

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Andreza de Oliveira Lira

**MÉTODOS LABORATORIAIS UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO
DA LEUCEMIA LINFOIDE CRÔNICA**

São Paulo

2016

Andreza de Oliveira Lira

**MÉTODOS LABORATORIAIS UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO
DA LEUCEMIA LINFOIDE CRÔNICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Adriano Pereira, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2016

Andreza de Oliveira Lira

**MÉTODOS LABORATORIAIS UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO
DA LEUCEMIA LINFOIDE CRÔNICA**

São Paulo, 2016

Professor Orientador Adriano Pereira

Professor Examinador

Dedico este Trabalho de Conclusão de Curso a todos os apaixonados pela área da saúde,
pelo corpo humano e especialmente a todos aqueles interessados no tema “Leucemia”,
especificamente na Leucemia Linfocítica Crônica.

Meu agradecimento vai primeiramente ao Pai, meu refúgio e fortaleza todos os dias, Aquele que guardou a minha vaga neste curso e universidade para um propósito maior- obrigada Deus, o meu diploma é para honra e glória do Teu nome! Agradeço à minha família e namorado Alex pelo apoio demonstrado de diversas formas e que foram essenciais para a minha formação. Agradeço aos amigos que compartilharam comigo tantos momentos inesquecíveis ao longo do trajeto, tenho plena certeza de que o conhecimento trocado e o dia-a-dia em sala de aula fizeram estes quatro anos serem muito mais divertidos e especiais. E, por fim, agradeço imensamente ao meu orientador Professor Adriano Pereira por todo auxílio dado para o desenvolvimento deste trabalho e à Professora Leila Borracha pela boa vontade em me apresentar pessoalmente no seu ambiente de trabalho algumas das técnicas laboratoriais abordadas aqui.

“Posso dizer, com toda a certeza, que o câncer me ajudou muito mais que me prejudicou. Hoje aceito minha condição de simples mortal, de um ser que erra, que cai e levanta, que não sou e nunca serei perfeita visto que ninguém o é. Hoje sou mais livre, sou mais forte, sou mais EU!”

Lílian Tassara (Vencendo a Leucemia)

LIRA, Andreza de Oliveira. **Métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico da leucemia linfóide crônica**. 2016. 85f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biomedicina)- Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016.

A leucemia linfocítica crônica (LLC) representa 0,9% de todos os cânceres, correspondendo a 30% de todos os casos de leucemia. Sua prevalência é maior nos países ocidentais, em homens e é mais comum em idosos, sendo raro seu diagnóstico antes dos 50 anos. É uma neoplasia que acomete as células hematopoiéticas da linhagem linfóide, sendo caracterizada clinicamente por linfocitose, em sua grande maioria, de linfócitos B. Ainda é desconhecida a etiologia desta doença, porém a mutação que acomete o progenitor linfóide mantém a capacidade de diferenciação e maturação celular, de modo a ocorrer proliferação e acúmulo de linfócitos maduros no sangue periférico, medula óssea e tecidos linfóides, como resultado de sobrevivência prolongada e apoptose diminuída. Seu curso clínico é altamente variável a cada paciente, podendo ser indolente ou evoluir de maneira agressiva, resultando em alterações corporais como os “sintomas B” típicos, anemia, linfonodomegalia, hepatoesplenomegalia, imunodeficiências, síndromes autoimunes e infecções recorrentes por microrganismos comuns. O tratamento não tem finalidade curativa e é realizado de diferentes formas, dependendo da idade e do estágio da doença em que o paciente está, sendo a imunoterapia o tratamento mais amplamente utilizado atualmente na LLC. O objetivo deste trabalho foi descrever os métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico da LLC e que auxiliam o estabelecimento do prognóstico dos pacientes. Para a realização do mesmo foi realizada uma revisão de literatura em livros e artigos científicos, com dados abrangendo os anos de 2000 a 2016. A direção inicial do diagnóstico da LLC é dada através da análise do hemograma e da extensão sanguínea, que irão demonstrar linfocitose e morfologia característica de linfócitos leucêmicos, respectivamente. A confirmação da linhagem e do estágio de maturação em que estas células estão é fornecida através da imunofenotipagem por citometria de fluxo, que promove uma caracterização fenotípica das células hematopoiéticas anormais. A avaliação da biópsia de medula óssea tanto morfológica quanto por métodos imunohistoquímicos é importante para identificar parâmetros com significado diagnóstico complementar e inclusive prognóstico, por exemplo, através do estudo da infiltração leucêmica na medula óssea. As técnicas citoquímicas são importantes para estabelecimento do diagnóstico e classificação da leucemia, principalmente quando associadas ao estudo imunofenotípico. A citogenética convencional é útil para detecção de mutações genéticas presentes no paciente com LLC, já que essas alterações ocorrem em cerca de 80% dos casos e se correlacionam com o prognóstico. Técnicas moleculares como a hibridização *in situ* por fluorescência e a PCR são complementares ao diagnóstico e têm papel fundamental de estabelecimento do prognóstico dos pacientes, pelo fato de serem mais sensíveis à identificação de conteúdo genético com importância para o curso clínico da doença e estabelecimento da melhor forma de tratamento. Para que haja um diagnóstico fidedigno da LLC é necessário um conjunto de técnicas laboratoriais complementares, precisas, atualizadas e multiparamétricas, tais como as descritas neste trabalho.

Palavras-chave: Leucemia linfóide- diagnóstico. Técnicas de laboratório clínico. Prognóstico.

LIRA, Andreza de Oliveira. **Laboratory methods used in the diagnosis of chronic lymphocytic leukemia**. 2016. 85f. Conclusion Work of Course (Graduation in Biomedicine)- Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016.

The chronic lymphocytic leukemia (CLL) represents 0,9% of all cancers, corresponding 30% of all leukemia's cases. Its prevalence is higher in western countries, is more common in the elderly men and its diagnosis is rare before age 50. It is a cancer that affects the hematopoietic cells of lymphoid lineage, clinically characterized by lymphocytosis, mostly of B lymphocytes. It is still unknown the etiology of this disease, however the mutation that affects the lymphoid progenitor maintains the ability to differentiate and cell maturation, so that to occur proliferation and accumulation of mature lymphocytes in the peripheral blood, bone marrow and lymphoid tissues, as a result of prolonged survival and decreased apoptosis. Its clinical course is highly variable to each patient and may be indolent or evolve aggressively, resulting in bodily changes as "B symptoms" typical, anemia, lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, immune deficiencies, autoimmune syndromes and recurrent infections by common microorganisms. The treatment has not curative purpose and is accomplished in different ways depending of the age and stage of disease where the patient is, with an immunotherapy treatment currently most widely used in CLL. The goal of this study was to describe the laboratory methods used for the diagnosis of CLL, that help establish the prognosis of patients. For the realization of even a literature review was carried out in books and scientific articles with data covering the years 2000 to 2016. The initial direction of the diagnosis of CLL is given through the blood count analysis and blood extension, which will demonstrate lymphocytosis and characteristic morphology of leukemic lymphocytes, respectively. Confirmation of the lineage and maturation stage in which these cells are, is provided by immunophenotyping by flow cytometry, which promotes a phenotypic characterization of the abnormal hematopoietic cells. A review of bone marrow biopsy both morphologically by immunohistochemical methods it is important to identify complementar diagnosis parameters, including prognostic parameters, for example, through the study of leukemic infiltration in bone marrow. The cytochemical techniques are important to establish the diagnosis and classification of leukemia, particularly when associated with immunophenotypic study. The conventional cytogenetics is useful for detection of gene mutations present in patients with CLL, as these changes occur in about 80% of cases and correlates with prognosis. Molecular techniques such as fluorescence *in situ* hybridization and PCR are complementary to the diagnosis and play a fundamental role in the establishment of patients' prognosis, because they are more sensitive to identification of genetic content that have importance for the clinical course of the disease and establishment of best form of treatment. To allow for a reliable diagnosis of CLL is needed a set of complementary laboratory techniques, accurate, current and multiparametric, such as those described in this work.

Keywords: Lymphocytic leukemia- diagnostic. Clinical laboratory techniques. Prognostic.

Lista de Figuras

Figura 1- Hierarquia da hematopoiese.....	22
Figura 2- LLC: linfonodopatia.....	29
Figura 3- LLC: infecção por vírus herpes- zoster.....	30
Figura 4- Hemograma representativo em caso de LLC.....	36
Figura 5- LLC: linfocitose.....	37
Figura 6- LLC: Linfócitos maduros e mancha nuclear (<i>Gumprecht</i>).....	37
Figura 7- Pró- linfócitos.....	38
Figura 8- Histologia normal da MO.....	40
Figura 9- Padrões de infiltração da MO na LLC.....	41
Figura 10- Citologia da infiltração da MO na LLC.....	42
Figura 11- BMO em paciente com LLC: infiltração intersticial.....	43
Figura 12- Reação da fosfatase ácida com inibição pelo ácido tartárico.....	45
Figura 13- Reação da fosfatase ácida sem inibição pelo ácido tartárico.....	45
Figura 14- Reação da POX.....	46
Figura 15- Blastos com moderada a forte atividade para peroxidase.....	46
Figura 16- Reação do PAS.....	47
Figura 17- Coloração pelo SBB.....	48
Figura 18- Reação de ANAE em célula monocítica.....	49
Figura 19- Reação inespecífica da esterase com inibição pelo flúor.....	49
Figura 20- Reação inespecífica da esterase sem inibição pelo flúor.....	50

Figura 21- CMF (<i>dot plots</i>) demonstrando padrões de expressão em linfócitos normais, leucêmicos e coexistências imunofenotípicas em ambos tipos de células.....	52
Figura 22- Cariótipo normal de humano.....	59
Figura 23- Cariótipo de um caso de LLC com trissomia dos cromossomos 12, 18 e 19.....	61
Figura 24- Exemplificação do procedimento na técnica FISH.....	63
Figura 25- FISH usando sondas para 11q22.3 (ATM) e 17p13.1 (TP 53).....	64
Figura 26- Células em intérfase apresentando sinais fluorescentes pela técnica de FISH.....	65
Figura 27- Demonstração geral da técnica de PCR.....	67
Figura 28- Demonstração geral da técnica RT-PCR.....	68
Figura 29- Comparação da expressão de RNAm e níveis proteicos de LEF1 em células B leucêmicas e células B normais.....	71
Figura 30- Comparação da expressão do RNAm de LEF1 em pacientes com gene IGHV não mutado e mutado.....	72

Lista de Tabelas

Tabela 1- Estadiamento da LLC de acordo com a classificação de Rai.....	27
Tabela 2- Estadiamento da LLC de acordo com a classificação Binet.....	28
Tabela 3- Resumo dos resultados das reações citoquímicas utilizadas para auxílio diagnóstico na LLC-B.....	50
Tabela 4- Marcadores utilizados para imunofenotipagem por CMF.....	53
Tabela 5- Imunofenótipo dos precursores normais da linhagem linfóide B.....	54
Tabela 6- Score da CMF para diagnóstico de LLC.....	55
Tabela 7- Classificação das doenças linfóides crônicas, segundo a linhagem celular de origem.....	57
Tabela 8- Alterações cromossômicas comuns na LLC, frequência e relação com prognóstico.....	60

Lista de Siglas

AcMo	Anticorpos Monoclonais
ADCC	<i>Antibody Dependent Cell- mediated Cytotoxicity</i>
ADP	<i>Antibody- Dependent cellular Phagocytosis</i>
Ags	Antígenos
AHAI	Anemia Hemolítica Autoimune
ANAE	Alfa- Naftil Acetato Esterase
APSV	Aplasia Pura da Série Vermelha
B2M	Beta-2 Microglobulina
BFU-E	Unidade formadora de explosão eritroide
BFU-Meg	Unidade formadora de explosão de megacariócitos
BMO	Biópsia de Medula Óssea
CDC	<i>Complement- Dependent Cytotoxicity</i>
cDNA	DNA complementar
CDs	<i>Clusters of Differentiation</i>
CFU-Baso	Unidade formadora de basófilos
CFU-E	Unidade formadora de colônias eritroides
CFU-Eo	Unidade formadora de eosinófilos
CFU-G	Unidade formadora de colônias granulocíticas
CFU-GEMM	Unidade formadora de colônias granulocíticas/ eritroides/ megacariocíticas/ monocíticas
CFU-GM	Unidade formadora de colônias granulocíticas/ monocíticas
CFU-M	Unidade formadora de colônias monocíticas

CFU-Meg	Unidade formadora de colônias megacariocíticas
CFU-S	Unidade formadora de colônias esplênicas
CMF	Citometria de fluxo
CMV	Citomegalovírus
CTHs	Células-tronco hematopoiéticas
CYLD	Cilindromatose
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DRM	Doença Residual Mínima
EBMT	<i>Society for European Bone Marrow Transplantation</i>
EPO	Eritropoietina
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FCR	Fludarabina, Ciclofosfamida e Rituximab
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G-CSF	Fator estimulador de colônias granulocíticas
GM-CSF	Fator estimulador de colônias granulocítico-monocíticas
GVHD	<i>Chronic Graft- Versus Host- Disease</i>
GVL	<i>Graft- Versus- Leukaemia</i>
Hb	Hemoglobina
HE	Hematoxilina-eosina
HMG	Hemograma
Ht	Hematócrito
HTLV-1	<i>Human T Lymphotropic Vírus type 1</i>

Ig	Imunoglobulina
IGHV	<i>Immunoglobulin Heavy chain Variable</i>
IL	Interleucina
LDGCB	Linfoma Difuso de Grandes Células B
LEF1	<i>Lymphoid Enhancer binding Factor-1</i>
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LLC	Leucemia Linfoide Crônica
LLC-B	Leucemia Linfocítica Crônica de células B
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LP	Leucemia Prolinfocítica
M-CSF	Fator estimulador de colônias monocíticas
mm	Milímetros
MO	Medula óssea
mRNAs	Micro RNAs
NCI	<i>Nacional Cancer Institute</i>
NK	<i>Natural-killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	<i>Periodic Acid- Schiff</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMNs	Polimorfonucleares
POX	Mieloperoxidase
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>

RNA _m	RNA mensageiro
RT- PCR	<i>Reverse Transcriptase-PCR</i>
SBB	Sudan Black B
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SE	Síndrome de Evans
slg	Imunoglobulina de superfície
SNC	Sistema Nervoso Central
SR	Síndrome de Richter
SSC	<i>Side Scatter</i>
TdT	<i>Terminal Deoxinucleotidil Transferase</i>
TPI	Trombocitopenia Imune
TPO	Trombopoietina

SUMÁRIO

Dedicatória

Agradecimentos

Epígrafe

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Siglas

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 METODOLOGIA.....	20
4 DESENVOLVIMENTO.....	21
4.1 Hematopoiese.....	21
4.2 Leucemias.....	24
4.3 Leucemia linfocítica crônica (LLC)	25
4.3.1 Epidemiologia.....	26
4.3.2 Estadiamento.....	27
4.3.3 Patogênese.....	28
4.3.4 Quadro clínico.....	29
4.3.5 Tratamento.....	30

4.4 Métodos laboratoriais utilizados para diagnóstico da LLC.....	33
4.4.1 Hemograma.....	33
4.4.1.1 Eritrograma.....	34
4.4.1.2 Leucograma.....	35
4.4.1.3 Plaquetograma.....	35
4.4.2 Análise morfológica da extensão sanguínea.....	36
4.4.3 Biópsia de medula óssea, exames histopatológicos e imunohistoquímicos.....	38
4.4.4 Citoquímica.....	44
4.4.4.1 Fosfatase ácida.....	44
4.4.4.2 Mieloperoxidase (POX)	46
4.4.4.3 Ácido periódico de Schiff (<i>Periodic Acid- Schiff, PAS</i>).....	47
4.4.4.4 Sudan Black B (SBB)	48
4.4.4.5 Esterases	48
4.4.5 Imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	50
4.4.6 Citogenética convencional.....	58
4.4.7 Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (<i>Fluorescent In Situ Hybridization, FISH</i>).....	62
4.4.8 Reação em cadeia de polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction, PCR</i>).....	66
4.5 Marcadores biológicos e prognóstico.....	72
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

As leucemias compõem um dos três principais cânceres que acometem o sangue (KOOHI et al., 2015), sendo um grupo de doenças hematológicas complexas, malignas, metastáticas e clonais dos leucócitos (SANTOS, 2013; KOOHI et al., 2015), que se acumulam no sangue, medula óssea (MO) e tecidos linfoides (MONTSERRAT; MORENO, 2008). Podem ser classificadas como mieloide (ou mielocítica) e linfóide (ou linfocítica) e, estas ainda podem ser agudas ou crônicas. Existem tipos diferentes de leucócitos, e por este motivo, há diversos tipos de leucemias. De modo que, classicamente há quatro tipos principais: Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Leucemia Mieloide Crônica (LMC), Leucemia Linfóide Aguda (LLA) e Leucemia Linfóide Crônica (LLC) (SANTOS, 2013).

As leucemias agudas são caracterizadas pela proliferação acelerada dos clones malignos imaturos dos leucócitos, que perdem sua capacidade de maturação e diferenciação, não exercendo mais corretamente suas devidas funções. Este quadro apresenta características clínicas, imunológicas, moleculares e morfológicas distintas e seu diagnóstico e classificação precisos favorecem um tratamento e prognóstico adequados. Já as leucemias crônicas são caracterizadas pela proliferação acelerada de clones leucocitários, porém com capacidade de maturação e diferenciação celular, de modo que a MO e sangue periférico são compostos de número aumentado de células maduras (SANTOS, 2013).

Especificamente, a LLC é classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma neoplasia de linhagem B, periférica. Representa a leucemia mais comum nos Estados Unidos, com cerca de 15.000 novos diagnósticos por ano (BIASOLI; SPECTOR, 2015). É responsável por cerca de 30% de todas as leucemias e 1% dos cânceres no mundo (SANTOS, 2013). Seu diagnóstico é possível quando está presente uma linfocitose acima de $10 \times 10^9/L$ no hemograma e linfocitose $> 40\%$ na análise da MO; existindo ou não no paciente linfonodomegalia, hepato e/ou esplenomegalia, anemia e/ ou plaquetopenia. As células neoplásicas são semelhantes aos linfócitos normais, encontrando-se até 2% de pró-linfócitos ou blastos (METZE, 2005).

O fator de risco mais importante para seu desenvolvimento é uma história familiar de LLC, em vista que dentre os pacientes recentemente diagnosticados, 8 a 10% a possuem (LANASA, 2010). É uma doença predominantemente de pessoas

idosas- a maioria dos pacientes tem mais de 70 anos no momento do diagnóstico inicial- e pelo fato deste quadro ter uma progressão lenta, muitos destes pacientes sucumbem a outros problemas médicos, ao invés da LLC. É frequentemente acompanhada por anos sem tratamento e, devido à falta de dados que demonstram que o tratamento precoce traz benefícios à sobrevivência, o Grupo de Trabalho do Instituto Nacional do Câncer publicou critérios recomendados para o início do tratamento, os quais incluem o desenvolvimento de “sintomas B” (perda de peso > 10% no prazo de seis meses, febres por duas semanas, suores noturnos, fadiga extrema), agravamento de anemia e/ ou trombocitopenia, citopenias autoimunes, esplenomegalia progressiva, linfadenopatia progressiva e tempo de duplicação de linfócitos de seis meses (ABBOTT, 2006).

A escolha de um tratamento de primeira linha depende dos fatores de risco do paciente. Os pacientes mais jovens ou aqueles com estágios mais avançados ou com fatores prognósticos adversos podem se beneficiar de regimes combinados mais agressivos ou transplantes alogênicos no início do curso da sua doença, já que esta é a única terapia potencialmente curativa. Para os pacientes mais velhos ou mais doentes, o tratamento paliativo deve ser utilizado, com tratamentos menos susceptíveis a induzir mielossupressão ou risco infeccioso (ABBOTT, 2006).

O diagnóstico da LLC é baseado nas características clínicas e laboratoriais. O hemograma, a análise morfológica e a imunofenotipagem são as investigações iniciais (MATUTES et al., 2010). Requer uma detecção sustentada de mais de 5000 linfócitos B monoclonais no sangue periférico, com características imunofenotípicas específicas, que são determinadas por citometria de fluxo (CMF) (MONTSERRAT; MORENO, 2008), sendo CD5, CD19, CD20, CD23 e imunoglobulinas de superfície alguns dos marcadores utilizados no diagnóstico (LANASA, 2010). Morfologicamente, a LLC pode ser classificada em típica e atípica. Em casos atípicos, as investigações citadas devem ser complementadas com a genética molecular e/ ou histologia para excluir outras doenças de linfócitos B (MATUTES et al., 2010).

Cerca de 80 a 90% dos pacientes com LLC apresentam aberrações cromossômicas, que podem ser visualizadas por meio da citogenética convencional ou hibridização *in situ* por fluorescência (*Fluorescence in situ Hybridization*, FISH) (MONTSERRAT; MORENO, 2008; MATUTES et al., 2010). Ainda assim, a imunofenotipagem é o único método que pode estabelecer ou confirmar o diagnóstico de LLC (MATUTES et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Descrever sobre os métodos laboratoriais utilizados no diagnóstico da leucemia linfóide crônica (LLC).

2.2 Objetivos específicos

Descrever aspectos gerais da LLC, dados epidemiológicos, estadiamento, patogênese, quadro clínico e tratamento; abordar os métodos laboratoriais que podem ser realizados e utilizados para um diagnóstico eficaz da doença, sendo eles:

- Hemograma
- Análise Morfológica da Extensão Sanguínea
- Biópsia de Medula Óssea, Exames Histopatológicos e Imunohistoquímicos
- Citoquímica
- Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo
- Citogenética Convencional
- Hibridização *in situ* por fluorescência (*Fluorescent In Situ Hybridization*, FISH)
- Reação em Cadeia de Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR)

E por fim, descrever os atuais marcadores biológicos dos linfócitos neoplásicos, os quais são úteis para estabelecer o prognóstico dos pacientes com LLC.

3 METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão de literatura utilizando livros da área de Hematologia e similares de propriedade da autora, orientador e da Biblioteca Padre Inocente Radrizzani, situada no Centro Universitário São Camilo, campus Ipiranga. Também foram utilizados artigos científicos pesquisados na revista eletrônica SciELO; bases de dados LILACS e PubMed, sendo eles nos idiomas português e inglês, do período entre 2000 a 2016.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Hematopoiese

A hematopoiese é o processo pelo qual as células do sangue são produzidas. Apresenta como principais funções a renovação das células do sangue e a manutenção dos seus níveis séricos, além da capacidade de adaptação às necessidades tanto fisiológicas como patológicas (OLIVEIRA; NETO 2004).

Ao longo da vida os locais da hematopoiese variam. Nas primeiras semanas de vida intrauterina o saco vitelino é o responsável pelo processo; a partir da sexta semana ao sétimo mês fetal, o fígado e baço passam a ser os órgãos hematopoiéticos e produzem células sanguíneas até cerca de duas semanas após o nascimento. A MO torna-se o sítio hematopoiético mais importante a partir de seis a sete meses de vida fetal e durante o resto da vida é a única fonte de células sanguíneas em condições normais- fígado e baço podem retomar seu papel hematopoiético (hematopoiese extramedular) em quadros graves em que a MO deixa de ser funcional (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008).

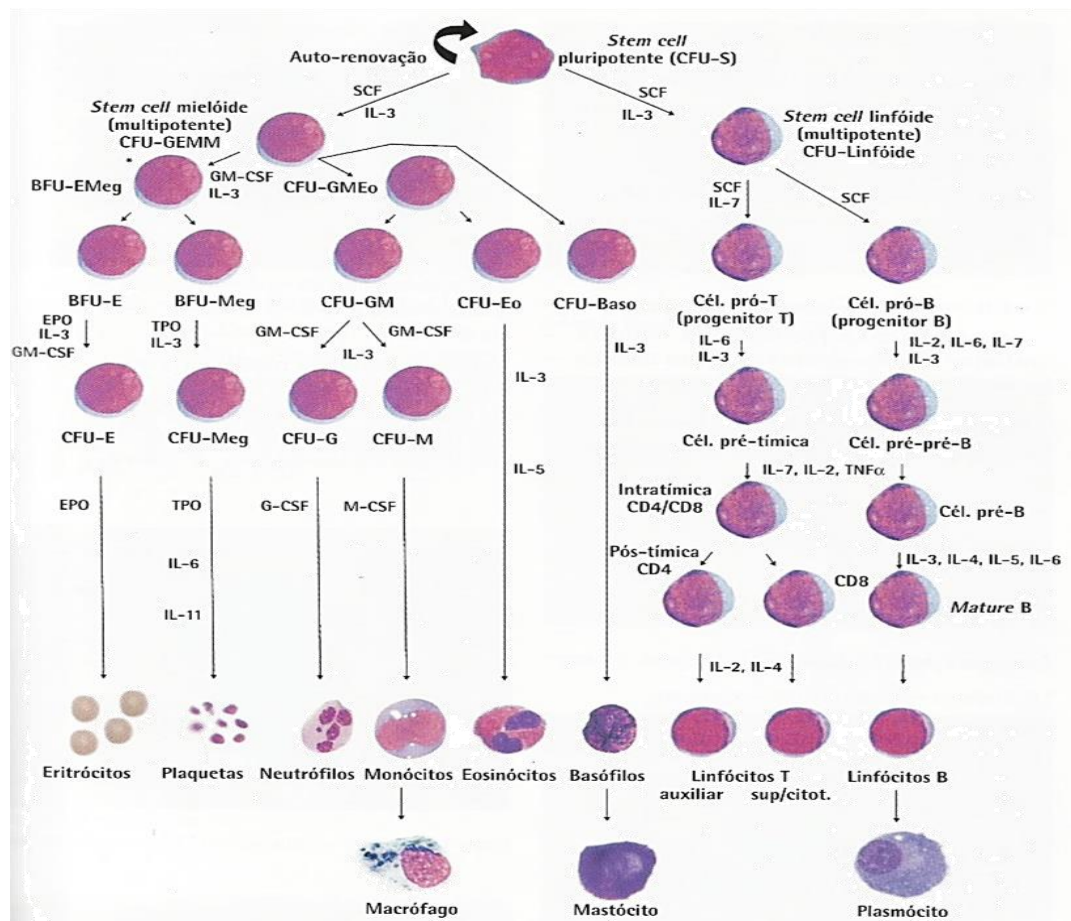
Para que a síntese das células sanguíneas ocorra de maneira adequada na MO é necessário que a mesma esteja normal, ou seja, possua um microambiente com células hematopoiéticas sadias (sem alterações moleculares), células assessoriais e estromais que incluem adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos- que produzem os fatores de crescimento e moléculas que compõem a matriz extracelular-, nutrientes suficientes para a realização do processo e as citocinas necessárias para direcionar as células progenitoras (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008).

As células-tronco hematopoiéticas (CTHs) produzem o conteúdo celular do sangue e possuem a capacidade de se diferenciar e originar qualquer linhagem de célula sanguínea. Estas células primitivas têm como características potenciais principais a autorrenovação (capacidade de dividir-se e originar duas células-filhas idênticas a ela genética e fenotipicamente) e a diferenciação (sequência de eventos celulares que culminam numa célula mais madura) (SANTOS, 2013).

Por meio de estímulos apropriados (Figura 1), as CTHs originam os progenitores hematopoiéticos iniciais: o mieloide comum, a partir do qual são produzidas as linhagens eritroide (eritropoese), granulocítica (granulopoese),

monocítica (monopoese) e plaquetária (trombopoese); e o linfóide comum, a partir do qual é produzida a linhagem linfóide (linfopoese)- B, T e *natural killer* (NK) (OLIVEIRA; NETO 2004). Estes estímulos desempenham um papel delicado no equilíbrio homeostático entre proliferação, diferenciação e sobrevivência de células precursoras hematopoiéticas (SALEEM; YUSOFF, 2016).

Figura 1- Hierarquia da hematopoiese



Nota: Fatores de crescimento envolvidos na hematopoiese: CFU-S (unidade formadora de colônias esplênicas); CFU-GEMM (unidade formadora de colônias granulocíticas/ eritroides/ megacariocíticas/ monocíticas); BFU-E (unidade formadora de explosão [burst] eritroide); CFU-E (unidade formadora de colônias eritroides); CFU-GM (unidade formadora de colônias granulocíticas/ monocíticas); CFU-G (unidade formadora de colônias granulocíticas); CFU-M (unidade formadora de colônias monocíticas); CFU-Eo (unidade formadora de eosinófilos); CFU-Baso (unidade formadora de basófilos); BFU-Meg (unidade formadora de explosão de megacariócitos); CFU-Meg (unidade formadora de colônias megacariocíticas); SCF (*stem cell factor*); IL (interleucina); GM-CSF (fator estimulador de colônias granulocítico-monocíticas); G-CSF (fator estimulador de colônias granulocíticas); M-CSF (fator estimulador de colônias monocíticas); EPO (eritropoietina); TPO (trombopoietina).

Fonte: (OLIVEIRA; NETO 2004)

A eritropoese é estimulada por fatores de crescimento específicos e pelo hormônio eritropoietina (EPO), produzido principalmente pelas células do parênquima renal e em menor quantidade nos hepatócitos e outros locais. Atua nas células progenitoras eritroides, favorecendo ação dos fatores de transcrição (MOCINI et al., 2007) e aumentando a quantidade de células progenitoras direcionadas para a eritropoese (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008). Este processo possui como células precursoras os proeritroblastos, células nucleadas que se diferenciam e amadurecem a eritroblastos basófilos, eritroblastos policromáticos, eritroblastos ortocromáticos, que perdem o núcleo, reticulócitos, que vão para a corrente sanguínea e, após o fim da etapa de hemoglobinizacão, tornam-se enfim os eritrócitos maduros (SANTOS, 2013).

A granulopoeise possui como primeiras células precursoras morfologicamente identificáveis os mieloblastos que se diferenciam e amadurecem a promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonetes e por fim as células segmentadas que podem ser três tipos celulares: os neutrófilos, os basófilos e os eosinófilos. A monopoese possui como primeiras células precursoras morfologicamente identificáveis os monoblastos que se diferenciam e amadurecem a promonócitos e monócitos (SANTOS, 2013).

A trombopoese é estimulada por fatores de crescimento específicos e pelo hormônio trombopoietina (TPO), produzido nos hepatócitos. É um fator de diferenciação apenas megacariocítica, dirigindo a maturação de megacariócitos e formação de plaquetas, mas não tem nenhum efeito sobre as células imaturas da linhagem ou outros tipos de células hematopoiéticas (KAUSHANSKY, 2014). Possui como primeiras células precursoras os megacarioblastos que se diferenciam e amadurecem a megacariócitos, os quais se fragmentam e originam as plaquetas (OLIVEIRA; NETO 2004).

A linfopoese possui como primeiras células precursoras os linfoblastos que se diferenciam e amadurecem a prolinfócitos e linfócitos. Ainda não é muito compreendido o processo pelo qual diferentes tipos de linfócitos são originados deste progenitor, sugere-se uma hierarquia mais complexa de progenitores (SANTOS, 2013).

Os eritrócitos, monócitos, plaquetas e granulócitos são produzidos apenas na MO, já os linfócitos são produzidos na MO e em outros diversos locais do tecido

linfogênico como linfonodos, baço, timo, tonsilas, bolsões do tecido linfoide e placas de Peyer (GUYTON; HALL, 2011).

4.2 Leucemias

As leucemias fazem parte do grande grupo das doenças linfoproliferativas e compõem um grupo de doenças neoplásicas que acometem células hematopoiéticas da linhagem mieloide ou linfoide, as quais passaram por um processo de mutação somática, de modo a expressarem inapropriadamente oncogenes e perderem a função adequada dos genes supressores de tumor e, como resultado disso, sofrem uma proliferação clonal descontrolada. Seus diversos tipos apresentam variedades quanto à patogenia, etiologia, prognóstico e resposta ao tratamento e, por isso, são separados em entidades distintas (OLIVEIRA; NETO, 2004; SÁNCHEZ; ORTEGA; BARRIENTOS, 2007), além disso, provocam altas taxas de mortalidade e pesadas despesas ao longo do processo de diagnóstico e tratamento (KOOHI et al., 2015).

São consideradas doenças relativamente novas, com seus primeiros achados datando de 1838, reconhecidos *post mortem* e associados à esplenomegalia. Somente a partir de 1845, o termo leucemia passou a ser utilizado por Rudolf Virchow; antes disso eram reportadas como *piemia* ou *Weisses Blut* (OLIVEIRA; NETO 2004); em 1891 Ehrlich introduziu métodos para sua distinção e em 1913 foram divididas em grupos (SÁNCHEZ; ORTEGA; BARRIENTOS, 2007).

As leucemias podem ser divididas de acordo com a linhagem celular sanguínea acometida em mieloide e linfoide e, de acordo com sua evolução, o prognóstico varia desde as que conduzem rapidamente à morte até as que evoluem com lentidão, sendo, respectivamente classificadas em agudas ou crônicas. Portanto, são definidos classicamente quatro tipos principais de leucemias: Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Leucemia Mieloide Crônica (LMC), Leucemia Linfoide Aguda (LLA) e a Leucemia Linfoide Crônica (LLC) (SÁNCHEZ; ORTEGA; BARRIENTOS, 2007; SANTOS, 2013).

Nas leucemias agudas a alteração mutacional que acomete a célula progenitora hematopoiética, iniciadora do processo leucemogênico, causa a perda da capacidade de maturação celular, resultando em acúmulo de células imaturas, chamadas blastos, na MO e sangue periférico. Já nas leucemias crônicas, a mutação que acomete o progenitor mantém a capacidade de diferenciação e

maturação celular, resultando em acúmulo de células maduras na MO, sangue periférico e tecidos linfoides e, conseqüentemente um quadro de leucocitose. Pode-se ainda observar a migração das células leucêmicas para outros órgãos como baço, fígado e sistema nervoso central (SNC) (OLIVEIRA; NETO, 2004).

Particularmente, as leucemias linfoides devem ser diferenciadas dos linfomas, que também são proliferações neoplásicas da linhagem linfoide. Esta separação pode ser feita por meio das características das doenças: enquanto as leucemias se manifestam clinicamente associadas a alterações na MO e sangue, os linfomas se manifestam predominantemente nos linfonodos e em outros órgãos linfoides (OLIVEIRA; NETO, 2004).

4.3 Leucemia linfoide crônica (LLC)

A LLC é definida como uma linfocitose monoclonal de linfócitos B (LLC-B) (GARLEY et al., 2016). É caracterizada por proliferação e acúmulo de linfócitos maduros no sangue periférico, MO e tecidos linfoides (STRATI et al., 2016), como resultado de sobrevida prolongada e apoptose diminuída (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008). A presença de uma infiltração clinicamente significativa da LLC fora destes sítios como, por exemplo, no SNC, é relativamente rara e definida como LLC extramedular (STRATI et al., 2016).

As idades médias de diagnóstico e morte destes pacientes são de 70 e 80 anos, respectivamente (BIASOLI; SPECTOR, 2015), sendo raro seu diagnóstico antes dos 50 anos (MELO, 2008) e seu curso clínico é altamente variável (BIASOLI; SPECTOR, 2015).

A proliferação e o aumento da sobrevida de linfócitos B disfuncionais são regulados por citocinas endógenas por meio de sinalização autócrina e também por meio de sinais parácrinos, cuja fonte pode vir de células imunocompetentes, incluindo os neutrófilos (PMNs) - primeira linha de defesa - que podem facilmente identificar as células transformadas, levando à sua eliminação. O papel dos neutrófilos no decurso da LLC-B ainda está sendo discutido, no entanto já foi determinado que estas células são capazes de liberar uma variedade de citocinas que podem afetar o processo neoplásico (GARLEY et al., 2016).

Tipicamente, a doença é dividida em três grupos: a LLC típica ou clássica, na qual persiste em maioria os linfócitos maduros e presença de raros ou nenhum pró-

linfócitos ou linfócitos atípicos; LLC com transformação pró-linfocítica ou atípica, na qual persiste a presença de cerca de 11 a 54% de pró-linfócitos no sangue periférico; e LLC mista, que é caracterizada pela presença de cerca de 10% de pró-linfócitos e frequentemente alguns linfócitos atípicos (MELO, 2008).

Mais recentemente, a doença também pôde ser classificada entre aquela com mutação do gene IGHV (*Immunoglobulin Heavy chain Variable*) e aquela sem a mutação do gene IGHV, o qual codifica a região variável da cadeia pesada das imunoglobulinas. Este tipo de mutação no caso da LLC está associado a melhores respostas a alguns tratamentos e à sobrevivência prolongada (DIELSCHNEIDER et al., 2016).

Com base no estado mutacional deste gene, os pacientes com LLC podem ser divididos em dois grupos: se são detectadas mutações em um nível igual ou superior a 2%, o resultado é interpretado como pacientes com hipermutações somáticas; se as mutações são detectadas a um nível inferior a 2%, o resultado é interpretado como pacientes sem hipermutações somáticas. Os pacientes com o gene mutado geralmente têm uma doença menos agressiva e mais indolente, com sobrevida global maior. Já os pacientes sem mutação têm geralmente uma doença mais agressiva e sobrevida global mais curta. Acredita-se que o estado mutacional deste gene seja um dos marcadores mais robustos para doentes com LLC (GONZÁLEZ et al., 2016).

A LLC pode ainda evoluir para outros quadros graves como leucemia pró-linfocítica (LP) e linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), conhecido como síndrome de Richter (SR) (SANDES et al., 2016), na qual o paciente possui um mau prognóstico de aproximadamente 6 anos de vida (MELO, 2008) e, ocasionalmente, também pode evoluir para quadros agudos das leucemias linfóide ou mieloide (SANTOS, 2013). Hoje em dia, a LLC é considerada uma doença dinâmica impulsionada por fatores intrínsecos (genéticos) e extrínsecos (microambientais) (BALIAKAS et al., 2013).

4.3.1 Epidemiologia

A LLC-B representa 0,9% de todos os novos cânceres (BIASOLI; SPECTOR, 2015), tendo uma incidência variável de uma a cinco pessoas a cada 100.000 no mundo (SANTOS, 2013). É uma doença mais comum nos países ocidentais

(SANDES et al.; 2016), sendo estimado que haveriam cerca de 15.000 novos casos e 4.600 mortes devido LLC nos Estados Unidos em 2015 (BIASOLI; SPECTOR, 2015).

Corresponde a cerca de 30% de todos os casos de leucemia e é mais comum em homens do que em mulheres (proporção 2:1) (MELO, 2008; SCHWARTZ; KLUG, 2015).

4.3.2 Estadiamento

Para aumentar a precisão do diagnóstico e prognóstico do paciente e para escolher o melhor tratamento, é útil estadiar a doença dos pacientes (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008). São amplamente utilizados os sistemas de estadiamento Rai (Tabela 1), que inclui linfonodopatia, hepato e/ou esplenomegalia, anemia e trombocitopenia como marcadores da progressão da doença; e o sistema Binet (Tabela 2), que depende do número de órgãos aumentados, anemia e trombocitopenia presentes (ABBOTT, 2006).

Ambos são usados em associação com parâmetros laboratoriais e características clínicas do paciente (TABBARA; KITTAI; YU, 2015), de modo que a sobrevida do mesmo é alterada conforme o estágio em que for classificado (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008). Ambos os sistemas possuem classificações baseadas apenas em exames hematológico e físico (SANTOS, 2013).

Tabela 1- Estadiamento da LLC de acordo com a classificação de Rai

Estádio
0 Linfocitose absoluta $> 15 \times 10^9/L$
I Como estágio 0 + aumento de linfonodos (linfonodopatia)
II Como estágio 0 + aumento de fígado e/ou baço $\pm$ linfonodopatia
III Como estágio 0 + anemia ($Hb < 10g/dL$) $\pm$ linfonodopatia $\pm$ organomegalia Como estágio 0 + trombocitopenia (plaquetas $< 100 \times 10^9/L$) $\pm$ linfonodopatia
IV $\pm$ organomegalia

Fonte: (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008)

Tabela 2- Estadiamento da LLC de acordo com a classificação Binet

Estádio	Organomegalias*	Hemoglobina (g/dL)	Plaquetas (x 10 ⁹ /L)
A (50-60%)	0, 1 ou 2 áreas		
B (30%)	3, 4 ou 5 áreas	≥ 10	≥ 100
C (<20%)	Não considerado	< 10	e/ ou < 100

Nota: * Uma área equivale a linfonodos > 1 cm no pescoço, axilas, regiões inguinais, ou aumento de baço ou aumento de fígado.

Fonte: (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008)

O estabelecimento do estadiamento clínico do paciente constitui o maior fator preditivo de sobrevida, de modo que quanto mais avançado o estágio da doença, a média de sobrevida equivale a um e dois anos. E quanto mais baixo o estágio, a média da sobrevida equivale a cerca de 10 anos (OLIVEIRA; NETO, 2004; ABBOTT, 2006).

Esses sistemas ainda são usados para indicar o início do tratamento, de modo que nos estágios 0 (Rai) e A (Binet) o mesmo não é indicado; nos estágios I e II (Rai) e B (Binet) o tratamento é opcional; e nos estágios III e IV (Rai) e C (Binet) o tratamento é necessário, independente da progressão da doença (KERSTING et al., 2016).

4.3.3 Patogênese

Ainda é desconhecida a etiologia da LLC, porém o fator de risco mais bem estabelecido é história familiar de neoplasia hematológica (SCHWARTZ; KLUG, 2016). Estudos em larga escala de sequenciamento revelam que mutações genéticas e alterações epigenéticas estão envolvidas, além de micro ácidos ribonucleicos (*Ribonucleic Acids*, RNAs) (mRNAs) desregulados também já terem sido identificados (ZENZ et al., 2010; SANDES et al., 2016).

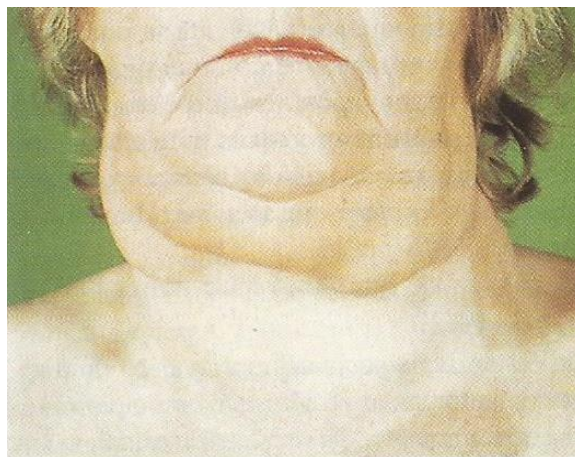
Radiação ionizante, materiais químicos como o benzeno e pesticidas utilizados na agricultura têm sido reconhecidos como fatores de risco para o desenvolvimento deste tipo de câncer, apesar de não haver evidências consistentes de que os mesmos estejam realmente envolvidos. Quimioterapia, tabagismo,

infecção pelo HTLV-1 (*Human T Lymphotropic Vírus type 1*), níveis financeiro e social também têm sido associados (KOOHI et al., 2015; SCHWARTZ; KLUG, 2016).

4.3.4 Quadro clínico

A evolução da doença é indolente em cerca de 50% dos casos, porém quando evolui de maneira mais agressiva pode cursar com os "sintomas B" típicos: febre acima de 38°C por duas semanas e/ou sudorese sem evidência de infecção, perda de peso acima de 10% nos últimos seis meses e fadiga extrema. Além de anemia (HAMERSCHLAK, 2010; SANDES et al., 2016), linfonodomegalias (aumento simétrico de tamanho dos linfonodos cervicais, axilares ou inguinais) - sinal clínico mais comum e maior motivo pelo qual os pacientes procuram atendimento médico (Figura 2), hepatoesplenomegalia (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008), além de perturbações imunes expressas em imunodeficiências e síndromes autoimunes (GARLEY et al., 2016) como, por exemplo, anemia hemolítica autoimune (AHAI) (SANDES et al., 2016).

Figura 2- LLC: linfonodopatia



Nota: Linfonodopatia cervical bilateral em mulher de 67 anos de idade, paciente de LLC.

Fonte: (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008)

Pelo fato dos linfócitos serem funcionalmente incompetentes, o paciente torna-se mais suscetível a infecções recorrentes (SANDES et al., 2016) que acabam sendo importantes causas de morbidade e mortalidade (GABE; ALMEIDA; SIQUEIRA, 2009) e que podem ser causadas por bactérias comuns como

Streptococcus pneumoniae, *Staphylococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes* e até mesmo infecções fúngicas causadas, por exemplo, por *Candida* sp. e *Aspergillus* ssp. e virais como, por exemplo, por citomegalovírus (CMV) e vírus herpes-zóster (Figura 3). Quadros de febre e suores noturnos são menos frequentes (SANTOS, 2013).

Figura 3- LLC: infecção por vírus herpes- zoster



Nota: Infecção por vírus herpes zoster, em região dorsal, em mulher de 68 anos de idade, paciente de LLC.

Fonte: (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008)

4.3.5 Tratamento

Em contraste com a maioria dos outros tipos de leucemia, a LLC não é necessariamente tratada no momento do diagnóstico, mas sim, após o início dos sintomas da doença (ZENS et al., 2010), como, por exemplo, em casos de organomegalias incomodativas, episódios hemolíticos e supressão da MO devido infiltração linfóide (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008). Em grande porcentagem dos pacientes, a LLC progride lentamente e não necessita de tratamento, no entanto, algumas características moleculares de risco podem ajudar a delinear, no momento do diagnóstico inicial, se os pacientes terão um curso mais agressivo, havendo a necessidade do tratamento (ABBOTT, 2006; GARLEY et al., 2016).

O tratamento é geralmente não curativo e é dirigido para reduzir os sintomas e não para normalizar as contagens de células sanguíneas (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008).

A imunoterapia, que se baseia no uso de anticorpos monoclonais (AcMo) que reconhecem um antígeno (Ag) específico da neoplasia, é o tratamento mais amplamente utilizado atualmente na LLC. Estes anticorpos recrutam uma resposta imunológica predominantemente por meio da opsonização das células cancerosas, sinalizando-as para serem destruídas por células efectoras via citotoxicidade celular dependente de anticorpo (*Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*, ADCC) e fagocitose celular dependente de anticorpo (*Antibody-Dependent cellular Phagocytosis*, ADP). Também pode provocar um recrutamento da cascata do complemento e citotoxicidade dependente de anticorpo (*Complement-Dependent Cytotoxicity*, CDC). Dentre os imunoterápicos mais utilizados estão o rituximab, ofatumumab, obinutuzumab (todos anti-CD20) e alemtuzumab (anti-CD52) (FREEMAN; GRIBBEN, 2016).

A quimioterapia, quando feita muito antecipadamente, pode diminuir a sobrevida do paciente ao invés de aumentá-la. A terapia com clorambucil (agente alquilante) diminui a carga da doença na maioria das vezes (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008) e é muito indicada para pacientes mais velhos que têm contraindicações para as drogas mais modernas. Uma limitação deste tratamento é o risco 2,5 vezes maior de desenvolvimento do quadro de LMA secundária, em pacientes com exposição prévia a agentes alquilantes (ABBOTT, 2006; SILVA, 2012).

Novos regimes de tratamento para LLC que incorporam análogos da purina aumentam as taxas de remissões moleculares completas, o que pode levar a melhores tempos de sobrevida (ABBOTT, 2006). O agente mais eficaz é a fludarabina, sendo o de primeira escolha em pacientes jovens e também naqueles resistentes ao clorambucil (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008).

A combinação de fludarabina, ciclofosfamida e rituximab, conhecido como regime FCR é o mais efetivo para o controle da LLC (DIELSCHNEIDER et al., 2016) pelo fato de induzir maiores taxas de resposta e maior sobrevida global, quando comparado ao uso de fludarabina e ciclofosfamida sozinhos (VITALE; BURGER, 2016). Esta combinação representa o padrão atual para pacientes não tratados que são jovens e em boas condições físicas (SILVA, 2012; ROSSI et al., 2016).

De acordo com estudo recente feito por Dielschneider et al. (2016) as células neoplásicas presentes na LLC possuem mais lisossomos e níveis aumentados de lipídeos de membrana, quando comparadas às células B normais. Dessa forma, por

meio do tratamento com a droga siramesine, as células neoplásicas são susceptíveis à morte celular mediada por lisossomos. Este medicamento promove uma permeabilização da membrana dos lisossomos, aumentando níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), promove ativação de catepsinas (as quais favorecem a degradação de proteínas anti-apoptóticas), de modo que uma peroxidação lipídica ocorre, resultando na permeabilização mitocondrial e, conseqüentemente, morte celular.

O transplante alogênico de CTHs é o único tratamento curativo para LLC e demonstra o potencial que uma resposta durável de uma célula T contra as células cancerosas da LLC pode ter. A evidência para um efeito de enxerto *versus* leucemia (*Graft – Versus - Leukaemia*, GVL) foi demonstrada pelo baixo risco de recaída observado após ocorrência de doença crônica de enxerto *versus* hospedeiro (*Chronic Graft - Versus Host - Disease*, GVHD). Em 2007, a Sociedade para Transplante de Medula Óssea Europeia (*Society for European Bone Marrow Transplantation*, EBMT) sugeriu sua utilização em pacientes de alto risco com características prognósticas pobres, que podem esperar uma redução significativa da expectativa de vida sob terapias alternativas (FREEMAN; GRIBBEN, 2016). Além de jovens com perfis genéticos desfavoráveis e pacientes com baixa resposta a terapia intensiva (ZENS et al., 2010).

Outras formas de tratamento incluem a radioterapia, mais utilizada para diminuição do volume dos linfonodos que não responderam à quimioterapia; reposição de imunoglobulina, para pacientes com hipogamaglobulinemia e infecções recidivantes; procedimento de esplenectomia, para pacientes com aumento grande e doloroso do baço (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008); além de outras combinações de tratamento que podem variar de acordo com as características laboratoriais do paciente, como no caso de alterações cromossômicas presentes (KERSTING et al., 2016).

4.4 Métodos laboratoriais utilizados para diagnóstico da LLC

4.4.1 Hemograma

O hemograma (HMG) pode fornecer grande diversidade de informações que, embora bastante inespecíficas, tornam esse exame uma indicação de primeira linha

na avaliação clínica de distúrbios e respostas do sistema hematopoiético e é hoje uma das provas mais acessíveis e solicitadas ao laboratório clínico (TORRELIO, 2011).

A análise das informações fornecidas do sangue periférico visa responder duas questões básicas: a primeira é se a MO está produzindo um número suficiente de células maduras de diferentes linhagens; e a segunda é se os processos de proliferação, diferenciação e desenvolvimento de funções de cada um dos tipos de células sanguíneas estão ocorrendo de maneira adequada (GROTTO, 2009).

Os parâmetros numéricos fornecidos pelos sistemas automatizados hematológicos e o exame morfológico das células à microscopia óptica podem responder a essas perguntas. De modo que a somatória dos aspectos quantitativos, morfológicos e o conhecimento fisiopatológico dos distúrbios da hematopoiese servem de grande auxílio diagnóstico em diversas condições clínicas, inclusive nas doenças hematológicas (GROTTO, 2009).

O diagnóstico da LLC geralmente acontece durante a fase assintomática da doença, por exemplo, por meio de um HMG de rotina realizado ou feito por qualquer outro motivo mais específico, de modo que se torna o primeiro exame laboratorial feito pelo paciente capaz de revelar o quadro patológico (SANDES et al., 2016).

O curso clínico da LLC é frequentemente complicado por citopenias autoimunes que podem afetar uma proporção significativa de pacientes. Estas complicações incluem anemia hemolítica autoimune (AHAI) em 7-10% dos casos, trombocitopenia imune (TPI) em 1-5% e, mais raramente, aplasia pura da série vermelha (APSV) e granulocitopenia autoimune (<1%), todas as quais podem ser primeiramente detectadas por meio do HMG (VISCO et al., 2014; CARLI et al., 2016).

Essas citopenias associadas à LLC são usualmente mediadas por autoanticorpos IgG que opsonizam os eritrócitos, granulócitos e as plaquetas, promovendo uma retirada acelerada destas células do sangue periférico para o fígado e baço. Autoanticorpos ou células-T autorreativas também podem prejudicar a produção de células sanguíneas ao interferir na maturação de eritroblastos ou megacariócitos na MO como no caso da APSV e TPI. Além disso, estudos *in vitro* têm demonstrado que as células *natural killer* (NK) são capazes de lisar diretamente eritroblastos (VISCO et al., 2014).

A combinação específica (simultânea ou sequencial) de TPI e AHAI que pode surgir secundariamente à LLC, é conhecida como síndrome de Evans (SE). Seu

curso clínico é crônico, com períodos de remissão seguidos de exacerbação e resposta variável à terapia (CARLI et al., 2016).

Segundo Carli et al. (2016) enquanto as citopenias autoimunes secundárias à LLC têm sido bem caracterizadas na literatura, existem pouquíssimos dados sobre SE secundária à LLC. Nenhuma publicação analisou especificamente este tema, de modo que os poucos dados existentes sobre o assunto podem ser extrapolados a partir de uma série de pacientes com citopenias secundárias à LLC publicados na literatura.

4.4.1.1 Eritrograma

O eritrograma demonstra a situação da série eritrocitária no momento da coleta do sangue periférico e constitui-se de contagem de eritrócitos, dosagem de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), índices hematimétricos e avaliação da morfologia eritrocitária (SANTOS, 2013).

O paciente com LLC pode ou não apresentar quadro de anemia (Figura 4) em grau variado (OLIVEIRA; NETO, 2004), sendo comum anemia normocítica em estágios avançados da doença (SANDES et al., 2016) e, como dito anteriormente, casos de AHAI secundária à LLC também podem ocorrer (VISCO et al., 2014). Deste modo, o valor de eritrócitos (4.500.000 a 6.000.000/mm³ para homens e 3.950.000 a 5.400.000/mm³ para mulheres) e de hemoglobina (12 a 16g/dL para mulheres e 14 a 18g/dL para homens) se apresentarão menores que o normal, e haverá presença de reticulocitose (> 85.000/mm³), a qual só estará ausente quando a função da MO estiver deprimida pela infiltração de células leucêmicas ou inibida devido à quimioterapia (OLIVEIRA, 2007; SANTOS, 2013; VISCO et al., 2014).

Casos de APSV secundários à LLC devem ser considerados em qualquer paciente com anemia e reticulocitopenia (< 85.000/mm³) evidentes no eritrograma (OLIVEIRA, 2007; SANTOS, 2013; VISCO et al., 2014).

4.4.1.2 Leucograma

O leucograma demonstra a contagem total de leucócitos, assim como a análise quantitativa e qualitativa dos diferentes tipos de leucócitos. Estão inclusas na

avaliação do leucograma a contagem, características morfológicas, proporções relativas, maturação e modificações (SANTOS, 2013).

O critério que define o diagnóstico da LLC inclui a presença de linfocitose com pelo menos $5 \times 10^6/L$ de linfócitos B, com o fenótipo característico da LLC, persistindo no sangue periférico por pelo menos 3 meses (BIASOLI; SPECTOR, 2015) e sendo esta linfocitose acima de 70% na contagem diferencial (Figura 4) (OLIVEIRA, 2007). Pró-linfócitos podem estar presentes em números variados, porém em valores acima de 55% recomenda-se a realização de diagnóstico diferencial com a leucemia pró-linfocítica (SANTOS, 2013; SANDES et al., 2016).

Casos de granulocitopenia autoimune secundária à LLC raramente ocorrem e devem ser suspeitados em pacientes com neutropenia isolada na contagem diferencial, com nenhuma outra causa aparente além da doença em questão (VISCO et al., 2014).

4.4.1.3 Plaquetograma

O plaquetograma é constituído pela contagem e análise da morfologia das plaquetas, além dos índices plaquetários (SANTOS; FILHO, 2004).

Na LLC as plaquetas podem estar diminuídas ($<150.000/mm^3$) ou normais ($150-450.000/mm^3$) em número (Figura 4) e, conforme a doença se agrava, na maioria das vezes há um proporcional aumento da trombocitopenia (OLIVEIRA; NETO, 2004; SANDES et al., 2016).

As causas mais comuns de trombocitopenia na LLC são esplenomegalia, insuficiência da MO secundária à infiltração neoplásica, quimioimunoterapia recente e a incapacidade de se recuperar uma contagem normal devido à displasia megacariocítica (VISCO et al., 2014).

Como dito anteriormente, casos de TPI secundária à LLC também podem ocorrer, a qual é caracterizada por queda (de pelo menos metade dos níveis iniciais e abaixo de $100 \times 10^9/L$) da contagem de plaquetas que não pode ser explicada por nenhum outro motivo (VISCO et al., 2014).

Figura 4- Hemograma representativo em caso de LLC

ERITROGRAMA		
Eritrócitos (milhões/mm ³)	4,91	
Hemoglobina (g/dL)	14,4	
Hematócrito (%)	44,8	
VCM (fL)	91,2	
HCM (pg)	29,3	
CHCM (g/dL)	32,1	
RDW (%)	13,9	
LEUCOGRAMA		
Leucócitos (/mm ³)	32.900	
Diferencial	%	/mm³
Neutrófilos	17	5.593
segmentados	17	5.593
bastonetes	0	0
metamielócitos	0	0
mielócitos	0	0
Promielócitos	0	0
Blastos	0	0
Linfócitos	80	26.320
Prolinfócitos	2	658
Monócitos	1,4	460
Eosinófilos	0	329
Basófilos	0	0
PLAQUETOGRAMA		
Plaquetas (/mm ³)	193.000	

Nota: Hemograma representativo de paciente com LLC, do sexo masculino, 60 anos, que apresenta linfadenomegalia de 2 cm em região cervical e axilar bilateral. Demonstra eritrograma e plaquetograma normais, porém leucograma alterado com linfocitose, neutropenia e monocitopenia.

Fonte: Modificado de (OLIVEIRA, 2007)

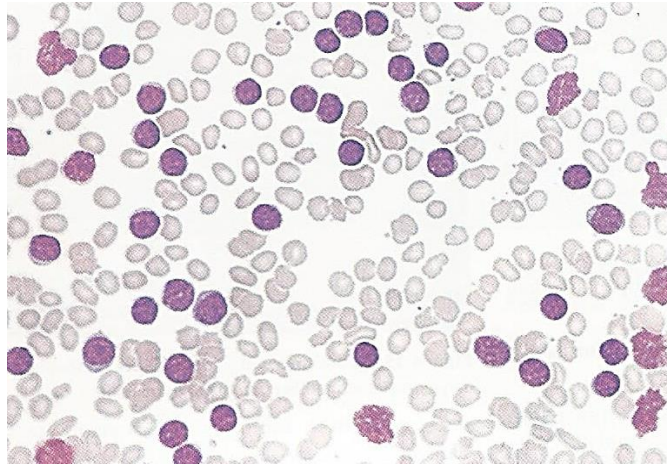
4.4.2 Análise morfológica da extensão sanguínea

A análise microscópica morfológica da extensão sanguínea é uma etapa fundamental para confirmar os resultados numéricos obtidos no HMG e para observar se a morfologia dos componentes sanguíneos se encontra sem alterações (OLIVEIRA, 2007).

A morfologia dos linfócitos leucêmicos (Figura 5) é caracterizada por tamanho pequeno, equivalendo de um a 1,5 eritrócitos; alta relação núcleo citoplasma; cromatina nuclear condensada separada em blocos por claros espaços; nucléolos

ausentes; contorno nuclear regular; citoplasma pouco basofílico e sem grânulos visíveis presentes (OLIVEIRA; NETO, 2004; MELO, 2008).

Figura 5- LLC: linfocitose

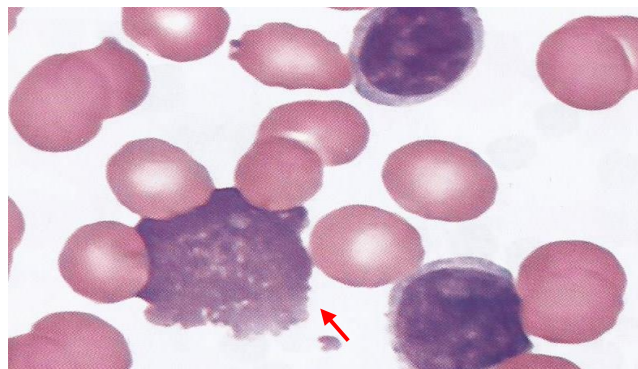


Nota: Distensão de sangue periférico demonstrando grande quantidade de linfócitos com fina borda de citoplasma, cromatina nuclear condensada e grosseira e núcleos ausentes.

Fonte: Modificado de (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008)

Frequentemente podem ser vistas manchas nucleares denominadas “*Gumprecht*” (Figura 6), que surgem durante a confecção da extensão sanguínea devido à fragilidade mecânica dos linfócitos anormais presentes (OLIVEIRA; NETO, 2004; MELO, 2008), as quais corroboram para o diagnóstico da doença, mesmo não estando presentes somente na LLC (SANTOS, 2013).

Figura 6- LLC: Linfócitos maduros e mancha nuclear (*Gumprecht*)

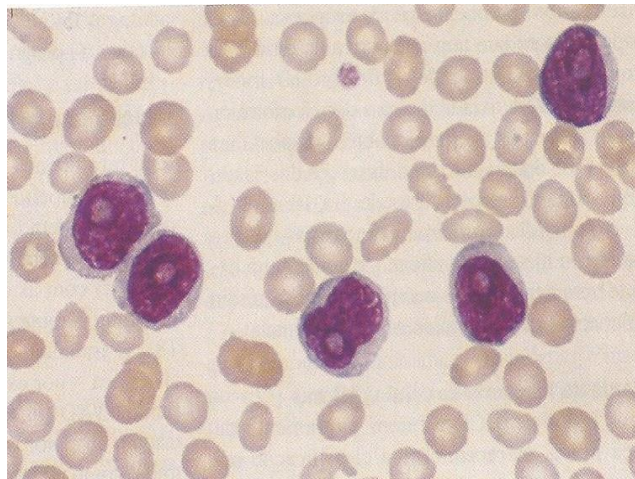


Nota: Distensão de sangue periférico demonstrando linfócitos maduros e mancha nuclear (*Gumprecht*) (seta) característica da LLC.

Fonte: Modificado de (MELO, 2008)

Já os pró-linfócitos (Figura 7) que podem ser encontrados na LLC apresentam tamanhos variados, maiores que 1,5 a 2 eritrócitos; cromatina condensada em grumos e heterogênea; nucléolo proeminente e geralmente central; baixa relação núcleo/ citoplasma; citoplasma pouco basofílico e sem grânulos visíveis (OLIVEIRA; NETO, 2004).

Figura 7- Pró-linfócitos



Nota: Distensão de sangue periférico demonstrando pró-linfócitos com nucléolo central proeminente e citoplasma abundante; os quais podem ser vistos em quadros de LLC.

Fonte: (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008)

A análise do esfregaço de sangue periférico também é muito importante para se excluir uma pseudo-trombocitopenia em caso de suspeita de TPI secundária à LLC baseada apenas no HMG (VISCO et al., 2014).

4.4.3 Biópsia de medula óssea, exames histopatológicos e imunohistoquímicos

A biópsia de MO (BMO) é um procedimento muito utilizado na prática clínica para diagnóstico de doenças metastáticas e hematológicas e também para o acompanhamento das últimas (CURY, 2003). Permite avaliar a quantidade de tecido hematopoiético medular, estudar o tecido conjuntivo presente e identificar comprometimentos neoplásicos que poderiam não ser detectados em esfregaços sanguíneos (ALVES, 2009).

Desde a primeira realização de punção aspirativa de MO feita por Arinkin, em 1929, para estudo citológico sistemático, o qual permite reconhecimento e descrição das células hematopoiéticas precursoras, inúmeras agulhas foram produzidas para uso, cada uma contendo características específicas como: ser menos traumática, mais confortável ao manuseio, possibilidade de obtenção de melhor quantidade de material medular e de preservar melhor o fragmento retirado (CURY, 2003), sendo a mais utilizada a de Jamshidi, introduzida em 1971 (ALVES, 2009).

A BMO geralmente é feita em crista ilíaca posterior, obtendo-se o conteúdo em um cilindro com diâmetro em torno de 2 milímetros (mm) e comprimento em torno de 20 a 30 mm (dependendo da profundidade da biópsia). A partir da obtenção do fragmento de MO é feito o processamento por técnicas histológicas para a análise histopatológica (ALVES, 2009).

Apesar de o mielograma - exame realizado a partir da punção aspirativa que preserva as características minuciosas das células hematopoiéticas e possibilita um completo estudo citoquímico (ALVES, 2009) - ser um procedimento mais simples e confortável do que a BMO, esta última fornece de maneira melhor que a citologia, dados importantes como o grau de celularidade medular. A realização da BMO praticamente não tem contraindicações, sendo a mesma realizada inclusive em portadores de doenças hemorrágicas sem observação de maiores danos (CURY, 2003).

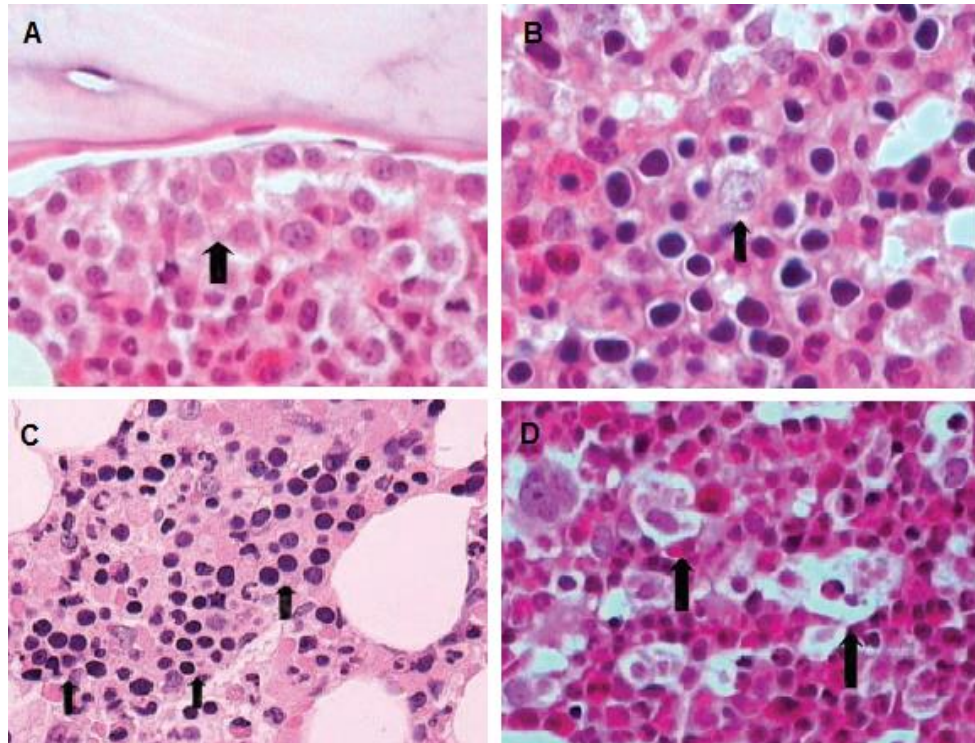
Os exames histopatológico e imunohistoquímico da BMO são de grande valor no diagnóstico, acompanhamento e avaliação global de doenças malignas de células B, incluindo a LLC. Até o final da década de 1990, a BMO foi considerada essencial na determinação do diagnóstico da mesma, no entanto mais recentemente, esta prática desvaneceu-se gradualmente e, talvez, tenha sido totalmente abandonada. As orientações do Instituto Nacional do Câncer (*Nacional Cancer Institute*, NCI) de 2008, determinam que um aspirado e BMO geralmente não são necessários para o diagnóstico da LLC e devem ser reservados para avaliar fatores que podem contribuir para citopenias, as quais podem ou não estar diretamente relacionadas com a infiltração de células leucêmicas na MO (BALIAKAS et al., 2013).

De acordo com as diretrizes do NCI, novas indicações para a realização da BMO na LLC são em casos de progressão clínica antes do início da terapia e para avaliação do tratamento, pelo menos no âmbito de ensaios clínicos. Em retrospectiva, uma possível razão para essa mudança na utilidade do exame foi o

fato de que o valor prognóstico da BMO pode agora ser substituído por novos marcadores prognósticos (BALIAKAS et al., 2013).

A BMO na LLC pode demonstrar uma alteração na arquitetura normal da MO (Figura 8), podendo apresentar padrão de infiltração linfocítica neoplásica de tipo nodular, intersticial ou difusa (Figura 9) (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008; SANDES et al., 2016). No padrão nodular o tecido hematopoiético normal é substituído, mas a arquitetura medular é preservada e nenhum padrão intersticial é observado; no padrão intersticial, as células leucêmicas são misturadas com elementos hematopoiéticos; e no padrão difuso a medula apresenta lesões sólidas difusas com a substituição completa de células hematopoiéticas e gordurosas. É comum ver a coexistência de vários padrões em uma única amostra de BMO, situação determinada como padrão misto (BALIAKAS et al., 2013). O tipo de infiltração medular reflete a carga tumoral e fornece algumas informações de prognóstico (HALLEK et al., 2008).

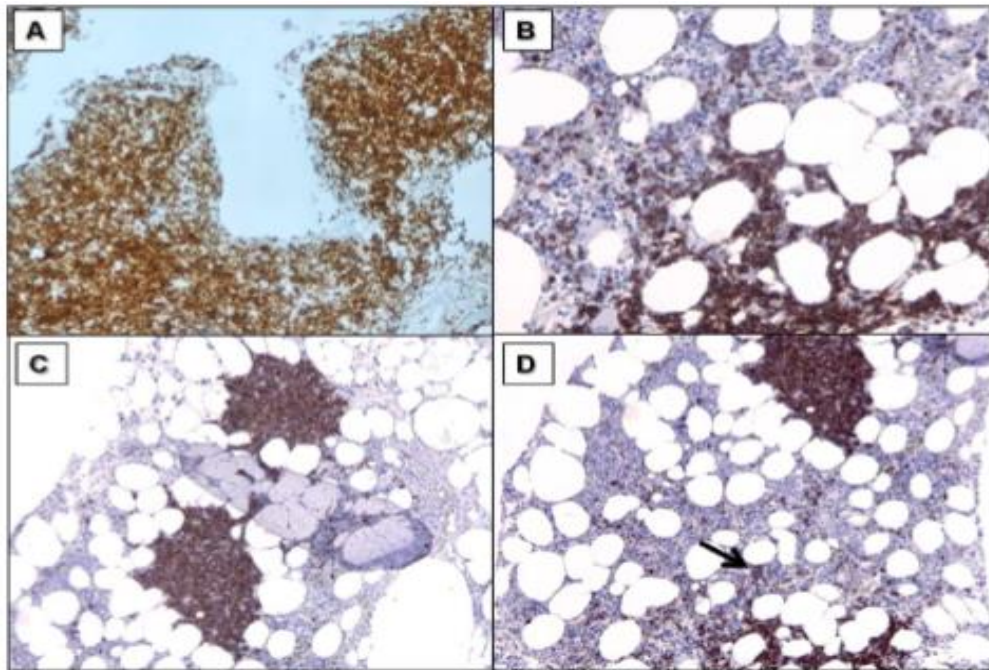
Figura 8- Histologia normal da MO



Nota: Demonstração de partes da arquitetura citológica da MO sem alterações: A) Precursores mieloides junto à trabécula óssea; B) Ilhota eritroblástica com proeritroblasto em posição central, indicado na seta; C) Ilhotas eritroblásticas típicas e D) Histiócitos com corpos apoptóticos.

Fonte: Modificado de (ALVES, 2009)

Figura 9- Padrões de infiltração da MO na LLC



Nota: Padrões de infiltração da MO na LLC: A) Difuso (CD79α), B) Intersticial (CD20), C) Nodular puro (CD20) e D) Misto de padrões nodular e intersticial (seta) (CD20).

Fonte: (BALIAKAS et al., 2013)

A extensão da infiltração neoplásica da MO na LLC é muito mais fielmente avaliada em amostras de biópsia do que em comparação a esfregaços de aspirado da MO devido à natureza multifocal da infiltração linfocítica, com variabilidade esperada no conteúdo de linfócitos dos esfregaços, especialmente se as células neoplásicas constituírem menos do que 30% do total de células. Além disso, outra grande vantagem da BMO sobre o esfregaço do aspirado é que só o primeiro permite a identificação do padrão da infiltração linfocítica neoplásica da MO (difusa *versus* não-difusa) que, quando combinada com informações imunofenotípicas, pode ser útil na distinção entre LLC e outra pequena infiltração linfocítica de células neoplásicas na MO e fornece informações de prognóstico (BALIAKAS et al., 2013).

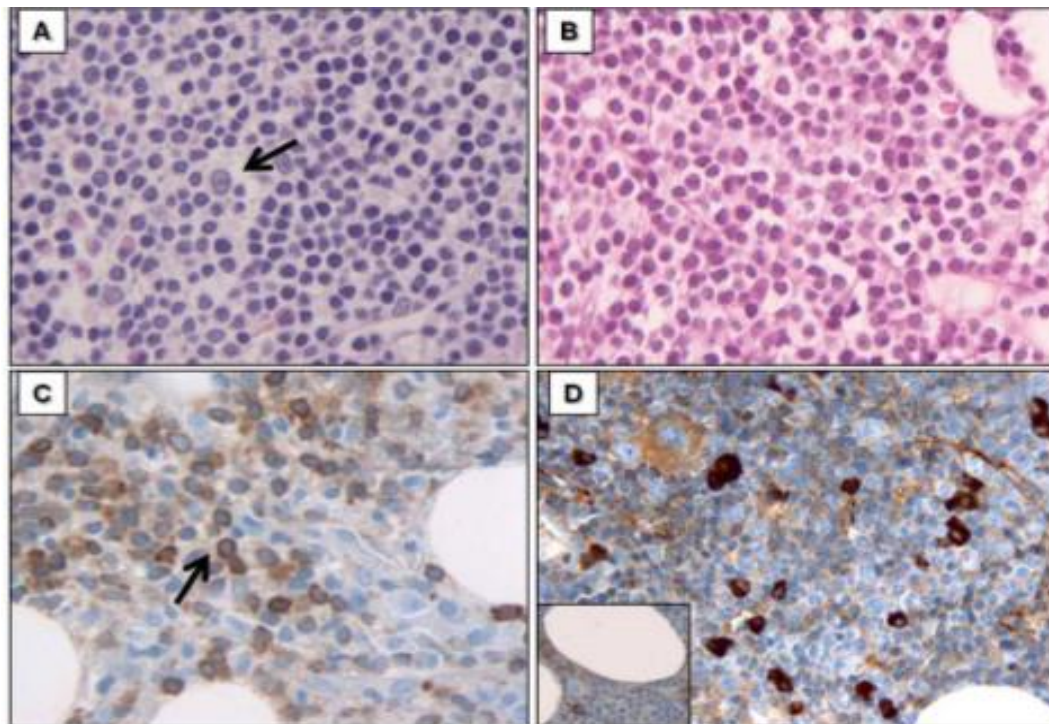
Estudos feitos na década de 1980 relataram que o padrão difuso de infiltração está associado a um pior prognóstico, enquanto, que o padrão não difuso (especialmente o nodular) está associado a um melhor prognóstico, possivelmente devido ao fato de que este padrão tem um perfil biológico distinto caracterizado pela expressão significativamente mais frequente do gene IGHV mutado e, em contraste, significativamente a menor prevalência de marcadores prognósticos adversos em

comparação aos outros padrões de infiltração, especialmente o difuso (BALIAKAS et al., 2013).

Este dado isolado de que os achados da BMO possuem valor prognóstico tem valor reduzido quando comparado aos parâmetros prognósticos bioquímicos e moleculares, assim também como o estadiamento. Em uma publicação de revisão da Clínica Mayo recomenda-se que o estudo da MO só deva ser feito antes do início da quimioterapia (SHANAFELT; CALL, 2004).

O exame detalhado da BMO no diagnóstico da LLC contribui para a análise do perfil celular (Figura 10) e imunohistologia da infiltração linfocitária neoplásica na MO e também para o diagnóstico diferencial da LLC frente a outros distúrbios linfoproliferativos ou outras doenças malignas de origem hematopoiética ou não (BALIAKAS et al., 2013).

Figura 10- Citologia da infiltração da MO na LLC



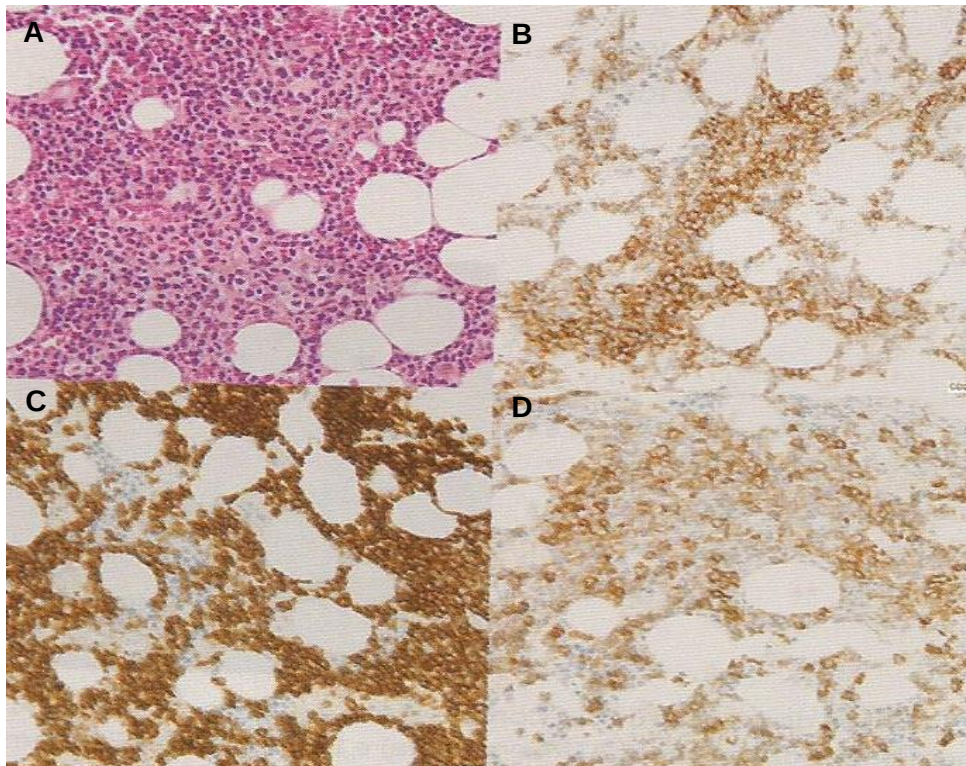
Nota: Células presentes na infiltração da MO: A) Predominantemente pequenos linfócitos neoplásicos com citoplasma escasso e um único paraimunoblasto com cromatina dispersa e nucléolo central (seta) (coloração HE); B) Células do tipo monócitóides com citoplasma claro (coloração HE); C) Diferenciação plasmocitóide (seta) (imunocoloração para IgM); D) Diferenciação plasmocítica com restrição da cadeia leve *lambda* (células plasmáticas expressando cadeia leve *kappa*- detalhe).

Fonte: (BALIAKAS et al., 2013)

Os exames de imunohistoquímica têm sido realizados e considerados um poderoso instrumento diagnóstico, especialmente, para identificação de neoplasias primárias, metastáticas e doenças específicas do tecido hematopoiético. Os antígenos (Ags) de interesse a serem pesquisados na MO dependem dos tipos celulares e doenças a serem identificadas como, por exemplo, mieloperoxidase (POX), lisozima, glicoforina e CD34 para doenças hematopoiéticas (ALVES, 2009).

Em casos duvidosos entre LLC e outras linfoproliferações B, como por exemplo, leucemia de células do manto e linfoma, a pesquisa de ciclina D1 por imunohistoquímica (Figura 11) no conteúdo da biópsia pode ser realizada para definir a doença em questão (SANDES et al., 2016), sendo que células leucêmicas da LLC geralmente são negativas para ciclina D1 (ZENS et al., 2010), enquanto que as linfoproliferações citadas se diferenciam da LLC por não expressarem CD23 e apresentarem ciclina D1 intracelularmente (ABBOTT, 2006).

Figura 11- BMO em paciente com LLC: infiltração intersticial



Nota: Biópsia de MO com infiltração intersticial na LLC: A) Pequenas células linfoides (CD20+, CD5+ e CD23+); B,C e D) Pesquisa de ciclina D1 por método imunohistoquímico.

Fonte: Modificado de (SANDES et al., 2016)

4.4.4 Citoquímica

A citoquímica pode ser entendida como o estudo dos constituintes químicos presentes nas células, por meio de produtos corantes, possibilitando a observação dos componentes à luz da microscopia. As colorações citoquímicas são de grande importância para identificação de tipos celulares e estabelecimento de critérios diagnósticos, inclusive nas doenças hematológicas. Constituem um valioso procedimento para o diagnóstico e classificação de leucemias e linfomas, em especial quando associadas ao estudo imunofenotípico. Essa pesquisa pode ser feita utilizando-se diferentes amostras como esfregaços de sangue periférico, *imprint* de MO e linfonodos (OLIVEIRA; NETO, 2004).

Existem substâncias comuns a todas as células, porém apenas algumas delas podem apresentar coloração para tais substâncias, o que demonstra que aquele tipo de coloração citoquímica tem sensibilidade suficiente para corar aquela substância naquele tipo celular específico. Isto não quer dizer que outros tipos celulares não possam conter tal substância. Outras vezes, mesmo que um determinado tipo celular contenha um elemento específico durante toda sua diferenciação e maturação, a técnica citoquímica só consegue detectá-la a partir de determinada fase evolutiva, o que na prática pode ser usado para revelar o grau de diferenciação e/ ou maturação celular (OLIVEIRA; NETO, 2004).

Esta técnica visa detectar principalmente a presença de enzimas intracelulares, que catalisam e controlam várias reações. A atividade destas enzimas é demonstrada pela adição de pseudo substratos, que levam a uma conversão enzimática colorida. As células sanguíneas normais e suas precursoras têm atividade e localização enzimática muitas vezes diferentes quando comparadas a seus correspondentes malignos, como no caso dos linfócitos da LLC (OLIVEIRA; NETO, 2004).

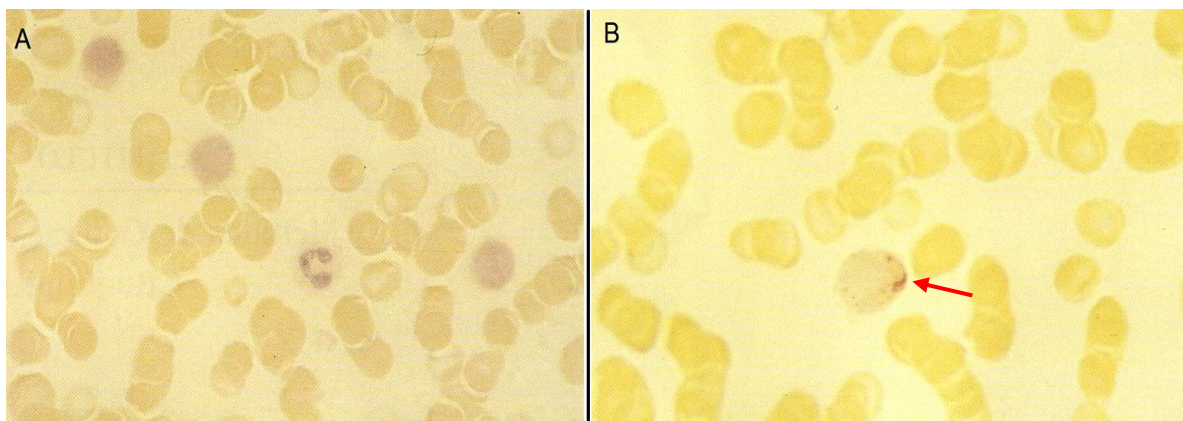
Para auxílio diagnóstico da LLC as principais reações citoquímicas utilizadas são: fosfatase ácida, mieloperoxidase (POX), PAS, sudan black B (SBB) e alfa- naftil acetato esterase (ANAE) (Tabela 3) (OLIVEIRA, 2008).

4.4.4.1 Fosfatase ácida

A fosfatase ácida (Figuras 12 e 13) é uma enzima lisossomal contida nos grânulos primários dos granulócitos, de modo que sua atividade é mais evidente nos promielócitos e mielócitos, que contém grande número desses grânulos (OLIVEIRA; NETO, 2004), porém também é encontrada em células pilosas, histiócitos, linfócitos e macrófagos ativados (ANDERSON; POULSEN, 2005). A detecção da sua atividade pode ser muito útil na distinção entre os vários subtipos de linfoblastos (OLIVEIRA; NETO, 2004).

Cerca de 95% dos casos de LLC são da linhagem B, com fosfatase ácida positiva nos elementos linfoides da linhagem T, porém negativo para os da linhagem B (OLIVEIRA; NETO, 2004).

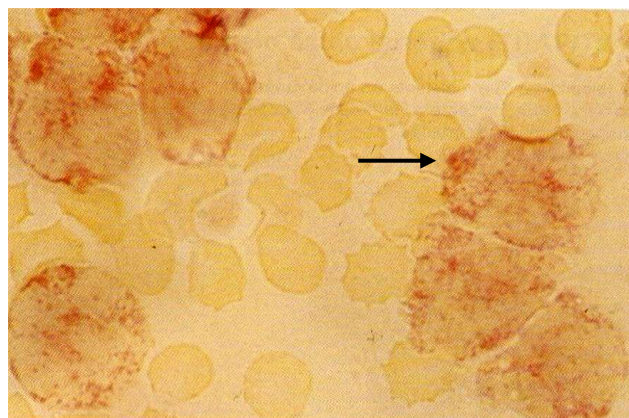
Figura 12- Reação da fosfatase ácida com inibição pelo ácido tartárico



Nota: A) Reação negativa; B) Reação positiva (seta).

Fonte: Modificado de (ANDERSON; POULSEN, 2005)

Figura 13- Reação da fosfatase ácida sem inibição pelo ácido tartárico



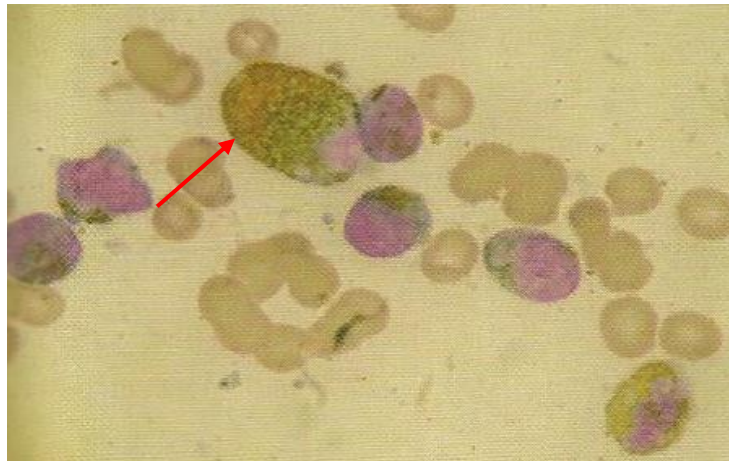
Nota: Reação positiva (seta).

Fonte: Modificado de (ANDERSON; POULSEN, 2005)

4.4.4.2 Mieloperoxidase (POX)

A POX (Figura 14 e 15) é uma enzima lisossomal localizada nos grânulos dos neutrófilos, monócitos e eosinófilos, podendo estar presente também em megacariócitos e plaquetas. É capaz de catalisar a oxidação de substâncias pelo peróxido de hidrogênio, de acordo com a equação: $\text{XH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{POX}} \text{X} + 2\text{H}_2\text{O}$, em que X é a substância oxidada ou indicador. A presença de atividade da POX nas células é indicada pela oxidação (com revelação de cor) da substância ou indicador (OLIVEIRA; NETO, 2004).

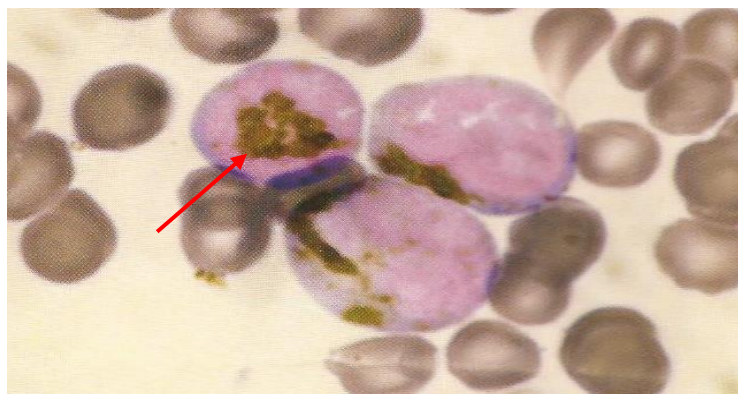
Figura 14- Reação da POX



Nota: Reação positiva (seta).

Fonte: Modificado de (OLIVEIRA; NETO, 2004)

Figura 15- Blastos com moderada a forte atividade para peroxidase



Nota: Reação positiva (seta).

Fonte: Modificado de (OLIVEIRA, 2007)

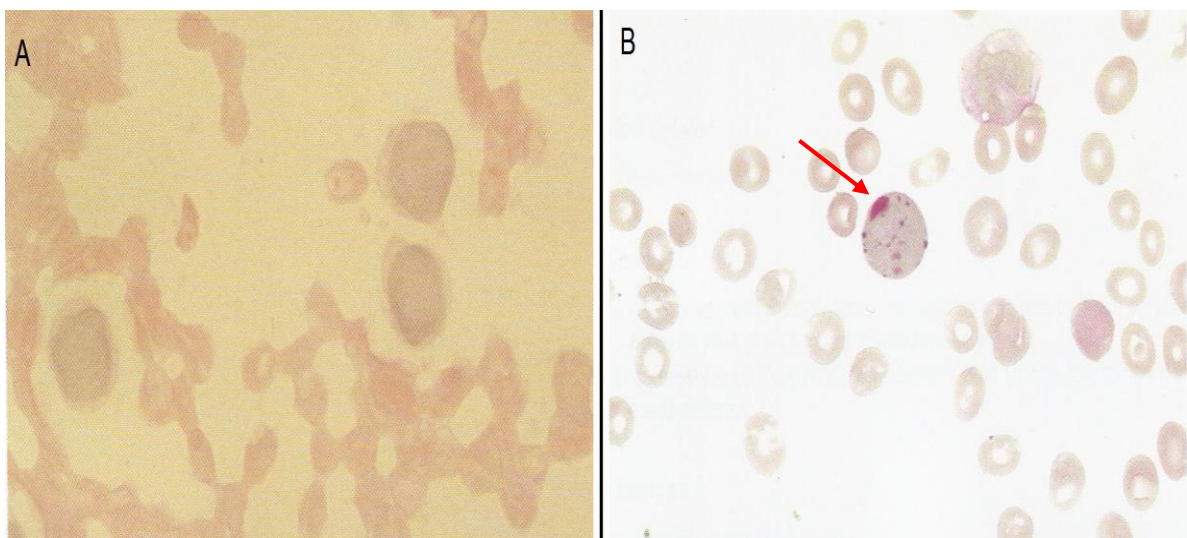
A POX está ausente em linfócitos normais e esta condição não muda nos linfócitos neoplásicos, de forma que a reação de POX na LLC é negativa (OLIVEIRA; NETO, 2004).

4.4.4.3 Ácido periódico de *Schiff* (*Periodic Acid- Schiff, PAS*)

O PAS é um agente oxidante que converte em aldeído os grupos hidróxidos de carbono, formando um complexo de cor vermelha no citoplasma das células, resultante da presença do reativo de *Schiff* (pararosanilina e metabissulfato de sódio). A leitura do PAS pode ser feita através do padrão granular, difuso ou em blocos. Esta reação é positiva na presença de polissacarídeos, mucopolissacarídeos e glicoproteínas (OLIVEIRA, 2008).

Células PAS positivas terão grãos com uma coloração entre o róseo e o vermelho (Figura 16), que podem ser caracterizados como *score* de zero (negativo) a quatro cruzes (4+). Estas células incluem neutrófilos, mielócitos neutrófilos, monócitos, megacariócitos, plaquetas, eritroblastos patológicos, linfócitos normais, maioria dos blastos leucêmicos e também linfócitos patológicos (reação mais intensa que nos normais) (OLIVEIRA; NETO, 2004), incluindo os presentes na LLC que são, portanto, PAS positivos (OLIVEIRA, 2008).

Figura 16- Reação do PAS



Nota: A) Reação negativa; B) Reação positiva (seta).

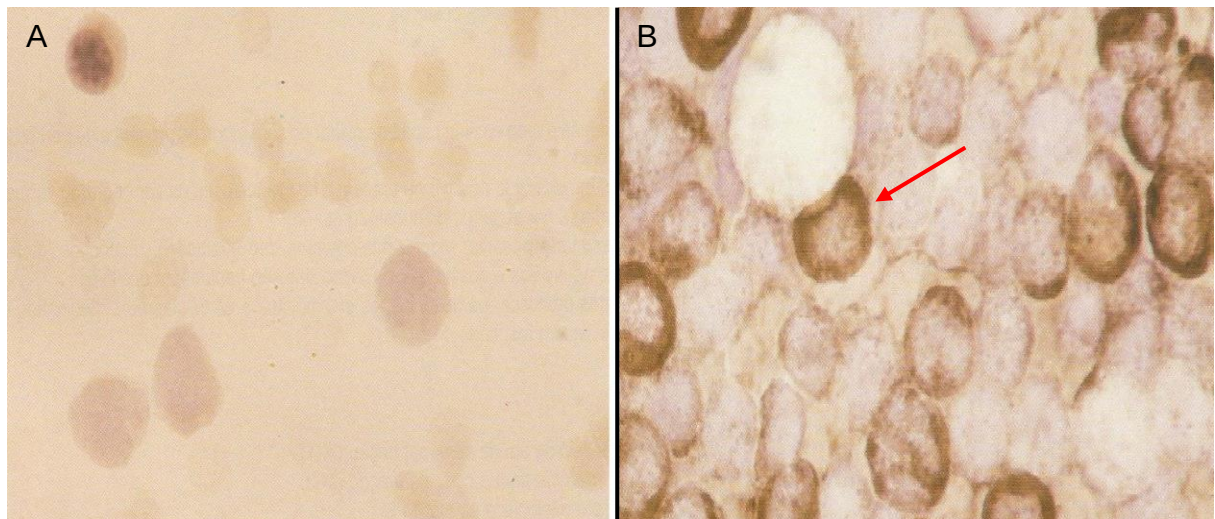
Fonte: Modificado de (ANDERSON; POULSEN, 2005)

4.4.4.4 Sudam Black B (SBB)

O SBB (Figura 17) é uma substância lipossolúvel muito usada para demonstração de lípides em células sanguíneas que, apesar de os conterem em seu citoplasma, membrana plasmática e algumas organelas, não são exibidos pelas colorações *Romanowsky*. Em contato com os lípides celulares o SBB difunde-se e é fragmentado por entre essas moléculas e à solução corante, de modo a conferir às moléculas lipídicas uma coloração escura (OLIVEIRA; NETO, 2004).

Cora as linhagens granulocítica (positivo forte), monocítica (reações em graus variados de positividade)- tornando-se mais intensa em células com maior grau de maturação- e eosinófilos (fracamente). Porém, é negativo nos mieloblastos normais; nas séries megacariocítica e eritroide; e também nas células linfoides, inclusive nos linfócitos presentes na LLC. É muito usado para distinguir as LLAs das LMAs e é interpretado similarmente com as reações da POX (OLIVEIRA; NETO, 2004).

Figura 17- Coloração pelo SBB



Nota: A) Reação negativa; B) Reação positiva (seta).

Fonte: Modificado de (ANDERSON; POULSEN, 2005)

4.4.4.5 Esterases

As esterases são enzimas que catalisam a hidrólise de um éster em um álcool e um ácido: $\text{RCOOR} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCOO} + \text{ROH}$, agem em pH ótimo (que varia de 5 a 9)

com uma variedade de substratos diferentes e que respondem diferentemente aos inibidores usuais. Podem ser específicas ou inespecíficas; as específicas agem somente sobre granulócitos e correspondem aos subtipos 1, 2, 7, 8 e 9, por exemplo, naftol ASD cloroacetato (cloroacetato esterase); já as inespecíficas agem sobre granulócitos, linfócitos T e células monocitoides e correspondem aos subtipos 3, 4, 5 e 6, por exemplo, α -naftil acetato esterase (ANAE) (OLIVEIRA; NETO, 2004).

A ANAE (Figura 18, 19 e 20) é uma esterase inespecífica ausente em linfócitos B normais, cuja condição não é alterada nos linfócitos neoplásicos, de forma que esta reação na LLC é negativa (OLIVEIRA; NETO, 2004).

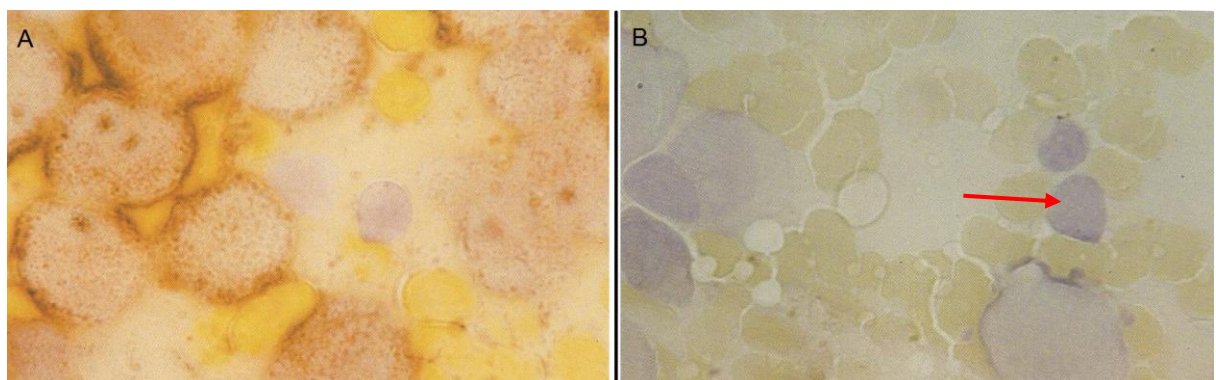
Figura 18- Reação de ANAE em célula monocítica



Nota: Reação positiva (seta).

Fonte: Modificado de (OLIVEIRA; NETO, 2004)

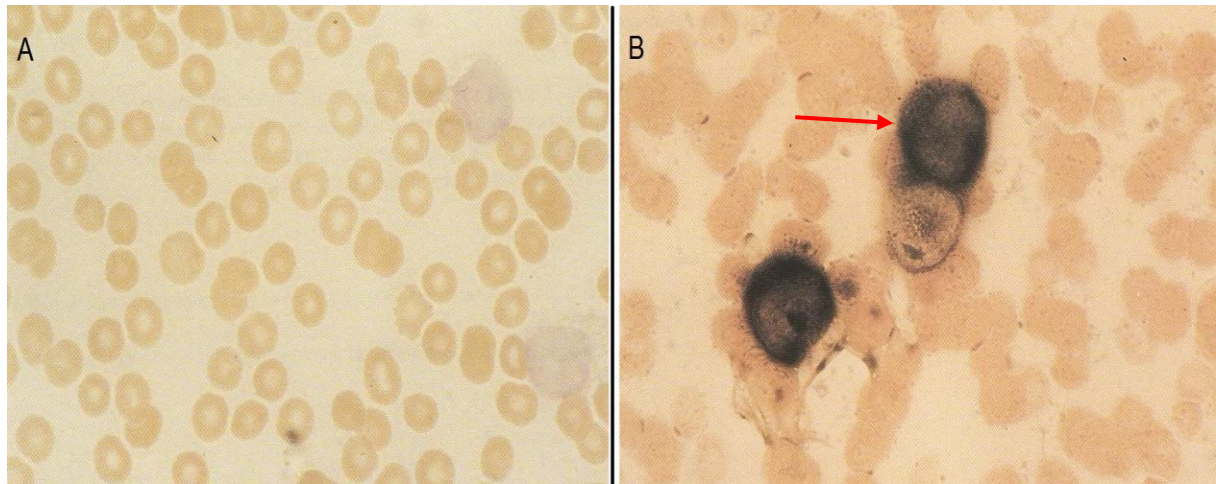
Figura 19- Reação inespecífica da esterase com inibição pelo flúor



Nota: A) Resultado negativo da inibição; B) Resultado positivo da inibição (seta).

Fonte: Modificado de (ANDERSON; POULSEN, 2005)

Figura 20- Reação inespecífica da esterase sem inibição pelo flúor



Nota: A) Resultado negativo; B) Resultado positivo (seta).

Fonte: Modificado de (ANDERSON; POULSEN, 2005)

Tabela 3- Resumo dos resultados das reações citoquímicas utilizadas para auxílio diagnóstico na LLC-B

Reação Citoquímica	Resultado
Fosfatase ácida	Negativo
POX	Negativo
PAS	Positivo
SBB	Negativo
ANAE	Negativo

Fonte: Modificado de (OLIVEIRA; NETO, 2004)

4.4.5 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Precursos de linfócitos B normais e malignos apresentam similaridades morfológicas quando analisados por microscopia, porém suas estruturas possuem diversos tipos de moléculas com diferentes funções, as quais necessitam de uma caracterização mais específica para identificação da origem celular. A imunofenotipagem permite essa distinção porque identifica o exato tipo de célula que compõe determinado tecido, através da interação entre AcMo e Ags de membrana, citoplasmático ou intracelular (WOHLFAHRT et al., 2015).

A imunofenotipagem por citometria de fluxo (CMF) fornece uma análise simples, rápida e adequada em procedimentos de triagem clínica. Essa técnica permite identificar um perfil celular mesmo que este esteja presente em populações pequenas, por meio da múltipla coloração fluorescente das células em análise, tecnologia a laser e métodos de separação celular, podendo contribuir para o diagnóstico, a classificação, estadiamento, prognóstico e monitoramento de malignidades hematológicas, assim como na caracterização fenotípica das células hematopoiéticas anormais (QUIXABEIRA; SADDI, 2008; WOHLFAHRT et al., 2015).

Esta técnica avalia as propriedades celulares, por meio de uma metodologia em que as células se movem em uma solução isoeletrolítica, por meio de um conjunto de detectores de fluorescência. Em 1979 foi definida por Mendelsohn como sendo o movimento de uma suspensão celular, que atravessa uma a uma um canal de fluxo, promovendo o desvio da luz incidente sobre ela e que é medido por um detector. Consiste em uma técnica multiparamétrica que utiliza AcMo marcados com moléculas que emitem fluorescência (fluorocromos), a fim de analisar qualitativa e quantitativamente os padrões de expressão de Ags, denominados “*clusters of differentiation*” (CDs) na população celular de interesse. A metodologia permite a análise de 10^5 a 10^6 células por minuto, medindo simultaneamente as propriedades físicas e químicas de tais células, oferecendo objetividade, sensibilidade, especificidade, rapidez e precisão na análise das características celulares, permitindo uma avaliação multiparamétrica de um grande número de células em pequeno intervalo de tempo (QUIXABEIRA; SADDI, 2008).

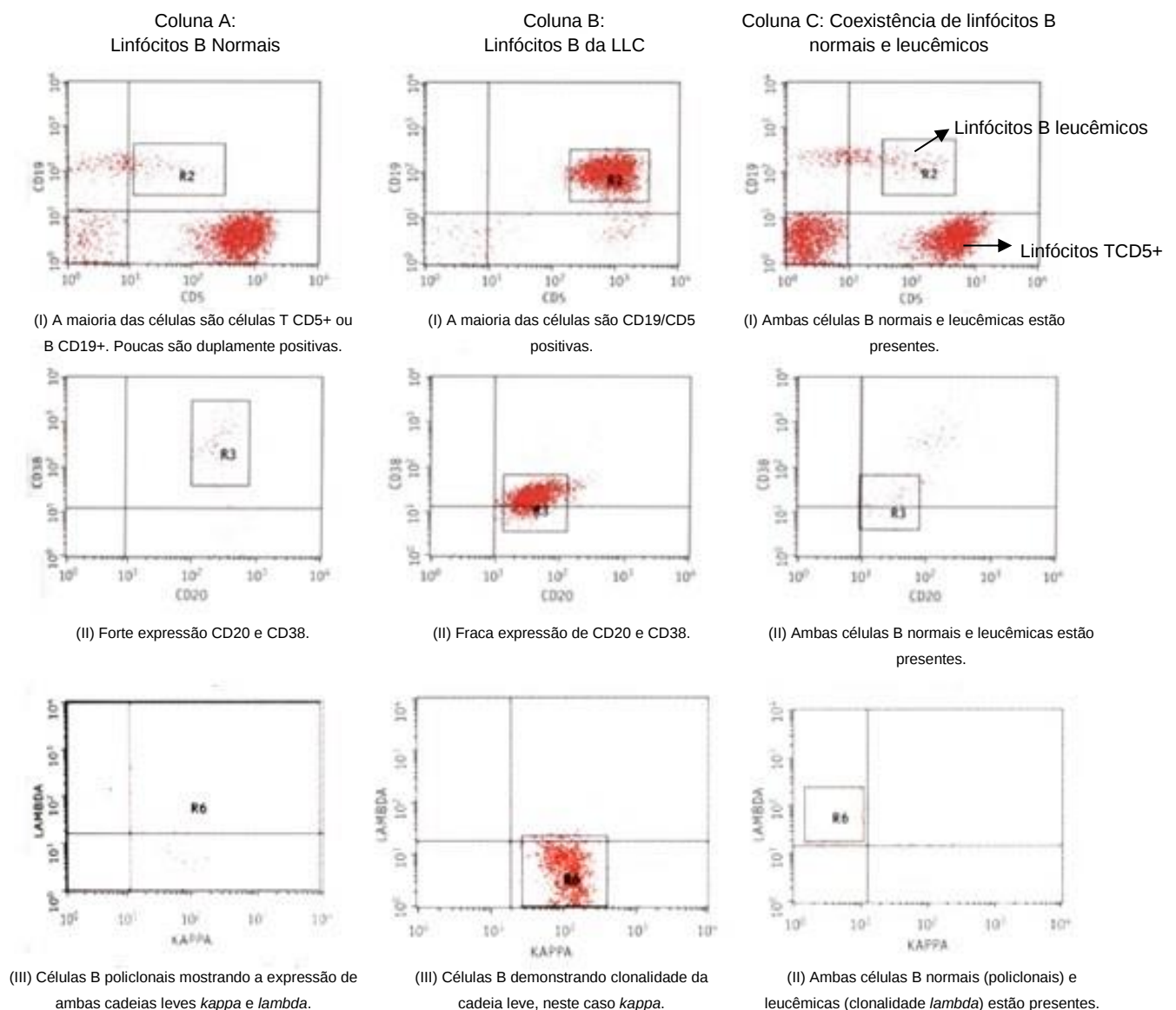
Os parâmetros celulares avaliados pelo método podem ser divididos em dois principais grupos: os evidenciados pela luz dispersa, que refletem o tamanho celular (*forward scatter*, FSC) e complexidade interna (*side scatter*, SSC); e os associados à presença de um ou mais anticorpos marcados com fluorocromos que reconhecem moléculas celulares específicas, refletindo características fenotípicas importantes, como grau de diferenciação celular, linhagem celular, ploidia, expressão de proteínas apoptóticas, dentre outras (QUIXABEIRA; SADDI, 2008).

A CMF é uma tecnologia exata, porque o processo analítico é altamente controlado e os dados expressos quantitativamente. É visível, pois grande parte da análise é baseada no reconhecimento dos padrões visuais dos *dot plots*, onde os *plots* de densidade e contorno podem ser utilizados para identificar anormalidades, acrescida da expressão de diversos marcadores identificados pela ligação a

anticorpos específicos conjugados a fluorocromos. Finalmente, a multiplicidade é uma característica crescente da hematocitometria, pois os aparelhos atuais perfazem análise policromática de seis ou mais parâmetros, facilitando sobremaneira a avaliação de doença residual mínima (DRM) (VASCONCELOS, 2007).

A distinção entre células hematopoiéticas anormais e células normais presentes na amostra é baseada nos padrões fenotípicos que diferenciam tais populações celulares (Figura 21).

Figura 21- CMF (dot plots) demonstrando padrões de expressão em linfócitos normais, leucêmicos e coexistências imunofenotípicas em ambos tipos de células



Fonte: Modificado de (BAIN et al., 2012)

Células leucêmicas apresentam características imunofenotípicas de células normais, porém bloqueadas em um estágio de maturação. Fenótipos aberrantes de células leucêmicas misturam determinantes antigênicos de linhagens celulares mieloide e linfoide, assincronia de expressão gênica, fenótipos ectópicos e diferenciação anormal, dentre outras características. Estes fenótipos aberrantes traduzem as anormalidades genéticas presentes nestas células (QUIXABEIRA; SADDI, 2008).

De acordo com o Consenso da Segunda Conferência da América Latina para Imunofenotipagem de Malignidades Hematológicas por Citometria de Fluxo, ocorrido em 2005, no México, os painéis de AcMo utilizados na imunofenotipagem são montados de acordo com os sinais clínicos dos pacientes e os achados morfológicos e citoquímicos previamente analisados. No caso das neoplasias crônicas de células da linhagem B (Tabela 4), faz-se necessário o estudo individualizado das cadeias *kappa* e *lambda*, bem como das imunoglobulinas íntegras (QUIXABEIRA; SADDI, 2008).

Tabela 4- Marcadores utilizados para imunofenotipagem por CMF

	Linhagem	Maturação celular	Subclassificação	Marcadores opcionais
LLA-T	CD2, CD7, CD3cy	CD34, TdT, CD45		
LLA-B	CD19, CD79 ^α	HLA-DR, CD34, CD45	CD10, Igs d e membrana	CD20, CD38
LMA	MPOcy, CD13, CD33, CD117 ^α	HLA-DR, CD34, CD45	CD15	CD36, CD64
LLC-B	CD19, CD56, Kappa, Lambda		CD5, CD22, CD23, FMC7, CD10, CD38, CD11c, CD103, CD25, CD16	
LLC-T	CD4, CD8, CD3, CD56		CD7, TCR ^{αβ}	

Fonte: (QUIXABEIRA; SADDI, 2008)

A análise imunofenotípica por CMF de células imaturas da linhagem linfoide permite identificar de qual tipo celular se trata (células B ou T) e o fenótipo dessas células em diferentes estágios de maturação (WOHLFAHRT et al., 2015).

Os padrões fenotípicos dos precursores linfoides são divididos em três estágios de maturação: imaturo, intermediário e maduro (Tabela 5). Os CDs que caracterizam os precursores imaturos de linfócitos B na MO normal são o CD34, CD22, CD19- marcador de célula B, porém pouco expresso nas células imaturas-, CD10, desoxinucleotidil transferase terminal (*terminal deoxynucleotidil transferase*, TdT)- enzima marcadora de linfócitos B e T imaturos. Na transição do estado imaturo para intermediário, estas células perdem a expressão de TdT e de CD34, diminuem a intensidade da expressão de CD10 e aumentam a expressão de CD45 para níveis intermediários, com aumento também de CD19. Durante a fase de maturidade, estas células adquirem em sua superfície membranar a imunoglobulina de classe M (IgM)- marcador de células B maduras- e apresentam alta expressão de CD45 e baixa ou nula intensidade de expressão de CD10 (WOHLFAHRT et al., 2015).

Tabela 5- Imunofenótipo dos precursores normais da linhagem linfóide B

Antígeno	Imaturo	Intermediário	Maduro
CD22	↓	↓	↑
CD34	↑	—	—
TdT	↑	—	—
CD19	↓	+	↑
CD10	↑	+	—/↓
CD45	↓	+	↑
IgM	—	—	+

Nota: Classificação dos precursores linfóides B de acordo com a presença e intensidade da expressão de Ags nas células. Símbolos: (-) falta na expressão do Ag; (+) presença da expressão do Ag; (↑) aumento na intensidade de expressão; (↓) diminuição na intensidade de expressão.

Fonte: Modificado de (WOHLFAHRT et al., 2015)

A disponibilidade de valores de referência obtidos pela CMF para as diversas populações de leucócitos distribuídas na MO de indivíduos saudáveis pode ser útil para identificar variações normais e anormais na hematopoiese e são, portanto, úteis como primeira triagem de indivíduos com suspeita de neoplasias ou outras doenças hematológicas. Estudos recentes têm demonstrado que a diferenciação das células

brancas do sangue por CMF é tão confiável quanto uma citologia padrão (BROOIMANS et al., 2009).

Os linfócitos presentes na LLC apresentam tipicamente um imunofenótipo altamente distintivo, com positividade para CD5, CD19 e CD23. O *score* da CMF (Tabela 6) para identificação da LLC é muito útil para um diagnóstico diferencial, já que casos típicos de LLC têm *score* de 4-5 e outros linfomas indolentes têm geralmente *score* de 0-2 (SMOLEJ; SIMKOVIC, 2016).

Tabela 6- Score da CMF para diagnóstico de LLC

Marcador	Pontos	
	1	0
CD5	Positivo	Negativo
CD23	Positivo	Negativo
slg	Fraco	Forte
CD79b	Fraco	Forte
FMC7	Negativo	Positivo

Nota: slg- Imunoglobulina de superfície

Fonte: Modificado de (SMOLEJ; SIMKOVIC, 2016)

O perfil imunológico dos linfócitos presentes na LLC é definido por níveis fracos de expressão de imunoglobulinas (Ig) na superfície da membrana (na maioria das vezes IgM ou IgM e IgD) e expressão dos Ags de células B CD23, CD19 e CD20 (fraco), com a co-expressão de CD5. Geralmente são negativas para CD10, e há também normalmente a fraca ou nula expressão de CD22, CD79b (ZENS et al., 2010) e a expressão de FMC7 deveria ser ausente (KERSTING et al., 2016).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as células da LLC são identificadas imunofenotipicamente como positivo para: imunoglobulinas de superfície monotípicas de fraca expressão; forte expressão de CD5, CD23, CD19, CD79 α ; fraca expressão de CD20 e CD22. Em contraste, são geralmente negativos para imunoglobulinas citoplasmáticas, CD11c, CD79 β , CD25 e FMC7; com muitas poucas exceções, principalmente na LLC atípica (BALIAKAS et al., 2013).

Dentre os variados imunofenótipos encontrados com importância prognóstica, inclui-se a expressão do CD38 (ZENS et al., 2010), o qual confere pior prognóstico.

Porém, é necessário salientar que a pesquisa desse marcador está cercada de dificuldades técnicas que não devem ser consideradas para a correta interpretação dos resultados. Além disso, o marcador CD38 frequentemente apresenta uma distribuição bimodal, ou seja, com parte das células neoplásicas negativas e parte positiva na mesma amostra. Também apresenta variabilidade de expressão associada à origem da amostra (sangue *versus* MO) e variabilidade associada ao tratamento (REGO; SANTOS, 2009).

De acordo com Rusak et al. (2011), a determinação da expressão de CD38 permite a identificação de pacientes com a natureza potencialmente progressiva de leucemia independentemente do estado clínico. Deve ser lembrado que a expressão de CD38 tende a flutuar no decorrer da doença. Em estudo realizado ainda pelo mesmo autor, os resultados também demonstram uma correlação fortemente negativa da expressão de CD38 e ZAP-70 (*zeta-associated protein 70*) em linfócitos da LLC-B, com a vulnerabilidade dos mesmos a apoptose (RUSAK et al., 2011).

A presença do marcador CD5 não configura com propriedade uma aberração fenotípica, visto que uma pequena porcentagem de linfócitos B normais apresenta expressão desse marcador (especialmente linfócitos B do sangue periférico e população normal CD5 positiva também ocorre na MO). Ademais, células B CD5 positivas podem ser encontradas em linfonodos, especialmente em pacientes com doença autoimune. Portanto, a interpretação da expressão de CD5 em populações de células B depende da avaliação conjunta de outros marcadores imunofenotípicos, análise de monoclonalidade de slg, bem como avaliação clínica e correlação com a avaliação da MO (REGO; SANTOS, 2009).

A presença de baixa expressão conjunta de slg e outras moléculas relacionadas ao receptor de membrana de célula B, como o CD20, CD22 e CD79b, é um achado sugestivo de LLC. Portanto, os resultados da CMF devem sempre ser interpretados em conjunto com a avaliação clínica, morfológica e, em alguns casos, análise genotípica para um diagnóstico diferencial com o LDGCB e a LP (REGO; SANTOS, 2009).

Pela identificação de Ags associados à linhagem, as neoplasias de células linfoides maduras podem ser divididas em neoplasias da linhagem B, T ou NK (Tabela 7) (REGO; SANTOS, 2009).

Tabela 7- Classificação das doenças linfoides crônicas, segundo a linhagem celular de origem

Células B	Células T ou NK
Leucemia linfocítica crônica	Leucemia prolinfocítica
Leucemia prolinfocítica	Clássica
Tricoleucemia	Variante de células pequenas
Clássica	Doença linfoproliferativa de linfócitos granulares
Variante	Células T
Linfomas não-Hodgkin em fase leucêmica	Células NK
Linfoma esplênico de linfócitos vilosos	Síndrome de Sézary
Linfomas foliculares	Leucemia- linfoma de células T do adulto
Linfoma linfoplasmocitoide/ Imunocitoma	Linfomas T- periféricos
Linfoma de células do manto	
Outros	

Nota: Apresentação da classificação das doenças linfoides crônicas que podem apresentar-se com células circulantes passíveis de caracterização imunofenotípica por CMF.

Fonte: Modificado de (REGO; SANTOS, 2009)

A CMF permite identificar células com imunofenótipo anormal dentro da população de células maduras da linhagem B. Existem duas evidências a favor da presença de doença neoplásica que são pesquisadas neste contexto: a monoclonalidade para a cadeia leve da imunoglobulina de superfície (ou *kappa* ou *lambda*) e alterações de expressão antigênica relacionadas com doenças específicas. Neoplasias da linhagem B habitualmente representam um único clone derivado de uma célula com slg *kappa* ou *lambda*. Esse fato está em contraste com o padrão policlonal que ocorre na extensa maioria dos casos de linfocitose reativa (REGO; SANTOS, 2009).

Nos últimos vinte anos, estudos de CMF estabeleceram em grande parte as características antigênicas das leucemias. Na atualidade, mais de trezentas moléculas relacionadas aos leucócitos são conhecidas (VASCONCELOS, 2007).

Além disso, a CMF é fundamental para a distinção entre LLA e LMA, subtipagem imunológica e predição de anormalidades biomoleculares cariotípicas, expressão de marcadores prognósticos, descoberta de moléculas potencialmente exploráveis como objetivo para imunoterapia (CD20, CD52, CD33), determinação de

presença e quantificação do número de células na DRM, avaliação de clonalidade de células B e T, entre muitas outras características passíveis de identificação (VASCONCELOS, 2007).

Em estudo realizado por Lopes (2010) amostras de sangue periférico de 80 pacientes com LLC-B foram analisadas por CMF multiparamétrica juntamente com análises hematológicas de rotina, com um painel de AcMo: CD45/CD14, CD3/CD19/CD45, CD4/CD8/CD3, CD20/CD5/CD3, CD3/CD16-56/CD45, CD2/CD7, FMC7/CD23, CD103/CD22/CD20, HLADR/CD38, CD10/CD19, CD1a, CD11b além de IgM/gD, e cadeias leves das imunoglobulinas *kappa* e *lambda* visando a detecção de Igs e do perfil de restrição clonal das cadeia leves das imunoglobulinas. As células neoplásicas demonstraram um fenótipo característico para LLC- B (CD5+/CD19+/CD20+/HLADR+/CD23+) na maioria dos casos, associados à ausência de expressão para marcadores de células T (CD1a, CD2, CD4, CD3, CD7, CD8), CD103, CD14 e FMC7.

A presente observação destaca a importância da imunofenotipagem para correto diagnóstico das síndromes linfoproliferativas crônicas e sendo o painel de AcMo utilizado capaz de estabelecer a confirmação diagnóstica da LLC-B (LOPES, 2010).

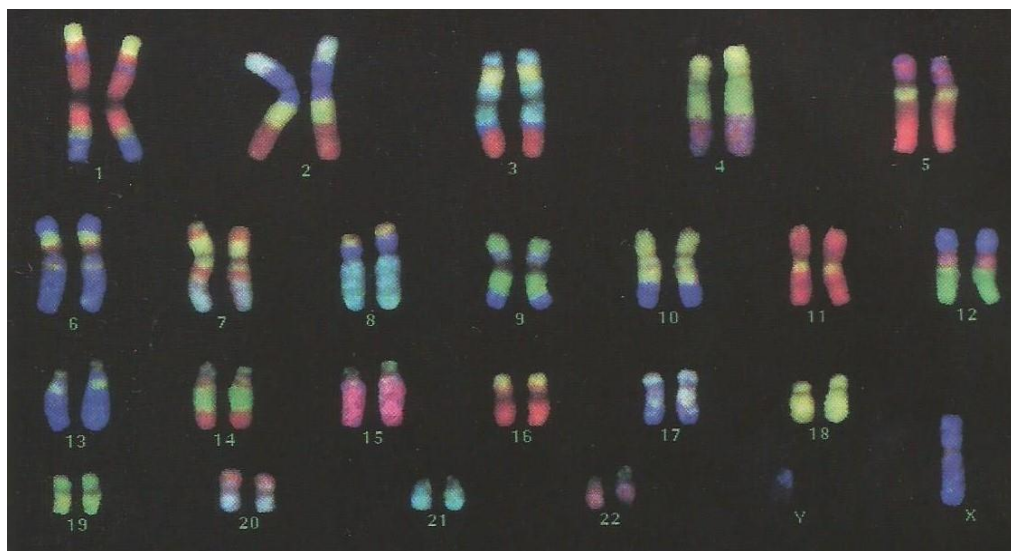
Atualmente a CMF é a principal ferramenta diagnóstica para LLC e também é utilizada mesmo após o tratamento para seguimento de DRM (SANDESA et al., 2016).

4.4.6 Citogenética convencional

A análise citogenética clássica é realizada em células que entraram em processo de mitose e pararam em fase de metáfase, na qual os cromossomos individualizados podem ser reconhecidos por seu tamanho e pelo padrão de coloração de suas bandas (utilizam-se coloração *Giemsa* ou fluorescente). Alternadas bandas escuras e claras são numeradas a partir do centrômero em direção ao telômero para facilitar a descrição de qualquer anormalidade detectada (BAIN et al., 2012). A análise de cariótipo envolve um estudo morfológico direto ao microscópio dos cromossomos das células, havendo a necessidade de cultivá-las para estimular a divisão celular antes da preparação cromossômica (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008).

Os resultados de uma análise podem ser apresentados visualmente, por meio de um cariograma, o qual é caracterizado por meio de imagens de cromossomos aleatórios; ou escrito de acordo com os padrões convencionais, por meio de um idiograma/ carótipo (Figura 22), o qual demonstra em esquema fotográfico a ordenação dos cromossomos de acordo com seus tamanhos. Esta técnica pode ser realizada utilizando-se as seguintes amostras: fibroblastos de pele ou feto hemaglutinina de linfócitos estimulados, células da MO, células do sangue periférico, células isoladas de linfonodos ou outros órgãos suspeitos de estarem infiltrados por linfócitos ou outras neoplasias, células isoladas de derrames cavitários e amniócitos isolados de fluido amniótico. Porém, para investigação de neoplasias hematológicas um aspirado de MO é geralmente preferido (BAIN et al., 2012).

Figura 22- Cariótipo normal de humano



Fonte: (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008)

As indicações para um estudo citogenético numa suspeita ou definitivo diagnóstico de neoplasia hematológica, incluem fornecer evidências de clonalidade e permitir o diagnóstico de uma condição neoplásica quando a presença da mesma não está demonstrada de outra forma; confirmar um diagnóstico específico; permitir a classificação da neoplasia; fornecer informações prognósticas; indicar quais genes de fusão são susceptíveis a estarem presentes e, assim, fornecer informações que permitam detectar DRM por análise molecular (BAIN et al., 2012).

Alterações genéticas na LLC ocorrem em cerca de 80% dos casos e se correlacionam com o prognóstico (Tabela 8) (SANDES et al., 2016). As quatro anomalias cromossômicas mais comuns são deleção de 13q14, trissomia 12, deleção de 11q23 e anomalias estruturais de 17p; além de outras aberrações menos frequentes (CHAUFFAILLE et al., 2006; HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008). Deleções 13q e ganho do cromossomo 12 afetam em conjunto mais do que 80% dos casos de LLC e são mutuamente exclusivos. Ambos são tipicamente detectados em níveis clonais que os categoriza como eventos iniciais da patogênese (TAUSCH; MERTENS, STILGENBAUER, 2016). No entanto, como os linfócitos da LLC são células maduras e apresentam baixa taxa de divisão celular em cultura, o cariótipo pode não ser muito informativo (SANDES et al., 2016).

Tabela 8- Alterações cromossômicas comuns na LLC, frequência e relação com prognóstico

Mutação	Frequência	Prognóstico
del (13q)	50%	Bom
Trissomia 12	20%	Intermediário
del (11q22-23)	<10%	Desfavorável
del (6q21)	<10%	Desfavorável
del (17p13)	<10%	Muito desfavorável

Fonte: Modificado de (SANDES et al., 2016)

A anomalia trissomia 12 (Figura 23) é identificada como a anormalidade cromossômica numérica mais comum, sendo frequentemente associada à morfologia atípica dos linfócitos na LLC, doença avançada e um curso clínico agressivo. Anormalidades estruturais mais frequentemente envolvem o braço longo do cromossomo 13 com diferentes pontos de interrupção, incluindo deleções de 13q14; deleções ou translocações de 13q14 têm sido associadas a uma morfologia típica dos linfócitos e não carrega um significado prognóstico adverso. Deleção 11q tem sido associada a uma doença progressiva rápida, extensa linfadenopatia, estágios avançados, intervalos sem tratamento mais curtos e menor tempo de sobrevida. Perda alélica do cromossomo 17p, precisamente no local do gene

codificante da proteína p53, é frequentemente associada a um mau resultado clínico e resistência à droga (CHAUFFAILLE et al., 2006).

Figura 23- Cariótipo de um caso de LLC com trissomia dos cromossomos 12, 18 e 19



Fonte: Modificado de (SANDES et al., 2016)

Mais da metade dos cariótipos anormais são constituídos por anormalidades individuais, enquanto complexos cariótipos são encontrados em cerca de 10% a 15% de todos os pacientes. De modo que, qualquer anomalia cromossômica clonal indica um pior prognóstico em comparação a um cariótipo normal. Contudo, a complexidade do mesmo é um parâmetro significativo, já que anormalidades individuais indicam uma sobrevivência mais longa do que múltiplas anormalidades (CHAUFFAILLE et al., 2006).

A citogenética identifica dois grupos de risco na LLC: um baixo e um alto. No de baixo risco estão inclusos os pacientes com cariótipo normal e deleção 13q14 isolada, pelo fato desta deleção prevenir a expressão de mRNAs que controlam a expressão de proteínas relevantes para a sobrevivência dos linfócitos da LLC. Já no de alto risco estão inclusos aqueles pacientes com trissomia 12, pelo fato de ser um indício desfavorável da doença e demonstrar uma possível transformação para outra doença; deleção 17p, devido a mutação do gene de p53, fator de transcrição que é ativado por danos no ácido desoxirribonucléico (*Deoxyribonucleic Acid*, DNA), induzindo a apoptose ou interrupção do ciclo celular, sendo crítica para o conserto ou morte de células com danos e atuando contra o desenvolvimento de clones anormais de células; e deleção 11q, no qual está localizado o gene codificante da

proteína ATM (11q22), a qual protege a integridade do genoma bloqueando o seguimento do ciclo celular e ativando mecanismos de reparação do DNA. A deleção de 11q22 tem sido associada a cursos clínicos agressivos da doença (HJALMAR et al., 2001; CHAUFFAILLE et al., 2006; HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008; HAMERSCHLAK, 2010).

Em relação ao sistema de estadiamento Binet, entre os pacientes com pior prognóstico citogenético, houve uma prevalência dos grupos B e C, enquanto entre os pacientes com prognóstico favorável o grupo A prevaleceu, como esperado (CHAUFFAILLE et al., 2006).

Como as alterações citogenéticas têm sido relacionadas ao prognóstico na LLC, há um grande interesse na identificação de alterações cromossômicas que podem definir subgrupos de pacientes com prognóstico diferente (CHAUFFAILLE et al., 2006). Além disso, a análise citogenética é tão crucial para o diagnóstico e gestão de neoplasias hematológicas que é necessária para que hematologistas entendam os princípios e estejam aptos a entender os casos recebidos (BAIN et al., 2012).

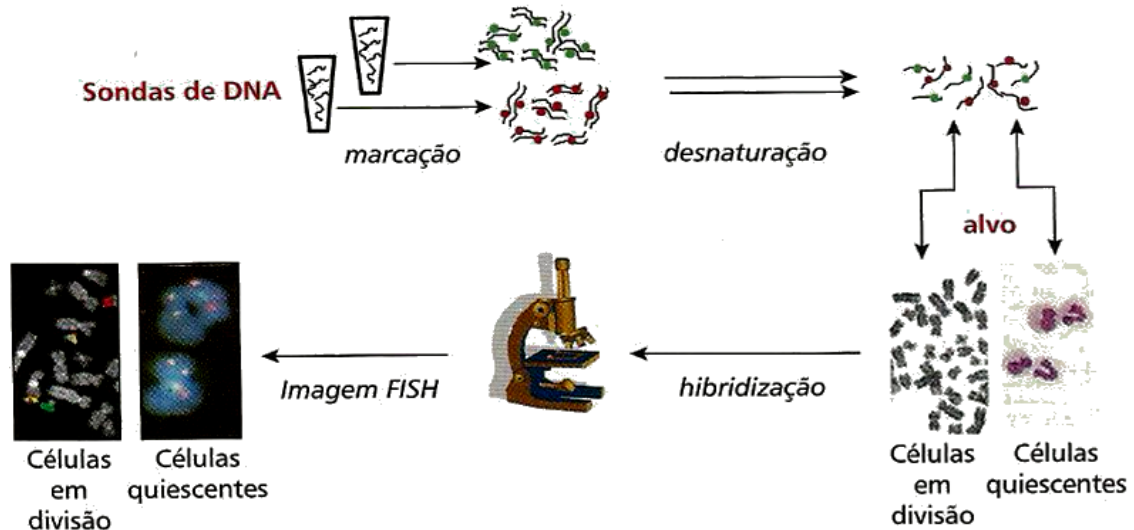
Em conclusão, o cariótipo é uma ferramenta importante e útil para se distinguir clones dentro de um grupo homogêneo de linfócitos sob os pontos de vista morfológico e imunofenotípico, demonstrando que as alterações genéticas são indicativas de comportamento biológico diferente (CHAUFFAILLE et al., 2004).

4.4.7 Hibridização *in situ* por fluorescência (*Fluorescent In Situ Hybridization, FISH*)

O desenvolvimento de técnicas moleculares, por exemplo, a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) (Figura 24) melhorou a detecção de anormalidades cromossômicas específicas da LLC. Esta técnica envolve o uso de sondas genéticas fluorescentes que se hibridizam a partes específicas do genoma, sendo possível marcar cada cromossomo com uma combinação diferente de marcadores fluorescentes. É uma técnica sensível que pode identificar cópias extras de material genético de células em fase de metáfase do ciclo celular e também detecta facilmente células na fase de intérfase, uma qualidade notável da técnica que evita o problema de células tumorais com baixo índice mitótico. Usando duas sondas diferentes, pode revelar translocações cromossômicas ou até mesmo revelar

redução do número ou de segmentos cromossômicos (HJALMAR et al., 2001; HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008).

Figura 24- Exemplificação do procedimento na técnica FISH



Fonte: (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008)

Uma variedade de sequências de ácidos nucleicos é utilizada como sondas para o DNA celular alvo, levando à visualização de regiões cromossômicas específicas. Três tipos diferentes de sondas podem ser utilizados: sondas centroméricas para anormalidades cromossômicas numéricas; sondas de cromossomos inteiros; e sondas específicas para determinado *locus* cromossomal. As sondas de DNA são marcadas com fluorocromos e os sinais gerados são suficientemente fortes para permitir a análise e podem ser dirigidas a qualquer região cromossômica definida (HJALMAR et al., 2001).

A LLC caracteriza-se por um genoma estável com um baixo número de mutações e aberrações em comparação a outras malignidades hematológicas e especialmente a tumores sólidos. No entanto, quatro de cinco casos de LLC abrigam pelo menos uma aberração cromossômica tipicamente caracterizada por deleções recorrentes ou - menos frequentemente - por ganhos cromossômicos. Em 2000, as aberrações mais comuns foram integradas em um sistema hierárquico que reflete o impacto clínico das diferentes aberrações mesmo quando existentes em coocorrência. Assim, para a prática diária, um pequeno conjunto de sondas de FISH

é suficiente para avaliar a presença de deleções de 13q, 11q e 17p e trissomia 12 e para determinar a progressão da doença e sobrevida pobre com base na classificação Döhner, como segue: del17p> del11q> tri12> cariótipo normal> del13q. (TAUSCH; MERTENS, STILGENBAUER, 2016).

Um consenso está surgindo para o papel de FISH no estudo de aberrações cromossômicas na LLC. O método deve ser simples, sensível e reproduzível quando utilizada para a detecção de trissomia 12 e outras anomalias nesta doença. Ao analisar linfócitos não estimulados, as anomalias detectadas são, provavelmente, inerentes ao clone maligno e são de importância biológica e clínica (HJALMAR et al., 2001).

Por mais de 15 anos a classificação hierárquica Döhner, usando amostras de FISH para identificar trissomia 12 e deleções como 13q14.2- q14.3 (incluindo DLEU2, MIR15A/MIR16-1), 11q22.3 (ATM) e 17p13.1 (TP53) tem sido o padrão ouro para caracterização genética e avaliação do prognóstico para pacientes com LLC (DYKE et al., 2016).

A FISH é mais sensível para detectar mutações específicas, na dependência do painel de sondas utilizadas. Podem ser usadas sondas para as mutações mais importantes para o prognóstico, como também exclusivamente para a pesquisa da deleção do 17p (TP53) (Figura 25), mutação indicativa de prognóstico desfavorável que influencia o tratamento (SANDES et al., 2016).

Figura 25- FISH usando sondas para 11q22.3 (ATM) e 17p13.1 (TP 53)



Nota: Gene ATM, em verde, mostrando apenas um sinal; genes TP 53, em vermelho, mostrando dois sinais.

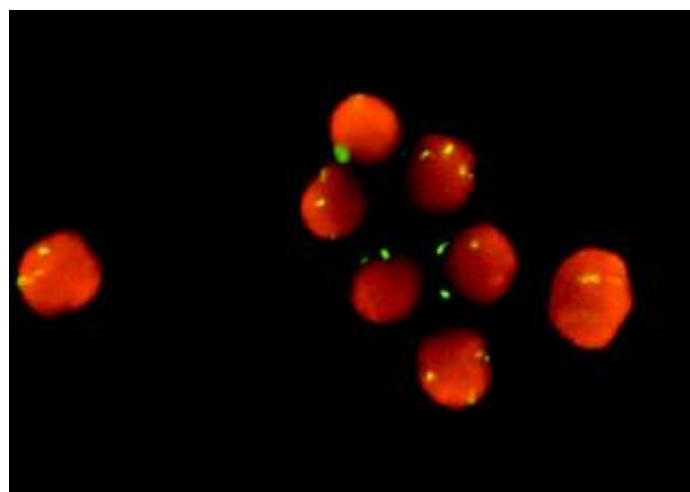
Fonte: (SANDES et al., 2016)

Hjalmar et al. (2001) estudando FISH sequencial para análise do cromossomo 12 em pacientes com LLC, demonstraram que a porcentagem de células com trissomia 12 aumentou durante o período de acompanhamento de pacientes com sinais de doença progressiva exigindo terapia. Eles também demonstraram que o tamanho relativo do clone trissômico diminui significativamente depois de uma quimioterapia bem sucedida. No entanto, a aquisição extra de um cromossomo 12 na LLC até agora tem sido relatada apenas em pacientes com sinais de transformação para a síndrome de Richter. Os pacientes com trissomia 12 neste estudo também apresentaram CD38 e/ou ZAP-70 positivo, indicando um curso desfavorável da doença, que foi posteriormente confirmado (CHAUFFAILLE et al., 2006).

A importância clínica da trissomia 12 na LLC tem sido amplamente investigada e a LLC atípica, definida como morfologia ou imunofenotipagem atípicas, fortemente associada com a trissomia 12. Além disso, os pacientes com doença avançada têm mostrado uma maior incidência dessa anomalia do que pacientes assintomáticos recém-diagnosticados (HJALMAR et al., 2001).

Chauffaille et al. (2000) avaliaram que o método de FISH é sensível e altamente específico para detecção da trissomia 12. No estudo feito por eles cujo objetivo era detectar essa alteração em 13 pacientes com LLC utilizando FISH, foram observadas células apresentando a mesma (Figura 26).

Figura 26- Células em intérfase apresentando sinais fluorescentes pela técnica de FISH



Nota: Cada ponto fluorescente representa o centrômero de um cromossomo 12.

Fonte: (CHAUFFAILLE et al., 2000)

Esta técnica tem sido útil na demonstração da presença de alterações não detectáveis no cariótipo, seja porque as células portadoras da anomalia não entraram em divisão, seja porque passaram despercebidas, pois, por serem clones pequenos, seriam necessárias dezenas de células analisadas para que pudessem ser detectadas (CHAUFFAILLE; VIEIRA; MARTINS, 2004). A frequência de del17p e mutação p53 aumenta com recaídas sucessivas. A realização de FISH nas recaídas passa a ser muito importante (KERSTING et al., 2016).

Dados publicados mostram que alterações cromossômicas são detectadas em apenas 30 a 40% dos casos pela citogenética convencional, enquanto estes índices atingem até 82% quando citogenética molecular (FISH) é usada isoladamente ou em conjunto com a citogenética convencional (CHAUFFAILLE et al., 2006).

Chauffaille et al. (2006), concluíram que a citogenética e a técnica de FISH são importantes indicadores de prognóstico e devem ser correlacionadas com outros parâmetros de prognóstico, tais como ZAP-70, CD38 e estado de mutação IGHV no momento do diagnóstico, a fim de prever o curso clínico.

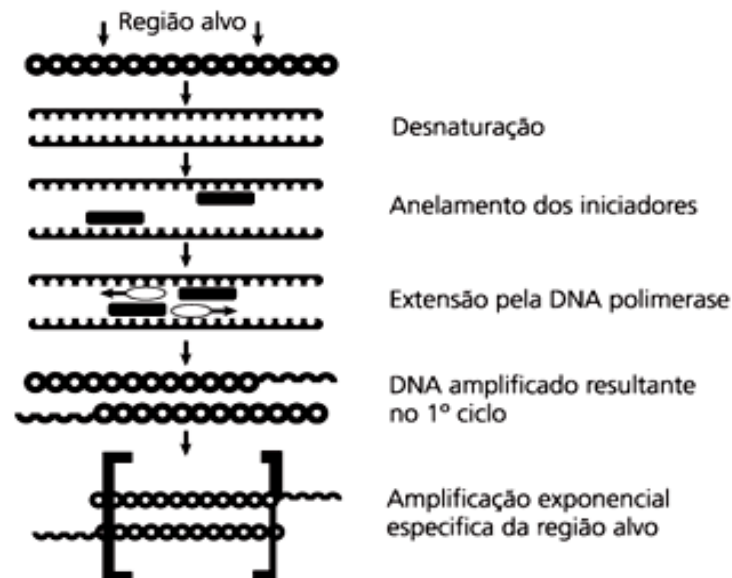
4.4.8 Reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

A PCR é uma das principais técnicas utilizadas para o diagnóstico molecular de diversas doenças. A introdução do seu uso resultou em grande revolução tecnológica, permitindo a amplificação de uma sequência gênica específica de interesse contida em uma amostra complexa de DNA e possibilitou a adoção de métodos automatizados para a análise do genoma. A tecnologia desta técnica também é bastante flexível e permite que diversas modificações sejam feitas a fim de possibilitar seu emprego na análise de uma grande variedade de amostras (ALBERTS et al., 2010).

Para a realização da técnica (Figura 27) utiliza-se uma enzima termoestável, denominada DNA polimerase, a qual na presença de um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e dos nucleotídeos que compõem a molécula de DNA, amplifica a região gênica de interesse a partir de uma pequena quantidade de DNA. Este processo de amplificação ocorre durante repetidos ciclos de temperatura, sendo necessário 93-95°C (Celsius) para desnaturação do DNA, 37 a 65°C para hibridização dos *primers* à sequência-alvo e 72°C para síntese das novas

sequências de DNA. Este processo ocorre em equipamentos chamados termocicladores e o DNA amplificado pode então ser separado e visualizado em géis de agarose ou poliacrilamida e utilizado para diversos fins (ALBERTS et al., 2010).

Figura 27- Demonstração geral da técnica de PCR

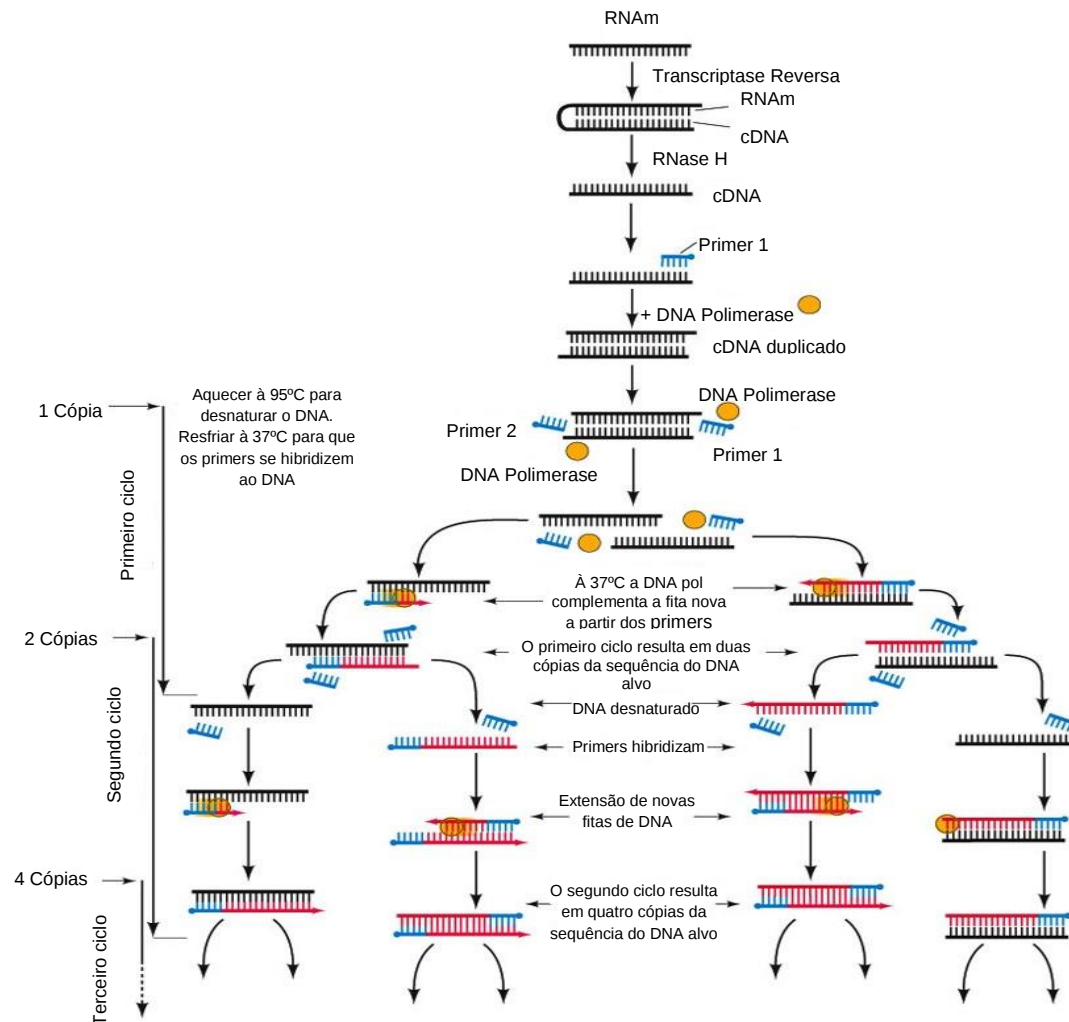


Fonte: (BARROS; OLIVEIRA; MARIN, 2008)

Existem técnicas resultantes de modificações da PCR convencional e dentre elas, as principais são o RT-PCR (*Reverse Transcriptase-PCR*), *nested* PCR, *multiplex* PCR, PCR a partir de *primers* randômicos e PCR em tempo real. A RT-PCR (Figura 28) é uma das variações mais utilizadas e utiliza uma enzima chamada transcriptase reversa para converter uma molécula de ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*, RNA) em DNA complementar (cDNA) antes da etapa de amplificação por PCR convencional, possibilitando estudos de vírus de RNA e análises de expressão gênica. *Nested* PCR emprega uma segunda etapa de amplificação utilizando um par de *primers* internos aos utilizados na primeira etapa e visa aumentar a sensibilidade e especificidade do método. *Multiplex* PCR tem como objetivo detectar múltiplas sequências-alvo numa mesma amostra. PCR a partir de *primers* randômicos utiliza sequências curtas de oligonucleotídeos para amplificar regiões repetitivas do DNA genômico. Por fim, PCR em tempo real permite que a amplificação e a detecção ocorram simultaneamente, num sistema fechado, sendo

necessário, um termociclador com sistema de monitoramento de emissão de fluorescência (ALBERTS et al., 2010).

Figura 28- Demonstração geral da técnica RT-PCR



Fonte: Modificado de (GILBERT, 2013)

Na LLC a técnica de PCR tem sido utilizada para detectar genes codificantes de proteínas que são utilizadas como marcadores prognósticos, os quais se relacionam com o curso clínico e orientam as decisões de tratamento (BILOUS et al., 2016).

Mutações no gene NOTCH1 foram recentemente identificadas como novas alterações genéticas associadas a um menor tempo para o primeiro tratamento e sobrevida livre de progressão. Além disso, foi encontrada em alguns ensaios clínicos a resistência a AcMo anti-CD20 em pacientes com LLC que possuem mutação neste gene (BILOUS et al., 2016).

O gene NOTCH1 codifica um receptor transmembranar, que funciona como um ligante ativador de fator de transcrição. A sinalização promovida pelo NOTCH1 está envolvida em processos celulares críticos, tais como a proliferação, diferenciação e apoptose. Alterações nesta sinalização de NOTCH1 têm sido relatadas em diferentes doenças (BILOUS et al., 2016).

Na LLC mutações neste gene são detectadas em 8-15% dos casos, independentemente da fase clínica da doença e são representadas principalmente por uma recorrente deleção localizada no éxon 34 do gene. Esta deleção resulta na remoção do domínio C-terminal, denominado PEST (BILOUS et al., 2016), o qual em condições normais é necessário para limitar a intensidade e a duração da ativação do receptor NOTCH1 (ROSSI et al., 2012) e também regula o dobramento da proteína pelo complexo ubiquitina-proteassoma para sua degradação posterior, de modo que a sua deleção gênica conduz a acumulação da proteína constitutivamente ativa e a desregulação de vias dependentes de NOTCH1 (BILOUS et al., 2016).

A ativação constitutiva da sinalização NOTCH1 é considerada contributiva para a resistência a apoptose e aumento da sobrevivência de células leucêmicas. Para detectar mutações de NOTCH1 técnicas convencionais de sequenciamento de DNA são utilizadas (BILOUS et al., 2016) e Rossi et al. (2012) projetaram um real time-PCR para rastreio da mutação mais comum do gene em questão (mutação c.7541_7542delCT, responsável por cerca de 80% de todas as mutações de NOTCH1 detectáveis na LLC).

No estudo realizado por Bilous et al. (2016) em que utilizaram a técnica de real time-PCR desenvolvida por Rossi et al. (2012) foi concluído que pacientes que possuem a deleção NOTCH1 mostraram uma sobrevida livre de progressão significativamente menor em comparação aos pacientes que não possuem a mutação no gene NOTCH1. Além das implicações no prognóstico, as mutações de NOTCH1 podem orientar as opções de tratamento no contexto da adição de AcMo anti-CD20 e também podem proporcionar um alvo terapêutico para os inibidores da via NOTCH1. A utilização destes inibidores em combinação com a quimioterapia é considerada uma abordagem promissora para o tratamento de casos de LLC com mutações na ativação de NOTCH1 (ROSSI et al., 2012).

A relevância das mutações de NOTCH1 na LLC é reforçada pelo conhecimento da ativação da via NOTCH1 nesta leucemia e pela possibilidade de

alvejar NOTCH1 com drogas atualmente em desenvolvimento em outros contextos clínicos. Os principais estudos que identificaram mutações de NOTCH1 na LLC forneceram evidências iniciais sugerindo que alterações neste gene podem estar associadas a uma evolução clínica desfavorável. No entanto, diversos aspectos das implicações clínicas das mutações na LLC ainda continuam a ser elucidados, como: a sua distribuição entre subgrupos genéticos bem estabelecidos, incluindo aqueles com anormalidades definidas por FISH e *status* TP53; e o seu papel prognóstico independente, dado a estreita associação entre mutações NOTCH1 e ausência de mutação do gene IGHV, um dos prognosticadores mais aceitos na LLC (ROSSI et al., 2012).

Diferentes mecanismos podem explicar, pelo menos em parte, o pobre prognóstico associado a mutações de NOTCH1 na LLC. Primeiro, as mutações de NOTCH1 levam à aquisição de um fenótipo clínico progressivo que exige tratamento logo após a apresentação inicial, como documentado por uma sobrevida livre de tratamento média de cerca dois anos para casos mutados contra cerca de nove anos para os pacientes sem a mutação (ROSSI et al., 2012). Segundo, a análise feita por Rossi et al. (2012) indica que os pacientes com a mutação exibem um maior risco de desenvolver a síndrome de Richter, uma condição que é frequentemente letal e abriga recorrentes mutações de NOTCH1 já presentes no momento da apresentação da LLC numa fração significativa dos pacientes com a síndrome.

A abordagem explorada no estudo feito por Rossi et al. (2012) conclui que as mutações de NOTCH1 são fatores prognósticos independentes mantendo o seu valor preditivo na LLC seguido em diferentes instituições.

Outro gene importante de ser estudado na LLC utilizando técnicas moleculares é o Fator de ligação Potencializador Linfóide-1 (*Lymphoid Enhancer binding Factor-1*, LEF1). A técnica de RT-PCR é utilizada na LLC para amplificação do RNA mensageiro (RNAm) deste gene, o qual regula uma variedade de genes relacionados à regulação do ciclo e proliferação celular (WU et al., 2016).

Dados recentes demonstraram um papel vital de LEF1 na hematopoiese precoce e transformação leucêmica em modelos murinos. Também desempenha um papel crítico na hematopoiese humana normal, especialmente no desenvolvimento de linfócitos B e T. A expressão aberrante de LEF1 foi encontrada em várias

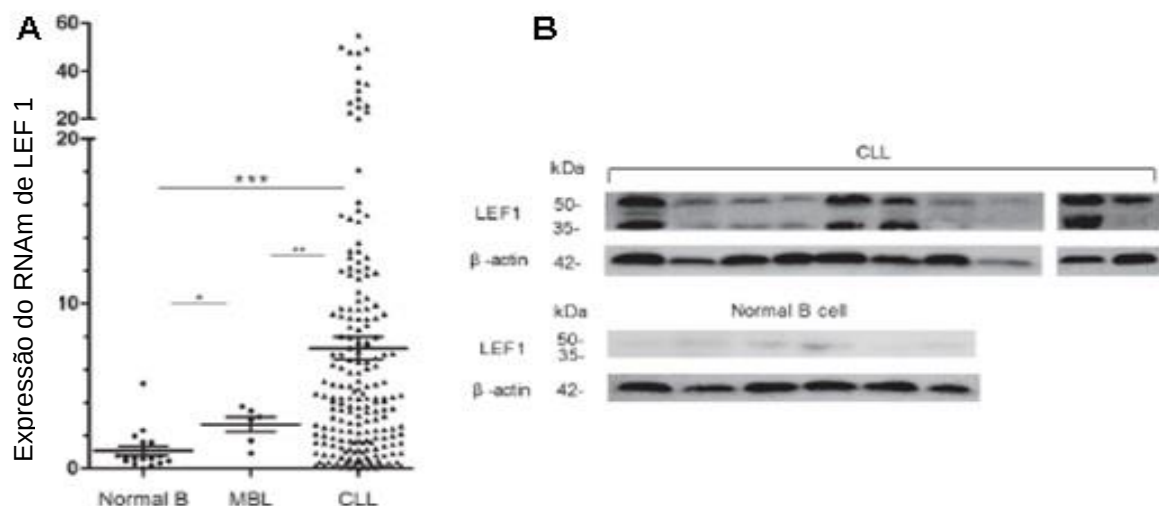
malignidades hematológicas em humanos, no entanto, o significado prognóstico de expressão de LEF1 não foi exatamente esclarecido na LLC (WU et al., 2016).

O gene cilindromatose (CYLD) codifica uma enzima deubiquitinizante que regula uma variedade de processos fisiológicos, incluindo a mitose celular, a homeostase da célula B, resposta imune e desenvolvimento de células T. Estudo anterior provou CYLD como um gene supressor de tumor, além disso, é um regulador chave na necroptose, um termo recentemente inventado e usado para descrever uma forma particular de necrose programada induzida por receptores de morte estimulados (WU et al., 2016).

O mesmo grupo de estudo do Wu et al. (2016) já havia provado que as células da LLC têm defeitos na sinalização necroptótica. Também identificaram LEF1 como um repressor da transcrição de CYLD nestas células e que a inibição da expressão de LEF1 sensibiliza células da LLC para necroptose. Assim, alvejar o eixo LEF1-CYLD para restaurar a via necroptótica pode representar uma nova abordagem para o tratamento da LLC (WU et al., 2016).

Ainda no estudo realizado por Wu et al. (2016) foi demonstrado que as células leucêmicas exibem uma expressão dramaticamente maior de RNAm de LEF1 (Figura 29-A) e níveis da proteína LEF1 significativamente maior (Figura 20-B) que as células B normais. Esses resultados indicaram um papel para LEF1 na leucemogênese da LLC.

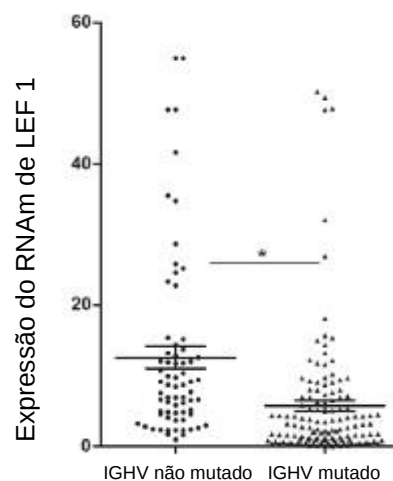
Figura 29- Comparação da expressão de RNAm e níveis proteicos de LEF1 em células B leucêmicas e células B normais



Fonte: Modificado de (WU et al., 2016)

De acordo com Wu et al. (2016) a alta expressão de LEF1 foi fortemente associada com o status não mutado do gene IGHV. Pacientes com gene IGHV não mutado tem uma expressão maior desta proteína do que aqueles com a mutação (Figura 30), sugerindo um papel desta proteína no comportamento clínico agressivo da LLC. Nenhuma correlação foi encontrada entre a expressão de LEF1 e outras características clínica, molecular ou citogenética. Não foi observada qualquer associação significativa entre a expressão LEF1 e os níveis de ZAP70 ou CD38. Pela primeira vez foi demonstrado também que a alta expressão de LEF1 está ligada a uma sobrevida global inferior nos pacientes com LLC, especialmente aqueles com anomalias de TP53 (WU et al., 2016).

Figura 30- Comparação da expressão do RNAm de LEF1 em pacientes com gene IGHV não mutado e mutado



Fonte: Modificado de (WU et al., 2016)

A investigação de genes ativados de modo aberrante que possuem relevância prognóstica na LLC pode ajudar a identificar os pacientes com pior prognóstico e a desenvolver novos alvos terapêuticos para a doença (WU et al., 2016).

4.5 Marcadores biológicos e prognóstico

Vários marcadores biológicos têm sido associados a uma forma mais agressiva da LLC, o que inclui linfócitos com tempo rápido de duplicação, achados citogenéticos, níveis séricos de beta-2 microglobulina (B2M), expressão de CD38, ausência de mutação do gene IGHV e expressão da proteína ZAP-70. O tempo

rápido de duplicação de linfócitos é geralmente definido como a duplicação da contagem absoluta de linfócitos do sangue periférico em menos de 12 meses (CHAUFFAILLE et al., 2006). Bosch e Montserrat. (2002) relataram um tempo médio de sobrevida de mais de 118 meses para pacientes com tempo lento de duplicação de linfócitos, enquanto que para os pacientes com tempos rápidos de duplicação, o tempo médio de sobrevida foi de apenas 61 meses, independentemente do estadiamento Rai. Dados conflitantes existem a respeito da B2M (ABBOTT et al., 2006), porém é relatado que níveis séricos maiores que 4,9mg/dL têm impacto prognóstico negativo (HAMERSCHLAK, 2010).

O marcador CD38 é uma glicoproteína transmembranar, presente em linfócitos T, B, células NK, monócitos, macrófagos e eritrócitos. Estudos da expressão de CD38 em células da LLC demonstraram que os pacientes que expressam este Ag na superfície celular de linfócitos B apresentam piores prognósticos (CHAUFFAILLE et al., 2006). Dewald et al. (2003) demonstraram que pacientes CD38 positivo (CD38+) eram mais propensos a ter múltiplas anomalias (avaliadas por FISH) e indicaram que anomalias favoráveis (del13q) e desfavoráveis (trissomia 12, del11q e del17p) podem ocorrer em doenças estáveis ou progressivas. Resultados da técnica de FISH juntamente com expressão de CD38 podem fornecer informações prognósticas valiosas em pacientes com LLC (CHAUFFAILLE et al., 2006).

Na LLC esta molécula CD38 está frequentemente expressa em células leucêmicas de pacientes que apresentaram uma progressão precoce da doença. O limiar para considerar um caso CD38+ é a sua expressão em mais de 30% de células por CMF. A positividade de CD38 está associada a uma sobrevida global significativamente menor e também a uma fraca resposta a fludarabina (ABBOTT et al., 2006). Ghia et al. (2003) reportaram que pacientes CD38+ têm uma probabilidade de progressão de 75% em um seguimento médio de 90 meses, em comparação a probabilidade de progressão de 13% em pacientes CD38 negativo (CD38-).

Quando as células B reconhecem um Ag no centro germinal de tecidos linfoides secundários, elas sofrem um processo dito “hipermutação somática”, no qual ocorrem mutações aleatórias no gene da cadeia pesada da imunoglobulina. Na LLC, o gene IGHV apresenta evidência desta hipermutação em cerca de 50% dos casos, enquanto nos demais, o mesmo não é mutado, os quais têm prognóstico

desfavorável (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008). Os pacientes que apresentam a mutação tendem a apresentar uma doença estável ou lentamente progressiva, com comportamento favorável. Por outro lado, os pacientes com genes não mutados têm uma doença rapidamente progressiva e sobrevida mais curta (ABBOTT et al., 2006; HAMERSCHLAK, 2010).

Stilgenbauer et al. (2002) analisaram os parâmetros genéticos em relação ao prognóstico e descobriram que a incidência geral de aberrações genômicas era semelhante nos grupos com gene IGHV mutado e não mutado. Aberrações favoráveis foram mais frequentemente observadas no grupo com o gene mutado, enquanto que aberrações desfavoráveis foram super-representadas no grupo com o gene não mutado (CHAUFFAILLE et al., 2006).

A proteína ZAP-70 é uma tirosinoquinase envolvida na sinalização celular, após reconhecimento de Ag pelos receptores de Ags nos linfócitos. Sua expressão é normalmente restrita a células T, mas também é expressa, de modo aberrante, em casos de LLC. Essa expressão associa-se a uma evolução clínica desfavorável (HOFFBRAND; MOSS; PETIT, 2008).

A expressão dessa enzima pode ser avaliada por meio da citometria de fluxo, técnicas de imunohistoquímica ou *immunoblot*, permitindo a identificação de pior sobrevida quando positivo (CHAUFFAILLE et al., 2006). Grever et al. (2003) demonstraram que em grupos de alto risco (del17p e del11q), onde a progressão é heterogênea, que a presença da ZAP-70 também pode distinguir os pacientes que têm predisposição para uma progressão precoce *versus* tardia da doença. A determinação desta proteína em pacientes com LLC complementa os dados citogenéticos e pode auxiliar no planejamento de decisões terapêuticas (CHAUFFAILLE et al., 2006).

A expressão desta molécula de sinalização intracelular parece estar associada ao *status* da mutação do gene IGHV, de forma que a maioria dos casos mutados é ZAP-70 negativos (ZAP-70-), enquanto que as formas não mutadas são ZAP-70 positivos (ZAP-70+) (HAMERSCHLAK, 2010), condição última que é altamente preditiva de pacientes com doença progressiva rápida e morte (ABBOTT et al., 2006).

Estudos prospectivos estão em andamento para determinar se o tratamento de doentes com ZAP-70+ e forma mais agressiva da doença irá melhorar os resultados clínicos. Ainda é necessária precaução na interpretação dos resultados

de ensaios para detecção dessa molécula, de modo que a análise da mesma permanece uma ferramenta prognóstica de utilização clínica incerta (ABBOTT et al., 2006).

Em estudo feito por Calpe et al. (2013) foi demonstrado que a proteína ZAP-70 é responsável por uma migração celular melhorada dos linfócitos à MO causada por uma resposta amplificada à estimulação da molécula CXCR4, no que diz respeito a sinalização e migração neste modelo celular. Em pacientes com LLC, este mecanismo facilitaria o acesso das células malignas para receber sobrevida adicional, sinais anti-apoptóticos e proliferativos que podem ser encontrados no microambiente da MO. Uma correlação entre maior infiltração na MO e alta expressão de ZAP-70 foi observada em pacientes com LLC, de modo que o papel de ZAP-70 na infiltração medular por linfócitos malignos pode potencialmente ser explorado para o desenvolvimento de novos tratamentos.

O recurso diagnóstico conveniente de ZAP-70 é o fato de que, ao contrário de CD38, a sua expressão permanece estável durante todo o curso da doença. Acredita-se que níveis elevados de ZAP-70 indicam uma rápida progressão da LLC e redução no tempo médio de sobrevida, independentemente do estágio da doença no momento da implantação do tratamento (RUSAK et al., 2011). Resultados do estudo de Rusak et al. (2011) também demonstraram uma correlação fortemente negativa da expressão de CD38 e ZAP-70 com a vulnerabilidade dos linfócitos leucêmicos a apoptose.

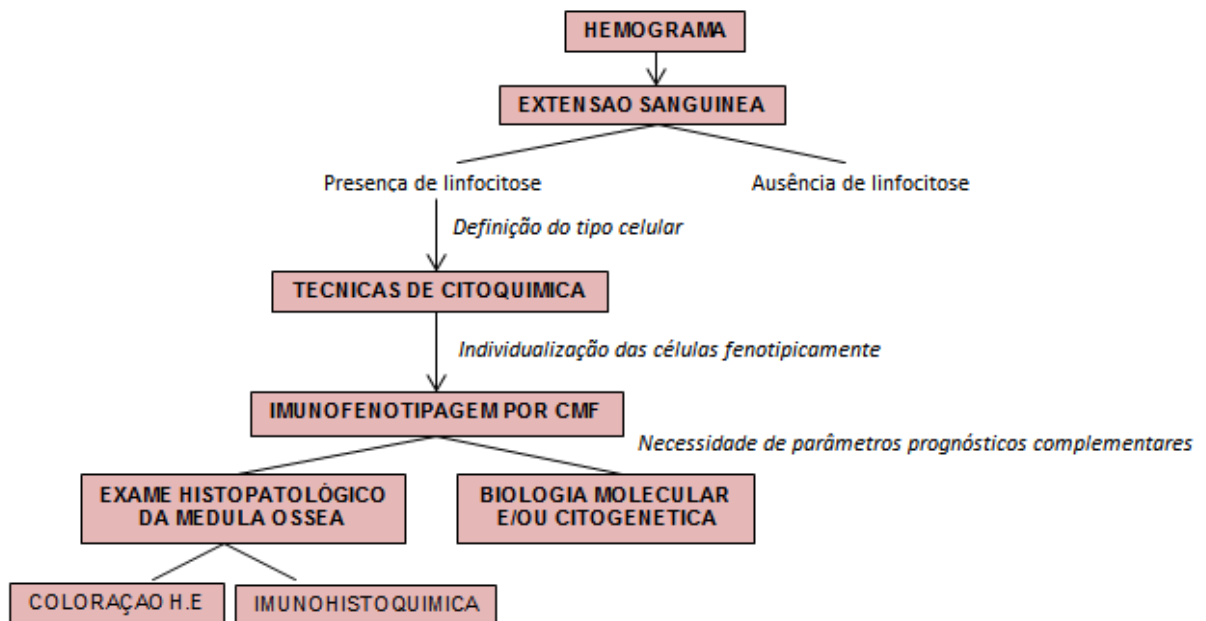
Tem sido relatado que muitos fatores de mau prognóstico (incluindo CD38, ZAP-70, B2M, estado de mutação IGHV e deleções 11q23 ou 17p53) podem ajudar a identificar pacientes de alto risco em estágios iniciais da LLC. Adicionalmente, as características do sistema imune destes pacientes, tal como o número de linfócitos TCD8 e TCD4 no momento do diagnóstico, também podem prever a progressão da doença (GONZÁLEZ et al., 2016).

Além de alta linfocitose clonal, anemia, trombocitopenia, pequeno número de manchas *Gumprecht*, baixa atividade apoptótica e elevada porcentagem de células CD38 e ZAP-70 positivas podem servir como fatores prognósticos que são complementares uns aos outros e podem ajudar a identificar pacientes com um curso desfavorável da LLC-B e avaliar a resposta ao tratamento já numa fase precoce de avanço da neoplasia (RUSAK et al., 2011).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A compreensão dos mecanismos biológicos da LLC e suas características clínicas e moleculares foi consideravelmente desenvolvida nos últimos anos, de modo que para que haja um diagnóstico fidedigno da doença é necessário um conjunto de técnicas laboratoriais complementares, precisas, atualizadas e multiparamétricas, tais como as descritas neste trabalho. A análise do hemograma e da extensão sanguínea, assim também como a realização de técnicas de citoquímica fazem parte da investigação inicial e fornecem o primeiro direcionamento da doença. O estudo da BMO não é necessário para o diagnóstico da LLC, porém permite detectar parâmetros diagnóstico e prognóstico complementares que podem ser importantes para alguma decisão médica. No entanto, a principal ferramenta diagnóstica atualmente é a imunofenotipagem por CMF, a qual promove uma caracterização fenotípica das células hematopoiéticas anormais, individualizando-as, sendo capaz de diferenciar a LLC de outras doenças bastante confundidas como os linfomas leucemizados. E, por fim, as técnicas moleculares que envolvem o estudo de alterações cromossômicas, mutações genéticas e detecção de genes/ mutação nos mesmos, as quais incluem, respectivamente, a citogenética convencional, FISH e PCR, são essenciais para fornecer informações que possibilitem estabelecer o prognóstico do paciente, direcionar seu tratamento e até mesmo fornecer possíveis novos alvos terapêuticos a serem estudados na LLC.

Fluxograma 1- Métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico da LLC



REFERÊNCIAS

ABBASI, S.Y.; et al.. Correlation of CD38 expression and cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia (CLL). **Blood**, Italy, v.102, n.4, p.350-355, feb. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12406914>>. Acesso em: 07 julho 2016.

ABBOTT, Brian L. Chronic lymphocytic leukemia: recent advances in diagnosis and treatment. **The Oncologist**. Colorado, v.11, p.21-30. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16401710>>. Acesso em: 16 novembro 2015.

ALBERTS, Bruce; et al.. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396 p.

ALVES, Antonio C.. Histologia da medula óssea. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.31, n.3, p.183-188. 2009. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/rbhh/2009nahead/aop4909.pdf>. Acesso em: 30 março 2016.

ANDERSON, Shauna C.; POULSEN, Keila B.. **Atlas de hematologia de Anderson**. 1. ed. São Paulo: Santos, 2005. 586 p.

BAIN, Barbara J.; et al.. **Dacie and lewis practical haematology**. 11. ed. China: Elsevier, 2012. 668 p.

BALIAKAS, Panagiotis; et al.. The role of bone marrow biopsy examination at diagnosis of chronic lymphocytic leukemia: a reappraisal. **Leukemia & Lymphoma**, Thessaloniki, v.54, n.11, p.2377-2384. 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.780653?journalCode=ilal20>>. Acesso em: 2 abril 2016.

BARROS; Natália Eudes Fagundes de; OLIVEIRA, Edna Maria Moraes; MARIN, Victor Augustus. Aplicabilidade da metodologia de reação de polimerase em cadeia em tempo real na determinação do percentual de organismos geneticamente modificados em alimentos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.21, n.1, p.85-92, jan-fev. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rn/v21n1/a09v21n1.pdf>>. Acesso em: 14 julho 2016.

BIASOLI, Irene; SPECTOR, Nelson. Monoclonal b-cell lymphocytosis. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v.37, n.5, p.285-286. 2015. Disponível em: <<http://rbhh.org/pt/monoclonal-b-cell-lymphocytosis-in-individuals/articulo-resumen/S1516848415000894>>. Acesso em: 01 março 2016.

BILOUS, N. I.; et al.. Detection of notch1 c.7544_7545delct mutation in chronic lymphocytic leukemia using conventional and real-time polymerase chain reaction. **Experimental Oncology**, Ucrânia, v.38, n.2, p.112-116, jun. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27356580>>. Acesso em: 16 julho 2016.

BOSCH, F.; MONTSERRAT, E.. Refining prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. **Reviews in Clinical and Experimental Haematology**, Barcelona, v.6, n.4, p.335-349, dez. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12823776>>. Acesso em: 07 julho 2016.

BROOIMANS, R.A; et al.. Flow Cytometric Differential of Leukocyte Populations in Normal Bone Marrow: Influence of Peripheral Blood Contamination. **Cytometry Part B Clinical Cytometry**, Netherlands, v.76, n.1, p.18-26, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18942105>>. Acesso em: 29 março 2016.

CALPE, Eva; et al.. Zap-70 promotes the infiltration of malignant b-lymphocytes into the bone marrow by enhancing signaling and migration after cxcr4 stimulation. **Plos One**, Barcelona, v.8, n.12, p.1-10. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24312539>>. Acesso em: 19 abril 2016.

CARLI, Giuseppe; et al.. Evans syndrome secondary to chronic lymphocytic leukaemia: presentation, treatment, and outcome. **Annals of Hematology**, Italy, p.1-8. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00277-016-2642-x>>. Acesso em: 29 março 2016.

CHAUFFAILLE, Maria de Lourdes L. Ferrari. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e aspectos clínicos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.32, n.4, p.308-316. 2010. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/rbhh/v32n4/aop90010.pdf>. Acesso em: 01 março 2016.

CHAUFFAILLE, Maria de Lourdes L. Ferrari; et al.. CLL: Chromosomal abnormalities (FISH) and their relation with clinical stage, CD38 and ZAP-70. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.28, n.1, p.5-10. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151684842006000100004>. Acesso em: 20 junho 2016.

CHAUFFAILLE, Maria de Lourdes L. Ferrari; et al.. Detection of trisomy 12 by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in chronic lymphocytic leucemia. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.23, n.3, p.531-533, sept. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572000000300005>. Acesso em: 20 junho 2016.

CHAUFFAILLE, Maria de Lourdes L. Ferrari; VIEIRA, Samantha; MARTINS, Sérgio Luiz Ramos. Importância do cariótipo em leucemia linfocítica crônica: relato de 18 casos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, São Paulo, v.40, n.2, p.75-78, abr. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1676-24442004000200005&script=sci_abstract&lng=pt>. Acesso em: 20 junho 2016.

CURY, Patricia M.. Biópsia de medula óssea e sua interpretação: o papel do hematopatologista. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v.25, n.2, p.79-80. 2003. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/rbhh/v25n2/v25n2a02.pdf>. Acesso em: 20 abril 2016.

DEWALD, G.W.; et al.. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **British Journal of Haematology**, Rochester, v.121, n.2, p.287-295, apr. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694251>>. Acesso em: 07 julho 2016.

DIELSCHNEIDER, R. F.; et al. Lysosomotropic agents selectively target chronic lymphocytic leukemia cells due to altered sphingolipid metabolism. **Nature**, Manitoba, p. 2-38. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/leu/journal/vaop/ncurrent/full/leu20164a.html>>. Acesso em: 26 fevereiro 2016.

DYKE, Daniel L. Van; et al.. The Dohner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL research consortium experience. **British Journal of Haematology**, Rochester, v.173, n.1, p.105-113, apr. 2016. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26848054>>. Acesso em: 20 fevereiro 2016.

FREEMAN, Ciara L.; GRIBBEN, John G.. Immunotherapy in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). **Current Hematologic Malignancy Reports**, London, v.11, n.1, p.29-36. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11899-015-0295-9>>. Acesso em: 20 fevereiro 2016.

GABE, Cristina; ALMEIDA, Denise R.; SIQUEIRA, Luciano O.. Evaluation of opportunistic infections in children suffering from leucemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Passo Fundo, v.31, n.2, p.74-79. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v31n2/aop1709>>. Acesso em: 05 março 2016.

GARLEY, Marzena; et al. Expression of IL-1 and IL-6 and their natural regulators in leukocytes of B-cell chronic lymphocytic leukaemia patients. **Advances in Medical Sciences**, Bialystok, v.61, n.2, p. 187-192. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26876087>>. Acesso em: 26 fevereiro 2016.

GHIA, Paolo; et al.. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. **Blood**, Italy, v.101, n.4, p.1262-1269, feb. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12406914>>. Acesso em: 07 julho 2016.

GILBERT, Scott F.. **Developmental biology**. 10. ed. Sunderland: Sinauer, 2013. 719 p.

GONZÁLEZ, Segundo; et al.. Analysis of clinical prognostic variables for chronic lymphocytic leukemia decision-making problems. **Journal of Biomedical Informatics**, Spain, v.60, p.342-35, apr. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26956213>>. Acesso em: 25 março 2016.

GREVER M.R.; et al.. ZAP-70 protein expression varies by interphase cytogenetic group and may predict disease progression to requirement of treatment among select genetic groups in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). **Blood**, Italy, v.102, n.4, p.73-80, feb. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12406914>>. Acesso em: 07 julho 2016.

GROTTO, Helena Z. W.. O hemograma: importância para a interpretação da biópsia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Campinas, v.31, n.3, p.178-182. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-84842009000300013&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 04 abril 2016.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John E.. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1216 p.

HALLEK, Michael; et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. **Blood**, Washington, v.111, n.12, p.5446-5456. 2008. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/111/12/5446?sso-checked=true>>. Acesso em: 25 abril 2016.

HAMERSCHLAK, Nelson. **Manual de hematologia: programa integrado de hematologia e transplante de medula óssea**. 1. ed. Barueri: Manole, 2010. 531 p.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H.; PETIT, J. E.. **Fundamentos em hematologia**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 400 p.

HJALMAR, Viktoria. Sequential Fluorescence In Situ Hybridization Analysis for Trisomy 12 in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. **Methods in Molecular Medicine**, Totowa, v.115, p.231-240. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15998971>>. Acesso em: 20 junho 2016.

KAUSHANSKY, Kenneth. Thrombopoiesis. **Seminars in Hematology**. New York, v.52, n.1, p.4-11. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25578413>>. Acesso em: 23 fevereiro 2016.

KERSTING, S.; et al. Dutch guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukaemia. **The Netherlands Journal of Medicine**, Amsterdam, v.74, n.2, p.68-74, feb. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26951351>>. Acesso em: 23 março 2016.

KOOHI, Fatemeh; et al. Leukemia in Iran: epidemiology and morphology trends. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Iran, v.16, n.17, p.7759-7763. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26625794>>. Acesso em: 23 fevereiro 2016.

LANASA, Mark C. Novel insights into the biology of CLL. **Hematology**. Durham, v.2010, n.1, p.70-76. 2010. Disponível em: <<http://ashededucationbook.hematologylibrary.org/content/2010/1/70.full.pdf+html>>. Acesso em: 17 novembro 2015.

LOPES, Maria Cleide A. Emprego da citometria de fluxo na avaliação do perfil imunofenotípico de pacientes com leucemia linfocítica crônica. **Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia**, Natal, v.32, n.4, p.337-338. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000400012>. Acesso em: 4 abril 2016.

MATUTES, Estella; et al.. Diagnostic issues in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). **Best Practice & Research Clinical Hematology**. v.23, p.3-20, mar. 2010. Disponível em: <[http://www.bprch.com/article/S1521-6926\(10\)00002-2/abstract](http://www.bprch.com/article/S1521-6926(10)00002-2/abstract)>. Acesso em: 17 novembro 2015.

MELO, Márcio. **Leucemias e linfoma: atlas do sangue periférico**. 1. ed. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2008. 166 p.

METZE, Irene Lorand. LLC: critérios diagnósticos, imunofenotipagem e diagnóstico diferencial. **Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia**. Campinas, v.27, n.4, p.233-235. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151684842005000400003>. Acesso em: 16 novembro 2015.

MOCINI, D.; LEONE, T.; TUBARO, M.; SANTINI, M.; PENCO, M.. Structure, production and function of erythropoietin: implications for therapeutical use in cardiovascular disease. **Current Medicinal Chemistry**. Rome, v.14, n.21, p. 2278-2287. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17896976>>. Acesso em: 24 fevereiro 2016.

MONTSERRAT, E.; MORENO, C. Chronic lymphocytic leukaemia: a short overview. **Annals of Oncology**. Barcelona, v.19, p.320-325, sept. 2008. Disponível em: <http://annonc.oxfordjournals.org/content/19/suppl_7/vii320.full.pdf>. Acesso em: 17 novembro 2015.

OLIVEIRA, Maria Regina A. Azevedo. **Hematologia básica: fisiopatologia e estudo laboratorial**. 4. ed. São Paulo: Livraria Luana Editora, 2008. 420 p.

OLIVEIRA, Raimundo Antônio Gomes. **Hemograma: como fazer e interpretar**. 1. ed. São Paulo: Livraria Médica Paulista, 2007. 505 p.

OLIVEIRA, Raimundo Antônio Gomes; NETO, Adelino Poli. **Anemias e leucemias: conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2004. 421 p.

QUIXABEIRA, Valéria Bernadete Leite; SADDI, Vera Aparecida. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Goiânia, v.40, n.3, p.199-202. 2008. Disponível em: <http://www.diagnosticodobrasil.com.br/arquivos_site/e5bd9622ec96d871ccae064ff860ca72_arquivo.pdf>. Acesso em: 23 maio 2016.

REGO, Eduardo M.; SANTOS, Guilherme A. S.. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitose. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Ribeirão Preto, v.31, n.5, p.367-374, oct. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151684842009000500016>. Acesso em: 25 março 2016.

ROSSI, Davide; et al. Molecular prediction of durable remission after first- line fludarabine- cyclophosphamide-rituximab in chronic lymphocytic leukemia. **Blood Journal**, Italy, v.126, n.16, p. 1921-1924. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26276669>>. Acesso em: 20 fevereiro 2016.

ROSSI, Davide; et al.. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leucemia. **Blood**, Italy, v.119, n.2, p.521-529, jan. 2012.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22077063>>. Acesso em: 16 julho 2016.

RUSAK, Malgorzata; et al.. Utility of laboratory tests in B-CLL patients in different clinical stages. **International Journal of Hematology**, Poland, v.93, n.6, p.736-744, jun. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21626106>>. Acesso em: 19 abril 2016.

SALEEM, Mohamed; YUSOFF, Narazah Mohd. Fusion genes in malignant neoplastic disorders of haematopoietic system. **Hematology**, Malásia, p.1-23. 2016. Disponível em: <<http://www.pubfacts.com/detail/26871368/Fusion-genes-inmalignant-neoplastic-disorders-of-haematopoietic-system>>. Acesso em: 29 fevereiro 2016.

SÁNCHEZ, Manuel Alfredo Ortega; ORTEGA, Maria Luisa Osnaya; BARRIENTOS, José Vicente Rosas. Leucemia linfoblástica aguda. **Medicina Interna de México**, Pachuca, v.23, n.1, p.26-33. 2007. Disponível em: <http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=43827&id_seccion=1480&id_ejemplar=4453&id_revista=47>. Acesso em: 20 novembro 2015.

SANDES; Alex Freire; et al. **Diagnósticos em hematologia**. 1. ed. Barueri: Manole, 2016. 358 p.

SANTOS, Elvany Verônica dos Santos; FILHO, José Meirelles. Measurement of platelet parameters in normal and preeclamptic pregnant women. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Goiabeiras, v.26, n.3, p.201-206. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-72032004000300005&script=sci_arttext>. Acesso em: 02 abril 2016

SANTOS, Paulo Caleb Júnior de Lima (Coord.). **Hematologia: métodos e interpretação**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2013. 450 p.

SCHWARTZ, Gary G.; KLUG, Marilyn G.. Incidence rates of chronic lymphocytic leukemia in US states are associated with residential radon levels. **Future Oncology, USA**, v.12, n.2, p.165-174. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26515766>>. Acesso em: 23 fevereiro 2016.

SHANAFELT, Tait D.; CALL, Timothy G.. Current Approach to Diagnosis and Management of Chronic Lymphocytic Leukemia. **Mayo Clinic Proceedings**, Rochester, v.79, n.3, p.388-98. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15008611>>. Acesso em: 26 abril 2016.

SILVA, Rodrigo Lopes da. Spectrum of Neurologic Complications in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia**, Lisboa, v.12, n.3, p.164-179. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22192500>>. Acesso em: 3 março 2016.

SMOLEJ, Lukas; SIMKOVIC, Martin. Practical approach to management of chronic lymphocytic leucemia. **Archives of Medical Science**, Czech Republic, v.12, n.2, p.448-456, apr. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27186193>>. Acesso em: 23 maio 2016.

STILGENBAUER, S.; et al.. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and VH gene mutation status in pathogenesis and clinical course. **Leukemia**, Germany, v.16, n.6, p.993-1007, jun. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12040431>>. Acesso em: 07 julho 2016.

STRATI, Paolo; et al. Prevalence and Characteristics of Central Nervous System Involvement by Chronic Lymphocytic Leukemia. **Haematologica**, Chicago, p.1-24. 2016. Disponível em: <<http://www.pubfacts.com/detail/26819053/Prevalence-and-Characteristics-of-Central-Nervous-System-Involvement-by-Chronic-Lymphocytic-Leukemia>>. Acesso em: 26 fevereiro 2016.

TAUSCH, Eugen; MERTENS, Daniel; STILGENBAUER, Stephan. Genomic Features: Impact on Pathogenesis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. **Oncology Research and Treatment**, Germany, v.39, n.1-2, p.34-40, jan. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26890126>>. Acesso em: 25 março 2016.

TABBARA, Imad A.; KITTAI, Adam; YU, Eun-Mi. Chronic lymphocytic leukemia: current concepts. **Anticancer Research**, Washington, v.35, p.5149-5166. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26408673>>. Acesso em: 25 fevereiro 2016.

TORRELIO, Eduardo Aranda. El hemograma como instrumento diagnóstico básico en pediatría. **Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría**, La Paz, v.50, n.2, p.1-8. 2011. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/doc/205841845/El-hemograma-como-instrumento-diagnostico-basico-en-pediatria>>. Acesso em: 04 abril 2016.

VASCONCELOS, Dewton de Moraes. Análise de marcadores intracelulares por citometria de fluxo nas leucemias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v.29, n.2, p.105-106. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000200003#end>. Acesso em: 25 março 2016.

VISCO, Carlo; et al.. Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leucemia. **American Journal of Hematology**, Milan, v.89, n.11, p.1055-1062, nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3652131/>>. Acesso em: 29 março 2016.

VITALE, Candida; BURGER, Jan A.. Chronic lymphocytic leukemia therapy: new targeted therapies on the way. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, Houston, p.1-36. 2016. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/14656566.2016.1168401>>. Acesso em: 23 março 2016.

WASIK, Agata M.; et al.. Flow cytometric analysis of SOX11: a new diagnostic method for distinguishing B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma from mantle cell lymphoma. **Leukemia & Limphoma**, Suécia, v.56, n.5, p.1425-1431, oct. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25120048>>. Acesso em: 18 maio 2016.

WOHLFAHRT, Aline B.; et al.. The importance of immunophenotyping by flow cytometry in distinction between hematogones and B lymphoblasts. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Santa Maria, v.51, n.1, p.7-12, feb. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442015000100007>. Acesso em: 24 maio 2016.

WU, Wei; et al.. High LEF1 expression predicts adverse prognosis in chronic lymphocytic leukemia and may be targeted by ethacrynic acid. **Oncotarget**, China, v.7, n16, p.21631-21643, feb. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26950276>>. Acesso em: 20 julho 2016.

ZENZ, Thorsten; et al.. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. **Nature Reviews**, Germany, v.10, p.37-50. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19956173>>. Acesso em: 25 fevereiro 2016.