD25 ⁺	3 – 25
% CD3 ⁺ CD69 ⁺	0 – 10
% CD3 ⁺ TCRγδ ⁺	1 – 15
% CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ (células NK)	1 – 22,5
% CD19 ⁺ (células B)	2 – 19

4.2. Hemograma e esfregaços de sangue periférico: análise morfológica dos linfócitos

A análise dos resultados dos hemogramas do grupo com doença evidenciou linfopenia em um único caso do grupo com doença avançada e linfocitose em 22,5% dos doentes em geral (tabelas 1, 2 e anexos G, H, N e O).

Percentuais de células de Sézary acima de sete foram observados em 25% dos doentes, sendo mais freqüentes no grupo com doença avançada (47%). Presença de células de Sézary grandes foi observada em maior número de casos no grupo com doença avançada (53%). Valores absolutos de CS acima de 1000 células / mm³ foram observados exclusivamente no grupo com doença avançada: - em dois pacientes com SS e em um paciente com micose fungóide eritrodérmica associada à mucinose folicular (tabelas 1, 2 e anexos N e O).

Valores de linfócitos pleomórficos acima de 24% foram encontrados em 37,5% dos doentes, sendo observados mais freqüentemente no grupo com doença avançada (60%) (tabelas 1, 2 e anexos N e O).

Tabela 1 - Resultado da análise morfológica dos casos com doença

	GRUPO COM DOENÇA
Linfócitos < 691,8/mm ³	1/40 (2,5%)
Linfócitos > 2722,2/mm ³	9/40 (22,5%)
% CS > 7	10/40 (25%)
% CS grandes ≠ 0	13/40 (32,5%)
CS > 1000 cél/mm ³	3/40 (7,5%)
% LP > 24	15/40 (37,5%)

Tabela 2 - Resultado da análise morfológica dos casos com doença fase precoce e com doença fase avançada

	DOENÇA PRECOCE	DOENÇA AVANÇADA	p
Linfócitos < 691,8/mm ³	-	1/15 (7%)	-
Linfócitos > 2722,2/mm ³	4/25 (16%)	5/15 (33%)	0,25
% CS > 7	3/25 (12%)	7/15 (47%)	0,02
% CS grandes ≠ 0	5/25 (20%)	8/15 (53%)	0,03
CS > 1000 cél/mm ³	-	3/15 (20%)	-
% LP > 24	6/25 (24%)	9/15 (60%)	0,02

4.3. Análise por citometria de fluxo

4.3.1. Alterações quantitativas: percentual dos linfócitos

imunofenotipicamente marcados no sangue periférico

4.3.1.1. Expansão de população linfocitária

Expansão da população de células T maduras ($CD3^+/CD2^+/CD5^+/TCR\alpha\beta^+$) e de células T $CD4^+$ foi observada em ambos os grupos com doença. O grupo com doença avançada apresentou maior percentual de casos com expansão da população celular T em relação ao grupo com doença precoce. (tabelas 3, 4 e anexos G, H, N e O).

Tabela 3 - Expansão da população celular expressando marcadores de células T maduras

	DOENÇA PRECOCE	DOENÇA AVANÇADA	<i>p</i>
% $CD3^+/CD2^+/CD5^+/TCR\alpha\beta^+$	2/25 (8%)	7/15 (47%)	0,01

Tabela 4 - Expansão da população celular T expressando $CD4$

	DOENÇA PRECOCE	DOENÇA AVANÇADA	<i>p</i>
% $CD3^+CD4^+$	2/25 (8%)	5/15 (33%)	0,08

Observou-se expansão da população T $CD7^-$ de modo semelhante nos grupos com doença precoce e doença avançada (tabela 5 e anexos G, H, N e O).

Tabela 5 - Expansão da população celular T $CD7^-$

	DOENÇA PRECOCE	DOENÇA AVANÇADA	<i>p</i>
% $CD3+CD7^-$	5/25 (20%)	4/15 (27%)	0,70

4.3.1.2. Relação CD4:CD8

O aumento da relação CD4:CD8 comportou-se de modo semelhante entre os grupos com doença precoce e com doença avançada (tabela 6 e anexos G, H, N e O).

Tabela 6 - Aumento da relação CD4:CD8

	DOENÇA PRECOCE	DOENÇA AVANÇADA	<i>p</i>
Relação CD4:CD8 > 3,7	4/25 (16%)	4/15 (27%)	0,44

4.3.1.3. Presença de população duplamente marcada CD4⁺CD8⁺

Aumento de linfócitos T com dupla marcação para CD4 e CD8, em relação ao grupo controle, foi observado nos grupos com doença precoce e avançada. (tabela 7 e anexos G, H, N e O).

Tabela 7 - Aumento de população celular T com dupla marcação CD4⁺CD8⁺

	DOENÇA PRECOCE	DOENÇA AVANÇADA	<i>p</i>
% CD4 ⁺ CD8 ⁺	7/25 (28%)	2/15 (13%)	0,44

4.3.1.4. População de células T maduras expressando CLA e CD25

Aumento da população CD3⁺ expressando CLA foi observado em seis doentes (15%), assim como da população CD3⁺ expressando o receptor de IL-2, CD25 (tabela 8 e anexos G, H, N e O). Entretanto, não foram observadas diferenças entre os grupos com doença precoce e com doença avançada.

Tabela 8 - Aumento da população celular T expressando CLA e CD25

	<i>DOENÇA PRECOCE</i>	<i>DOENÇA AVANÇADA</i>	<i>p</i>
%CD3 ⁺ CLA ⁺	3/25 (12%)	3/15 (20%)	0,65
%CD3 ⁺ CD25 ⁺	3/25 (12%)	4/15 (27%)	0,17

4.3.1.5. Expansão da população de células NK e B

Expansão da população celular NK e B ocorreu em poucos casos, de modo semelhante no grupo com doença precoce e com doença avançada (tabelas 9, 10 e anexos G, H, N e O)

Tabela 9 - Expansão da população celular NK

	<i>DOENÇA PRECOCE</i>	<i>DOENÇA AVANÇADA</i>	<i>p</i>
% CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	3/23 (13%)	2/13 (15%)	1,00

Tabela 10 - Expansão da população celular B CD19⁺

	<i>DOENÇA PRECOCE</i>	<i>DOENÇA AVANÇADA</i>	<i>p</i>
% CD19 ⁺	5/25 (20%)	2/15 (13%)	0,69

4.3.1.6. Redução de população linfocitária

Redução da população de células T maduras (CD3⁺/CD2⁺/CD5⁺/TCR $\alpha\beta$ ⁺), de células T CD4⁺ e de células T CD7⁺ foi observada nos grupos com doença precoce e com doença avançada, sem diferenças estatisticamente significantes (tabelas 11 - 13 e anexos G, H, N e O).

Tabela 11 - Redução da população celular expressando marcadores de células T maduras

	<i>DOENÇA PRECOCE</i>	<i>DOENÇA AVANÇADA</i>	<i>p</i>
% CD3 ⁺ /CD2 ⁺ /CD5 ⁺ /TCR $\alpha\beta$ ⁺	4/25 (16%)	3/15 (20%)	1,00

Tabela 12 - Redução da população celular T expressando CD4

	<i>DOENÇA PRECOCE</i>	<i>DOENÇA AVANÇADA</i>	<i>p</i>
% CD3 ⁺ CD4 ⁺	3/25 (12%)	1/15 (7%)	1,00

Tabela 13 - Redução da população celular T expressando CD7

	<i>DOENÇA PRECOCE</i>	<i>DOENÇA AVANÇADA</i>	<i>p</i>
% CD3 ⁺ CD7 ⁺	8/25 (32%)	5/15 (33%)	0,86

4.3.1.7. Perda da expressão de marcadores de células T

Pode-se observar perda de expressão de marcadores de células T maduras apenas no grupo com doença avançada (tabela 14 e anexos G, H, N e O).

Tabela 14 - Perda de expressão de marcadores de células T maduras

	<i>DOENÇA PRECOCE</i>	<i>DOENÇA AVANÇADA</i>
Perda de CD2	-	2/15 (13%)
Perda de TCR $\alpha\beta$	-	1/15 (7%)

4.3.1.8. Perda da expressão da molécula CD4

Perda de expressão de CD4 nos linfócitos T foi observada nos grupos com doença (tabela 15 e anexos G, H, N e O).

Tabela 15 - Perda de expressão do marcador CD4

	<i>DOENÇA PRECOCE</i>	<i>DOENÇA AVANÇADA</i>	<i>p</i>
Perda de CD4	1/25 (4%)	2/15 (13%)	0,54

4.3.1.9. Perda da expressão da molécula CD7

Perda de expressão de CD7 nos linfócitos T foi observada em um caso do grupo com doença precoce (tabela 16 e anexos G, H, N e O).

Tabela 16 - Perda de expressão do marcador CD7

	<i>DOENÇA PRECOCE</i>	<i>DOENÇA AVANÇADA</i>
Perda de CD7	1/25 (4%)	-

4.3.2. Análise das variações de intensidade de fluorescência nas populações linfocitárias

Populações com variação da intensidade de fluorescência para os marcadores CD3, TCR $\alpha\beta$, CD4, CD8 e CD25 foram observadas apenas no grupo com doença. Variações na intensidade de fluorescência para o CD7 foram observadas mais freqüentemente no grupo com doença (tabelas 17-19 e anexos F – L, M, N e O).

Tabela 17 - Alteração da intensidade de fluorescência da população celular T do grupo controle e grupos com doença

	<i>GRUPO CONTROLE</i>	<i>GRUPO COM DOENÇA</i>	<i>p</i>
Alteração na intensidade de fluorescência	4/26 (15%)	24/40 (60%)	< 0,01

Tabela 18 - Alteração da intensidade de fluorescência da população celular T do grupo controle e grupos com doença

	GRUPO CONTROLE	GRUPO COM DOENÇA	<i>p</i>
CD3 ⁺ "bright"	-	1/40 (2,5%)	-
CD2 ⁺ "dim"	2/26 (8%)	8/40 (20%)	0,29
CD5 ⁺ "dim"	1/26(4%)	5/40 (12,5%)	0,39
CD5 ⁺ "bright"	1/26(4%)	7/40 (17,5%)	1,13
TCRαβ ⁺ "dim"	-	1/40 (2,5%)	-
TCRαβ ⁺ "bright"	-	1/40 (2,5%)	-
CD7 ⁺ "bright"	1/26(4%)	14/40 (35%)	0,00
CD4 ⁺ "dim"	-	1/40 (2,5%)	-
CD8 ⁺ "dim"	-	3/40 (7,5%)	-
CD25 ⁺ "bright"	-	1/40 (2,5%)	-

Tabela 19 - Alteração da intensidade de fluorescência da população celular T para os grupos com doença

	DOENÇA PRECOCE	DOENÇA AVANÇADA	<i>p</i>
CD3 ⁺ "bright"	-	1/15 (7%)	-
CD2 ⁺ "dim"	2/25 (8%)	4/15 (27%)	0,17
CD5 ⁺ "dim"	4/25 (16%)	1/15 (7%)	0,63
CD5 ⁺ "bright"	5/25 (20%)	2/15 (13%)	0,69
TCRαβ ⁺ "dim"	-	1/15 (7%)	-
TCRαβ ⁺ "bright"	-	1/15 (7%)	-
CD7 ⁺ "bright"	6/25 (24%)	8/15 (53%)	0,06
CD4 ⁺ "dim"	-	1/15 (7%)	-
CD8 ⁺ "dim"	2/25 (8%)	1/15 (7%)	1,00
CD25 ⁺ "bright"	-	1/15 (7%)	-

4.3.3. Análise do tamanho da população linfocitária

Na análise inicial das populações de linfócitos observaram-se duas ou mais populações com tamanhos distintos mais freqüentemente no grupo com doença (60%) em relação ao grupo controle (23%). Os grupos com doença precoce e avançada comportaram-se de modo semelhante. Um caso do grupo com doença avançada apresentou três populações de tamanhos distintos (tabelas 20, 21 e anexos I - L, M, N e O).

Tabela 20 - Encontro de mais de uma população linfocitária de tamanhos distintos

	GRUPO CONTROLE	GRUPO COM DOENÇA	<i>p</i>
Populações linfocitárias com tamanhos distintos	6/26 (23%)	24/40 (60%)	0,00

Tabela 21 - Encontro de mais de uma população linfocitária de tamanhos diferentes para os grupos com doença precoce e avançada

	DOENÇA PRECOCE	DOENÇA AVANÇADA	<i>p</i>
Populações linfocitárias com tamanhos diferentes	14/25 (56%)	10/15 (67%)	0,74

Na re-análise dos casos com duas populações com tamanhos distintos de linfócitos, quando comparados os valores percentuais das populações de maior tamanho com a população pequena, observou-se expansão de linfócitos B CD19⁺, T CD3⁺CLA⁺ e de CD3⁺CD25⁺ tanto para o grupo controle como para os grupos com doença. Não foram observadas perdas de marcadores de células T maduras (anexos I – L).

No caso com três populações de linfócitos observaram-se valores diferentes de marcadores entre as populações de menor e maior tamanho. As populações com linfócitos de maior tamanho se comportaram de modo semelhante entre si com perda de marcadores de células T maduras: - CD2, TCRαβ e CD4 e expansão de CD3⁺, CD3⁺CD5⁺ e CD3⁺CD25⁺ (anexo L).

A re-análise das diferenças de intensidade de fluorescência não evidenciou diferenças entre as populações de maior e menor tamanho.

4.4. Dados consolidados das anormalidades morfológicas e imunofenotípicas dos linfócitos

A presença de CS em número percentual maior que sete e de LP maior que 24 comportou-se de modo diferente entre os grupos com doença. Estes achados foram mais observados no grupo com doença avançada (tabela 22).

Todas as outras observações, não evidenciadas no grupo controle, comportaram-se de modo semelhante entre os grupos com doença (tabela 22).

Tabela 22 - Alterações observadas no hemograma e na CMF para os grupos com doença precoce e com doença avançada

	DOENÇA PRECOCE	DOENÇA AVANÇADA	<i>p</i>
Contagem linfocitária alterada no hemograma	4 (16%)	6 (40%)	0,13
Células de Sézary > 7%	3 (12%)	7 (47%)	0,02
Linfócitos pleomórficos > 24%	6 (24%)	9 (60%)	0,02
Alterações quantitativas na CMF	17 (68%)	13 (87%)	0,19
Alterações qualitativas na CMF	14 (56%)	10 (67%)	0,50
Presença de mais de uma população linfocitária na CMF	15 (60%)	13 (87%)	0,07

4.4.1. Correlação entre os valores de linfócitos, presença de células de Sézary e de linfócitos pleomórficos com as alterações evidenciadas pela citometria de fluxo

Evidência de alterações qualitativas na CMF (presença de populações com diferentes intensidades de fluorescência) foi achado mais freqüente para o grupo com doença precoce quando comparados com

dados do hemograma (alteração do número de linfócitos como linfocitose ou linfopenia, presença de CS acima de 7% e de LP acima de 24%) (tabelas 23 – 25).

Tabela 23 - Correlação entre a contagem linfocitária e a presença de alterações qualitativas na CMF nos grupos com doença precoce e com doença avançada

	CONTAGEM LINFOCITÁRIA ALTERADA NO HEMOGRAMA	ALTERAÇÕES QUALITATIVAS NA CMF	<i>p</i>
DOENÇA PRECOCE	4/25 (16%)	14/25 (56%)	< 0,01
DOENÇA AVANÇADA	6/15 (40%)	10/15 (67%)	0,14

Tabela 24 - Correlação entre a presença de mais de 7% de células de Sézary e alterações qualitativas na CMF nos grupos com doença precoce e com doença avançada

	CS > 7	ALTERAÇÕES QUALITATIVAS	<i>p</i>
DOENÇA PRECOCE	3/25 (12%)	14/25 (56%)	< 0,01
DOENÇA AVANÇADA	7/15 (47%)	10/15 (67%)	0,27

Tabela 25 - Correlação entre a presença de mais de 24% de linfócitos pleomórficos e alterações qualitativas na CMF nos grupos com doença precoce e com doença avançada

	LP > 24	ALTERAÇÕES QUALITATIVAS	<i>p</i>
DOENÇA PRECOCE	6/25 (24%)	14/25 (56%)	< 0,01
DOENÇA AVANÇADA	9/15 (60%)	10/15 (67%)	0,70

Evidência de alterações quantitativas e presença de mais de uma população com tamanhos distintos na CMF foram achados mais freqüentes

para o grupo com doença precoce quando comparados com presença de linfócitos pleomórficos acima de 24% (tabelas 26 e 27).

Tabela 26 - Correlação entre a presença de mais de 24% de linfócitos pleomórficos e alterações quantitativas na CMF nos grupos com doença precoce e com doença avançada

	ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS NA CMF		<i>p</i>
	<i>LP > 24</i>		
DOENÇA PRECOCE	6/25 (24%)	17/25 (68%)	< 0,01
DOENÇA AVANÇADA	9/15 (60%)	13/15 (87%)	0,10

Tabela 27 - Correlação entre a presença de mais de 24% de linfócitos pleomórficos e a presença de populações com tamanhos diferentes na CMF nos grupos com doença precoce e avançada

	POPULAÇÕES COM TAMANHOS DISTINTOS NA CMF		<i>p</i>
	<i>LP > 24</i>		
DOENÇA PRECOCE	6/25 (24%)	15/25 (60%)	0,01
DOENÇA AVANÇADA	9/15 (60%)	13/15 (87%)	0,10

Alterações quantitativas, assim como a presença de mais de uma população de linfócitos com tamanhos distintos na CMF, foram mais freqüentemente observadas, tanto no grupo com doença precoce como no grupo com doença avançada, quando comparadas com a presença de alterações na contagem linfocitária e presença de mais de 7% de CS (tabelas 28 – 31).

Tabela 28 - Correlação entre a contagem linfocitária e a presença de alterações quantitativas na CMF nos grupos com doença precoce e avançada

	CONTAGEM LINFOCITÁRIA ALTERADA NO HEMOGRAMA	ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS NA CMF	<i>p</i>
DOENÇA PRECOCE	4/25 (16%)	17/25 (68%)	< 0,01
DOENÇA AVANÇADA	6/15 (40%)	13/15 (87%)	< 0,01

Tabela 29 - Correlação entre a presença de mais de 7% de células de Sézary e alterações quantitativas na CMF nos grupos com doença precoce e com doença avançada

	CS > 7	ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS NA CMF	<i>p</i>
DOENÇA PRECOCE	3/25 (12%)	17/25 (68%)	< 0,01
DOENÇA AVANÇADA	7/15 (47%)	13/15 (87%)	0,02

Tabela 30 - Correlação entre a contagem linfocitária e a presença de populações com tamanhos distintos na CMF nos grupos com doença precoce e com doença avançada

	CONTAGEM LINFOCITÁRIA ALTERADA NO HEMOGRAMA	POPULAÇÕES COM TAMANHOS DISTINTOS NA CMF	<i>p</i>
DOENÇA PRECOCE	4/25 (16%)	15/25 (60%)	< 0,01
DOENÇA AVANÇADA	6/15 (40%)	13/15 (87%)	0,01

Tabela 31 - Correlação entre a presença de mais de 7% de células de Sézary e a presença de populações com tamanhos distintos na CMF nos grupos com doença precoce e avançada T

	CS > 7	POPULAÇÕES COM TAMANHOS DISTINTOS NA CMF	<i>p</i>
DOENÇA PRECOCE	3/25 (12%)	15/25 (60%)	< 0,01
DOENÇA AVANÇADA	7/15 (47%)	13/15 (87%)	0,02

5. DISCUSSÃO

Os critérios para o diagnóstico do comprometimento do sangue periférico na MF e SS ainda são controversos. As CS, que a princípio pareciam ser patognomônicas da doença, mostraram-se também presentes no sangue periférico de indivíduos normais (Meijer et al, 1977; Matutes et al, 1983) e com doenças cutâneas inflamatórias (Lutzner et al, 1971; Guccion et al, 1979; Payne et al, 1991). A medida percentual ou absoluta de CS circulantes que possa separar as condições normais ou reacionais das doenças linfoproliferativas não está completamente definida. Os índices morfométricos, através de estudos de microscopia eletrônica, mostram-se promissores na determinação de linfócitos com características neoplásicas, entretanto seu alto custo e dificuldades inerentes à técnica não permitem sua aplicação na rotina diagnóstica (Vonderheid et al, 2002).

Neste estudo, alterações das contagens linfocitárias em números absolutos foram observadas esporadicamente nos casos avançados da doença. Através da observação criteriosa de esfregaços de sangue periférico, linfócitos com pleomorfismo nuclear e células com núcleos convolutos e cerebriformes (CS) foram encontradas em indivíduos normais e

em doentes com MF. Nos indivíduos saudáveis, os linfócitos com alterações nucleares apresentaram-se com tamanhos próximos ao dos linfócitos normais e não foram evidenciados percentuais acima de 7% para CS e 24% para LP. Vinte e cinco por cento dos pacientes com MF apresentaram contagens de CS acima de 7%, de modo semelhante ao relatado na literatura (Meijer et al, 1977), e 37,5% deles apresentaram percentuais de LP acima de 24. Curiosamente, embora as CS estejam exaustivamente estudadas e relatadas na literatura (Schechter et al, 1979; Van Fletcher et al, 1984), o encontro de linfócitos com pleomorfismo nuclear parece não ter demonstrado interesse dos morfologistas. Na leitura de trabalhos recentes pode-se verificar referências às dificuldades técnicas relacionadas à interpretação morfológica das anomalias nucleares linfocitárias, delegando este exame a apenas um examinador experiente (Vonderheid et al, 1985; Evans et al, 2001; Scarisbrick et al, 2001), como realizado neste estudo (PAFO). Neste trabalho tanto os percentuais de pacientes com alterações morfológicas do tipo CS como do tipo LP aumentaram de modo significativo no grupo com doença avançada, o que poderia sinalizar que estas células acompanhariam o processo de transformação neoplásica. CS grandes e valores de CS acima de 1000 por mm^3 foram observadas apenas nos doentes, corroborando os relatos da literatura, que reforçam estes dados como elementos importantes para o diagnóstico de acometimento hematológico da doença (Winkelman & Peters, 1981; Vonderheid et al, 1985). Estes dados nos sugerem que o conjunto das alterações morfológicas, embora não específicas, quando cuidadosamente analisadas

conjuntamente com a clínica e outros dados laboratoriais, são auxiliares importantes no diagnóstico de LCCT em determinados casos suspeitos.

O advento da citometria de fluxo vem permitindo um conhecimento mais adequado do imunofenótipo das CS, assim como dos linfócitos normais e reativos no sangue periférico. Os linfócitos neoplásicos da MF/SS apresentam fenótipo de células T pós tímica, de memória, $CD2^+$, $CD3^+$, $CD5^+$, $TCR\alpha\beta^+$, $CD4^+$, $CD45RO^+$. A ausência de expressão do $CD7$, embora seja um achado freqüente em vários estágios da doença (no sangue periférico de 60 - 70% dos doentes com SS), tem se mostrado como valor limitado do ponto de vista diagnóstico, uma vez que é inconstante e que linfócitos $CD7^-$ têm sido observados em lesões cutâneas e no sangue periférico de processos linfóides benignos (Harmon et al, 1996; Alaibac et al, 2003), além das evidências atuais sugerindo que células T $CD7^-$ possam representar uma via de diferenciação distinta das células T $CD4^+$ normais (Reinhold et al, 1996).

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos enfocando especificamente o perfil imunofenotípico da CS através da CMF (Borowitz et al, 1993; Harmon et al, 1996; Jakob et al, 1996; Bogen et al, 1996; Laetsch et al, 2000; Bernengo et al, 2001; Vonderheid et al, 2001; Rappl et al, 2001; Washington et al, 2002; Lima et al, 2003; Wang et al, 2004; Sokolowska-Wojdylo et al, 2005). Quase a totalidade deles estuda especificamente as alterações da população $CD4^+CD7^-$ e poucos enfocam evidências do acometimento do sangue periférico nas formas iniciais da MF (Jakob et al, 1996; Laetsch et al, 2000).

Este estudo não foi direcionado para avaliar especificamente as células de Sézary $CD4^+CD7^-$. Seu desenho objetivou, através da utilização de amplo painel de anticorpos monoclonais, estudar possíveis comprometimentos dos linfócitos do sangue periférico, nas fases precoce e avançada da MF, através de alterações no perfil imunofenotípico comparativamente a indivíduos saudáveis. Desconhecemos trabalho semelhante realizado, até o momento, no Brasil.

Encontramos alterações quantitativas, na CMF, como expansão ou redução da população celular T expressando CD2, CD3, CD5, $TCR\alpha\beta$, CD4 e CD7 e / ou perda de expressão de um ou mais desses marcadores em 87% dos casos com doença avançada e em 68% dos casos com doença precoce. A expansão de células T maduras foi significativamente mais freqüente na doença avançada e a perda de expressão dos marcadores CD2 e $TCR\alpha\beta$ ocorreu somente no grupo com doença avançada, conforme relatado na literatura (Harmon et al, 1996; Jakob et al, 1996), enquanto que a perda de expressão do marcador CD7 foi observada em apenas um doente do grupo precoce. Expansão da população $CD3^+CD7^-$ foi observada em 20% dos casos com doença precoce e em 27% dos casos com doença avançada. Estudos demonstram expansão da população $CD7^-$ na maioria dos casos de SS, entretanto os trabalhos analisam especificamente a subpopulação $CD4^+CD7^-$ em doentes com elevados percentuais de linfócitos anômalos (Harmon et al, 1996; Jakob et al, 1996; Laetsch et al, 2000; Bernengo et al, 2001; Vonderheid et al, 2001; Rappl et al, 2001; Lima et al, 2003). Aumento da relação CD4:CD8, comparativamente ao valor máximo

do intervalo para o grupo controle, foi evento raro, encontrado de forma semelhante entre os grupos com doença. Valores de $CD4:CD8 \geq 10$ foram observados em apenas dois casos de MF com doença avançada e em um caso com doença precoce que se mostrou, no seguimento, com rápida evolução e transformação da doença, com desenvolvimento de tumores e linfonodomegalia. A literatura menciona que 63 a 80% dos casos com SS apresentam relação $CD4:CD8 \geq 10$ (Willenze et, 1983; Chu et al, 1986). Nenhum dos três casos de SS deste estudo apresentou aumento da relação $CD4:CD8 \geq 10$, embora todos apresentassem valores percentuais elevados de CS e a mais ampla combinação de alterações imunofenóticas dentre todos os doentes, com expansão da população celular T madura, perda de expressão de marcador de linhagem T e com alteração na intensidade de fluorescência para o CD7 e CD2. Dois deles apresentaram também expansão da população $CD3^+CD7^-$.

Alterações qualitativas, como variação na intensidade de fluorescência nas populações linfocitárias, pode ser observada em raros casos do grupo controle, entretanto ocorreu mais significativamente nos doentes, de modo semelhante no grupo com doença precoce e com doença avançada. O aparecimento de população $CD7^+$ com brilho mais intenso foi a alteração qualitativa mais observada, tanto nos casos com doença precoce como naqueles com doença avançada. Diferença de intensidade de fluorescência principalmente para os marcadores CD3, CD4, CD7 são descritas para pacientes com MF e SS (Washington et al, 2002).

A expressão da cadeia alfa do receptor de IL2, molécula CD25, é observada em células T CD4⁺ normais e ativadas, não sendo relevante para distinguir linfócitos anômalos. Entretanto, se tem demonstrado valores percentuais aumentados na SS (Lima et al, 2003). Observou-se, neste estudo, aumento de população celular T expressando CD25 em 12% dos casos com doença precoce associado a outras alterações imunofenotípicas (expansão ou redução de população celular T madura, aumento da relação CD4:CD8, perda da expressão de CD7 e alteração da intensidade de fluorescência) e em 27% dos casos com doença avançada (expansão e perda de marcadores de células T maduras e alteração da intensidade de fluorescência).

O antígeno CLA é encontrado em 80 – 90% dos linfócitos dos infiltrados cutâneos e em 5 – 10% daqueles presentes em outros locais (Picker et al, 1990), apresentando-se em cerca de 6 a 16% dos linfócitos T periféricos (Ferenczi et al, 2002). Neste trabalho observamos, para a população normal, valores de CLA compreendidos entre 0 - 7% dos linfócitos T. Doze por cento dos casos com MF precoce e 20% daqueles com doença avançada apresentaram valores percentuais aumentados de células CD3⁺CLA⁺ comparados aos valores do grupo controle, associando-se menos freqüentemente a outras alterações imunofenotípicas. Valores aumentados de células CLA⁺ entre as CS são referidos na literatura (Ferenczi et al, 2002).

Agrupamentos de linfócitos com tamanhos diferentes, evidenciados pela observação de mais de uma população linfocitária, na análise por CMF,

foram encontrados mais freqüentemente nos doentes (60%). No grupo controle, este dado foi observado apenas nos pacientes mais idosos (não doadores; recrutados para aumentar a média das idades). Há referências de alterações imunofenotípicas próprias do envelhecimento, em relação à expressão dos receptores de superfície nas sub-populações de linfócitos (Ginaldi et al, 2001). Embora, este achado nos doentes pudesse ser indicativo da presença, na população de maior tamanho, de células possivelmente neoplásicas, não foi possível, neste estudo, observar anormalidades imunofenotípicas que corroborassem tal suposição. Na maioria dos casos, pode-se observar na sub-população de maior tamanho, aumento percentual de células B e de células T expressando CD25 e CLA em relação à de menor tamanho, fato que poderia denotar presença de população reacional (decorrente do perfil Th2 da doença?). Em apenas um caso de SS com três sub-populações linfocitárias de tamanhos diferentes foram observadas, nas populações de maior tamanho, alterações imunofenotípicas consistentes com neoplasia de células T.

Neste estudo, não foram encontradas alterações consistentes relativas aos linfócitos NK e B que pudessem sugerir comprometimento significativo desse perfil imunofenotípico. Há citação na literatura de diminuição no percentual de células NK na SS (Harmon et al, 1996).

A comparação entre a análise do hemograma (presença de linfócitos pleomórficos e células de Sézary) e da CMF, nos doentes, identificou mais freqüentemente modificações imunofenotípicas qualitativas e quantitativas que alterações morfológicas. Este dado poderia denotar que o

imunofenótipo estivesse comprometido mais precocemente que a morfologia das células na microscopia óptica. Tais achados não têm sido claramente valorizados na literatura.

Este trabalho demonstrou que alterações imunofenotípicas puderam ser evidenciadas precocemente e que a análise criteriosa e conjunta da morfologia dos linfócitos no hemograma detectou indícios de envolvimento do sangue periférico até mesmo nos doentes com MF aparentemente localizada na pele. Estes achados necessitam de confirmação através de estudo com maior número de casos. Possivelmente, inferências prognósticas poderão ser feitas através de seguimento clínico adequado dos doentes e repetição periódica de estudo morfológico e por CMF em amostras de sangue periférico.

6. CONCLUSÕES

- Em relação à morfologia dos linfócitos nos esfregaços de sangue periférico, concluiu-se que:

1. Linfócitos com pleomorfismo nuclear e células de Sézary foram observadas em indivíduos sãos e doentes com micose fungóide ou síndrome de Sézary.
2. Quantidades percentuais de linfócitos com pleomorfismo nuclear acima de 24% e de células de Sézary acima de 7% somente foram observadas nos doentes com micose fungóide e síndrome de Sézary, sendo mais freqüentes na doença avançada.
3. Células de Sézary grandes somente foram observadas em pacientes com micose fungóide e síndrome de Sézary.
4. Quantidades de células de Sézary acima de 1000 células / mm³ somente foram observadas na micose fungóide avançada e na síndrome de Sézary.

- Em relação à análise dos linfócitos do sangue periférico através da citometria de fluxo, concluiu-se que:

1. Alterações quantitativas, como expansão ou redução de população e perda de marcadores imunofenotípicos, foram observadas nos grupos com doença precoce (68%) e com doença avançada (87%).
2. Alterações qualitativas, como variação na intensidade de fluorescência dos marcadores imunofenotípicos, foram mais freqüentemente observadas nos grupos com doença (60%) em relação ao grupo controle (15%).
3. A presença de populações linfocitárias com tamanhos distintos foi mais freqüente nos grupos com doença (60%) em relação ao grupo controle (23%). Ocorreram, no grupo controle, apenas em indivíduos com idade igual ou superior a 56 anos.
4. Três populações linfocitárias com tamanhos celulares distintos foram evento exclusivo na doença avançada.

- Comparando-se os achados da CMF com os achados do hemograma, concluiu-se que:

1. Na doença precoce, alterações quantitativas, qualitativas e presença de mais de uma população com tamanhos distintos, na CMF, foram

significativamente mais observadas que alterações no hemograma (número e morfologia dos linfócitos).

2. Na doença avançada alterações quantitativas e presença de populações com tamanhos distintos na CMF foram significativamente mais observadas que alterações no número de linfócitos e presença de células de Sézary em número maior que 7%.
3. Alterações imunofenotípicas na CMF foram observadas mais precocemente que alterações numéricas e morfológicas no hemograma.

7. ANEXOS

Anexo A – Distribuição dos grupos por sexo

GRUPOS		SEXO		TOTAL
		F	M	
Controle	Contagem	14	12	26
	%	21,2%	18,2%	39,4%
Doente	Contagem	22	18	40
	%	33,3%	27,3%	60,6%
	Contagem	36	30	66
	%	54,5%	45,5%	100,0%

F = pacientes do sexo feminino, M = pacientes do sexo masculino

Anexo B - Distribuição dos grupos por idade

GRUPOS	ESTATISTICAS	IDADE
Controle	Média	42,50
	Mediana	38,00
	Desvio padrão (S)	17,59
	Mínimo	19,00
	Máximo	86,00
Doente	Média	53,15
	Mediana	51,00
	Desvio padrão (S)	18,70
	Mínimo	19,00
	Máximo	89,00

Anexo C – Distribuição dos doentes por estadio clínico

ESTADIAMENTO	EC I	EC II	EC III	EC IV	TOTAL
Contagem	19	6	10	5	40
%	47,5	15	25	12,5	100

EC: estadio clínico

Anexo D – Distribuição dos doentes considerando-se fase precoce e fase avançada

	FASE PRECOCE	FASE AVANÇADA	TOTAL
Contagem	25	15	40
%	62,5	37,5	100

Anexo E - Distribuição das características clínicas do grupo doente na ocasião da realização dos exames laboratoriais

	MF CLÁSSICA E VARIANTES	MF ERITRODÉRMICA SECUNDÁRIA	MF ERITRODÉRMICA PRIMÁRIA	SS	TOTAL
Contagem	31	1	5	3	40
%	77,5	2,5	12,5	7,5	100

MF: Micose Fungóide, SS: Síndrome de Sézary

Anexo F: Grupo controle: número absoluto, morfologia e imunofenótipo dos linfócitos do sangue periférico

N	Li	%CS total	%CS gdes	%Li pleo	Pop tam dif	Intensid fluor dif	%CD3+	%CD3+ CD2+	%CD3+ CD5+	%CD3+ TCR $\alpha\beta$ +	%CD3+ CD4+	%CD3+ CD8+	CD4:CD8	CD4+CD8+	%CD3+ CD7+	%CD3+ CD7-	%CD3+ CLA+	%CD3+ CD25+	%CD19+	%NK
1	1530	2	0	12	0	-	76	72	72	70	40	28	1,4	0,85	68	7	4,0	11,5	10	12
2	2930	0	0	9	0	-	78	75	74	66	50	26	1,9	0,9	67	9	1,5	9,5	17	4
3	1690	0	0	5	0	-	79	74	72	70	36	38	0,9	1,04	71	3	4,5	5	11	5
4	1220	0	0	10	0	-	76,5	69	73	70	43	30	1,4	1,3	65,5	7	3,0	12	6	12
5	1730	3	0	14	0	-	73	63	69	61	39	33	1,2	1,02	41	18,5	4,0	4	12	12
6	740	0	0	10	0	-	61	54	61	54	41	18	2,3	0,6	52	4,5	6,0	13,5	13	10
7	1430	0	0	14	0	-	72,5	66	69,5	62	38	32,5	1,2	1,5	56	13	3,0	3,5	8	14
8	1730	0	0	3	0	-	75	62	61	65	52	22,5	2,3	1,7	49,5	13	6,0	7	10	7
9	1410	0	0	10	0	-	73,5	68	71	62	45	28,5	1,6	2,75	61	8	4,0	14	9	10,5
10	2180	0	0	4	0	-	79,5	70	75	70	49	29	1,7	1,3	66	5	2,0	5	12	5
11	1270	0	0	7	0	-	70	62	63	66	49	21	2,3	2,47	54	8	7,0	10	13	8
12	1800	1	0	8	0	-	78	72	75	73	57	19	3	0,75	52	17	1,0	4	13	4
13	1410	1	0	8	0	-	67	60,5	62	56	42	25	1,7	1,6	52,5	9	4,0	13	10	21,5
14	1880	2	0	6	0	-	73	73	71	64,5	46	26	1,8	0,7	63	9	6,0	12	7	16
15	2090	7	0	13	0	-	74	70	70	61	42	29	1,4	0,9	61,5	4	2,0	6	15	7
16	840	2	0	10	0	-	70	66	70	67	50	16	3,1	1,6	60,5	6	6,0	5	4	12
17	1330	5	0	24	0	-	73	69	73	67	40	27	1,5	1,4	52	27,5	2,0	4	6	17
18	1240	2	0	11	0	CD2+dim	88	85	83	79	63	18	3,5	1,3	56	32	3,0	5	3,5	7
19	2330	2	0	12	0	CD2+dim	75	65	70	68,5	50	20	2,5	1,2	40	27	3,5	3	4	18
20	2260	3	0	9	2	-	63	63	63	58	41	19,5	2,1	0	58	5	1	18,5	18	16
21	1350	0	0	13	2	-	75	75	74	72,5	56	15	3,7	0	70	5	3	19	7	14
22	1720	0	0	5	2	CD7+bri CD5+bri	80,5	80	78,5	73	45,5	35	1,3	1,7	73	7	3	16,5	9	7,5
23	1590	0	0	7	2	CD5+dim	65	64	60	50	29	34	0,85	1,4	60	4	2	13	10	22
24	2500	0	0	5	2	-	65	65	63,5	62	47	17	2,8	1	61	4	3	25	19	11
25	2200	0	0	3	2	-	60	60	59	55	46	15	3,1	1,7	54,5	5,5	3	4	16	-
66	1970	0	0	10	0	-	73	69	66	61	46,5	17,5	2,6	0,9	64	9	1	14,4	6	20

Anexo G: Grupo com doença precoce: número absoluto, morfologia e imunofenótipo dos linfócitos do sangue periférico

N	EC	Li	%CS total	%CS gdes	%Li pleo	Pop tam dif	Intensid fluor dif	%CD3+	%CD3+ CD2+	%CD3+ CD5+	%CD3+ TCRαβ+	%CD3+ CD4+	%CD3+ CD8+	CD4:CD8	CD4+ CD8+	%CD3+ CD7+	%CD3+ CD7-	%CD3+ CLA+	%CD3+ CD25+	%CD19+	%NK
		(691-2722)	(0-7)	0	(0-24)			(60-86)	(55-81,5)	(57-81)	(51-78)	(31-60)	(11-38)	(0,4-3,6)	(0-2,4)	(42-76)	(3-32)	(0-7)	(3-25)	(2-19)	(1-22,5)
27	MF/IB	2100	1	1	18	0	CD5+bri	72	72	61	62	32	38,5	0,8	4	46	26	1,5	4	12	12
28	MF/IB	2600	0	0	14	0	CD7+bri	76	76	76	61	40	27	1,5	1,3	76	0	6	13	3	15
29	MF/IIA	2120	12	0	24	2	CD7+bri	68	68	67	64	44	20	2,2	0,6	66	2	3	23	20	NR
30	MF/IB	2800	0	0	3	2	-	80	80	79	77	40	37	1,1	1,2	29,5	51	1	11	11	6
31	MF/IA	2500	0	0	19	2	CD7+bri	65	64	63	59	35	28	1,3	1,2	62	3	2	12	9	19
32	MF/IA	2100	3	0	16	2	CD2+dim	71	71	71	67	52	17	3	1	56	15	5	23	14	8,5
34	MF/IIB	1600	0	0	7	2	CD5+dim CD7+bri	55	53	53	49	34	20	1,7	1,3	36	16	2	3	4	34
37	MF/IA	2000	0	0	40	2	CD5+ dim CD7+bri	66	66	57	55	37	24	1,5	0,7	61	6	3	12	10	13
40	MF/IB	2900	3	1	13	0	CD2+dim	86	73	79	85	78	17	4,6	3	0	85	8	28	1	7
41	MF/IIB	2700	0	0	9	0	-	69	69	69	64	46	22	2,1	2,6	54	15,5	2	13	10	15
42	MF/IB	2300	2	0	43	2	CD5+bri	81	80	75	75	27	54	0,5	0,7	34	11	1	7	3	12
43	MF/IA	2600	0	0	20	2	-	58	56	57	55	39	19	2,05	1,4	49	7	1	8	20	14
45	MF/IB	2500	0	0	13	0	CD5+dim	45	45	41	40	13	20	0,65	3,2	14	29	1	3	20	28
46	MF/IB	3800	0	0	17	0	CD5+dim	85	84	83	84	24	63	0,38	3,2	61	24	2	5	7	5
50	MF/IA	1600	2	0	18	0	CD5+bri	68	65	65	63	42	27	1,5	3	57	9,5	3	13	21	6
53	MF/IIB	2534	14	4	58	2	-	92	80	89,5	88,5	80	8	10	1	21	70	1	64	4	2
55	MF/IB	1000	8	1	29	0	-	72	70	70	66	34	37	0,9	2	50,5	21	11	9	13	5
57	MF/IIB	2400	0	0	5	2	-	70	70	68	69	35	33,5	1,04	1,5	29	42	0	6	8	12,5
58	MF/IB	2030	0	0	34	2	-	76	71	73	70	45	26	1,73	1,4	72	0	1	11	14	NR
59	MF/IIB	2600	3	0	40	2	-	76	75	76	67	41	29	1,41	1,9	5	70	5	22	13,5	9
61	MF/IB	2100	0	0	5	2	-	70	70	66	65	41	24	1,8	1	49	22	1	18	18	8
62	MF/IA	2300	0	0	20	2	CD5+bri CD7+bri	72	70	71	68	28,5	41	0,7	0,8	68	2	2	7	19	7
63	MF/IA	2900	2	1	21	0	-	68	66	65	61	58	11	5,2	3,5	48	19	10	21	21	9
64	MF/IB	1040	2	0	12	0	-	54	54	53	50	39	10	3,9	0,7	54	0	7	26	18	8
65	MF/IB	1400	0	0	19	0	CD5+dim	60	60	60	55	38	20	1,9	0,4	37	22	6,5	4	9	25

NOTA: Na primeira linha abaixo do cabeçalho encontram-se, entre parênteses, os valores de referência obtidos a partir do intervalo entre 5% e 95% da população do grupo controle; valores ressaltados na cor cinza correspondem a percentuais aumentados de células de Sézary e de linfócitos pleomórficos, ressaltados na cor vermelha correspondem à expansão de população; ressaltados na cor amarela correspondem à redução de população, ressaltados na cor azul correspondem à perda de expressão de marcador, ressaltados na cor rosa correspondem à aumento da expressão de CLA e CD25 e ressaltados na cor verde correspondem a aumento da relação CD4:CD8

Anexo H: Grupo com doença avançada: número absoluto, morfologia e imunofenótipo dos linfócitos do sangue periférico

N	EC	Li	%CS total	%CS gdes	%Li pleo	Pop Tam dif	Intensid fluor dif	%CD3+	%CD3+ CD2+	%CD3+ CD5+	%CD3+ TCRαβ+	%CD3+ CD4+	CD3+ CD8+	CD4:CD8	CD4+ CD8+	%CD3+ CD7+	%CD3+ CD7-	%CD3+ CLA+	%CD3+ CD25+	%CD19+	%NK
		(691-2722)	(0-7)	0	(0-24)			(60-86)	(55-81,5)	(57-81)	(51-78)	(31-60)	(11-38)	(0,4-3,6)	(0-2,4)	(42-76)	(3-32)	(0-7)	(3-25)	(2-19)	(1-22,5)
26	MF/IIIB	2200	5	2	28	0		81	79	78	75	83	19	3,3	1,1	50	29	29	43	3	12,5
33	MF/IIIB	2360	4	0	62	2	CD2+dim CD7+bri TCRαβ+dim	83	82	81	76	56	26,5	2,1	0,8	67	15	1	30	7	4
35	MF/IIIB	2200	3	0	64	2		88	87	86	88	77	11	7	0,7	45	45	3	19	4	NR
36	SS/IIIB	12369	95	74	3	3	CD7+bri	94	12	94	2	10	6	1,7	0,3	31	64	0	33	2	4
38	MF/IIIB	1400	0	0	38	2	CD5+dim CD7+bri	89	89	83	83	58	30	1,9	1,6	87	0,7	2	22	2	4
39	MF/IIIA	800	2	0	11	2		70	70	70	69	32	42	0,8	4	64	7	3	25	22	5
44	SS/IIIA	3385	26	4	58	2	CD7+bri	86	86	85	84	13	7	1,85	0,5	22	55	2	22	5	NR
47	MF/IIIA	1940	0	0	13	0	CD8+dim	67	67	67	66	49	22	2,2	8	45	22	0	33	16	11
48	MF/IVA	1320	0	0	22	2		69	67	67	66	50	17	2,9	0,9	65	4	15,5	18	2	19
49	SS/IVA	7400	44	9	28	2	CD2+dim CD7+bri	96	52	96	94	78	16	4,9	0,6	34,5	12	26	7	1,4	0,4
51	MF/IIIA	1700	0	0	11	0		55	52	54	55	33,5	21	1,6	1	37	15,5	7	23	31,5	6
52	MF/IVB	600	12	3	48	0	CD5+bri	32	32	28	27,5	16,5	16	1,03	2	15	10	0	6,5	4	53
54	MF/IIIA	9350	57	23	13	2	CD3+bri CD2+dim CD4+dim	96	93,5	91	95	94	2	47	0,6	94	1	1	15	1	1
56	MF/IVB	942	9	1	27	0	CD7+bri	56	58	49	53	34	19	1,8	0,9	52	2,5	2	17	5	29
60	MF/IVB	4600	12	10	68	2	CD2+dim	88	86	87,5	84	78	7,5	10,4	0,5	16	71	1	2	3	4

NOTA: Na primeira linha abaixo do cabeçalho encontram-se, entre parênteses, os valores de referência obtidos a partir do intervalo entre 5% e 95% da população do grupo controle; valores ressaltados na cor cinza correspondem a percentuais aumentados de células de Sézary e de linfócitos pleomórficos, ressaltados na cor vermelha correspondem à expansão de população; ressaltados na cor amarela correspondem à redução de população, ressaltados na cor azul correspondem à perda de expressão de marcador, ressaltados na cor rosa correspondem à aumento da expressão de CLA e CD25 e ressaltados na cor verde correspondem a aumento da relação CD4:CD8

Anexo I: Grupo controle: Análise do número absoluto, morfologia e imunofenótipo dos linfócitos do sangue periférico dos casos com mais de uma população linfocitária de tamanhos diferentes

N	Li	%Cs total	%Cs gdes	%Li pleo	Pop tam dif	Intensid fluor dif	%CD3+ CD2+	%CD3+ CD5+	%CD3+ TCR $\alpha\beta$ +	%CD3+ CD4+	%CD3+ CD8+	%CD3+ CD4:CD8	%CD3+ CD4+CD8+	%CD3+ CD7+	%CD3+ CD7-	%CD3+ CLA+	%CD3+ CD25+	%CD3+ CD19+	%NK	%LINFs	
20	2260	3	0	9	2	-	63	63	63	58	41	19,5	2,1	0	58	5	1	18,5	18	16	100
					peq	-	63	63	63	58	41	19,5	2,1	0	57,5	5	1	18	18	16	97
					gde	-	85	78	84	67	53	24	2,2	1,7	67	11	7	50	15	7	2
21	1350	0	0	13	2	-	75	75	74	72,5	56	15	3,7	0	70	5	3	19	7	14	100
					peq	CD2+	76	76	74	73	58	16	3,6	1	71	5	3	19	7	15	91
					gde	-	73	67	70	68	46	25	1,84	1	57	10	8,5	33	23	3	8
22	1720	0	0	5	2	CD7+bri CD5+bri	80,5	80	78,5	73	45,5	35	1,3	1,7	73	7	3	16,5	9	7,5	100
					peq	CD7+bri CD5+bri	79	80	79	73	46	34	1,35	1,6	73	7	2,5	16	8	7	92
					gde	CD7+bri CD5+bri	79	87	85	80	36	50	0,72	3,6	80,5	8	9	21,5	13,5	9	6,5
23	1590	0	0	7	2	CD5+dim	65	64	60	50	29	34	0,85	1,4	60	4	2	13	10	22	100
					peq	CD5+dim	62	65	62	51	30	34	0,9	0,7	62	4	1	13	7	22	91
					gde	CD5+dim	54	52	42	44	24	29,5	0,81	1,4	53	2	1	8	21	18	6
24	2500	0	0	5	2	-	65	65	63,5	62	47	17	2,8	1	61	4	3	25	19	11	100
					peq	-	64	65	64	62	48	17	2,8	1	62	3	3	25	19	11	95
					gde	-	80	80	80	79	53	23	2,3	1	63	16	8	38	20	8	3
25	2200	0	0	3	2	-	60	60	59	55	46	15	3,1	1,7	54,5	5,5	3	4	16	-	100
					peq	-	62	62	62	58	49	14	3,5	1,6	56	6	2	4	15	-	91
					gde	CD7+	41	40	45	53	15	25	0,6	3,4	33	8	3	4	36	-	7

NOTA: Na primeira linha abaixo do cabeçalho encontram-se, entre parênteses, os valores de referência obtidos a partir do intervalo entre 5% e 95% da população do grupo controle

Anexo J: Grupo com doença precoce (casos 29-42): Análise do número absoluto, morfologia e imunofenótipo dos linfócitos do sangue periférico dos casos com mais de uma população linfocitária de tamanhos diferentes número absoluto, morfologia e imunofenótipo dos linfócitos do sangue periférico

N	EC	Li	%CS total	%CS gdes	%Li pleo	Pop Tam dif	Intensid fluor dif	%CD3+ CD2+	%CD3+ CD5+	%CD3+ TCRαβ+	%CD3+ CD4+	%CD3+ CD8+	CD4:CD8	CD4+ CD8+	%CD3+ CD7+	%CD3+ CD7-	%CD3+ CLA+	%CD3+ CD25+	%CD19+	%NK	% LINFs	
		(691-2722)	(0-7)	0	(0-24)			(60-86)	(55-81,5)	(57-81)	(51-78)	(31-60)	(11-38)	(0,4-3,6)	(0-2,4)	(42-76)	(3-32)	(0-7)	(3-25)	(2-19)	(1-22,5)	
29	MF/IIA	2120	12	0	24	2	CD7+bri	68	68	67	64	44	20	2,2	0,6	66	2	3	23	20	-	100
						peq	CD2+CD7+bri	68	67	66	60	44	20	2,2	0,3	66	2	2	21	18	-	97
						gde	CD7+bri	88	80	88	85	58	15	3,9	3,4	60	25	11	62	0		3
30	MF/IB	2800	0	0	3	2		80	80	79	77	40	37	1,1	1,2	29,5	51	1	11	11	6	100
						Peq		80	81	79,5	79,5	41	39	1,05	1,1	54	28	3	7	10	6	96
						gde		45	40	41,5	33	31	15	2,1	1,7	18	23	12,5	23	51	2	3
31	MF/IA	2500	0	0	19	2	CD7+bri	65	64	63	59	35	28	1,3	1,2	62	3	2	12	9	19	100
						peq	CD7+bri	66	66	65	59	36	29	1,2	1,2	63	3	1	11	8	20	92
						gde	CD7+bri	70	70	68	68	34	30	1,1	1,2	69	4	7	32	27	3	4
32	MF/IA	2100	3	0	16	2	CD2+dim	71	71	71	67	52	17	3	1	56	15	5	23	14	8,5	100
						peq	CD2+dim	72	71,5	72	68	52	17	3	1	55	16	4	22	14	8	97
						gde	CD2+dim	61	46	53	55	49	11	4,45	2	26	20	22	32	22	5	2
34	MF/IIB	1600	0	0	7	2	CD5+dim CD7+bri	55	53	53	49	34	20	1,7	1,3	36	16	2	3	4	34	100
						peq	CD5+dim CD7+bri	55	54,5	54,5	50	35	20	1,75	1,3	39	15	2	4	3	35	88
							CD2+															
						gde	CD5+dim	77	77	70	68	41	33	1,24	0	60	20	12	5	14	11	6
							CD7+bri CD2+															
37	MF/IA	2000	0	0	40	2	CD5+ dim CD7+bri	66	66	57	55	37	24	1,5	0,7	61	6	3	12	10	13	100
						peq	CD5+ dim CD7+bri	67	68	60	58	40	24	1,7	0,6	65	4	3	13	6	14	84
						Gde	CD5+ dim CD7+bri	63	59	54	50	21	34	0,61	2,9	56	4	8	18	25	5	13
42	MF/IB	2300	2	0	43	2	CD5+bri	81	80	75	75	27	54	0,5	0,7	34	11	1	7	3	12	100
						Peq	CD5+bri	81	79,5	75	75	27	54	0,5	0,6	33	11	1	6,5	3	12,5	98
						Gde	CD5+bri	83	65	79	73	18,5	59	0,31	0	44	6	2	24,5	9	8	2,6

NOTA: Na primeira linha abaixo abaixo do cabeçalho encontram-se, entre parênteses, os valores de referência obtidos a partir do intervalo entre 5% e 95% da população do grupo controle

continua

Anexo J: Grupo com doença precoce (casos 43-62): Análise do número absoluto, morfologia e imunofenótipo dos linfócitos do sangue periférico dos casos com mais de uma população linfocitária de tamanhos diferentes número absoluto, morfologia e imunofenótipo dos linfócitos do sangue periférico

N	EC	Li	%CS total	%CS gdes	%Li pleo	Pop Tam dif	Intensid fluor dif	%CD3+ CD2+	%CD3+ CD5+	%CD3+ TCRαβ+	%CD3+ CD4+	%CD3+ CD8+	CD4:CD8	CD4+ CD8+	%CD3+ CD7+	%CD3+ CD7-	%CD3+ CLA+	%CD3+ CD25+	%CD19+	%NK	% LINFs	
		(691-2722)	(0-7,8)	0	(0-12)			(60-86)	(55-81,5)	(57-81)	(51-78)	(31-60)	(11-38)	(0,4-3,6)	(0-2,4)	(42-76)	(3-32)	(0-7)	(3-25)	(2-19)	(1-22,5)	
43	MF/IA	2600	0	0	20	2	-	58	56	57	55	39	19	2,05	1,4	49	7	1	8	20	14	100
						Peq	-	57	56	56	55	39	18	2,2	1,7	50	7	1	10	22	15	91
						Gde	-	80	75	80	75	48	34	1,4	-	62	14	5	28	14	6	8
53	MF/IIB	2534	14	4	58	2	-	92	80	89,5	88,5	80	8	10	1	21	70	1	64	4	2	100
						Peq	-	92	79,5	90	88	81	9	9	1	22	70	0,5	62	4	2	93
						Gde	-	73	65	73	84,5	63	4	15,75	1	3	66	2,5	63	31	29	7
57	MF/IIB	2400	0	0	5	2	-	70	70	68	69	35	33,5	1,04	1,5	29	42	0	6	8	12,5	100
						Peq	-	70	70	67	69	35	33	1,1	1,3	26	45	0	5	8	12,5	97
						Gde	-	60	49	59	60	14,5	39	0,37	0	23	28	1	4	13,5	13	3
58	MF/IB	2030	0	0	34	2	-	76	71	73	70	45	26	1,73	1,4	72	0	1	11	14	-	100
						Peq	-	74	73	74	71	46	27	1,7	1,2	73,5	0,4	1	10	13	-	95,5
						Gde	-	38	30	38	33	18	4	4,5	1	30	0	3	15,5	56	-	3
59	MF/IIB	2600	3	0	40	2	-	76	75	76	67	41	29	1,41	1,9	5	70	5	22	13,5	9	100
						Peq	-	77	77	75,5	65	42	29	1,45	1,5	2	76	4	20	13	7	98
						Gde	-	52	52	50	36,5	33	33	1	6	8	48	26	21	48	6	2
61	MF/IB	2100	0	0	5	2	-	70	70	66	65	41	24	1,8	1	49	22	1	18	18	8	100
						Peq	-	68	70	66	63	42	23	1,8	0,95	49	22	1	6	18	9	97
						Gde	-	91	91	86,5	72,5	24	56	0,4	0	58	33	1	31	4	2	2
62	MF/IA	2300	0	0	20	2	CD5+bri CD7+bri	72	70	71	68	28,5	41	0,7	0,8	68	2	2	7	19	7	100
						Peq	CD5+bri CD7+bri	73	71	72,5	69	31	40	0,8	0,7	70	2	1	7	19	7	87
						Gde	CD5+bri CD7+bri	77	76	75	73	15	57	0,3	0,7	75	2	4	11	21,5	3	11

NOTA: Na primeira linha abaixo do cabeçalho encontram-se, entre parênteses, os valores de referência obtidos a partir do intervalo entre 5% e 95% da população do grupo controle

Anexo L: Grupo com doença avançada (casos 33-49): Análise do número absoluto, morfologia e imunofenótipo dos linfócitos do sangue periférico dos casos com mais de uma população linfocitária de tamanhos diferentes número absoluto, morfologia e imunofenótipo dos linfócitos do sangue periférico

N	EC	Li	%CS total	%CS gdes	%Li pleo	Pop tam dif	Intensid fluor dif	%CD3+ (60-86)	%CD3+ (55-81,5)	%CD3+ (57-81)	%CD3+ (51-78)	%CD3+ (31-60)	CD3+ (11-38)	CD4+ (0,4-3,6)	CD4+ (0-2,4)	%CD3+ (42-76)	%CD3+ (3-32)	%CD3+ (0-7)	%CD3+ (3-25)	%CD3+ (2-19)	%NK (1-22,5)	% LINFs
33	MF/IIIB	2360	4	0	62	2	CD2+dim CD7+bri TCRAB+dim	83	82	81	76	56	26,5	2,1	0,8	67	15	1	30	7	4	100
						peq	CD2+dim CD7+bri TCRAB+dim	77	82	81	78	57	24	2,4	0,7	66	16,5	1	28,5	7	4	82
						gde	CD5+dim	93	92	92	89	54,5	40	1,36	1,2	59	33	1	41	5	2	16
35	MF/IIIB	2200	3	0	64	2	-	88	87	86	88	77	11	7	0,7	45	45	3	19	4	-	100
						peq	-	89	88	87	89	77	11	7	1,2	44	46	2	19	4	-	93
						gde	CD7+bri	90	82,5	80	87	80	15	5,3	8,5	40	45	7	36	10	-	5
36	SS/IIIB	12369	95	74	3	3	CD7+bri	94	12	94	2	10	6	1,7	0,3	31	64	0	33	2	4	100
						peq	CD7+bri	78	76	68	0,1	40	30	1,3	1,9	60	21	1	8,5	4		12
						gde	CD7+bri	99	9	99	1	6	2	3	0,3	33	66	0,2	35	0,4		64
						mai	CD7+bri	99	13	98	2	6	4	1,5	0,3	30	69	1	61	1		19
38	MF/IIIB	1400	0	0	38	2	CD5+dim CD7+bri	89	89	83	83	58	30	1,9	1,6	87	0,7	2	22	2	4	100
						peq	CD5+dim CD7+bri	91	89	85	84	58,5	31	1,9	1,6	89	0,3	1	20	1	4	89
						gde	CD5+dim CD7+bri	80	80	79,5	79,5	59	19	3,1	1,8	80	1,5	4	40	18	14	6
39	MF/IIIA	800	2	0	11	2	-	70	70	70	69	32	42	0,8	4	64	7	3	25	22	5	100
						peq	-	68	67	67	67	33	40	0,8	5	63	6	2,5	22	24	5	89
						gde	-	94	84	93	80	34	61	0,5	6	78	12,5	8	57	17	3	11
44	MF/IIIA	3385	26	4	58	2	CD7+bri	86	86	85	84	13	7	1,85	0,5	22	65	2	22	5	-	100
						peq	CD7+bri	88	88	87	86,5	12,5	7	1,78	0,6	17	71	1,5	23	4	-	93
						gde	CD7+bri	70	67	70	70	35	36	0,97	3,5	57	11	2	12,5	22	-	6
49	SS/IVA	7400	44	9	28	2	CD2+dim CD7+bri	96	52	96	94	78	16	4,9	0,6	84,5	12	26	7	1,4	0,4	100
						peq	CD2+dim CD7+bri	97	50	97	95,5	83	12	6,9	0,9	84	11	24	6	1,2	0,3	92
						gde	CD5+ CD7+bri	96	85	95	89	25	67	0,4	0,3	92	3	65,5	23	3	0	6

NOTA: Na primeira linha abaixo abaixo do cabeçalho encontram-se, entre parênteses, os valores de referência obtidos a partir do intervalo entre 5% e 95% da população do grupo controle

continua

Anexo L: Grupo com doença avançada (casos 54 e 60): Análise do número absoluto, morfologia e imunofenótipo dos linfócitos do sangue periférico dos casos com mais de uma população linfocitária de tamanhos diferentes número absoluto, morfologia e imunofenótipo dos linfócitos do sangue periférico

N	EC	Li	%CS total	%CS gdes	%Li pleo	Pop tam dif	Intensid	fluor dif	%CD3+	%CD3+ CD2+	%CD3+ CD5+	%CD3+ TCRαβ	%CD3+ CD4+	CD3+ CD8+	CD4:CD8	CD4+ CD8+	%CD3+ CD7+	%CD3+ CD7-	%CD3+ CLA+	%CD3+ CD25+	%CD19+	%NK	% LINFs			
54	MF/IIIA	9350	57	23	13	2	CD3+bri	CD2+dim	CD4+dim	96	93,5	91	95	94	2	47	0,6	94	1	1	15	1	1	100		
							CD5+bri	CD7+bri	TCRAB+bri																	
							CD25+bri																			
						peq	CD3+bri	CD2+dim	CD4+dim	96	93	91	95	94	2	47	0,4	94	1	0	16	1	2	95		
							CD5+bri	CD7+bri	TCRAB+bri																	
						gde	CD3+bri	CD5+bri	TCRAB+bri	91	83	91	90	78	1	78	1,6	78	6	0	17	8	2	2		
60	MF/IVB	4600	12	10	68	2	CD2+dim			88	86	87,5	84	78	7,5	10,4	0,5	16	71	1	2	3	4	100		
						peq	CD2+dim			89	88	89	87	79,5	8	9,93	0,2	16	74	1	2	3	3	88		
						gde	CD2+dim			85	70	85	71	73	4,5	16,2	4	5	64,5	3	6	4	21	7		

NOTA: Na primeira linha abaixo abaixo do cabeçalho encontram-se, entre parênteses, os valores de referência obtidos a partir do intervalo entre 5% e 95% da população do grupo controle

Anexo M – Grupo controle: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	SEXO	IDADE		ANT. PESSOAIS	LEUCÓCITOS	LINFÓCITOS
1	M	35	Doador	-	6100	1530
2	F	25	Doador	-	9100	2930
3	F	24	Doador	-	5100	1690
4	M	19	Doador	-	6300	1220
5	M	29	Doador	-	8500	1730
6	M	22	Doador	-	3900	740
7	M	25	Doador	-	6500	1430
8	M	50	Doador	-	5000	1730
9	F	40	Doador	-	4900	1410
10	M	36	Doador	-	8300	2180
11	F	48	Doador	-	5400	1270
12	F	30	Doador	-	6200	1800
13	F	45	Doador	-	5600	1410
14	M	30	Doador	-	7500	1880
15	F	41	Doador	-	5500	2090
16	M	36	Doador	-	3100	840
17	M	23	Doador	-	5300	1330
18	F	56	Doador	-	5300	1240
19	F	32	Doador	-	9900	2330
20	F	69	Pac Amb	ha	6580	2260
21	M	86	Pac Amb	-	6730	1350
22	F	60	Pac Amb	ha; dm	4980	1720
23	M	70	Pac Amb	ha; dm	6070	1590
24	F	56	Pac Amb	ha; vv	6390	2500
25	F	56	Funcionária	-	6750	2200
66	F	62	Funcionária	ha	7480	1970

F: feminino, M: masculino, Pac Amb: paciente ambulatorial, ha: hipertensão arterial, dm: diabetes melito, vv: vitiligo vulvar

continua

continuação

Anexo M – Grupo controle: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LINF	% CS PEQ	ABS	% CS GRAN	ABS	% CS P+G	ABS	% LI PLEO	ABS	%LI NORM	ABS
1	1530	2	30,6	0	0	2	30,6	12	183,6	84	1285,2
2	2930	0	0	0	0	0	0	9	263,7	91	2666,3
3	1690	0	0	0	0	0	0	5	84,5	95	1605,5
4	1220	0	0	0	0	0	0	10	122	90	1098
5	1730	3	51,9	0	0	3	51,9	14	242,2	83	1435,9
6	740	0	0	0	0	0	0	10	74	90	666
7	1430	0	0	0	0	0	0	14	200,2	86	1229,8
8	1730	0	0	0	0	0	0	3	51,9	97	1678,1
9	1410	0	0	0	0	0	0	10	141	90	1269
10	2180	0	0	0	0	0	0	4	87,2	96	2092,8
11	1270	0	0	0	0	0	0	7	88,9	93	1181,1
12	1800	1	18	0	0	1	18	8	144	91	1638
13	1410	1	14,1	0	0	1	14,1	8	112,8	91	1283,1
14	1880	2	37,6	0	0	2	37,6	6	112,8	92	1729,6
15	2090	7	146,3	0	0	7	146,3	13	271,7	80	1672
16	840	2	16,8	0	0	2	16,8	10	84	88	739,2
17	1330	5	66,5	0	0	5	66,5	24	496,6	71	944,3
18	1240	2	24,8	0	0	2	24,8	11	136,4	87	1078,8
19	2330	2	46,6	0	0	2	46,6	12	279,6	86	2003,8
20	2260	3	67,8	0	0	3	67,8	9	203,4	88	1988,8
21	1350	0	0	0	0	0	0	13	175,5	84	1134
22	1720	0	0	0	0	0	0	5	86	95	1634
23	1590	0	0	0	0	0	0	7	111,3	93	1478,7
24	2500	0	0	0	0	0	0	5	125	95	2375
25	2200	0	0	0	0	0	0	3	66	97	2134
66	1970	0	0	0	0	0	0	10	197	90	1773

LINF: linfócitos, CS: células de Sézary, P e PEQ: pequenas, G e GRAN: grandes, LI PLEO: linfócitos pleomórficos; LI NOR: linfócitos normais, ABS: valores absolutos

continua

continuação

Anexo M – Grupo controle: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LINF	%CD3 ⁺	ABS	%CD19 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	ABS
1	1530	76	1162,8	10	153	12	183,6
2	2930	78	2285,4	17	498,1	4	117,2
3	1690	79	1335,1	11	185,9	5	84,5
4	1220	76,5	933	6	73,2	12	146,4
5	1730	73	1262,9	12	207,6	12	207,6
6	740	61	451,4	13	96,2	10	74
7	1430	72,5	1036,7	8	114,4	14	200,2
8	1730	75	1297,5	10	173	7	121,1
9	1410	73,5	1036,3	9	126,9	10,5	148
10	2180	79,5	1733,1	12	261,6	5	109
11	1270	70	889	13	165,1	8	101,6
12	1800	78	1404	13	234	4	72
13	1410	67	944,7	10	141	21,5	303,1
14	1880	73	1372,4	7	131,6	16	300,8
15	2090	74	1546,6	15	313,5	7	146,3
16	840	70	588	4	33,6	12	100,8
17	1330	73	970,9	6	79,8	17	226,1
18	1240	88	1091,2	3,5	43,4	7	86,8
19	2330	75	1747,5	4	93,2	18	419,4
20	2260	69	1559,4	14	316,4	13	293,8
21	1350	75	1012,5	7	94,5	14	189
22	1720	80,5	1384,6	9	154,8	7,5	129
23	1590	65	1033,5	10	159	22	349,8
24	2500	65	1625	19	475	11	275
25	2200	60	1320	16	352	nr	nr
66	1970	73	1438	6	118	20	394

LINF: linfócitos, ABS: valores absolutos

continua

Anexo M – Grupo controle: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LINF	%CD3 ⁺ CD2 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD5 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD7 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD7 ⁻	ABS	%CD3 ⁺ TCRαβ ⁺	ABS	%CD3 ⁺ TCRγδ ⁺	ABS
1	1530	72	1101,6	72	1101,06	68	1040,4	7	107,1	70	1071	6	91,8
2	2930	75	2197,5	74	2168,2	67	1963,1	9	263,7	66	1933,8	2	58,6
3	1690	74	1250,6	72	1216,8	71	1199,9	3	50,7	70	1183	3	50,7
4	1220	69	841,8	73	890,6	65,5	799,1	7	85,4	70	854	3	36,6
5	1730	63	1089,9	69	1193,7	41	709,3	18,5	320,0	61	1055,3	1,5	25,9
6	740	54	399,6	61	451,4	52	384,8	4,5	33,3	54	399,6	1	7,4
7	1430	66	943,8	69,5	993,8	56	800,8	13	185,9	62	886,6	3	42,9
8	1730	62	1072,6	61	1055,3	49,5	856,3	13	224,9	65	1124,5	2	34,6
9	1410	68	958,8	71	1001,1	61	860,1	8	112,8	62	874,2	2	28,2
10	2180	70	1526	75	1635	66	1438,8	5	109	70	1526	3	65,4
11	1270	62	787,4	63	800,1	54	685,8	8	101,6	66	838,2	1	12,7
12	1800	72	1296	75	1350	52	936	17	306,0	73	1314	1	18
13	1410	60,5	853	62	874,2	52,5	740,2	9	126,9	56	789,6	1	14,1
14	1880	73	1372,4	71	1334,8	63	1184,4	9	169,2	64,5	1212,6	1	18,8
15	2090	70	1463	70	1463	61,5	1285,5	4	83,6	61	1274,9	2	41,8
16	840	66	554,4	41	344,4	60,5	508,2	6	50,4	67	562,8	2,5	21
17	1330	69	917,7	73	970,9	52	691,6	27,5	365,7	67	891,1	3	39,9
18	1240	85	1054	88	1091,2	56	694,4	32	396,8	79	979,6	8	99,2
19	2330	65	1514,5	75	1747,5	40	932	27	629,1	68,5	1596	4,5	104,8
20	2260	67	1514,2	67	1514,2	64	1446,4	5	113,0	66	1491,6	2	45,2
21	1350	75	1012,5	74	999	70	945	5	67,5	72,5	978,7	1	13,5
22	1720	80	1376	78,5	1350,2	73	1255,6	7	120,4	73	1255,6	5	86
23	1590	64	1017,6	60	954	60	954	4	63,6	60	654	15	238,5
24	2500	65	1625	63,5	1587,5	61	1525	4	100,0	62	1550	1	25
25	2200	60	1320	59	1298	54,5	1199	5,5	121,0	55	1210	3	66
66	1970	69	1359	66	1300	64	1260	9	177,0	61	1202	8	157,6

LINF: linfócitos, ABS: valores absolutos

continua

Anexo M – Grupo controle: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LINF	%CD3 ⁺ CD4 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD8 ⁺	ABS	CD4:CD8	CD4 ⁺ CD8 ⁺	ABS
1	1530	40	612	28	428,4	1,4	0,85	13
2	2930	50	1465	26	761,8	1,9	0,9	26,6
3	1690	36	608,4	38	642,2	0,9	1,04	17,6
4	1220	43	524,6	30	366	1,4	1,3	15,7
5	1730	39	674,7	33	570,9	1,2	1,02	17,6
6	740	41	303,4	18	133,2	2,3	0,6	4,4
7	1430	38	543,4	32,5	464,7	1,2	1,5	21,4
8	1730	52	899,6	22,5	389,2	2,3	1,7	29,4
9	1410	45	634,5	28,5	401,8	1,6	2,75	38,8
10	2180	49	1068,2	29	632,2	1,7	1,3	28,3
11	1270	49	622,3	21	266,7	2,3	2,47	31,4
12	1800	57	1026	19	342	3	0,75	13,5
13	1410	42	592,2	25	352,5	1,7	1,6	22,6
14	1880	46	864,8	26	488,8	1,8	0,7	13,2
15	2090	42	877,8	29	606,1	1,4	0,9	18,8
16	840	50	420	16	134,4	3,1	1,6	13,4
17	1330	40	532	27	359,1	1,5	1,4	18,6
18	1240	63	781,2	18	223,2	3,5	1,3	16,2
19	2330	50	1165	20	466	2,5	1,2	28
20	2260	50	1130	17	384,2	2,9	0	0
21	1350	56	756	15	205,5	3,7	0	0
22	1720	45,5	782,6	35	602	1,3	1,7	29,2
23	1590	29	461,1	34	540,6	0,85	1,4	22,3
24	2500	47	1175	17	425	2,8	1	25
25	2200	46	1012	15	330	3,1	1,7	37,4
66	1970	46,5	916	17,5	345	2,6	0,9	17,7

LINF: linfócitos, ABS: valores absolutos, CD4:CD8: relação CD4CD8

continua

Anexo M – Grupo controle: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LINF	%CD3 ⁺ CLA ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD25 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD69 ⁺	ABS
1	1530	4,0	61,2	11,5	175,9	2	30,6
2	2930	1,5	43,9	9,5	278,3	0	0
3	1690	4,5	76	5	84,5	2	33,8
4	1220	3,0	36,6	12	146,4	2	24,4
5	1730	4,0	69,2	4	69,2	2	34,6
6	740	6,0	44,4	13,5	99,9	2	14,8
7	1430	3,0	42,9	3,5	50	3	42,9
8	1730	6,0	103,8	7	121,1	0	0
9	1410	4,0	56,4	14	197,4	0	0
10	2180	2,0	43,6	5	109	3	65,4
11	1270	7,0	88,9	10	127	2	25,4
12	1800	1,0	18	4	72	1	18
13	1410	4,0	56,4	13	183,3	3	42,3
14	1880	6,0	112,8	12	225,6	2	37,6
15	2090	2,0	41,8	6	125,4	4	83,6
16	840	6,0	50,4	5	42	3	25,2
17	1330	2,0	26,6	4	53,2	1,5	19,9
18	1240	3,0	37,2	5	62	1	12,4
19	2330	3,5	81,5	3	69,9	1	23,3
20	2260	15,5	350,3	18	406,8	2	45,2
21	1350	3,0	40,5	19	256,5	2	27
22	1720	3,0	51,6	16,5	283,8	1	17,2
23	1590	2,0	31,8	13	206,7	10	159
24	2500	3,0	75	25	625	0,5	12,5
25	2200	3,0	66	4	88	1	22
66	1970	1,0	20	14,4	284	1	19,7

LINF: linfócitos, ABS: valores absolutos

continua

Anexo M – Grupo controle: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	NÚMERO DE POPULAÇÕES EM RELAÇÃO AO TAMANHO CELULAR	SUBPOPULAÇÕES COM DIFERENTES INTENSIDADES DE FLUORESCÊNCIA		
		CD2 ⁺	CD5 ⁺	CD7 ⁺
1	1	-	-	-
2	1	-	-	-
3	1	-	-	-
4	1	-	-	-
5	1	-	-	-
6	1	-	-	-
7	1	-	-	-
8	1	-	-	-
9	1	-	-	-
10	1	-	-	-
11	1	-	-	-
12	1	-	-	-
13	1	-	-	-
14	1	-	-	-
15	1	-	-	-
16	1	-	-	-
17	1	-	-	-
18	1	SIM	-	-
19	1	SIM	-	-
20	2	-	-	-
21	2	SIM	-	-
22	2	-	SIM	SIM
23	2	-	SIM	-
24	2	-	-	-
25	2	-	-	SIM
66	1	-	-	-

Anexo N – Grupo com doença fase precoce: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	S	I	DIAGNÓSTICO	T	N	M	B	EC	HTLV
27	M	27	MF placa > 10%	2	0	0	0	IB	NEG.
28	F	72	MF patch / placa >10%	2	0	0	0	IB	NEG.
29	F	44	MF placa > 10%	2	1	0	0	IIA	NEG.
30	F	32	MF patch > 10%	2	0	0	0	IB	NEG.
31	F	19	MF placa < 10%	1	0	0	0	IA	NEG.
32	F	25	MF patch < 10%	1	0	0	0	IA	NEG.
34	M	65	MF tumor (unilesional)	3	0	0	0	IIB	NEG.
37	M	42	MF patch < 10%	1	0	0	0	IA	NEG.
40	M	89	MF placa > 10%	2	0	0	0	IB	NEG.
41	M	41	MF placa / tumor	3	0	0	0	IIB	NEG.
42	M	84	MF placa > 10%	2	0	0	0	IB	NEG.
43	F	51	MF placa < 10%	1	0	0	0	IA	NEG.
45	M	35	MF placa > 10%	2	0	0	0	IB	NEG.
46	F	64	MF poiquilod loc > 10%	2	0	0	0	IB	NEG.
50	F	36	MF patch < 10%	1	0	0	0	IA	NEG.
53	F	71	MF placa / tumor	3	0	0	2	IIB	NEG.
55	M	38	MF poiquilod loc > 10%	2	0	0	0	IB	NEG.
57	M	69	MF placa / tumor	3	0	0	0	IIB	NEG.
58	M	20	MF patch > 10%	2	0	0	0	IB	NEG.
59	M	45	MF placa / tumor	3	0	0	0	IIB	NEG.
61	F	60	MF placa > 10%	2	0	0	0	IB	NEG.
62	F	48	MF poiquilod loc < 10%	1	0	0	0	IA	NEG.
63	F	59	MF poiquilod loc < 10%	1	0	0	0	IA	NEG.
64	F	52	MF placa > 10%	2	0	0	0	IB	NEG.
65	M	36	MF placa > 10%	2	0	0	0	IB	NEG.

S: sexo, M: masculino, F: feminino, C: cor, PA: parda, BR: branca, NE: negra, AM: amarela, I: idade, TEV(M): tempo de evolução medido em meses, SS: Síndrome de Sézary, MF: Micose Fungóide, poiquilod loc = poiquilodérmica localizada, poiquilod gen = poiquilodérmica generalizada, EC: estágio clínico, NEG: negativo

continua

Anexo N – Grupo com doença fase precoce: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LEU	LI
27	7500	2100
28	7500	2600
29	6940	2120
30	6380	2800
31	8110	2500
32	6000	2100
34	7900	1600
37	8230	2000
40	7120	2900
41	10600	2700
42	9820	2300
43	6580	2600
45	7460	2500
46	7500	3800
50	5700	1600
53	6850	2534
55	5500	1000
57	8130	2400
58	6040	2030
59	7450	2600
61	5450	2100
62	7070	2300
63	8100	2900
64	2630	1040
65	4700	1400

LEU: leucócitos, LI = linfócitos, Eo = eosinófilos (expressos em valores absolutos)

continua

Anexo N – Grupo com doença fase precoce: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LINF	%CS PEQ	ABS	%CS GRAN	ABS	%CS P+G	ABS	%LI PLEO	ABS	%LI NORM	ABS
27	2100	0	0	1	21	1	21	18	378	81	1701
28	2600	0	0	0	0	0	0	14	364	86	2236
29	2120	12	254,4	0	0	12	254,4	24	508,8	64	1356,8
30	2800	0	0	0	0	0	0	3	84	97	2716
31	2500	0	0	0	0	0	0	19	475	81	2025
32	2100	3	63	0	0	3	63	16	336	81	1701
34	1600	0	0	0	0	0	0	7	112	93	1488
37	2000	0	0	0	0	0	0	40	800	60	1200
40	2900	2	58	1	29	3	87	13	377	84	2436
41	2700	0	0	0	0	0	0	9	243	91	2457
42	2300	2	46	0	0	2	46	43	989	55	1265
43	2600	0	0	0	0	0	0	20	520	80	2080
45	2500	0	0	0	0	0	0	13	325	87	2175
46	3800	0	0	0	0	0	0	17	646	83	3154
50	1600	2	32	0	0	2	32	18	288	80	1280
53	2534	10	253,4	4	101,4	14	354,8	58	1469,7	28	709,5
55	1000	7	70	1	10	8	80	29	290	63	630
57	2400	0	0	0	0	0	0	5	120	95	2280
58	2030	0	0	0	0	0	0	34	690,2	66	1177,4
59	2600	3	78	0	0	3	78	40	1040	57	1482
61	2100	0	0	0	0	0	0	5	105	95	1995
62	2300	0	0	0	0	0	0	20	460	80	1840
63	2900	1	29	1	29	2	58	21	609	77	2233
64	1040	2	208	0	0	2	208	12	124,8	86	124,8
65	1400	0	0	0	0	0	0	19	266	81	1134

LINF: linfócitos, CS: células de Sézary, P e PEQ: pequenas, G e GRAN: grandes, LI PLEO: linfócitos pleomórficos;
LI NOR: linfócitos normais, ABS: valores absolutos

continua

Anexo N – Grupo com doença fase precoce: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LINF	%CD3 ⁺	ABS	%CD19 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	ABS
27	2100	72	1512	12	252	12	252
28	2600	76	1976	3	780	15	390
29	2120	68	1441,6	20	424	nr	nr
30	2800	80	2240	11	308	6	168
31	2500	65	1625	9	225	19	475
32	2100	71	1491	14	294	8,5	178,5
34	1600	55	880	4	64	34	544
37	2000	66	1320	10	200	13	260
40	2900	86	2494	1	29	7	203
41	2700	69	1863	10	270	15	405
42	2300	81	1863	3	69	12	276
43	2600	58	1508	20	520	14	364
45	2500	45	1125	20	500	28	700
46	3800	85	3230	7	266	5	190
50	1600	68	1088	21	336	6	96
53	2534	91	2305,9	4	101,4	2	50,7
55	1000	72	720	13	130	5	50
57	2400	70	1680	8	192	13	312
58	2030	76	1542,8	14	284,2	nr	nr
59	2600	75	1950	13	338	7	182
61	2100	68	1428	18	378	9	189
62	2300	72	1656	4	92	7	161
63	2900	68	1972	21	609	9	261
64	1040	54	561,6	18	187,2	8	83,2
65	1400	60	840	9	126	25	350

LINF: linfócitos, cy: pesquisa intracitoplasmática, nr: não realizado

continua

Anexo N – Grupo com doença fase precoce: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LINF	%CD3 ⁺ CD2 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD5 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD7 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD7 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ TCRαβ ⁺	ABS	%CD3 ⁺ TCRγδ ⁺	ABS
27	2100	72	1512	61	1281	46	966	26	546	62	1302	2	42
28	2600	76	1976	76	1976	76	1976	0	0	61	1586	8	208
29	2120	68	1441,6	67	1420,4	66	1399,2	2	42,4	61	1293,2	3	63,6
30	2800	80	2240	79	2212	29,5	826	51	1428	77	2156	3	84
31	2500	64	1600	63	1575	62	1550	3	75	59	1475	4	100
32	2100	71	1491	71	1491	56	1176	15	315	67	1407	5	105
34	1600	53	848	53	848	36	576	16	256	49	784	2	32
37	2000	66	1320	57	1140	61	1220	6	120	55	1100	9	180
40	2900	73	2117	79	2291	0	0	85	2465	85	2465	1	29
41	2700	69	1863	69	1863	54	1458	15,5	418,5	64	1728	3	81
42	2300	80	1840	75	1725	35,5	816,5	11	253	75	1725	5,5	126,5
43	2600	56	1456	57	1482	49	1274	7	182	55	1430	2	52
45	2500	45	1125	41	1025	14	350	29	725	40	1000	1	25
46	3800	84	3192	83	3154	61	2318	24	912	84	3192	1	38
50	1600	65	1040	65	1040	57	912	9,5	152	63	1008	1	16
53	2534	81	2052,5	89	2255,3	22	557,5	70	1773,8	88	2229,9	2	50,7
55	1000	70	700	70	700	50,5	505	21	210	66	660	3	30
57	2400	70	1680	68	1632	29	696	42	1008	69	1656	3	72
58	2030	71	1441,3	73	1481,9	72	1461,6	0	0	70	1421	5	101,5
59	2600	77	2002	77	2002	1	26	70	1820	66	1716	3	78
61	2100	70	1470	66	1386	49	1029	22	462	63	1323	5	105
62	2300	70	1610	71	1633	68	1564	2	46	68	1564	4	92
63	2900	66	1914	65	1885	48	1392	19	551	61	1769	3	87
64	1040	54	561,6	53	551,2	54	561,6	0	0	50	520	2	20,8
65	1400	60	840	60	840	37	518	22	308	55	770	3	42

LINF: linfócitos, ABS: valores absolutos

continua

Anexo N – Grupo com doença fase precoce: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LINF	%CD3 ⁺ CD4 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD8 ⁺	ABS	CD4:CD8	CD4 ⁺ CD8 ⁺	ABS
27	2100	32	672	38,5	808,5	0,8	4	84
28	2600	40	1040	27	702	1,5	1,3	33,8
29	2120	44	932,8	20	424	2,2	0,6	12,7
30	2800	40	1120	37	1036	1,1	1,2	33,6
31	2500	35	875	28	700	1,3	1,2	30
32	2100	52	1092	17	357	3	3	63
34	1600	34	544	20	320	1,7	1,7	27,2
37	2000	37	740	24	480	1,5	1,5	30
40	2900	78	2262	17	493	4,6	3	87
41	2700	46	1242	22	594	2,1	2,6	70,2
42	2300	27	621	54	1242	0,5	0,7	16,1
43	2600	39	1014	19	494	2,05	1,4	36,4
45	2500	13	325	20	500	0,65	3,2	80
46	3800	24	912	63	2394	0,38	3,2	121,6
50	1600	42	672	27	432	1,5	3	48
53	2534	80	2027	9	2280,6	8,9	1	25,3
55	1000	34	340	37	370	0,9	2	20
57	2400	35	840	33,5	804	1,04	1,5	36
58	2030	45	913,5	26	527,8	1,73	1,4	28,4
59	2600	41	1066	29	754	1,41	1,9	49,4
61	2100	42	882	23	483	1,8	1	21
62	2300	28,5	655,5	41	902	0,7	0,8	18,4
63	2900	58	1682	11	319	5,2	3,5	101,5
64	1040	39	405,6	10	104	3,9	0,7	7,3
65	1400	38	532	20	280	1,9	0,4	5,6

LINF: linfócitos, ABS: valores absolutos

continua

Anexo N – Grupo com doença fase precoce: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LINF	%CD3 ⁺ CLA ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD25 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD69 ⁺	ABS
27	2100	1,5	31,5	4	84	0	0
28	2600	6	156	13	338	8	208
29	2120	2	42,4	13	275,6	1	21,2
30	2800	1	28	11	308	0	0
31	2500	2	50	12	300	2	50
32	2100	5	105	23	483	2	42
34	1600	2	32	3	48	1	16
37	2000	3	60	12	240	3,5	70
40	2900	8	232	28	812	0	0
41	2700	2	54	13	351	2	54
42	2300	1	23	7	161	4	92
43	2600	1	26	8	208	1	26
45	2500	1	25	3	75	1	25
46	3800	2	76	5	190	0	0
50	1600	3	48	13	208	0	0
53	2534	1	25,3	64	1621,8	1	25,3
55	1000	11	110	9	90	1	11
57	2400	0	0	6	144	1	24
58	2030	1	20,3	11	223,3	4	81,2
59	2600	5	130	24	624	1	26
61	2100	1	21	18	378	0	0
62	2300	2	46	7	161	1	23
63	2900	10	290	21	609	1	29
64	1040	7	72,8	26	270,4	2	20,8
65	1400	6,5	91	4	56	1	14

LINF: linfócitos, ABS: valores absolutos

continua

Anexo N – Grupo com doença fase precoce: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	NÚMERO DE POPULAÇÕES EM RELAÇÃO AO TAMANHO CELULAR	SUBPOPULAÇÕES COM DIFERENTES INTENSIDADES DE FLUORESCÊNCIA						
		CD2 ⁺	CD5 ⁺	CD7 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	TCRαβ ⁺	CD25 ⁺
27	1	-	SIM	-	-	-	-	-
28	1	-	-	SIM	-	-	-	-
29	2	-	-	SIM	-	-	-	-
30	2	-	-	-	-	-	-	-
31	2	-	-	SIM	-	-	-	-
32	2	SIM	-	-	-	-	-	-
34	2	-	SIM	SIM	-	-	-	-
37	2	-	SIM	SIM	-	-	-	-
40	1	SIM	-	-	-	-	-	-
41	1	-	-	-	-	-	-	-
42	1	-	SIM	-	-	-	-	-
43	2	-	-	-	-	-	-	-
45	1	-	SIM	-	-	-	-	-
46	1	-	SIM	-	-	-	-	-
50	1	-	SIM	-	-	-	-	-
53	2	-	-	-	-	-	-	-
55	1	-	-	-	-	-	-	-
57	1	-	-	-	-	-	-	-
58	2	-	-	-	-	-	-	-
59	1	-	-	-	-	-	-	-
61	2	-	-	-	-	-	-	-
62	2	-	SIM	SIM	-	-	-	-
63	1	-	-	-	-	-	-	-
64	1	-	-	-	-	-	-	-
65	1	-	SIM	-	-	-	-	-

Anexo O – Grupo com doença fase avançada: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	S	I	DIAGNÓSTICO	T	N	M	B	EC	HTLV
26	M	60	MF eritrodérmica	4	1	0	0	IIIB	NEG.
33	M	83	MF eritrodérmica	4	1	0	0	IIIB	NEG.
35	M	67	MF eritrodérmica	4	1	0	0	IIIB	NEG.
36	F	85	SS	4	1	0	2	IIIB	NEG.
38	M	54	MF eritrodérmica	4	1	0	0	IIIB	NEG.
39	M	63	MF eritrodérmica	4	0	0	0	IIIA	NEG.
44	F	73	SS	4	0	0	2	IIIA	NEG.
47	F	50	MF poiquilod gen > 10%	4	0	0	0	IIIA	NEG.
48	F	49	MF placa / tumor	3	3	0	0	IVA	NEG.
49	F	43	SS	4	3	0	2	IVA	NEG.
51	F	48	MF poiquilod gen > 10%	4	0	0	0	IIIA	NEG.
52	F	51	MF placa / tumor	3	3	1	0	IVB	NEG.
54	F	28	MF eritrodérmica (mf)	4	0	0	2	IIIA	NEG.
56	M	69	MF placa / tumor	3	1	1	0	IVB	NEG.
60	F	79	MF placa / tumor > 10%	3	0	1	2	IVB	NEG.

S: sexo, M: masculino, F: feminino, C: cor, PA: parda, BR: branca, NE: negra, AM: amarela, I: idade, TEV(M): tempo de evolução medido em meses, SS: Síndrome de Sézary, MF: Micose Fungóide, poiquilod loc = poiquilodérmica localizada, poiquilod gen = poiquilodérmica generalizada, EC: estágio clínico, NEG: negativo

continua

continuação

Anexo O – Grupo com doença fase avançada: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LEUCÓCITOS	LINFÓCITOS
26	13900	2200
33	7130	2360
35	8670	2200
36	19030	12369
38	5040	1400
39	4710	800
44	8910	3385
47	5880	1940
48	6270	1320
49	22400	7400
51	7200	1700
52	8150	600
54	24420	9350
56	7250	942
60	14470	4600

continua

Anexo O – Grupo com doença fase avançada: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LINF	%CS PEQ	ABS	%CS GRAN	ABS	%CS P+G	ABS	%LI PLEO	ABS	%LI NORM	ABS
26	2200	3	66	2	44	5	110	28	616	67	1474
33	2360	4	94,4	0	0	4	94,4	62	1463,2	34	802,4
35	2200	3	66	0	0	3	66	64	1408	33	726
36	12369	21	2597,5	74	9153,1	95	11750,5	3	371,1	2	247,4
38	1400	0	0	0	0	0	0	38	532	62	868
39	800	2	16	0	0	2	16	11	88	87	696
44	3385	22	744,7	4	135,4	26	880,1	58	1963,3	16	541,6
47	1940	0	0	0	0	0	0	13	252,2	87	1687,8
48	1320	0	0	0	0	0	0	22	290,4	78	1029,6
49	7400	35	2590	9	666	44	3256	28	2072	28	2072
51	1700	0	0	0	0	0	0	11	187	89	1513
52	600	9	54	3	18	12	72	48	288	40	240
54	9350	34	3179	23	2150,5	57	5329,5	13	1215,5	30	2805
56	942	8	75,4	1	9,42	9	84,8	27	254,3	64	602,9
60	4600	2	8	10	460	12	552	68	3128	20	920

LINF: linfócitos, ABS: valores absolutos

continua

continuação

Anexo O – Grupo com doença fase avançada: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LINF	%CD3 ⁺	ABS	%CD19 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	ABS
26	2200	81	1782	22	484	5	110
33	2360	83	1958,8	5	118	4	94,4
35	2200	88	1936	16	352	11	242
36	12369	94	11626,9	31,5	3896,2	6	742,1
38	1400	89	1246	1	14	2	28
39	800	70	560	3	24	12,5	100
44	3385	86	2911	7	236,9	4	135,4
47	1940	68	1319,2	4	77,6	11	213,4
48	1320	69	910,8	2	26,4	19	250,8
49	7400	96	7104	2	148	4	296
51	1700	55	935	14	238	13	221
52	600	37	222	1,4	8,4	0,4	2,4
54	9350	96	8976	3	280,5	53	4955,5
56	942	56	527,5	5	47,1	29	273,2
60	4600	88	4048	3	138	4	184

LINF: linfócitos, ABS: valores absolutos

continua

continuação

Anexo O – Grupo com doença fase avançada: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LINF	% CD3 ⁺ CD2 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD5 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD7 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD7 ⁺	ABS
26	2200	79	1738	78	1716	50	1100	29	638
33	2360	82	1935	81	1911,6	67	1581,2	15	354
35	2200	87	1914	86	1892	45	990	45	990
36	12369	12	1484,3	94	11626,9	31	3834,4	64	7916,2
38	1400	89	1246	83	1162	87	1218	0,7	9,8
39	800	70	560	70	560	64	512	7	56
44	3385	86	2911,1	85	2877,2	22	744,7	65	2200,2
47	1940	68	1319,2	68	1319,2	45	873	22	426,8
48	1320	67	884,4	67	884,4	65	858	0	0
49	7400	52	3848	96	7104	84,5	6253	12	888
51	1700	52	884	54	918	37	629	15,5	263,5
52	600	33	198	31	186	17	102	10	60
54	9350	93	8695,5	91	8508,5	94	8789	1	93,5
56	942	53	499,3	49	461,6	52	489,8	2,5	235,5
60	4600	86	3956	88	4048	16	736	71	3266

LINF: linfócitos, ABS: valores absolutos, cy:pesquisa intracitoplasmática

continua

continuação

Anexo O – Grupo com doença fase avançada: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LINF	% CD3 ⁺ TCR αβ ⁺	ABS	% CD3 ⁺ TCR αβ ⁺ cy	ABS	% CD3 ⁺ TCR γδ ⁺	ABS	% CD3 ⁺ TCR γδ ⁺ cy	ABS
26	2200	75	1650	nr	-	2	44	nr	-
33	2360	76	1793,6	nr	-	4	94,4	nr	-
35	2200	88	1936	nr	-	0	0	nr	-
36	12369	2	247,4	88	10884,7	0	0	0	0
38	1400	83	1162	nr	-	5	70	nr	-
39	800	69	552	nr	-	2	16	nr	-
44	3385	84	2843,4	nr	-	1	33,8	nr	-
47	1940	68	1319,2	nr	-	1	19,4	nr	-
48	1320	66	871,2	nr	-	2	26,4	nr	-
49	7400	94	6956	nr	-	2	148	nr	-
51	1700	55	935	nr	-	1	17	nr	-
52	600	29	174	nr	-	2	12	nr	-
54	9350	95	8882,5	nr	-	1	93,5	nr	-
56	942	53	499,3	nr	-	3	28,3	nr	-
60	4600	84	3864	nr	-	2	92	nr	-

LINF: linfócitos, ABS: valores absolutos, nr: não realizado

continua

continuação

Anexo O – Grupo com doença fase avançada: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LINF	%CD3 ⁺ CD4 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD8 ⁺	ABS	CD4:CD8	%CD4 ⁺ CD8 ⁺	ABS
26	2200	63	1386	19	418	3,3	1,1	24,2
33	2360	56	1321,6	26,5	49,6	2,1	0,8	18,8
35	2200	77	1694	11	242	7	0,7	15,4
36	12369	10	1236,9	6	742,1	1,7	0,3	37,1
38	1400	58	812	30	420	1,9	1,6	22,4
39	800	32	256	42	336	0,8	4	32
44	3385	13	440	7	236,9	1,85	0,5	16,9
47	1940	51	989,4	23	446,2	2,31	6	116,4
48	1320	50	660	17	224,4	2,9	0,9	11,9
49	7400	78	5772	16	1184	4,9	0,6	44,4
51	1700	33,5	569,5	21	357	1,6	1	17
52	600	20	120	17	102	1,18	2	12
54	9350	94	8789	2	187	47	0,6	56,1
56	942	34	320,3	19	179	1,8	0,9	8,5
60	4600	78	3588	7,5	345	10,4	0,5	23

LINF: linfócitos, ABS: valores absolutos, CD4:CD8: relação CD4:CD8

continua

continuação

Anexo O – Grupo com doença fase avançada: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	LINF	%CD3 ⁺ CLA ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD25 ⁺	ABS	%CD3 ⁺ CD69 ⁺	ABS
26	2200	29	638	43	946	1	22
33	2360	1	23,6	30	708	3	70,8
35	2200	3	66	19	418	1	22
36	12369	0	0	33	4081,8	5	618,4
38	1400	2	28	22	308	5	70
39	800	3	24	25	200	4	32
44	3385	2	67,7	22	744,7	0	0
47	1940	0	0	32	620,8	1	19,4
48	1320	15,5	204,6	18	237,6	2	26,4
49	7400	26	1924	7	518	0,5	37
51	1700	7	119	23	391	5	85
52	600	0	0	7	42	0	0
54	9350	0	0	16	1496	0	0
56	942	2	18,8	17	160,1	1	9,4
60	4600	1	46	2	92	3	138

LINF: linfócitos, ABS: valores absolutos, cinza: amostras apresentando populações de tamanhos diferentes, azul: valores acima do limite máximo (IC 95%) encontrado para o grupo controle, vermelho: valores abaixo do limite mínimo (IC 95%) encontrado para o grupo controle, amarelo: populações com diferentes intensidades de fluorescência

continua

Anexo O – Grupo com doença fase avançada: dados de identificação, resultados do hemograma, morfológicos e da citometria de fluxo

N	NÚMERO DE POPULAÇÕES EM RELAÇÃO AO TAMANHO CELULAR	SUBPOPULAÇÕES COM DIFERENTES INTENSIDADES DE FLUORESCÊNCIA						
		CD3 ⁺ CD2 ⁺	CD3 ⁺ CD5 ⁺	CD3 ⁺ CD7 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ TCRαβ ⁺	CD3 ⁺ CD25 ⁺
26	1	-	-	-	-	-	-	-
33	2	SIM	-	SIM	-	-	SIM	-
35	2	-	-	SIM	-	-	-	-
36	3	-	-	SIM	-	-	-	-
38	2	-	SIM	SIM	-	-	-	-
39	2	-	-	-	-	-	-	-
44	2	-	-	SIM	-	-	-	-
47	1	-	-	-	-	-	-	-
48	2	-	-	-	-	-	-	-
49	2	SIM	-	SIM	-	-	-	-
51	1	-	-	-	-	-	-	-
52	2	-	SIM	-	-	-	-	-
54	2	SIM	SIM	SIM	SIM	-	SIM	SIM
56	1	-	-	SIM	-	-	-	-
60	2	SIM	-	-	-	-	-	-

Anexo P: Gráficos representando os resultados do teste de normalidade de Ryan-Joiner para as variáveis estudadas para o grupo controle

8. REFERÊNCIAS

Alaibac M, Pigozzi B, Belloni-Fortina A, Michelotto A, Saponeri A, Peserico A. CD7 expression in reactive and malignant human skin T-lymphocytes. *Anticancer Res.* 2003; 23 (3B): 2707-10.

Bernengo MG, Quaglino P, Novelli M, Capello N, Doveil GC, Lisa F, et al. Prognostic factors in Sézary síndrome: a multivariate analysis of clinical, haematological and immunological features. *Ann Oncol* 1998; 8:57-63.

Bernengo MG, Novelli M, Quaglino P, Lisa F, De Matteis A, Savoia P, et al. The relevance of the CD4+CD26- subset in the identification of circulating Sézary cells. *Br J Dermatol* 2001; 144: 125-35.

Bogen SA, Pelley D, Charif M, McCusker M, Koh H, Foss F, et al. Immunophenotypic identification of Sézary cells in peripheral blood. *Am J Clin Pathol* 1996; 106: 739-48.

Borowitz MJ, Weidner A, Olsen EA, Picker LJ. Abnormalities of circulating T-cell subpopulations in patients with cutaneous T-cell lymphoma: cutaneous lymphocyte-associated antigen expression on T cells correlates with extent of disease. *Leukemia* 1993; 7: 859-63.

Bunn PA Jr, Lamberg SI. Report of the committee on staging and classification of cutaneous T-cell lymphomas. *Cancer Treat Rep* 1979; 63: 725-8.

Chu AC, Robinson D, Hawk JLM, Meacham R, Spittle MF, Smith NP. Immunologic differentiation of the Sézary syndrome due to cutaneous T-cell lymphoma and chronic actinic dermatitis. *J Invest Dermatol* 1986; 86: 134-7.

Diamandidou E, Colome-Grimer M, Fayad L, Duvic M, Kurzrock R. Transformation of mycosis fungoides / Sézary syndrome: clinical characteristics and prognosis. *Blood* 1998; 92: 1150-9.

D'Incan M, Souteyrand P, Bignon YJ, Fonck Y, Roger H. Hydantoin-induced cutaneous pseudolymphoma with clinical, pathologic, and immunologic aspects of Sézary syndrome. *Arch Dermatol* 1992; 128: 1371-4.

Economidou J, Choremi H, Kofina A, Tosca A, Kotsakis P, Vareldzidis A, Stratigos J. Blood lymphocyte subpopulations studied with monoclonal antibodies in leukemic stages of mycosis fungoides. *Dermatologica* 1985; 170: 59-64.

Edelson RL, Kirkpatrick CH, Shevach EM. Preferential cutaneous infiltration by neoplastic thymus derived lymphocytes. Morphologic and functional studies. *Ann Intern Med* 1974; 80: 685-92.

Evans AV, Wood BP, Scarisbrick JJ, Fraser-Andrews EA, Chinn S, Dean A, Walkins P, Whitaker SJ, Russell-Jones R. Extracorporeal photopheresis in Sézary syndrome: hematologic parameters as predictors of response. *Blood* 2001; 98(5): 1298-1301.

Ferenczi K, Fuhlbrigge RC, Pinkus JL, Pinkus GS, Kupper TS. Increased CCR4 expression in cutaneous T cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 2002; 119:1405-1410.

Flaxman BA, Zelazny G, Van Scott EJ. Nonespecificity of characteristic cells in Mycosis Fungoides. *Arch Derm* 1971; 104:141-147.

Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Loreto F, Modesti M, Quaglino D. Changes in the expression of surface receptors on lymphocyte subsets in the elderly: quantitative flow cytometric analysis. *Am J Hematol*. 2001; 67(2): 63-72.

Guccion JG, Fischmann AB, Bunn PA Jr, Schechter GP, Patterson RH, Matthews MJ. Ultrastructural appearance of cutaneous T cell lymphomas in skin, lymph nodes, and peripheral blood. *Cancer Treat Rep* 1979; 63: 565-70.

Harmon CB, Witzig TE, Katzmann JA, Pittelkow MR. Detection of circulating T cells with CD4⁺CD7⁻ immunophenotype in patients with benign and malignant lymphoproliferative dermatoses. *J Am Acad Dermatol* 1996; 35: 404-10.

Haynes B, Bunn, Mann D et al. Cell surface differentiation antigens of the malignant T cell in Sézary syndrome and mycosis fungoides. *J Clin Invest* 1981; 67: 523-30.

Jakob T, Neuber K, Altenhoff J, Kowalzick L, Ring J. Stage-dependent expression of CD7, CD45RO, CD45RA and CD25 on CD4-positive peripheral blood T-lymphocytes in cutaneous T-cell-lymphoma. *Acta Derm Venereol* 1996; 76: 34-6.

Kamarashev J, Burg G, Kempf W, Hess Schmid M, Dummer R. Comparative analysis of histological and immunohistological features in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *J Cutan Pathol* 1998; 25(8): 407-12.

Kim YH, Bishop K, Varghese A, Hoppe RT. Prognostic factors in erythrodermic mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Arch. Dermatol.* 1995; 131: 1003-8.

Kim YH, Hess S, Richardson SK, Newton S, Showe LC, Benoit BM, Ubriani R, Vittorio CC, Junkins-Hopkins JM, Wysocka M, Rook AH. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J. Clin. Invest.* 2005; 115 (4): 798-810.

Kupper TS, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 211-22.

Labastide W, Rana M, Barker C. A new monoclonal antibody (CH-F42) recognizes a CD7⁺ subset of normal T lymphocytes and circulating malignant cells in adult T-cell lymphoma-leukemia and Sézary syndrome. *Blood* 1990; 76: 1361-8.

Laetsch B, Häffner AC, Döbbeling U, Seifert B, Ludwig E, Burg G, et al. CD4⁺/CD7⁻ T cell frequency and polimerase chain reaction-based clonality assay correlate with stage in cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 107-11.

Lamberg IS, Green SB, Byar DP, Block JB, Clendenning WE, Douglass MC, et al. Clinical staging for cutaneous T-cell lymphoma. *Ann Intern Med* 1984; 100: 187-192.

Laroche L, Bach J-F. T cell imbalance in nonleukemic and leukemic cutaneous lymphoma defined by monoclonal anti-bodies. *Clin Immunol Immunopathol* 1981; 20: 278-84.

Lima M, Almeida J, Teixeira MA, Queiros ML, Santos AH, Fonseca S, Balanzategui A, Justiça B, Orfao A. Utility of flow cytometry immunophenotyping and DNA ploidy studies for diagnosis and characterization

of blood involvement in CD4+ Sézary's syndrome. *Haematologica* 2003; 88: 874-887.

Litovitz TL, Lutzner MA. Quantitative measurements of blood lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia and the Sézary syndrome. *J Natl Cancer Inst* 1974; 53: 75-7.

Lutzner MA, Jordan HW. The ultrastructure of an abnormal cell in Sézary's syndrome. *Blood* 1968; 31: 719-26.

Lutzner MA, Hobbs JW, Horvath P. Ultrastructure of abnormal cells in Sézary syndrome, mycosis fungoides, and parapsoriasis en plaque. *Arch Dermatol* 1971; 103: 375-86.

Matutes E, Robinson D, O'Brien M, Haynes BF, Zola H, Catovsky D. Candidate counterparts of Sézary cells and adult T-cell lymphoma-leukemia cells in normal peripheral blood: an ultrastructural study with the immunogold method and monoclonal antibodies. *Leuk Res* 1983; 7: 787-801.

Meijer CJLM, van Leewen AWFM, van der Loo EM, van der Putte LBA, van Vloten WA. Cerebriform (Sézary like) mononuclear cells in healthy individuals: a morphologically distinct population of T-cells. *Virchows Arch B cell Pathol* 1977; 25: 95-104.

Miale J.B. *Laboratory medicine hematology* 5^a ed. St. Louis: The C.V. Mosby Company; 1978.

Payne CM. Ultrastructural morphometry in the diagnosis of mycosis fungoides and Sézary's syndrome. *Clin Dermatol* 1991; 9: 187-203.

Picker LJ, Michie AS, Rott LS, Butcher EC. A unique phenotype of skin associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells of cutaneous sites. *Am J Pathol* 1990; 136: 1053-68.

Rappl G, Muche JM, Abken H, Sterry W, Tilgen W, Ugurel S, Reinhold U. CD4⁺CD7⁻ T cells compose the dominant-cell clone in the peripheral blood of patients with Sézary syndrome. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: 456-61.

Reinhold U, Herpertz M, Kukel S, Otermann I, Uerlich M, Kreysel H-W. Induction of nuclear contour irregularity during T-cell activation via the T-cell receptor/CD3 complex and CD2 antigens in the presence of phorbol esters. *Blood* 1994; 83:703-6.

Reinhold U, Liu L, Sesterhenn J, Abken H. CD7-negative T cells represent a separate differentiation pathway in a subset of post-thymic helper T cells. *Immunology* 1996; 89(3): 391-6.

Robley E, Fowlkes BJ. Selective events in T-cell development. *An Rev Immunol* 1994; 12: 675-705.

Rosenthal CJ, Noguera CA, Coppola A, Kapelner SN. Pseudolymphoma with mycosis fungoides manifestations, hyporesponsiveness to diphenylhydantoin, and lymphocyte dysregulation. *Cancer* 1982; 49: 2305-14.

Sanches JA Jr. Aspectos dermatológicos e suas correlações clínico-patológicas com doença extracutânea e com prognóstico {tese}. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1998

Sausville EA, Eddy JL, Makuch RW, Fischmann AB, Schechter GP, Matthews M, et al. Histopathologic staging at initial diagnosis of three distinctive prognostic groups. *Ann Intern Med* 1988; 109: 372-82.

Scarisbrick JJ, Whitaker S, Evans AV, Fraser-Andrews EA, Child FJ, Dean A, Russel-Jones R. Prognostic significance of tumor burden in the blood of patients with erythrodermic primary cutaneous. *Blood* 2001; 97(3): 624-30.

Schechter GP, Bunn PA, Fischman AB, Matthews MJ, Guccion J, Soehnlein F, Munson D, Minna JD. Blood and lymph node T-lymphocytes in cutaneous T-cell lymphoma: evaluation by light microscopy. *Cancer Treat Rep* 1979; 63: 571-4.

Schechter GP, Sausville EA, Fischmann AB, Soehnlen F, Eddy J, Matthews M, et al. Evaluation of circulating malignant cells provides prognostic information in cutaneous T cell lymphoma. *Blood* 1987; 69: 841-9.

Sokolowska-Wojdylo M, Wenzel J, Gaffal E, Lenz J, Speuser P, Erdmann S, Abuzahra F, Bowman E, Roszkiewicz J, Bieber T, Tüting T. Circulating clonal CLA⁺ and CD4⁺ T cells in Sézary syndrome express the skin-homing chemokine receptors CCR4 and CCR10 as well as the lymph node-homing chemokine receptor CCR7. *Br J Dermatol* 2005; 152: 258-264.

Stolz W, Schmoeckel C, Burg G, Braun-Falco O. Circulating Sézary cells in the diagnosis of Sézary syndrome (quantitative and morphometric analyses). *J Invest Derm* 1983; 81: 314-319.

Troter MJ, Whittaker SJ, Orchard GE, Smith NO. Cutaneous histopathology of Sézary syndrome: a study of 41 cases with a proven circulating T-cell clone. *J Cutan Pathol* 1997; 24: 286-91.

Van der Loo E, Meijer C, Scheffer E, van Vloten W. The prognostic value of membrane markers and morphologic characteristics of lymphoid cells in blood and lymphonodes from patients with mycosis fungoides. *Cancer* 1981; 48: 738-44.

Van Fletcher, Zackheim HS, Beckstead JH. Circulating Sézary cells. A new preparatory method for their identification and enumeration. *Arch Pathol Lab Med* 1984; 108: 954-958.

Veelken H, Wood GS, Sklar J. Molecular staging of cutaneous T cell lymphoma: evidence for systemic involvement in early disease. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 889-94.

Vonderheid EC, Sobel EL, Nowell PC, Finan JB, Helfrich MK, Whipple DS. Diagnostic and prognostic significance of Sézary cells in peripheral blood smears from patients with cutaneous T cell lymphoma. *Blood* 1985; 66:358-66.

Vonderheid EC, Bigler RD, Kotecha A, Boselli CM, Lessin SR, Bernengo MG, Polansky M. Variable CD7 expression on T cells in the leukemic phase of cutaneous T cell lymphoma (Sézary Syndrome). *J Invest Dermatol* 2001; 117(3): 654-662.

Vonderheid EC, Bernengo MG, Burg G, Duvic M, Heald P, Laroche L, Olsen E, Pittelkow M, Russell-Jones R, Takigawa M, Willemze R. Update on erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: Report of the International Society for cutaneous lymphomas. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46: 1, 95-106.

Wang S, Li N, Heald P, Fisk JM, Fadare O, Howe JG, McNiff JM, Smith BR. Flow cytometric DNA ploidy analysis of peripheral blood from patients with

Sézary syndrome. Detection of aneuploid neoplastic T cells in the blood is associated with large cell transformation in tissue. *Am J Clin Pathol* 2004; 122 (5): 774-82.

Washington LBT, Huh YO, Powers LC, Duvic M, Jones D. A stable aberrant immunophenotype characterizes nearly all cases of cutaneous T-cell lymphoma in blood and can be used to monitor response to therapy. *BMC Clinical Pathology* 2002; 2: 5, 1-7.

Wieselthier JS, Koh HK. Sézary syndrome: diagnosis, prognosis, and critical review of treatment options. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 381-401.

Willenze R, van Vloten WA, Hermans J, Damsteeg MJM, Meijer CJLM. Diagnostic criteria in Sézary's syndrome: a multiparameter study of peripheral blood lymphocytes in 32 patients with erythroderma. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 392-7.

Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005; 105 (10): 3768-3784.

Winkelman RK, Linman JW. Erythroderma with atypical lymphocytes (Sézary syndrome). *Am J Med* 1973; 55: 192-98.

Winkelman RK. Clinical studies of T-cell erythroderma in the Sézary syndrome. *Mayo Clin Proc* 1974; 49: 519-25.

Winkelman RK, Hoagland HC. The Sézary cell in the blood of patients with Mycosis Fungoides. *Dermatologica* 1980; 160: 73-79.

Winkelman RK, Peters MS. Absolute number of circulating Sézary cells (letter). *Arch Dermatol* 1981; 117: 382.

Wood GS, Hong SR, Sasaki DT, Abel EA, Hoppe RT, Warnke RA, et al. Leu-8/CD7 antigen expression of CD3⁺ T cells: comparative analysis of skin and blood in mycosis fungoide / Sézary syndrome relative to normal blood values. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 602-7.

Yawalkar N, Ferenczi K, Jones DA, Yamanaka K, Suh K-Y, Sadat S, Kupper TS. Profound loss of T-cell receptor repertoire complexity in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2003; 102(12): 4059-4066.