

MARGARETH FERNANDES

Expressão de Zap-70 e CD38 em leucemia
linfocítica crônica (LLC) e sua correlação
com prognóstico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em ciências

Área de concentração: Hematologia
Orientadora: Prof^a Dr^a Valeria Buccheri

São Paulo
2006

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of medical Journal Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação e dissertações. Teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação;2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Indexed in Index Medicus*.

“Nossos verdadeiros desejos sempre
se transformam em realidade”.

Paulo Coelho

À memória de
meu pai José e
a minha mãe
Petra, meus
exemplos.

Ao meu marido
Edson, meu
amor e à
minha filha
Natália,

*minha
existência.*

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a elaboração deste trabalho.

Primeiramente, agradeço a *Deus* por sempre guiar meus passos.

À *Profa Dra Valéria Buccheri*, minha orientadora, por sua dedicação, orientação científica e incentivo no desenvolvimento e conclusão deste trabalho e pela confiança em mim depositada.

À *Dra Therezinha Ferreira Lorenzi*, por me mostrar a beleza da hematologia.

À Biomédica e amiga *Claudia Viviane Rubens Pires*, pela agradável convivência ao longo de nossa vida profissional e por sua constante colaboração na realização deste estudo.

Às Biólogas e amigas *Alexandra M. M. P. Cavalcante* e *Santa Poppe*, pelo auxílio na elaboração das técnicas adotadas e principalmente pelo bom humor no nosso convívio diário.

Ao *Dr Luís Fernando Pracchia*, pelo profissionalismo e dedicação na realização das análises estatísticas.

À *Maria das Dores Duarte de Sousa Dias* pela simpatia e imprescindível auxílio na recuperação das referências bibliográficas.

À *Elizabeth Cristiane D. Martins*, pela dedicação e paciência na editoração deste trabalho.

À *Dra Maria Aparecida Zanicheli*, pela colaboração na recuperação dos dados dos pacientes do Hospital Brigadeiro.

Ao *Dr José Salvador Rodrigues Oliveira*, por ter permitido a realização deste estudo com os pacientes do Hospital Santa Marcelina.

Ao *Dra Maria do Rosário Ferraz Roberti*, da Santa Casa de Misericórdia de Goiânia e ao *Dr Ernesto Cunha Pires* e *Dr Gileno Portugal Jr*, do Instituto de Hematologia de Feira de Santa, pela preciosa colaboração com a casuística deste estudo.

Aos *Funcionários do ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas da FMUSP* pelo apoio dado na realização deste trabalho.

Aos colegas *Railton Pereira da Silva* e *Saulo de Carvalho Silva* pela convivência.

À *Fundação Maria Cecília Souto Vidigal* pelo apoio financeiro e oportunidade da realização deste estudo.

Ao meu marido e amigo *Edson de Castro*, pelo carinho, apoio, compreensão e respeito.

Aos meus pais, *José* (in memoriam) e *Petra* pela minha formação profissional e pessoal e pelo apoio em todos os momentos.

E finalmente e não menos importante aos pacientes, que possibilitaram este estudo.

SUMÁRIO

Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO

1. Introdução	02
1.1 Histórico	02
1.2 Doença Linfoproliferativas Crônicas de Células B	04
1.2.1 Definição	04
1.3 Leucemia Linfocítica Crônica	06
1.3.1 Epidemiologia	06
1.3.2 Quadro Clínico	06
1.3.3 Diagnóstico	08
1.3.4 Marcadores Imunológicos	10
1.3.5 Citogenética	11
1.3.6 Diagnóstico Diferencial	12
1.3.7 Estadiamento	14
1.3.8 Fatores de Prognóstico	17
1.4. Origem e Desenvolvimento da Célula B	19
1.4.1 Genes da Cadeia pesada da Imunoglobulina (V _H IG)	21
1.5 Expressão de CD38	24
1.6 Zap-70	27

2 OBJETIVOS

2. Objetivos	32
--------------------	----

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. Casuística e Métodos	34
3.1 Casuística	34
3.2 Métodos	35
3.2.1 Anticorpos Monoclonais Utilizados na Avaliação Imunofenotípica por Citometria de Fluxo (CMF)	35
3.2.2 Determinação dos Antígenos de Superfície por CMF	38
3.2.3 Determinação Intracelular da Proteína ZAP-70	38
3.2.3.1 Imunofluorescência Indireta	40
3.2.3.2 Imunoflorescência Direta	41
3.2.4 Aquisição e Análise de Células por CMF	42
3.2.5 Avaliação da Média de Intensidade de Fluorescência de CD38 e Zap-70	44
3.2.6 Análise Quantitativa do número de moléculas de CD38 e de Zap-70 por células	46
3.2.7 Análise estatística	50

4 RESULTADOS

4. Resultados	52
4.1 Características dos pacientes	52
4.2 Avaliação Imunofenotípica em LLC	53
4.3 Classificação imunológica dos pacientes portadores de LLC	55
4.4 Expressão de CD38 nas células B dos pacientes portadores de LLC	56
4.4.1 Ponto de corte de CD38 nas células B dos casos de LLC de acordo com o estágio clínico de Binet	57
4.5 Expressão Intracitoplasmática de Zap-70	59
4.5.1 Expressão de Zap-70 nas células B dos Casos de LLC	61
4.5.2 Ponto de corte de Zap-70 nas células B dos casos de LLC de acordo com o estágio clínico de Binet	62
4.6 Associação entre as expressões de Zap-70 e CD38 nas células B dos casos de LLC	65
4.7 Análise da sobrevida livre de tratamento (SLT)	66
4.7.1 Análise da SLT relacionada a expressão de CD38	67
4.7.2 Análise da SLT relacionada a expressão de Zap-70	68
4.7.3 Análise da SLT relacionada a expressão de Zap-70 e CD38	69
4.8 Análise da sobrevida global	71
4.8.1 Análise da SG relacionada a expressão de CD38	73
4.8.2 Análise da SG relacionada a expressão de Zap-70	75
4.8.3 Análise da SG relacionada a expressão de Zap-70 e CD38	77

5 DISCUSSÃO	80
6 CONCLUSÃO	88
7 ANEXOS	90
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esfregaço de SP de um paciente com diagnóstico de LLC com a presença de manchas Grumprecht´s.....	09
Figura 2	Representação esquemática dos vários estágios de diferenciação dos linfócitos B.....	20
Figura 3	Recombinação e expressão dos genes da cadeia pesada da Ig.....	22
Figura 4	Esquema ilustrativo do estado mutacional do gene V _H Ig nas células B de LLC e sua correlação com o prognóstico.....	23
Figura 5	Ligação da proteína tirosina quinase Zap-70 com o receptor de célula T.....	28
Figura 6	Esquema representativo da correlação da expressão de Zap-70, nas células B de LLC, com o estado mutacional de gene V _H Ig e prognóstico.....	29
Figura 7	Exemplo de avaliação imunofenotípica de um caso de LLC, utilizando o AcMo anti-CD19 PC-5 em todos os tubos.....	36
Figura 8	Análise da expressão intracelular de Zap-70, por citometria de fluxo.....	43
Figura 9	Gráfico de Histograma com análise MIF de CD38 PE.....	45
Figura 10	Gráfico de Histograma com análise da MIF de Zap-70 ID.....	45
Figura 11	Curva de calibração para a quantificação do número de moléculas/célula do AcMo anti-CD38 PE através de reagente <i>Quantum Simply Cellular Microbeads</i>	47
Figura 12	Curva de calibração para a quantificação do número de moléculas/célula do AcMo ZAP-70 AlexaFluor 488 através de reagente <i>Quantum Simply Cellular Microbeads</i>	48
Figura 13	Curva de calibração para a quantificação do número de moléculas/célula do AcMo anti-Zap-70 ID FITC através do reagente <i>Quantum Simply Cellular Microbeads</i>	49

Figura 14	Exemplo de avaliação imunofenotípica em um paciente com diagnóstico de LLC.....	54
Figura 15	Expressão de CD38 em todos os pacientes com diagnóstico de LLC e sua correlação com o estágio clínico de Binet.....	57
Figura 16	Expressão de CD38 com diferentes pontos de corte (<i>cut off</i>) e sua correlação com os pacientes do EC-A, EC-B e EC-C.....	58
Figura 17	Definição dos grupos de pacientes, distribuídos conforme a intensidade de fluorescência de CD38 e número de moléculas/célula.....	59
Figura 18	Avaliação da expressão de Zap-70 na mesma amostra utilizando-se: a) Zap-70 ID FITC e b) Zap-70 Alexa (ambos os casos positivos)....	60
Figura 19	Expressão de Zap-70 em todos os pacientes portadores de LLC e sua correlação com o EC de Binet.....	61
Figura 20	Expressão de Zap-70 com diferentes pontos de corte (<i>cut off</i>) e sua correlação com EC-A, EC-B e EC-C.....	63
Figura 21	Definição dos grupos de pacientes, distribuídos conforme a intensidade de fluorescência e número de moléculas/células de: a) Zap-70 Alexa e b) Zap-70 ID FITC.....	64
Figura 22	Curva Kaplan-Meier da SLT dos 85 pacientes do estágio clínico A LLC em relação a expressão de CD38: a) > 10%; b) > 20%; c) > 30%.....	68
Figura 23	Curva Kaplan-Meier da SLT dos 85 pacientes do estágio clínico A LLC em relação a expressão de Zap-70: a) > 20%; b) > 20%.....	69
Figura 24	Curva Kaplan-Meier da SLT dos 85 pacientes do estágio clínico A distribuídos em 3 grupos: Zap-70 ⁻ e CD38 ⁻ ; Zap-70 ⁺ ou CD38 ⁺ ; Zap-70 ⁺ e CD38 ⁺	70
Figura 25	Curva Kaplan-Meier da SLT dos 85 pacientes do estágio clínico A distribuídos em 2 grupos: Zap-70 ⁻ e CD38 ⁻ e Zap-70 ⁺ ou CD38 ⁺	71
Figura 26	Curva Kaplan-Meier da SG dos 205 pacientes com diagnóstico de LLC em relação ao estágio clínico de Binet A, B e C.....	73
Figura 27	Curva Kaplan-Meier da SG dos 205 pacientes de LLC em relação a expressão de CD38: a) > 10%; b) > 20%; c) > 30%.....	74
Figura 28	Curva Kaplan-Meier da SG dos 143 pacientes de LLC em relação a expressão intracelular da proteína Zap-70: a) > 10%; b) > 20%.....	76
Figura 29	Curva Kaplan-Meier da SG dos 144 pacientes estudados distribuídos em 3 grupos: Zap-70 ⁻ e CD38 ⁻ ; Zap-70 ⁺ ou CD38 ⁺ ; Zap-70 ⁺ e CD38 ⁺	77
Figura 30	Curva Kaplan-Meier da SG dos 144 pacientes estudados distribuídos em 2 grupos: Zap-70 ⁻ e CD38 ⁻ ; Zap-70 ⁺ ou CD38 ⁺	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das neoplasias de células B maduras – OMS.....	05
Tabela 2	Critérios laboratoriais para diagnóstico da LLC segundo NCI- EUA.	08
Tabela 3	Critérios para diagnóstico de LLC com base no sistema de pontuação proposto por Matutes et al (1994).....	11
Tabela 4	Perfil imunofenotípico das células leucêmicas da LLC e LNH.....	13
Tabela 5	Sistema de estágio clínico proposto por Rai et al (1975 e 1987).....	15
Tabela 6	Sistema de estágio clínico proposto por Binet et al 1981.....	16
Tabela 7	Anticorpos Monoclonais (AcMo) utilizados na avaliação Imunofenotípica das DLPC e no estudo da proteína Zap-70.....	37
Tabela 8	Característica dos pacientes portadores de LLC	52
Tabela 9	Detecção de monoclonalidade nos 205 casos de LLC.....	55
Tabela 10	Escore imunofenotípico dos pacientes diagnosticados como LLC e classificados pelo estágio clínico de Binet.....	56
Tabela 11	Expressão de CD38, nos estádios clínicos A, B e C, considerando-se como positividade para este marcador com diferentes pontos de corte.....	58
Tabela 12	Expressão de Zap-70, nos estádios clínicos A, B e C, considerando-se como positividade para este marcador com diferentes pontos de corte.....	62
Tabela 13	Expressão de Zap-70 > 20% e CD38 > 30% nos 144 casos de LLC de acordo com estágio clínico de Binet.....	65
Tabela 14	Expressão de Zap-70 e CD38 nos 144 casos de LLC de acordo com estágio clínico de Binet.....	66
Tabela 15	Sobrevida global dos pacientes com LLC segundo sexo, e estágio clínico.....	72

Tabela 16	Sobrevida global dos pacientes com LLC do estágio clínico A e B+C segundo a expressão de CD38.....	75
Tabela 17	Sobrevida global dos pacientes do estágio clínico A e B+C segundo a expressão de Zap-70.....	76
Tabela 18	SG dos 144 casos de LLC distribuídos em 3 grupos de acordo com a expressão de Zap-70 e CD38 e estratificado pelo estágio clínico A e B+C.....	78
Tabela 19	SG dos 144 casos de LLC distribuídos em 2 grupos de acordo com a expressão de Zap-70 e CD38 e estratificado pelo estágio clínico A e B+C.....	79

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

κ	cadeia leve kappa
λ	cadeia leve Lambda
μ	cadeia Mi
β_2	Beta 2
AcMo	Anticorpos monoclonais
AcMO	anticorpos monoclonais
AHAI	Anemia hemolítica auto-imune
BCR	Receptor de células B
C	Região Constante
cIg	Imunoglobulina de cadeia pesada intracitoplasmática
cIgD	Imunoglobulina de cadeia pesada intracitoplasmática D
cIgM	Imunoglobulina de cadeia pesada intracitoplasmática M
CLA	Capacidade de ligação antigênica
C μ	região constante mi
D	Região de diversidade
D-J	região da diversidade+junção
dl	Decilitro
DLPC	Doenças linfoproliferativas crônicas
DLPC-B	Doenças linfoproliferativas crônicas de células B

EC-A	Estádio clínico A
EC-B	Estádio clínico B
EC-C	Estádio clínico C
FISH	Técnicas de fluorescência associadas a hibridização <i>in situ</i>
g/dl	Gramas por decilitro
Hb	Hemoglobina
HCL	<i>Hairy cell leukemia</i>
Ig	Imunoglobulina
Ig(μ)	Imunoglobulina da cadeia pesada μ
IgD	Imunoglobulina de cadeia pesada D
IgM	Imunoglobulina de cadeia pesada M
J	Região de Junção
LCM	Linfoma de células do manto
LDGC	Linfoma difuso de células grandes
LE	Linfoma da zona marginal esplênico
LELV	Linfoma esplênico de linfócitos vilosos
LF	Linfoma folicular
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LLP	Linfoma linfoplasmocítico
LNH	Linfomas não Hodgkin
LPL	Leucemia pró-linfocítica
LZM	Linfoma da zona marginal nodal
MALT	Linfoma associado ao tecido linfóide das mucosas
MDM-2	mouse double minute 2 (inibidor do gene P53)
MIF	Media de intensidade de fluorescência
MM	Mieloma múltiplo
mm ³	Milímetros cúbicos
MO	Medula óssea
MRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
mRNA	RNA mensageiro
MV _H Ig	com mutações somáticas no gene da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina

NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NK	Células <i>Natural killer</i>
NMV _H Ig	Sem mutações somáticas no gene da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina
OMS	Organização Mundial de Saúde
P53	gene supressor de tumores
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PTK	Família tirosina quinase
RB1	Gene do retinoblastoma 1
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa
SIg	Imunoglobulina da cadeia pesada de superfície
sIgD	Imunoglobulina da cadeia pesada de superfície D
sIgM	Imunoglobulina da cadeia pesada de superfície M
SP	Sangue periférico
Syk	spleen tyrosine kinase
TCR	Receptor de célula T
TDL	Tempo de duplicação dos linfócitos
TdT	Enzima deoxinucleotidil terminal transferase
V	Região Variável
VDJ	região variável+diversidade+junção
V _H Ig	gene da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina
VJ	região variável+junção
ZAP-70	proteína Zeta associada
d	cadeia delta

RESUMO

Fernandes M. *Expressão de Zap-70 e CD38 em leucemia linfocítica crônica (LLC) e sua e correlação com prognóstico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 109p.

Atualmente, a Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) pode ser dividida em dois grupos: um com mutações somáticas no gene da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina (MIgV_H) e outro sem mutações (NMIgV_H). Alguns estudos mostraram que a expressão de CD38 na superfície das células B de LLC pode estar correlacionada com o estado mutacional do gene V_HIg, entretanto, esses controversos. Estudos recentes mostraram que a expressão da proteína tirosina quinase Zap-70 está melhor associada com o estado mutacional do gene IgV_H. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de Zap-70 e CD38, por citometria de fluxo, nas células CD19⁺ de pacientes com LLC e correlacioná-los com o estágio clínico (EC), sobrevida livre de tratamento (SLT) e sobrevida global (SG). A expressão de Zap-70 e CD38 foi avaliada, em 144 de pacientes com LLC classificados nos estádios clínicos A, B e C de acordo com os critérios de Binet: 59 (41%) do EC-A, 38 (26%) do EC-B e 47 (33%) do EC-C. Foi observada menor positividade para Zap-70 e CD38 nos pacientes do EC-A do que nos EC-B e C. Quando avaliada a SLT nos pacientes do EC-A, os casos Zap-70⁺ assim como os CD38⁺ apresentaram menor SLT. A média de SG dos pacientes Zap-70⁺ e CD38⁺ foi menor quando comparado com os Zap-70⁻ e CD38⁻ entretanto quando correlacionada com o EC não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a expressão desses marcadores e o EC-A, B ou C. Pela análise combinada de CD38 e Zap-70, dividimos os pacientes em dois grupos (Zap-70⁻/CD38⁻ e Zap-70⁺ ou CD38⁺). Observamos que a expressão positiva desses dois marcadores estava associada ao EC, uma vez que a grande maioria dos pacientes dos estádios B (74%) e C (66%) expressam Zap-70 ou CD38. Entretanto, os pacientes do EC-A, Zap-70⁺ ou CD38⁺, apresentaram SG menor quando comparado com os Zap-70⁻/CD38⁻. Essa diferença não foi observada nos pacientes do EC-B e do EC-C. Também foi observada menor SLT nos pacientes no EC-A, Zap-70⁺ ou CD38⁺.

Esses resultados sugerem que análise combinada de Zap-70 e CD38 podem ser empregadas na avaliação dos pacientes do EC-A para se acompanhar a evolução clínica desse grupo de pacientes. Porém, estudos adicionais devem ser realizados para se validar a utilização clínica desses marcadores.

Descritores: 1.LEUCEMIA CRÔNICA DE CÉLULAS B 2.PROGNÓSTICO 3.CITOMETRIA DE FLUXO 4.MARCADORES BIOLÓGICOS 5.PROTEÍNA TIROSINA QUINASE 6.SOBREVIVÊNCIA

SUMMARY

Fernandes M. *Zap-70 and CD38 expression in CLL patients and the association with prognosis*. [thesis]. Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brasil); 2006. 109p.

Actually, chronic lymphocytic leukemia (CLL) can be divided in two subsets: one with somatically mutated immunoglobulin heavy-chain variable-region genes (MIgV_H) and other with unmutated sequences. (UMIgV_H). Some studies have shown that CD38 expression in CLL cells are correlated with IgV_H mutational status. However, the value of CD38 as surrogate IgV_H mutational status is controversial. Recent studies, have found that Zap-70 protein tyrosine kinase expression is strongly associated with the mutational status IgV_H. The aim of this study was to evaluate the Zap-70 and CD38 expression, for flow cytometry, in CD19⁺ LLC cells and correlate with the Binet's staging system, treatment-free survival (TFS) and a overall survival (OS). Zap-70 and CD38 was evaluated, in 144 CLL patients that was classified in A, B and C Binet's staging system: 59 (41%) in stage A, 38 (26%) in B and 47 (33%) in C. We observed low Zap-70 and CD38 expression in stage A patients than in stage B and C cases. When we analyzed the TFS in stage A patients Zap-70⁺ and CD38⁺ patients showed shorter TFS than Zap-70⁻ and CD38⁻. Then we observed that the OS of Zap-70⁺ and CD38⁺ patients was, also, shorter than Zap-70⁻ and CD38⁻ cases. However, statistical differences was not found when Zap-70 and CD38 expression was correlated with stage A, B or C Binet's staging system. To understand the associated Zap-70 and CD38 expression, we divided the CLL patients in two subgroups (Zap-70⁻/CD38⁻ and Zap-70⁺ or CD38⁺). We observed that CD38⁺ or Zap-70⁺ was associated Binet's staging system, once most of stage B (74%) and C (66%) patients are Zap-70⁺ or CD38⁺. However, stage A patients, Zap-70⁺ or CD38⁺, showed shorter OS than Zap-70⁻/CD38⁻. These differences were not observed in stage B and C patients. Shorter TFS was also observed in the Zap-70⁺ or CD38⁺ stage A

patients. These results suggest that combined analysis of Zap-70 and CD38 can be used to evaluate stage A patients to observe the clinical evolution of the disease. Nevertheless, other studies must be carried to confirm the clinical use of these markers.

Descriptors: 1.B CELLS CHORNIC LEUKEMIA CHRONICLE OF CELLS B
2.PROGNÓSTICO 3. FLOW CYTOMETRY 4.BIOLOGICAL MARKERS 5.TYROSINE
KINASE PROTEIN 6.SURVIVAL

REVISÃO DA LITERATURA E INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1 – HISTÓRICO

O primeiro caso de leucemia foi descrito em 1827 por Velpeau, entretanto o termo leucemia (*leukämie*) foi citado somente duas décadas depois por Virchow (1847) em um relato de nove pacientes. Concomitantemente, Bennett adotou a terminologia leucocitemia para descrever outros 35 casos. Logo após, Virchow classificou a leucemia em formas esplênica e linfática; na forma esplênica os leucócitos eram granulares e na linfática, agranulares. Em 1870, Ernest Neumann reconheceu a importância da medula óssea (MO) como fonte de produção de células sanguíneas e descreveu dois padrões de envolvimento da MO: a hiperplasia linfadenóide composta por células com núcleo homogêneo e alta relação núcleo citoplasmática e a hiperplasia piogênica onde havia um predomínio de células granulares. Porém, somente em 1891, quando Paul Erlich desenvolveu a coloração tri-ácida, que permitiu uma melhor visualização do núcleo e dos detalhes do citoplasma, foi possível realizar a diferenciação morfológica das leucemias em linfóides e mieloides. Kundrat (1893), utilizou o termo linfosarcoma para descrever outra patologia que acometia principalmente linfonodos e quadro leucêmico geralmente ausente. Dez anos após, Türk (1903) relatou a similaridade entre o linfosarcoma e a leucemia linfocítica crônica (LLC), descrevendo o curso variável das neoplasias linfóides e propôs critérios diagnósticos para a LLC (apud Hamblin et al, 2000).

Durante as décadas que se seguiram, o reconhecimento das leucemias e

tentativas para classificá-las estavam baseadas meramente na avaliação morfológica. Somente em 1924, Minot e Isaacs fizeram a primeira descrição detalhada dos achados clínicos da LLC, entretanto nada relataram sobre o curso clínico da doença (apud Hamblin et al, 2000).

Em 1966, Boogs et al publicaram uma revisão sobre os critérios para o diagnóstico da LLC, e também avaliaram a resposta ao tratamento e dados relacionados a sobrevida. Esses autores observaram que os pacientes com sobrevida menor de cinco anos apresentavam mais manifestações clínicas ao diagnóstico daqueles que sobreviviam por um período longo. No mesmo ano, Galton (1966) observou que o rápido aumento do número absoluto de linfócitos no sangue periférico estava correlacionado com a progressão clínica da doença. Concomitantemente, Dameshek (1967) baseando-se em achados clínicos, tais como sintomas relacionados com a doença, aumento de linfonodos, presença de esplenomegalia e/ou hepatomegalia demonstraram detalhes da fisiopatologia da LLC. Dessa maneira, estes autores sugeriram que a principal característica da LLC seria o acúmulo progressivo de linfócitos, imunologicamente incompetentes.

Na década de 70, com o desenvolvimento das técnicas de imunofluorescência direta, alguns investigadores estudaram os linfócitos B do sangue periférico, em indivíduos normais e pacientes com LLC. Esses autores observaram que nos indivíduos normais aproximadamente 7% das células do sangue periférico eram linfócitos B, enquanto que nos pacientes com LLC em média 89% das células correspondiam a linfócitos B (apud Hamblin et al, 2000).

Nos últimos anos, o desenvolvimento da citometria de fluxo, o aprimoramento da citogenética e estudos moleculares, permitiram um diagnóstico

mais preciso da LLC e também foram de grande importância para o entendimento da imunopatologia da doença (Cheson et al, 1996; Naylor & Capra, 1999). Paralelamente, também foram identificados vários fatores com possível valor prognóstico (Juliussen et al 1990)

Porém, apenas recentemente a avaliação do estado mutacional da região variável gene da cadeia pesada da imunoglobulina, por técnicas de sequenciamento gênico, mostrou ser um indicador de prognóstico na LLC (Crespo et al, 2003). Após essa descrição, vários outros estudos foram desenvolvidos para se encontrar um substituto desse indicador prognóstico. Esses estudos avaliaram se o antígeno CD38 e a proteína tirosina quinase Zap-70 poderiam estar correlacionados com o estado mutacional do IgV_H e prognóstico (Schoroes et al, 2005).

1.2 – DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS DE CÉLULAS B

1.2.1 – DEFINIÇÃO

As doenças linfoproliferativas crônicas de células B (DLPC-B) constituem um grupo heterogêneo de neoplasias, que têm em comum sua origem a partir de células linfóides B maduras e que além de infiltrarem órgãos linfóides como gânglios linfáticos e baço, também estão presentes na medula óssea e sangue periférico.

Em anos recentes, foram reconhecidas distintas entidades de doenças linfoproliferativas crônicas, com características clínicas e laboratoriais específicas. Essas entidades foram identificadas quando marcadores da membrana celular, em

particular anticorpos monoclonais (AcMo), foram introduzidos rotineiramente na avaliação diagnóstica e maior atenção foi dada a certos detalhes morfológicos e no padrão de infiltração da medula óssea (Bennett et al, 1989). Além disso, a patogênese dessas doenças pôde ser estudada com técnicas modernas de uso crescente, como a citogenética e a reação em cadeia da polimerase (PCR) na investigação de genes específicos e regiões de quebra cromossômica (Jaffe et al, 2001).

Segundo a classificação de neoplasias de células B madura, proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), essas patologias são classificadas de acordo com suas características morfológicas, imunofenóticas, citogenéticas e alterações moleculares (Jaffe et al, 2001) (Tabela 1).

Tabela 1- Classificação das neoplasias de células B maduras - OMS

Neoplasias de células B maduras ou periféricas
Leucemias crônicas
Leucemia linfocítica crônica (LLC)/ Linfoma linfocítico de células pequenas
Leucemia pró-linfocítica (LPL)
Leucemia de células cabeludas (Tricoleucemia) (<i>Hairy cell leukemia</i>) (HCL)
Linfomas não Hodgkin (LNH)
Linfoma linfoplasmocítico (LLP)
Linfoma da zona marginal esplênico (LE)
Linfoma da zona marginal extranodal tipo MALT (associado ao tecido linfóide das mucosas)
Linfoma da zona marginal nodal (LZM)
Linfoma folicular (LF)
Linfoma de células do manto (LCM)
Linfoma difuso de células grande(LDCG)
Mieloma múltiplo (MM) e Leucemia de células plasmáticas (LCP)

1.3 – LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA

1.3.1 - EPIDEMIOLOGIA

A LLC é a mais comum das leucemias crônicas de células B e representa cerca de 90% dessas neoplasias (Dighiero & Jacques-Louis, 2000). Nos países ocidentais a LLC corresponde a 25% a 30% de todas as leucemias (Yuille, et al, 2000). Entretanto, nos países asiáticos sua incidência é baixa correspondendo apenas a 2,5% do total das leucemias (Linnet & Cartwright, 1988). No Brasil a LLC corresponde a aproximadamente 33% do total das leucemias nos adultos. (www.inca.gov.br). A média de idade ao diagnóstico é de 55 anos e aumenta com a progredir da idade. Essa patologia é mais freqüente no sexo masculino, com a razão de sexo H:M de 2:1 (Catosvky & Richards, 1989, Faguet, 1994).

A etiologia da LLC permanece desconhecida. Entretanto sua prevalência é maior entre trabalhadores expostos a agentes químicos e derivados de petróleo. Em algumas famílias, o risco de desenvolvimento da doença é maior em relação a população geral, sugerindo uma predisposição genética (Yuille et al, 2000).

1.3.2 – QUADRO CLÍNICO

O curso clínico da LLC é bastante variável. Alguns pacientes são assintomáticos e o diagnóstico normalmente é realizado durante um exame de rotina. Outros pacientes apresentam ao diagnóstico linfadenomegalia generalizada, hepato-

esplenomegalia, astenia, perda de peso, febre, infecções bacterianas e hemorragias (Kalil & Cheson, 2000).

Alterações no sistema imune são freqüentes. Em 8% dos casos ocorre hipogamaglobulinemia que aumenta progressivamente com a evolução da doença podendo ser encontrada em 65% dos casos com 10 anos ou mais de evolução. Aproximadamente 10% a 20% dos pacientes apresentam teste de Coombs positivo, porém é rara a evidência clínica de hemólise. A presença de anticorpos anti-eritrocitários aumenta com a progressão da doença e 10% a 20% dos pacientes desenvolvem anemia hemolítica auto-imune (AHAI) durante o curso da doença. A trombocitopenia auto-imune é observada em 2% dos casos, enquanto que neutropenia auto-imune e aplasia pura de série vermelha são raras (Pangalis et al, 1999).

A LLC, em geral, evolui lentamente com um aumento progressivo no número de prolinfócitos e piora da anemia, trombocitopenia e esplenomegalia (Rozman & Montserrat, 1995). Por outro lado, a transformação da LLC para formas mais agressivas ocorre em 10% a 15% dos pacientes, e em cerca de 5% dos casos ocorre a Síndrome de Richter, caracterizada pelo aparecimento de um linfoma difuso de grandes células B. Nesses casos, a sobrevida média é de 4 a 5 meses.

Entre 5% a 15% dos pacientes com LLC podem desenvolver uma segunda neoplasia devido a idade avançada e da deficiência da imunidade humoral. Normalmente as regiões mais comumente acometidas são a pele, o trato respiratório e trato gastrointestinal (Rozman & Montserrat, 1995).

1.3.3 - DIAGNÓSTICO

Nas últimas três décadas, vários critérios diagnósticos foram propostos, porém o mais utilizados são os critérios estabelecidos e revisados pelo *The International Workshop on CLL* (1989) e pelo National Cancer Institute - *Sponsored Working Group* (Cheson et al, 1996) que englobam: a) a presença de linfocitose em SP $> 5.000/\text{mm}^3$ com expressão de pelo menos um marcador de células B (CD19, CD20, CD23) e o marcador de células B de memória CD5; b) menos de 55% de prolinfócitos no SP; c) linfocitose na medula óssea (MO) = 30% (Tabela 2).

Tabela 2 - Critérios laboratoriais para diagnóstico da LLC segundo NCI- EUA

	Critérios
Sangue periférico (SP)	Linfocitose $>5000/\text{mm}^3$ Predominância de linfócitos pequenos e maduros Células atípicas $< 55\%$
Características imunofenotípicas	CD19 ⁺ , CD20 ⁺ , CD23 ⁺ CD5 ⁺ , sIg ⁺ , CD79b ⁻ , FMC7
Medula óssea (MO)	Normocelular ou hiper celular ou Linfocitose = 30% Padrão de infiltração: nodular, intersticial, difuso e misto

Morfológicamente, as células leucêmicas da LLC têm aparência de linfócitos maduros, normalmente pequenos, o núcleo apresenta a cromatina condensada sem nucléolo evidente e com alta relação núcleo/citoplasma. As membranas citoplasmática e nuclear são regulares, com citoplasma fracamente basofílico. É comum a visualização de células rompidas, a manchas de *Grumprecht*,

no esfregaço de sangue periférico da maioria dos pacientes, porém não existe uma explicação clara para essa formação (Foerster et al, 1993) (Figura 1).

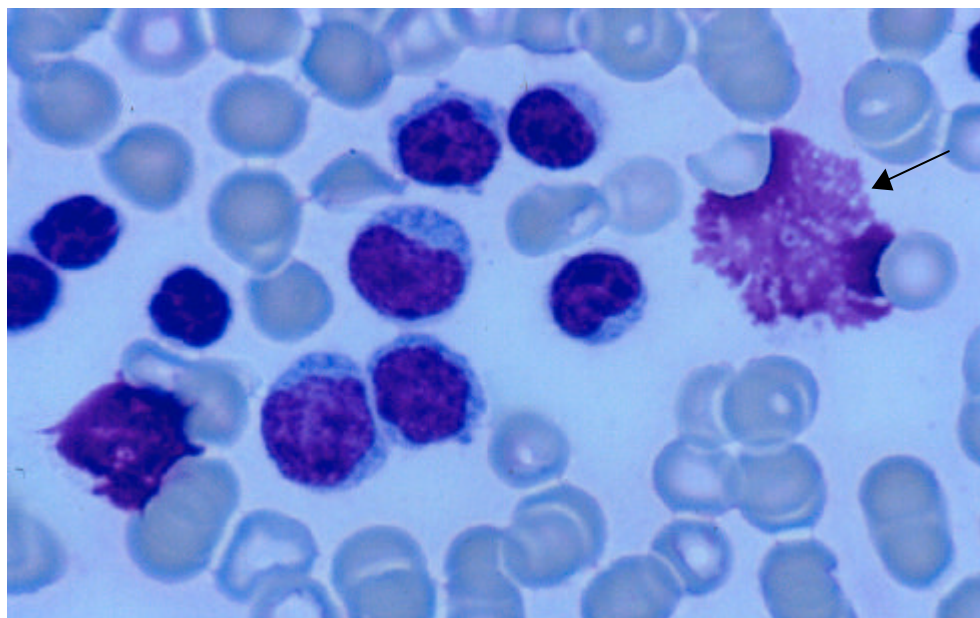


Figura 1 - Esfregaço de SP de um paciente com diagnóstico de LLC evidenciando a presença de manchas de *Grumpprecht*.

Aproximadamente 30% dos casos de LLC apresentam, ao diagnóstico, uma proporção variável de prolinfócitos entre 10% a 50%. Esses casos são denominados de LLC mista (Bennett et al, 1989).

A medula óssea na LLC geralmente é normocelular ou hiperclular e as características morfológicas dos linfócitos são as mesmas daquelas encontradas no sangue periférico (Bennett et al, 1989). O padrão de envolvimento da medula óssea pode ser intersticial, nodular, difuso ou uma combinação dos três anteriores (Jaffe et al, 2001) (Tabela 2).

1.3.4 - MARCADORES IMUNOLÓGICOS

Na década de 70, houve um grande avanço na caracterização das células hematopoéticas após o desenvolvimento, por Kohler e Miltein (1975), da técnica do hibridoma e a conseqüente produção de anticorpos monoclonais (AcMo).

As células leucêmicas na LLC expressam marcadores de superfície com fenótipo da linhagem linfóide B madura HLA-DR, CD19, CD20, CD22 e CD23. A expressão do antígeno CD20 é de baixa densidade e a expressão de CD22 é fraca ou mesmo negativa. Caracteristicamente, essas células apresentam na superfície celular co-expressão do antígeno de células T, CD5 e da imunoglobulina de cadeia pesada IgM ou IgM e IgD. A expressão, na superfície celular, das imunoglobulinas de cadeia leve é restrita a uma única cadeia leve kappa (κ) ou lambda (λ) (Jaffe et al, 2001). Definiu-se como critério de monoclonalidade quando há uma proporção de 3 ou mais moléculas de kappa para 1 de lambda ou 2 ou mais moléculas de lambda para 1 de kappa (Marti et al, 2005). Em uma minoria dos casos (10% a 15%) não é possível detectar monoclonalidade (Pangalis et al, 1999). A expressão do antígeno CD10 é negativa enquanto que a de FMC7 e CD79b são raramente encontrados, já a expressão dos antígenos CD11c e CD25 é variável.

Pela avaliação imunofenotípica das células patológicas nas DLPC foi possível compor um sistema de pontuação baseado na reatividade dos 3 anticorpos monoclonais CD5, CD23 e FMC7, bem como na intensidade de expressão das Ig na superfície celular e do CD22 (Matutes et al, 1994). Esse sistema de pontuação se mostrou essencial para o diagnóstico diferencial entre a LLC e as outras DLPC. São consideradas como LLC os casos com escores 3, 4 e 5, sendo que a grande maioria

dos casos apresentam escores 4 ou 5 e apenas uma pequena proporção com escore 3. As outras neoplasias de células B maduras geralmente apresentam pontuação de 0 a 2 (Tabela 3).

Tabela 3 - Critérios para diagnóstico de LLC com base no sistema de pontuação proposto por Matutes et al (1994).

Marcador	Pontos	
	1	0
CD5	Positivo	Negativo
CD23	Positivo	Negativo
CD79b/CD22*	Negativo/positivo	Moderado/forte
FMC7	Negativo	Positivo
sIg	Fraco	Moderado/Forte
Pontuação	3 - 4 - 5	0 - 2
Diagnóstico	LLC	Outras DLPC

*Avaliação de CD79b pode ser substituída pela avaliação de CD22

Negativo/fraco: negatividade ou baixa expressão antigênica

Moderado/forte: expressão antigênica moderada ou forte.

1.3.5 - CITOGENÉTICA

Pelo estudo das anormalidades cromossômicas nas neoplasias malignas foi observada forte associação entre a presença de anormalidades citogenéticas e certos tipos de tumores humanos. Na LLC, as células B malignas apresentam baixo índice mitótico *in vivo* e também respondem pouco a presença de agentes mitóticos dificultando assim a análise citogenética clássica (Kipps, 2000). Entretanto, com o

desenvolvimento de técnicas de fluorescência associadas a hibridização *in situ* (FISH) ocorreu melhora na detecção de algumas anormalidades cromossômicas, em relação a citogenética convencional (Dohner et al, 1999; Stilgenbauer et al, 2002).

A maioria dos estudos mostra que, pela citogenética convencional, 50 a 60% dos pacientes com LLC apresentam alguma anormalidade cromossômica. Recentemente, foi demonstrado por hibridização “*in situ*” que mais de 80% dos casos apresentam alterações citogenéticas (Dohner et al, 1999).

A trissomia do cromossoma 12 é a anormalidade mais freqüente sendo observada em um terço dos pacientes. A segunda anormalidade cromossômica mais encontrada é a alteração estrutural do braço longo do cromossomo 13, com uma alta freqüência para deleções e translocações envolvendo o locus 13q14 onde está localizado o gene do retinoblastoma (RB1). Outras anormalidades estruturais como a deleção do 11q, deleção 17p e deleção 6q são pouco freqüentes na LLC (Dohner et al, 1999; Doneda et al, 2001).

1.3.6 – DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

O diagnóstico diferencial entre a LLC e as outras DLPC é importante. Devem ser consideradas as outras leucemias crônicas de células B e T, bem como a fase leucêmica dos linfomas não Hodgkin (LNH) (Rowan et al, 1994).

Para um diagnóstico diferencial acurado devem ser avaliados o quadro clínico, as características citomorfológicas e histológicas, o perfil imunofenotípico e as anormalidades cromossômicas das células leucêmicas. Nos casos onde é

observada linfocitose elevada, deve ser considerado o diagnóstico diferencial entre a LLC, a LPL ou a forma variante da HCL. Na grande maioria dos casos os critérios morfológicos e imunofenotípicos são suficientes para que o diagnóstico diferencial seja estabelecido. Tanto as células da LPL como as da HCL não expressam CD23 e CD5. As células leucêmicas da HCL morfológicamente apresentam linfócitos pilosos, com positividade para CD103 (Galton et al, 1974; Matutes et al, 1994b) (Tabela 4).

Tabela 4 - Perfil imunofenotípico das células leucêmicas da LLC e LNH

	LLC	LPL	LCM	LF	HCL	LE	LLP	LDGC
CD19	++	++	++	++	+++	++	++	++
CD20	+	+++	++	++	+++	++	++	++
CD5	++	-/+	++	-/+	-	-/+	-/+	+ ou -
CD10	-	-/+	-	++	-	-	-	+ ou -
CD11c	+	-/+	-	-	++	+/-	-/+	
CD22	-/+	++	++	+/-	+++	++	+	+
CD23	++	-/+	-	-/+	-	-	-	
CD25	-/+	+/-	-	-	+++	+/-	-/+	
CD79b	-/+	++	++	++	++	++	+/-	
FMC7	-/+	+	+	+	+	+	+	
CD103	-	-	-	-	+++	+/-	-	
CD138	-	-	-	-	-	-	-	-
SIg	-/+	+++	++	++	+++	++	+	+

(+) expressão fraca do marcador imunofenotípico; (++) expressão moderada do marcador imunofenotípico; (+++) expressão forte do marcador imunofenotípico; (-) ausência de expressão; (-/+) marcador imunofenotípico expresso em menos de 50% dos pacientes; (+/-) marcador imunofenotípico expresso na maioria dos pacientes

A forma mais comum dos LNH em fase leucêmica é o LDGC no qual as células são caracterizadas pela expressão de antígenos da linhagem linfóide B madura (CD19, CD20, CD22, sIg), entretanto não há expressão de CD10. O LF é a segunda forma mais comum de LNH cuja característica fenotípica principal é a expressão de CD10. Outro subtipo de LNH é o LCM que apresenta expressão aumentada de ciclina D1 e muitas vezes o diagnóstico diferencial com a LLC é dado pela presença da translocação t(11;14)(q13;q32). As células do LELV além de expressarem os antígenos da linhagem linfóide B madura (CD19, CD20, CD22, CD79b e sIg) e FMC7, apresentam fraca expressão de CD10, CD23 e CD5. (Jaffe et al, 2001) (Tabela 4).

1.3.7 – ESTADIAMENTO

O curso clínico da LLC é bastante variável. Alguns pacientes são assintomáticos e sobrevivem por longos períodos sem a necessidade de terapia, enquanto outros evoluem rapidamente apesar de tratamento agressivo. Em 1966, alguns autores observaram que pacientes com sobrevida menor do que 5 anos tinham mais manifestações clínicas ao diagnóstico quando comparados com os que sobreviviam por um período longo e que o rápido aumento do número absoluto de linfócitos no sangue periférico estava correlacionado com a progressão clínica da doença (Boogs et al, 1966).

Baseando-se nas características clínicas, tais como aumento de linfonodos, presença ou ausência de esplenomegalia e/ou hepatomegalia e avaliação hematológica do sangue periférico vários sistemas de estadiamento clínico foram

propostos para identificar a extensão da doença nos pacientes com LLC, avaliar o prognóstico e desta forma programar melhor a estratégia terapêutica (Geisler et al 1986). Os dois sistemas mais utilizados na prática clínica são o sistema de estágio clínico de Rai (1975) e o de Binet (1981).

O sistema de estágio clínico proposto por Rai et al (1975) considerava: i) linfocitose absoluta maior que 15.000/ mm³ em SP associada ou não a adenomegalias, esplenomegalia e/ou hepatomegalia; ii) anemia definida como taxa de hemoglobina menor que 11g/dl; iii) plaquetopenia definida como contagem de plaquetas menor que 100.000/mm³. Esse sistema classificava os pacientes em 5 categorias de 0 a IV (Tabela 5).

Tabela 5 - Sistema de estágio clínico proposto por Rai et al (1975 e 1987).

Estádio	Áreas comprometidas	Hb (g/dl)	Plaquetas/mm ³	Prognóstico
0	não	>11,0	>100.000	Baixo risco
I	linfonodos	>11,0	>100.000	Baixo risco
II	Fígado e/ou baço	>11,0	>100.000	Risco intermediário
III	indiferente	<11,0	>100.000	Alto risco
IV	indiferente	indiferente	<100.000	Alto risco
0	não	> 11,0	>100.000	Baixo risco
I e II	Linfonodos +Fígado e/ou baço	> 11,0	>100.000	Risco intermediário
III e IV	indiferente	< 11,0	<100.000	Alto risco

Em 1987, esse sistema foi modificado pelos mesmos autores (Rai et al, 1987), e dividido em três categorias: baixo risco (estádio 0), de risco intermediário englobando os estádios I e II e alto risco, os estádios III e IV (Tabela 5).

O sistema de estágio clínico de Binet et al (1981) subdivide os pacientes em três categorias (Tabela 6). Os pacientes em estágio clínico A (EC-A) são considerados de baixo risco e clinicamente sem evidências de anemia ou plaquetopenia e com até duas cadeias ganglionares afetadas. Os pacientes em estágio clínico B (EC-B) diferem do grupo A, por apresentarem três ou mais cadeias ganglionares comprometidas e são consideradas de risco intermediário. Os pacientes classificados como estágio C (EC-C) apresentam anemia e plaquetopenia (Tabela 6).

Tabela 6 - Sistema de estágio clínico proposto por Binet et al 1981.

Estádio	Áreas comprometidas	Hb (g/dl)	Plaquetas/mm ³	Sobrevida média (anos)	Prognóstico
EC-A	< 3 áreas	> 10,0	>100.000	>10	Baixo risco
EC-B	= 3 áreas	> 10,0	>100.000	7	Risco intermediário
EC-C	indiferente	< 10,0	=100.000	1,5	Alto risco

Na década de 70, aproximadamente 40% dos pacientes diagnosticados com LLC eram do EC-A de Binet. Nas duas últimas décadas, vários estudos evidenciaram que, aproximadamente 80% dos pacientes com LLC encontram-se no EC-A de Binet, provavelmente devido a um diagnóstico precoce e pela realização de exames de rotina em pacientes assintomáticos (Molica, 1991, Rozman & Montserrat, 1995, Byrd et al 2004).

1.3.8 - FATORES DE PROGNÓSTICO

Esses dois sistemas de estádios clínicos descritos por Rai et al (1987) e Binet et al (1981) são amplamente utilizados, até hoje, como importantes fatores preditivos de sobrevida em pacientes com LLC. Entretanto, seu valor prognóstico é limitado nos estádios precoces da doença.

Vários estudos demonstraram que o tempo de duplicação dos linfócitos (TDL) é um indicador prognóstico da LLC. Pacientes com o TDL inferior ou igual a 12 meses tem sobrevida menor comparado àqueles em que o TDL é superior a 12 meses e que apresentam sobrevida maior (Monteserrat et al, 1986; Molica & Albert, 1987).

O padrão de envolvimento da medula óssea por células leucêmicas também divide os pacientes com LLC em dois grupos, com prognóstico distintos. Pacientes com padrão de infiltração difuso apresentam uma sobrevida média de 2 a 4 anos, enquanto que os pacientes com padrão de infiltração nodular e intersticial tem sobrevida de 8 a 10 anos (Molica et al 1995, Rozman et al, 1984).

Outros fatores tem sido propostos por vários autores como indicadores de prognóstico, tais como, sexo e idade (Catovsky et al, 1989), níveis séricos de CD23 solúvel (Sarfati et al, 1996), níveis séricos de β_2 microglobulina (Keating et al, 1995) e aumento de timidina quinase no soro (Hallek et al, 1999).

Em relação as anormalidades cromossômicas, pacientes com cariótipo normal, deleção 13q14 ou com trissomia 12 estão correlacionados com melhor prognóstico. Por outro lado, uma proporção dos pacientes com deleções 17p13 ou deleções 11q23 tem pior prognóstico (Juliussen et al, 1990).

Mutações ou deleção do gene *P53*, assim como a expressão aumentada do

gene *MDM-2*, que se liga e inativa o *P53*, estão associados a estádios mais avançados da LLC (Barnabas et al, 2001).

Dados da literatura mostram que nenhum desses fatores é eficiente como indicador prognóstico nos estádios iniciais da LLC. Como, atualmente a maioria dos pacientes são diagnosticados nos estádios precoces da doença, existe a necessidade de se identificar fatores que possam auxiliar nessa avaliação (Cheson et al, 1996).

Recentemente, estudos moleculares mostraram que o melhor parâmetro utilizado como indicador prognóstico na LLC é a avaliação do estado mutacional do gene da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina (V_{HIg}). Mutações somáticas nesse gene V_{HIg} são observadas em aproximadamente metade dos casos de LLC e dividem os pacientes em 2 subgrupos: com mutações somáticas do gene V_{HIg} (MV_{HIg}) correlacionados com melhor prognóstico; e outro sem mutações somáticas do gene V_{HIg} (NMV_{HIg}) e que apresentam pior prognóstico (Hamblin et al, 1999).

A detecção de mutações somáticas no gene V_{HIg} é tecnicamente difícil e somente disponível em alguns laboratórios de pesquisa. Desse modo, a identificação de um marcador substituto para o estudo do seqüenciamento do gene V_{HIg} seria importante. Estudos preliminares mostraram que a expressão do CD38 na superfície das células leucêmicas poderia estar correlacionada com o estado mutacional do gene V_{HIg} e a sobrevida dos pacientes com LLC. Entretanto, a utilização do CD38 como indicador do estado mutacional do gene V_{HIg} parece ser contraditório. Além disso, estudos subseqüentes demonstraram que a expressão de CD38 pode variar durante o curso da doença (Del Poeta et al, 2001; Ibrahim et al, 2001; Hamblin et al, 2002).

Recentemente, a avaliação da expressão gênica nas células leucêmicas de

LLC, por técnicas de *microarray*, evidenciaram subgrupos de genes (Zap-70, IM1286077 e Lectina C), que estão correlacionados com o estado mutacional do gene V_HIg. O gene que codifica a proteína Zap-70 parece ser o que melhor está correlacionado com o estado mutacional do gene V_HIg (Rosenwald et al, 2001; Crespo et al, 2003).

1.4 – ORIGEM E DESENVOLVIMENTO DA CELULA B

Os linfócitos B se originam na MO a partir de células precursoras hematopoéticas (*stem cell*). Essas células dão origem as células pré-pré-B que apresentam expressão nuclear da enzima deoxinucleotidil terminal transferase (TdT) e dois outros marcadores na superfície celular: CD19, que se mantém até o final da diferenciação celular e CD10 que desaparece nos estágios mais maduros da diferenciação celular B. (Rajewsky, et al, 1996) (Figura 2).

Essas células pré-pré-B se diferenciam em células pré-B, nas quais se inicia a síntese do gene da cadeia pesada da Ig (μ) e dos genes de cadeia leve da Ig (κ ou λ), que ao ligar-se ao gene de cadeia pesada μ forma a molécula completa de IgM que primeiramente é expressa no citoplasma e depois na superfície celular. Após a expressão de IgM, ocorre o aparecimento de IgD, na superfície celular, tornando a célula capaz de reconhecer ou responder à antígenos.

As células B que ainda não entraram em contato com o antígeno, as células B virgens, saem da medula óssea e migram para os tecidos linfóides periféricos ou para a circulação sanguínea. Essas células apresentam na superfície celular CD19, IgD, IgM, CD23 e também co-expressam o marcador da linhagem linfóide T CD5.

(Rajewsky et al, 1996). As células que entraram em contacto com o antígeno, os linfócitos B ativados, continuam a se diferenciar até células secretoras de Ig (células plasmáticas). Por outro lado, alguns linfócitos B ativados não continuam a diferenciação para células plasmáticas, permanecendo como células B de memória e apresentam na superfície celular IgM, CD19, CD20 com baixa expressão de CD5 e CD10 (Jaffe et al, 2001).

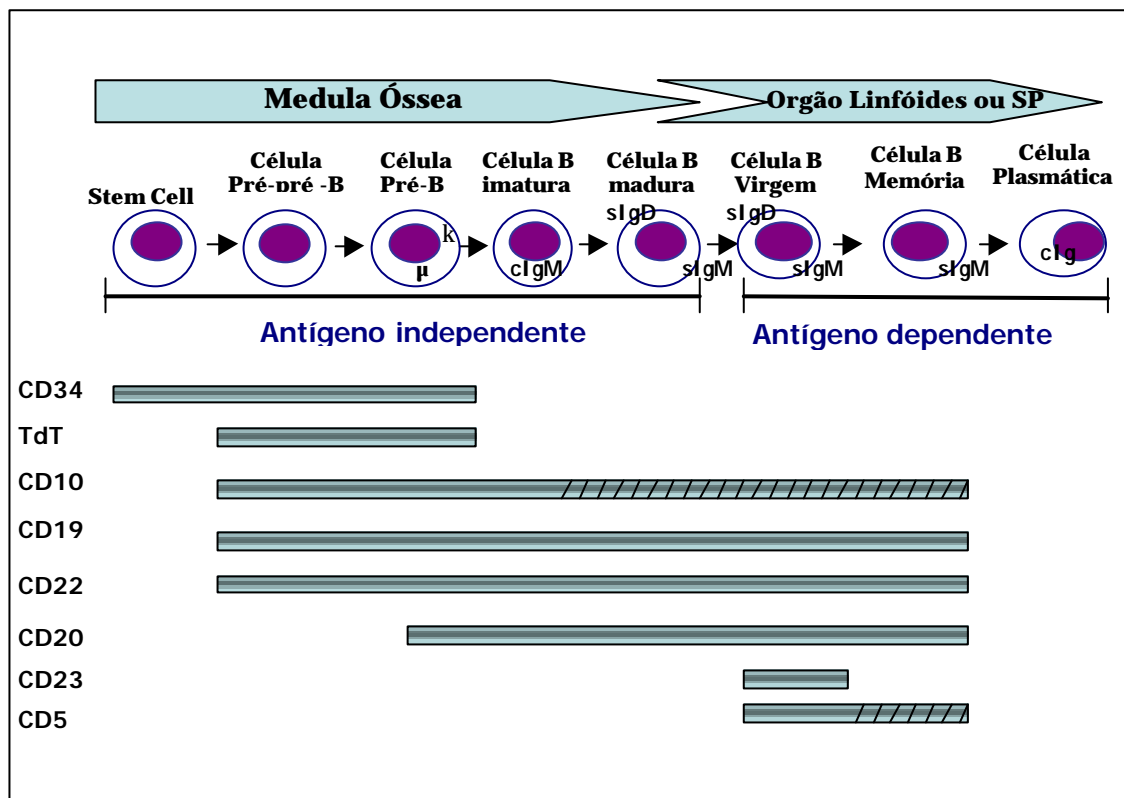


Figura 2 – Representação esquemática dos vários estágios de diferenciação dos linfócitos B.

1.4.1 – GENES DA CADEIA PESADA DA IMUNOGLOBULINA (V_{HIG})

As células B que foram apresentadas a um antígeno, com a ajuda dos linfócitos T e outras células acessórias, migram para o centro germinativo do folículo linfóide enquanto que as células B “virgens” permanecem na região do manto folicular. Nas células do centro germinativo ocorre uma série de rearranjos somáticos no DNA, para formar o gene que codifica a molécula de Ig. Esses rearranjos causam o acúmulo de pontos de mutações na estrutura dos genes da cadeia pesada da Ig. Estas mutações caracterizam as células que passaram ou não pelo centro germinativo (Kelsoe, 1996).

A recombinação dos segmentos gênicos obedece a uma ordem pré-estabelecida. A primeira recombinação ocorre no *locus* de cadeia pesada da Ig onde ocorre o rearranjo do segmento D (região de diversidade) com o segmento J (região de junção) originando o segmento DJ. Após a recombinação D-J, um dos vários genes que compõem a região V (variável) se junta ao complexo DJ dando origem a um gene VDJ rearranjado que permanece separado dos genes da região C (constante). Após a transcrição do complexo VDJ e dos genes C (μ e δ) é formado o RNA (nuclear). Este é processado pela retirada de seqüências de nucleotídeos entre o complexo VDJ e do gene $C\mu$ dando origem ao mRNA funcional. Sendo assim, a tradução do mRNA da cadeia pesada μ induz a produção da proteína μ (Pritsch et al, 1993) (Figura 3).

Paralelamente, ocorre a recombinação do *locus* das cadeias leves κ e λ da Ig, que também obedecem a uma seqüência ordenada semelhante a dos genes de Ig de cadeia pesada. Nos genes das cadeias leves não existem segmentos D, deste modo

a recombinação envolve a junção de um segmento V a um segmento J, formando o complexo VJ, que permanece separado da região C. Durante a transcrição do RNA ocorre a junção da região C ao complexo VJ formando um mRNA que será traduzido nas proteínas κ ou λ . Finalmente, no retículo endoplasmático as proteínas de cadeias leves κ ou λ se reúnem com a proteína de cadeia pesada μ para formar a molécula completa de IgM que será expressa na superfície das células B.

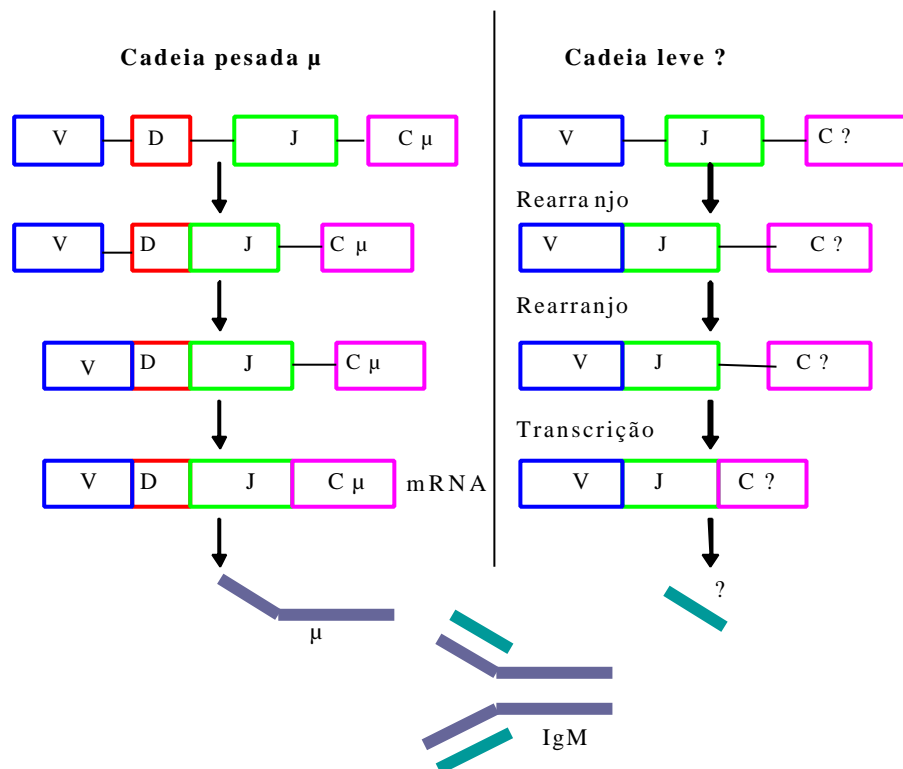


Figura 3 – Recombinação e expressão dos genes da cadeia pesada da Ig.

A LLC é caracterizada pelo acúmulo de uma população clonal de células B $CD5^+$. Inicialmente essas células foram consideradas como linfócitos B “virgens”, entretanto dados recentes (Schroers et al, 1994; Fais et al, 1998) mostraram que pelo

menos metade dos casos de LLC representam expansão clonal de células pós centro germinativo ou células B de memória. Essas conclusões foram baseadas no estudo do sequenciamento dos genes da região variável da cadeia pesada da Ig (V_{HIg}), onde foram encontradas um número significativo de mutações somáticas nesses genes (Fais et al, 1998). As células B com mutações somáticas inferior a 2% são classificadas como não mutadas (NMV_{HIg}), enquanto que aquelas com mutações somáticas superior ou igual a 2% são consideradas mutadas (MV_{HIg}).

Estudos realizados por Damle et al (1999) e Hamblin et al (2000) verificaram que cerca de 50% dos pacientes com LLC não apresentam mutações no gene V_{HIg} . A outra metade é caracterizada pela presença de células B com mutações somáticas no gene V_{HIg} . Esses autores verificaram que o estado mutacional dos genes V_{HIg} está correlacionado, inversamente, com o curso clínico e sobrevida dos pacientes com LLC. Os pacientes com células B NMV_{HIg} tem o curso clínico da doença mais agressivo e menor sobrevida quando comparados com os pacientes MV_{HIg} (Figura 4).

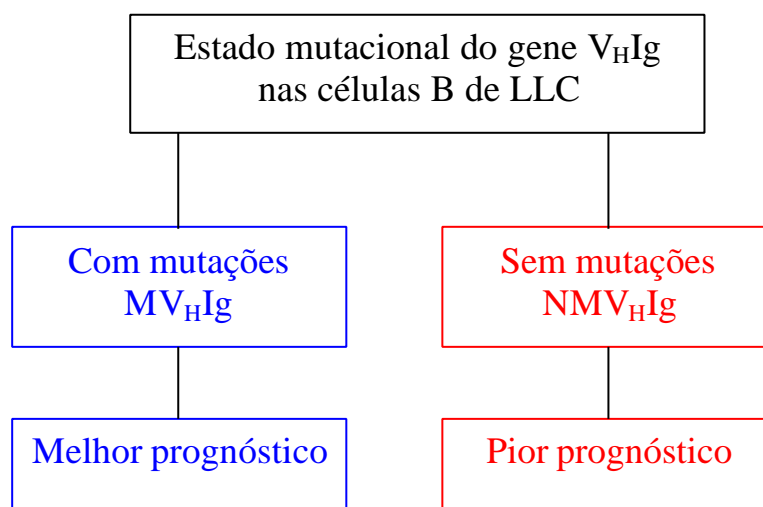


Figura 4 – Esquema ilustrativo do estado mutacional do gene V_{HIg} nas células B de LLC e sua correlação com o prognóstico.

1.5 – EXPRESSÃO DE CD38

Estudo realizado por Naylor et al (1999) demonstrou que a análise das expressões de CD38 e IgD pode ser utilizada para diferenciar os linfócitos B “virgens”, que estão localizadas no manto folicular e as células B de memória, que já passaram pelo centro germinativo.

A expressão de CD38 ocorre em várias células do sistema hematopoético, bem como de outros tecidos não hematopoéticos. A sua expressão nas células hematopoéticas é variável e ocorre principalmente nas células progenitoras CD34+, nos precursores mielóides, nos linfócitos T e B ativados, células NK, células plasmáticas, monócitos e células endoteliais. O CD38 é uma glicoproteína do tipo II de linhagem não específica e está envolvida na ativação de linfócitos. Desempenha também várias outras funções incluindo adesão ao endotélio celular e tem um papel importante no *homing* dos linfócitos, entretanto sua função nas células B não está claramente definida (Hamblin et al, 2002).

Nos últimos anos tem sido investigado se a expressão de CD38 nas células B da LLC está correlacionada com o estado mutacional dos genes V_H Ig e a evolução clínica dos pacientes (Damle et al, 1999). Vários estudos mostraram que células B de LLC com mutações somáticas nos genes V_H Ig e associadas com baixa ou nenhuma expressão de CD38, exibiam um curso clínico favorável da doença,. Por outro lado, os casos sem mutações somáticas nos genes V_H Ig e com alta expressão de CD38 exibiam um pior prognóstico (D’Arena et al, 2001; Del Poeta et al, 2001; Dürig et al 2002; Ibrahim et al, 2001; Jelinek et al, 2001).

Entretanto, outros autores não encontraram correlação entre a expressão de

CD38, a presença ou ausência de mutações no gene da V_H Ig e o curso clínico da doença (Matrai et al, 2001; Thunberg et al, 2001).

Os resultados discordantes podem ser explicados pelo fato da expressão de CD38 se alterar durante o curso da doença, isto é, ela pode aumentar na progressão da doença ou na vigência de processo infeccioso (Chang et al, 2002; Hamblin et al, 2002). Outra explicação é que o valor a ser considerado como positivo para a expressão de CD38 é discutido. Dependendo do ponto de corte escolhido, os pacientes podem ser divididos em diferentes grupos de prognóstico. A porcentagem de expressão de $CD38 \geq 30\%$ é utilizada pela maioria dos autores como associada a pior prognóstico (Damle et al, 1999; Del Poeta et al, 2001; Hamblin et al 2001; Thurnberg et al, 200; Ghia et al 2003). Outros estudos, entretanto, mostraram que expressão de $CD38 \geq 15\%$ ou $CD38 \geq 20\%$ também indicavam pior prognóstico (Ibrahim et al, 2001; Jelinek et al 200; Domingo-Domènich et al, 2002; Dürig et al, 2002). Além disso, Kröber et al (2002) demonstraram que considerando positividade para $CD38 \geq 7\%$ também se pode identificaram os dois subgrupos de LLC, de acordo com o estado mutacional do gene da V_H Ig.

Vários métodos também foram descritos com a finalidade de se identificar as diferenças nas expressões dos antígenos presentes na superfície ou no citoplasma das células (Schawartz et al, 1998; Barnett et al, 2000). A grande maioria dos estudos tem utilizado micropartículas cobertas com quantidades definidas de anticorpos monoclonais (AcMo), conjugados a fluorocromos específicos, que servem como um controle para a análise da intensidade de fluorescência. Esse sistema converte a intensidade de fluorescência em capacidade de ligação antigênica (CLA).

Recentemente, alguns autores, observaram que a intensidade de expressão

de CD38 associada com a positividade deste marcador estava correlacionada com pior prognóstico e menor sobrevida livre de tratamento em pacientes no estágio clínico A (Morabito et al, 2001; Mainou-Fowler et al, 2004). Outros estudos (Hsi et al, 2003) demonstraram que no subgrupo de pacientes de LLC com expressão de CD38 < 30% e taxa de sobrevida baixa só podem ser identificados pela avaliação da CLA deste marcador.

A avaliação da expressão antigênica também pode ser quantificada utilizando-se a média de intensidade de fluorescência (MIF). Recentemente, foi avaliada a MIF de CD38, em pacientes com LLC, e esses casos foram comparados com a expressão de CD38 com a CLA desse marcador. Foi observado que tanto a MIF como CLA de CD38 podem ser utilizadas para avaliar o prognóstico em pacientes com LLC (Mainou-Fowler et al, 2004)

Recentemente, Ghia et al (2003) avaliaram a expressão de CD38, baseados no padrão de expressão desse marcador e a presença de mutações somáticas do gene V_HIg. Estes autores demonstraram a presença de três populações de células B de LLC: uma homogeneamente negativa para CD38; outra homogeneamente positiva para CD38 e uma terceira caracterizada pela presença concomitante de uma população CD38⁺ e outra CD38⁻. Esses autores sugeriram que a presença desta população CD38⁺ dentro do clone de células leucêmicas estava correlacionada com o estado mutacional do gene da V_HIg e poderia identificar pacientes de LLC com curso clínico desfavorável.

1.6 - ZAP-70

Rosenwald et al (2001) pela técnica de “*microarray*” avaliaram a expressão de diversos genes nas células B da LLC. Esses autores descreveram que a presença de um pequeno grupo de genes, incluindo o ZAP-70, o IM1286077 e a Lectina tipo C que identificava os dois subgrupos da LLC (mutados e não mutados). Dentre estes, o gene que codifica a proteína zeta associada (Zap-70) parece estar melhor correlacionada com o estado mutacional do gene $V_{H}Ig$.

Zap-70 é uma proteína membro da família tirosina quinase (PTK), normalmente expressa em linfócitos T e nas células NK e que desempenha um papel essencial na ativação dos linfócitos T através do receptor de antígeno T (TCR). Após a estimulação do receptor de célula T (TCR) ocorre a interação do Zap-70 com o complexo TCR/CD3, ativando a cascata de sinalização dos linfócitos T (Chan et al, 1992; Chan et al, 1994; Law et al, 1994) (Figura 5)

As células B de indivíduos normais, normalmente não expressam Zap-70. Essas células utilizam outra proteína da família tirosina quinase, a Syk, para a ativação do linfócito B pelo complexo do receptor de células B (BCR). As proteínas Zap-70 e Syk têm papéis semelhantes na sinalização do receptor de antígeno na membrana celular, entretanto, o significado funcional da expressão de Zap-70 nas células B da LLC ainda não é bem conhecido. A ligação do complexo BCR nas células B de pacientes com LLC, que expressam Zap-70, induz um aumento da fosforilação de Syk e está associado com a imunoglobulina de superfície e as moléculas CD79a e CD79b. Portanto, acredita-se que a expressão de Zap-70 está associada com o aumento da sinalização pelo complexo BCR e pode estar associado

ao curso clínico mais agressivo da doença (Chen et al, 2002).

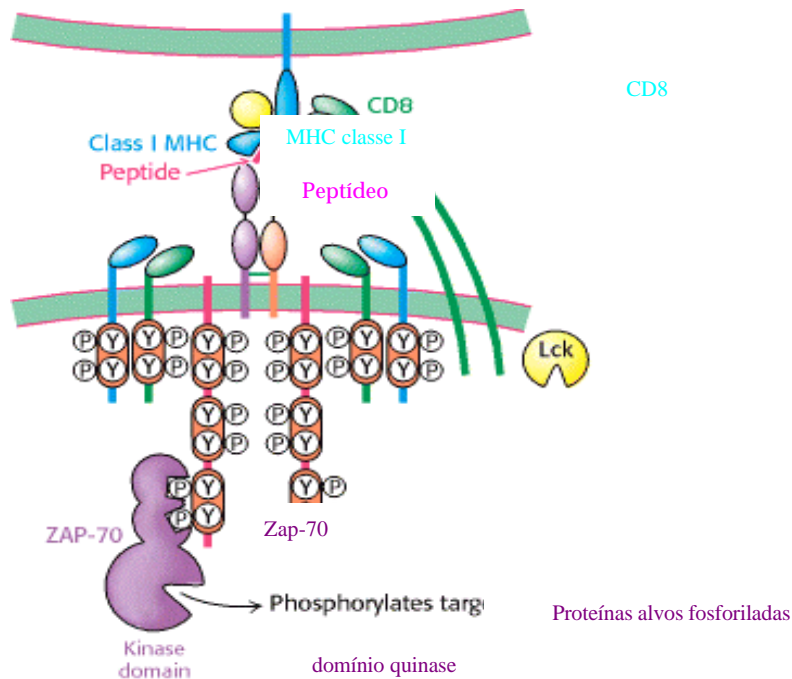


Figura 5 – Ligação da proteína tirosina quinase Zap-70 com o receptor de célula T.

Recentemente, Wiestner et al (2003) observaram alta correlação entre os níveis de expressão do gene Zap-70, avaliados pela análise quantitativa de mRNA pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e o estado mutacional do gene $V_{H}Ig$. Estes autores relataram que a grande maioria dos pacientes $NMV_{H}Ig$ apresentavam expressão de Zap-70, pior prognóstico e menor sobrevida (Figura 6).

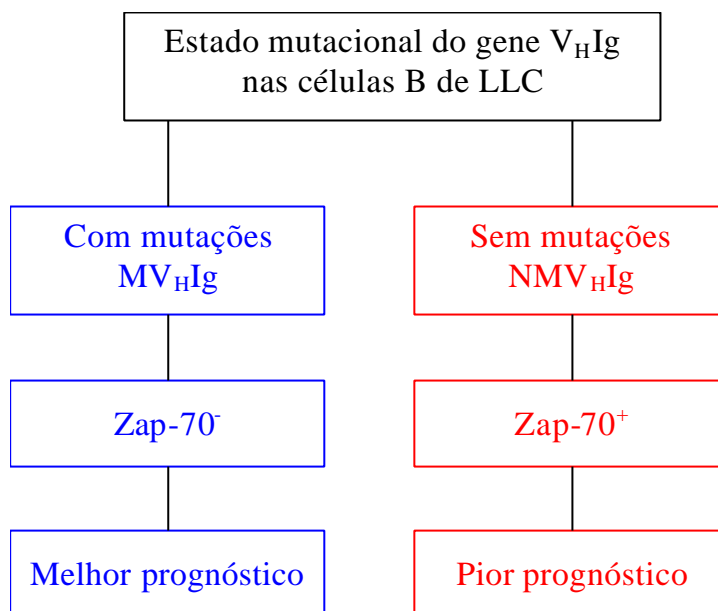


Figura 6 – Esquema representativo da correlação da expressão de Zap-70, nas células B de LLC, com o estado mutacional do gene V_HIg e prognóstico.

Considerando-se o citado acima, foi sugerido que a avaliação quantitativa de Zap-70 poderia ser utilizada como um marcador substituto ao seqüenciamento dos genes V_HIg. Entretanto, como o Zap-70 está normalmente expresso em linfócitos T e células NK, para a sua detecção as células leucêmicas devem ser separadas da população linfocitária normal. Recentemente, alguns autores, realizaram um estudo comparativo entre a expressão intracelular de Zap-70, por citometria de fluxo ou imunohistoquímica, e o estado mutacional do gene V_HIg. Esses autores verificaram que células B de LLC com alta expressão de Zap-70 não apresentavam mutações somáticas dos genes V_HIg. (Crespo et al, 2003; Dürig et al 2003; Orchard et al, 2004; Rassenti et al, 2004). Portanto a expressão de Zap-70 está correlacionada com o estado mutacional do gene V_HIg e pode ser utilizada como um marcador substituto

do estudo do seqüenciamento deste gene. Ao contrário do que ocorre com a expressão de CD38, Zap-70 parece ser estável durante o curso da doença (Dürig et al, 2003).

Entretanto, poucos estudos sobre a expressão de Zap-70 por citometria de fluxo foram realizados em pacientes com diagnóstico de LLC e correlacionados com o estágio clínico (EC) e a sobrevida livre de tratamento (SLT) e sobrevida global dos pacientes (SG) (Crespo et al, 2003; Wiestner et al, 2003; Rassenti et al, 2004) Além disso, até onde temos conhecimento, não existe relato na literatura sobre a avaliação de Zap-70 e CD38, por citometria de fluxo, nos pacientes portadores de LLC da casuística brasileira.

Como atualmente, pacientes do ECA podem ser beneficiados com tratamento quimioterápico e/ou anticorpos monoclonais, a identificação desses pacientes, nos quais a doença pode progredir, é essencial.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- A. Verificar o ponto de corte a ser utilizado para se considerar como positivas as expressões de Zap-70 e CD38.
- B. Avaliar a expressão de Zap-70 e de CD38 nos pacientes com LLC e correlacionar essas expressões com o estágio clínico da doença, sobrevida livre de tratamento e sobrevida global.
- C. Avaliar as expressões quantitativas de Zap-70 e CD38, pela média de intensidade de fluorescência (MIF) e capacidade de ligação antigênica (CLA) ou número de moléculas por células.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 – CASUÍSTICA

Neste estudo foram incluídas 205 amostras consecutivas de sangue periférico (SP) de pacientes portadores de LLC, encaminhadas ao Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Maria Cecília Souto Vidigal, durante o período de janeiro de 1995 a dezembro de 2004.

Em todos os 205 casos de LLC estudados o diagnóstico foi realizado utilizando-se os critérios estabelecidos e revisados pelo *The International Workshop on CLL* (1989) e pelo National Cancer Institute - *Sponsored Working Group* (Cheson et al, 1996), respectivamente. Foram considerados portadores de LLC os pacientes com:

- i) linfocitose absoluta em sangue periférico $>$ de $5.000/\text{mm}^3$ e morfologia de células linfóides maduras;
- ii) Fenótipo de células B (CD19+, CD20+, CD23+) com co-expressão de CD5, monoclonalidade para uma das cadeias leves da imunoglobulina (κ ou λ) e baixa densidade de expressão da Ig de superfície;
- iii) Aspirado de medula óssea evidenciando células linfóides \geq a 30% (de todas as células nucleadas) com celularidade normal ou hiper celularidade.

De acordo com os dados clínicos e laboratoriais, obtidos nos serviços de origem, os pacientes foram classificados clinicamente de acordo com o sistema de estadiamento clínico (EC) de Binet et al (1981). Após a avaliação imunofenotípica,

os pacientes foram imunologicamente classificados de acordo com o sistema de escore para diagnóstico de LLC, proposto por Matutes et al (1994).

3.2 – MÉTODOS

3.2.1 – ANTICORPOS MONOCLONAIS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO (CMF)

A avaliação imunofenotípica por citometria de fluxo foi realizada nas amostras de SP em heparina sódica ou EDTA.

Para a determinação do perfil imunológico foi utilizado um painel de AcMo, diretamente marcados com três diferentes fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e ficoeritrina-cianina 5.1 (PC-5) e dirigidos contra antígenos da linhagem linfóide B (CD10, CD19, CD20, CD23, CD79b, CD103, FMC7, anti-IgM, anti-IgD, antígenos da linhagem linfóide T (CD3, CD4, CD5, CD8) e de células ativadas (CD38). A monoclonalidade foi determinada pela restrição de uma das cadeias leves da Ig utilizando-se os AcMo anti-kappa ou anti-lambda (Tabela 7).

Todas as amostras foram avaliadas pelo método de tripla marcação com uma combinação dos diferentes fluorocromos: FITC, PE e PC-5. O AcMo anti-CD19 foi adicionado em todos os tubos, e utilizado como um marcador guia. A população a ser estudada foi evidenciada pela intensidade de fluorescência de CD19 *versus* a granulosidade celular (CD19/SSC) (Figura 7).

Na avaliação imunofenotípica foi utilizada a seguinte combinação de AcMO: CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC-5; CD20-FITC/CD5-PE/CD19-PC-5; FMC7-

FITC/CD10-PE/CD19-PC-5; CD23-FITC/CD103-PE/CD19-PC-5; IgM-
FITC/CD38-PE/CD19-PC-5; IgD-FITC/CD79b-PE/CD19-PC-5; Kappa-
FITC/Lambda-PE/CD19-PC-5.

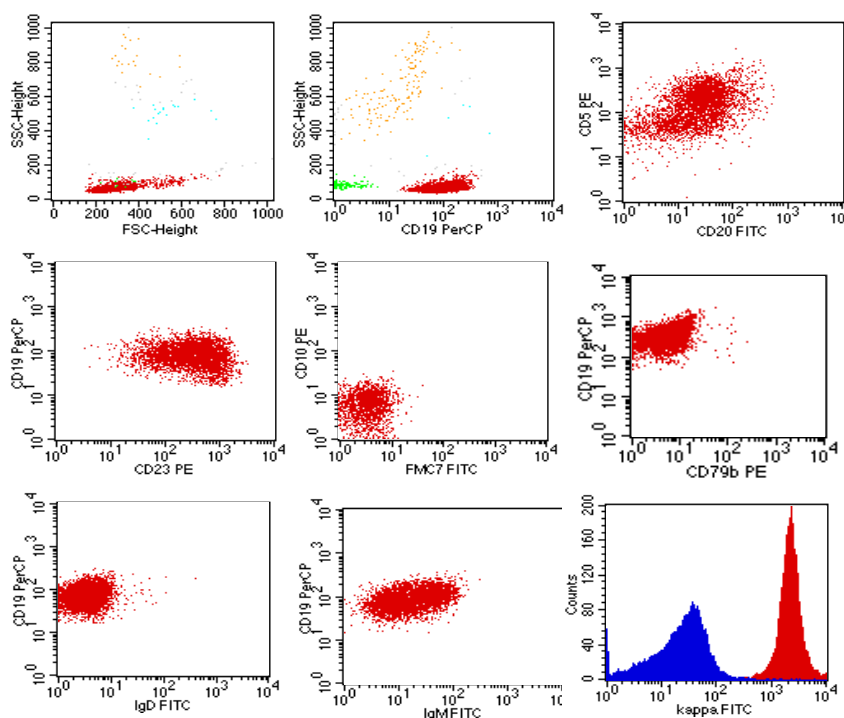


Figura 7 - Exemplo de avaliação imunofenotípica de um caso de LLC, utilizando o AcMo anti-CD19 PC-5 em todos os tubos

Para a avaliação da proteína Zap-70 foi utilizado o AcMo anti-Zap-70 não marcado com fluorocromo (Zap-70 quinase, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA) e/ou o anti-Zap-70 diretamente marcado com Alexa-Fluor (Caltag Laboratoires, Burlingame, California, USA) (Tabela 7). Nessa avaliação foi utilizada a seguinte combinação de AcMo: Zap-70-Alexa/CD3-PE/CD19-PC-5 ou Zap-70-ID FITC/CD3-PE/CD19-PC-5.

Tabela 7- Anticorpos Monoclonais (AcMo) Utilizados na avaliação Imunofenotípica das DLPC e no estudo da proteína Zap-70.

	AcMo/ Fluorocromo	Especificidade	Clone	Fonte Comercial
Marcadores	CD3 PE	Linfócitos T maduro,	UCHT1	Immunotech
	CD4 FITC	Linfócitos T auxiliares	S3.5	Caltag
Linfóide T	CD5 PE	Linfócitos T e células B de memória	UCHT2	BD-Pharmigen
	CD8 PE	Linfócitos T citotóxicos	B9.11	Immunotech
	CD10 PE	Célula B imatura	SS2/36	DAKO
	CD19 PC-5	Pan-B, exceto plasmócito	J4.119	Immunotech
	CD20 FITC	Linfócitos maduros, exceto plasmócitos	2H7	BD-Pharmigen
	CD23 PE	Linfócitos B, Linfócitos B ativados	MHM6	DAKO
Marcadores	FMC7 FITC	Linfócitos B	FMC-7	Caltag
linfóide B	CD79b PE	Linfócitos B	CB3-1	BD-Pharmigen
	CD103 FITC	Lifócitos B de tricoleucemia,	Ber-ACT8	DAKO
	IgM FITC	Cadeia pesada μ	R1/69	DAKO
	IgD FITC	Cadeia pesada δ	IA6-2	BD
	Kappa FITC	Cadeia leve κ	HP6062	Caltag
	Lambda PE	Cadeia leve λ	HP6054	Caltag
Células Ativadas	CD38 PE	Linfócitos B imaturos, T ativados e células plasmáticas	HB7	BD
Indicador de	Zap-70 ID FITC	Linfócitos T, células B de LLC	29	BD
Prognóstico	Zap-70 Alexa Fluor 488	Linfócitos T, células B de LLC	1E7.2	Caltag
AcMo secundário	IgG/coelho anti camundongo			DAKO
	IgG1 FITC	Controle isotópico	IgG ₁	Immunotech
Controles	IgG2a ID	Controle isotópico	IgG _{2a}	Immunotech
	IgG1 PE	Controle isotópico	IgG ₁	
	IgG1 PC-5	Controle isotópico	IgG ₁	DAKO

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína; **RPE:** Ficoeritrina; **PC-5:** Ficoeritrina – Cianina 5.1

3.2.2 – DETERMINAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE POR CMF

Amostras de SP, na concentração de 0.5 a 2.0 x10⁶ células/ml, foram distribuídas em tubos Falcon contendo 50µl de solução salina tamponada enriquecida com 0.02% de azida sódica (PBS-azida, pH 7,4). Em seguida, as células foram marcadas com quantidades adequadas de AcMo conjugados com FITC, PE ou PC-5, por 20 minutos. Decorrido esse período, as hemáceas foram lisadas com 100µl de solução de lise Optilyse B (Immunotech – Marseille – France) e incubadas por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1000µl de água destilada seguido de mais 10 minutos incubação. As células foram então lavadas com PBS azida (pH 7,4) por duas vezes a 2000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante desprezado e o botão celular ressuspenso com solução salina tamponada (PBS) (pH 7,4) ou paraformaldeído 1% (Sigma, St. Louis). Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente e no escuro.

Em todas as amostras foi realizado um controle negativo, contendo os controles isotípicos, dos antígenos pesquisados, diretamente marcados com FITC, PE ou PC-5.

3.2.3 – DETERMINAÇÃO INTRACELULAR DA PROTEÍNA ZAP-70

A avaliação intracelular da proteína Zap-70, por citometria de fluxo, foi realizada 144 pacientes com diagnóstico de LLC. Em 81 amostras a investigação foi realizada em SP total, logo após a coleta, e em 63 casos em células mononucleares

isoladas por gradiente de densidade Ficoll-Hypaque TM^{Plus} (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England) e criopreservadas na presença de dimetilsulfoxide (DMSO – Merck, Darmstadt, Germany).

Para a separação das células mononucleares, 10ml de sangue periférico (SP) total foi diluído em 30ml de solução salina tamponada (PBS) (pH 7,4). Posteriormente o SP diluído foi adicionado, delicadamente, sobre 10ml de Ficoll-Hypaque TM^{Plus} (Amersham Bioscience) e centrifugado por 30 minutos a 1800 rpm. A seguir a camada de células mononucleares, entre a camada de Ficoll e o plasma diluído em PBS, foi removida e lavada 2 vezes com PBS (pH 7,4)

Após as lavagens, a concentração celular foi ajustada para 30×10^6 células/ml. As células foram então ressuspensas em uma solução contendo: um volume de DMSO, na concentração de 20% diluído em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco – Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e um volume de soro fetal bovino (Fetal Bovine Serum (FBS) - Gibco-Invitrogen - UK), na concentração de 40% diluído em RPMI 1640. A seguir as células foram distribuídas em tubos próprios para congelamento (1ml em cada tubo), colocadas em *freezer* a -80°C durante 24 horas e posteriormente armazenadas em nitrogênio líquido a -196°C .

Quando requerido, uma alíquota foi retirada do tanque de nitrogênio, rapidamente descongelada em banho-maria a 37°C e adicionado a 10ml de meio RPMI 1640 (Gibco – Invitrogen) contendo 10% de FSB. A seguir as células foram lavadas 2 vezes, a 1800 rpm por 10 minutos. O botão celular foi ressuspensão em PBS (pH 7,4) e a concentração celular ajustada. Vinte e cinco microlitros da suspensão celular foi diluída em 25 μl de Tripán Blue 0,4% (Gibco – Invitrogen) para a avaliação da viabilidade celular.

A avaliação intracelular da proteína Zap-70 foi realizada utilizando-se a técnica de imunofluorescência direta, quando utilizado o anti-Zap70 Alexa Fluor (Caltag), ou imunofluorescência indireta, quando utilizado o anti-Zap-70 não marcado com fluorocromo (BD).

3.2.3.1 – IMUNONOFUORESCÊNCIA INDIRETA

A superfície das células foi inicialmente marcada com os AcMo CD3 (PE) e CD19 (PC-5) como descrito no item anterior (3.2.2) . Posteriormente, as células foram fixadas com 100µl da solução A do reagente Fix & Perm (Caltag Laboratories, Burlingame, California, USA), por 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS (pH 7,4) a 2000 rpm por 3 minutos e permeabilizadas com 100µl da solução B do reagente Fix & Perm (Caltag). Foi então adicionado o AcMo anti-Zap-70 (Zap-70 quinase, BD) por 20 minutos. As células foram então lavadas com PBS (pH 7,4) por 2 vezes a 2000 rpm por 3 minutos e incubadas com o anticorpo de coelho anti-imunoglobulina de camundongo marcado com FITC (Dako, Carpinteria, California, USA) e 100µl da solução B do reagente Fix & Perm (Caltag). Decorrido esse período, as células foram lavadas com PBS azida (pH 7,4) por duas vezes a 2000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante desprezado e o botão celular ressuspenso com PBS (pH 7,4) ou paraformaldeído 1% (Sigma). Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente e no escuro.

Em todos os experimentos foram realizados controles negativos, contendo o controle isotópico, dos antígenos pesquisados: não marcado com fluorocromo ou conjugado com PE e PC-5.

3.2.3.2 – IMUNONOFLUORESCÊNCIA DIRETA

A superfície das células foi primeiramente marcada com os AcMos CD3 (PE) e CD19 (PC-5), como descrito anteriormente (item 3.2.2). A seguir, as células foram fixadas com 100µl da solução A do reagente Fix & Perm (Caltag), por 10 minutos. Após, as células foram lavadas com PBS (pH 7,4) a 2000 rpm por 3 minutos, permeabilizadas com 100µl da solução B do reagente Fix & Perm (Caltag) e marcadas com o AcMo anti-Zap-70 diretamente marcado com Alexa Fluor (Caltag), por 20 minutos. Após esse período as células foram lavadas com PBS azida (pH 7,4) por duas vezes a 2000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante desprezado e o botão celular ressuspensão com PBS (pH 7,4) ou paraformaldeído 1% (Sigma – St Louis, MO – USA). Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente e no escuro.

Em todas as amostras foi realizado um controle negativo, contendo os controles isotópicos, dos antígenos pesquisados, marcados com FITC, PE e PC-5.

3.2.4 – AQUISIÇÃO E ANÁLISE DAS CÉLULAS POR CMF

Os antígenos pesquisados, da superfície celular e intracitoplasmáticos, foram adquiridos e analisados no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA), utilizando-se o programa Cell Quest (BD).

Este equipamento mede as características das células em suspensão orientadas num fluxo laminar e interceptadas, uma a uma, por um feixe de luz monocromática (Laser). A presença das células provoca alterações no feixe de luz que são detectadas por sensores chamados de detectores e a luz dispersa é captada por um sistema óptico que identifica as células por tamanho (*forward scatter* - FSC) e granulosidade (*side scatter* - SSC). Cada fluorocromo, utilizado para a marcação do antígeno, possui um padrão de absorção e emissão de fluorescência em comprimentos de ondas diferentes (510nm - FITC ou Alexa Fluor; 580nm – PE; 488nm PC-5 ou PERCP). Deste modo três cores de luz podem ser opticamente separadas e detectadas permitindo a avaliação simultânea de três antígenos.

Em todos os casos foram adquiridas 20.000 células ou eventos celulares. Antes de cada aquisição, foi feita uma calibração dos parâmetros: SSC, FSC e das fluorescências FL1 (FITC), FL2 (PE) e FL3 (PERCP). Para essa calibração foi utilizado o reagente CaliBRITE™³ (BD) que é composto por quatro populações de microesferas de poliuretano com 5–6 µm de diâmetro: microesfera não marcada com o fluorocromo e outras três marcadas com FITC, PE e PERC-P. O preparo do reagente, aquisição e ajuste das fluorescências foram realizadas de acordo com as especificações do fabricante, utilizando-se o programa FACScomp (BD).

Para identificação e análise da expressão intracelular de Zap-70, na população de células leucêmicas, foi realizado um gráfico de dispersão de pontos, *dot plot*, onde no eixo das abscissas foi colocado o parâmetro FSC e nas ordenadas o parâmetro SSC (Figura 8).

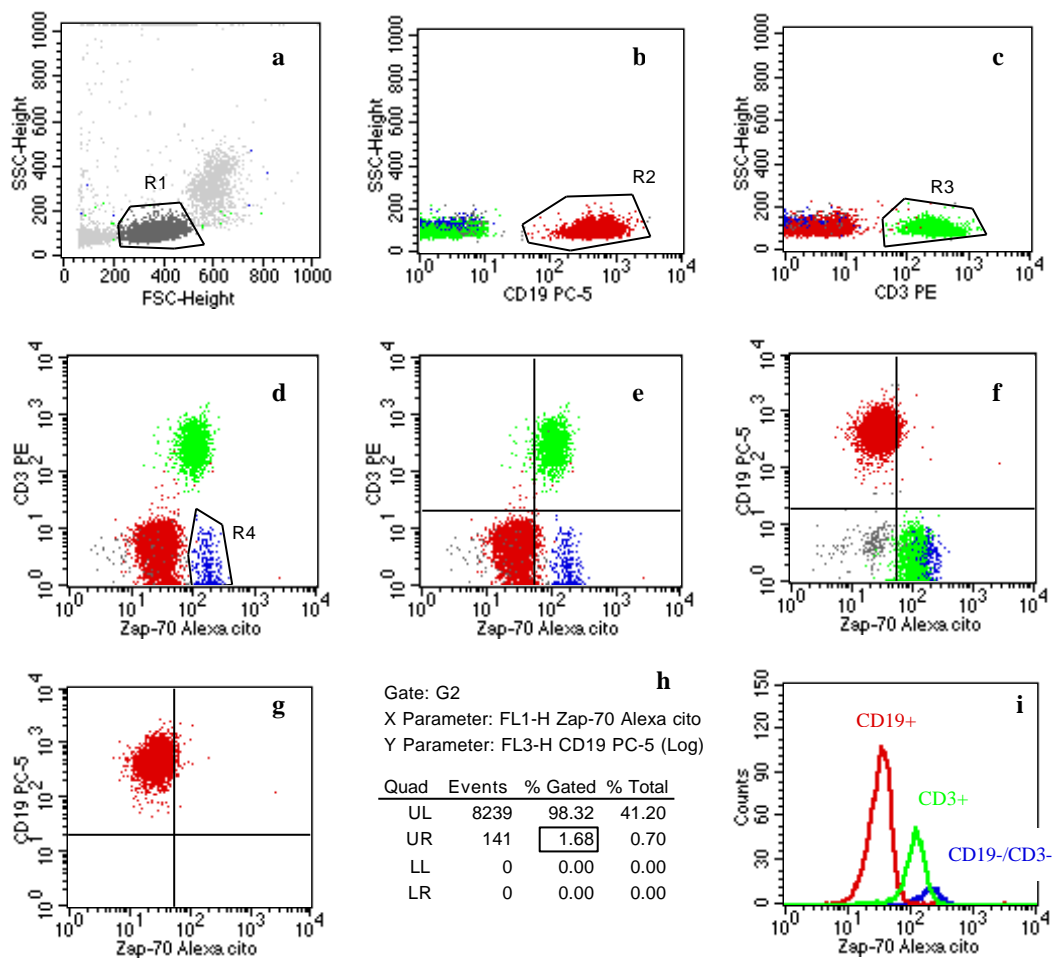


Figura 8- Análise da expressão intracelular de Zap-70, por citometria de fluxo. a) determinação da região (R1) de linfócitos no gráfico de FSC x SSC; b) Determinação da região (R2) de células leucêmicas CD19⁺ no gráfico de CD19 x SSC; c) Determinação da população (R3) de linfócitos T, CD3⁺ no gráfico de CD3 x SSC; d) Determinação da população (R4) de células NK, CD3⁺/CD19⁻ no gráfico de CD3 x CD19; e, f e g) Visualização das populações celulares e determinação da positividade nas células controle positivo (CD3⁺); h) Análise estatística da expressão de Zap-70 na população de células CD19⁺; i) Histograma para visualização da expressão de Zap-70 na população de células CD19⁺, na população de células CD3⁺ e NK (CD19⁻/CD3⁻).

Inicialmente, foi delimitada uma região (R1) ao redor das células com baixa granulosidade e pequeno tamanho a qual corresponde as células leucêmicas, linfócitos B e T normais e células NK. A seguir foram desenhados outros dois gráficos: um contendo no eixo das abscissas o parâmetro CD3 (FL2) e na ordenada o parâmetro SSC e outro com o parâmetro CD19 (FL3) *versus* o parâmetro SSC, respectivamente. Nesses gráficos foram delimitadas as regiões de células leucêmicas CD19+ (R2) e a população de linfócitos T CD3+ (R3), que foi utilizada como controle positivo. Posteriormente foi desenhado outro gráfico contendo Zap-70 (FL1) *versus* CD3 (FL2) que foi utilizado como controle positivo para a expressão de Zap-70. A porcentagem de expressão de Zap-70, nas células CD19, foi avaliada no gráfico contendo Zap-70 (FL1) *versus* CD19 (FL3) (figura 8).

3.2.5 – AVALIAÇÃO DA MÉDIA DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DE CD38 E ZAP-70

A média de intensidade de fluorescência (MIF) das proteínas CD38 e Zap-70, nas células B de LLC, foi estimada utilizando-se um gráfico de histograma com intensidade de fluorescência, de CD38 (Figura 9) ou Zap-70 (Figura 10), *versus* o número de células estudadas. A MIF foi dada pela relação: média de intensidade de fluorescência das células marcadas com o AcMO – a média de intensidade de fluorescência das células marcadas com o controle isotópico.

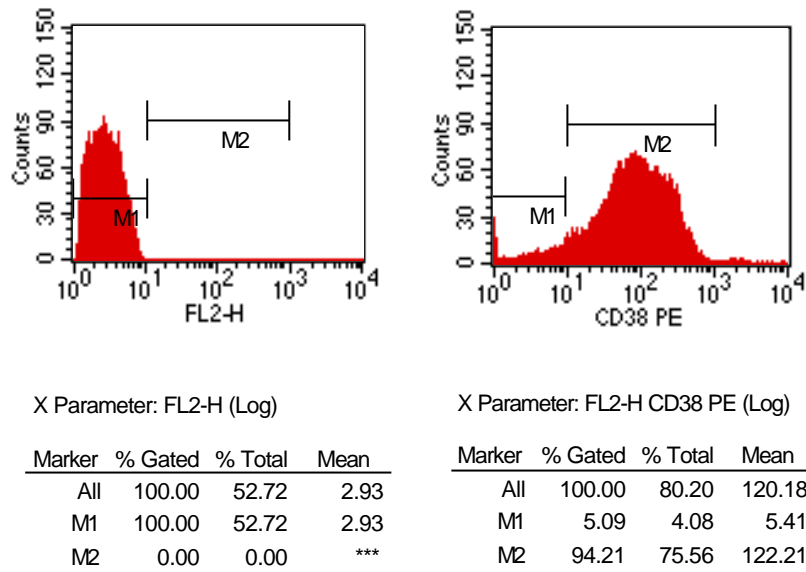


Figura 9 – Gráfico de Histograma com análise MIF de CD38 PE.

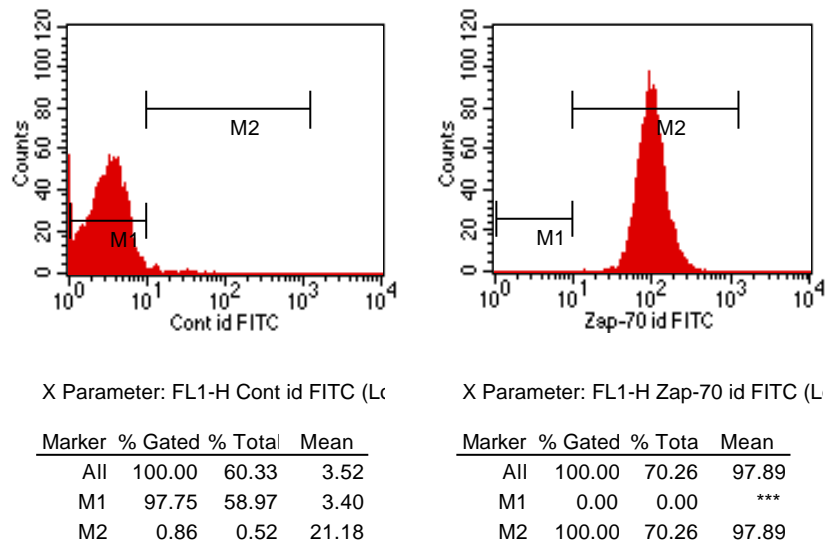


Figura 10 – Gráfico de Histograma com análise da MIF de Zap-70 ID.

3.2.6 – ANÁLISE QUANTITATIVA DO NÚMERO DE MOLÉCULAS DE CD38 E DE ZAP-70 POR CÉLULAS

A análise quantitativa das moléculas de Zap-70 e CD38 presente nas células leucêmicas foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se o reagente *Quantum Simply Cellular Microbeads* (Sigma). Esse reagente é composto por uma mistura de quatro populações de microesferas com capacidade de ligação antigênica pré-determinada. Portanto, quando as microesferas se ligam ao anticorpo específico fornecem uma curva de calibração utilizada para a quantificação. Essa curva representa o número de moléculas de AcMo com capacidade de ligação antigênica ou número de moléculas de antígeno por célula (mol/cel).

As microesferas foram incubadas e lavadas de acordo com os mesmos procedimentos que foram utilizados na marcação das células com os respectivos AcMo. Foram adicionadas aproximadamente 100.000 microesferas em um tubo contendo 50µl de PBS-azida (pH 7,4) e quantidades adequadas do AcMo anti- CD38 PE (BD) ou anti-Zap-70 Alexa fluor (Caltag) ou anti-Zap-70 ID FITC (BD). As microesferas foram adquiridas e análises no citometro de fluxo FacScalibur (BD) utilizando o program *Cell Quest* (BD).

Para a determinação da MIF das microesferas foi desenhado um gráfico de FSC x SCC onde foi delimitada uma região (R1) ao redor dos beads (Figura 11a, 12a e 13a) Posteriormente foi criado um histograma onde foram demarcados os picos (M1, M2, M3, M4 e M5) que definem as distintas MIF (Figura 11b, 12b, 13b e 11c, 12c, 13c). Os valores médios da intensidade de fluorescência dos quatro picos de microesferas foram utilizados para construir a curva de calibração. Foi construída

uma curva de calibração para cada AcMo utilizado: anti CD38-PE (Figura 11d), anti-Zap-70 Alexa (Figura 12d) e anti-Zap-70 ID FITC (Figura 13d).

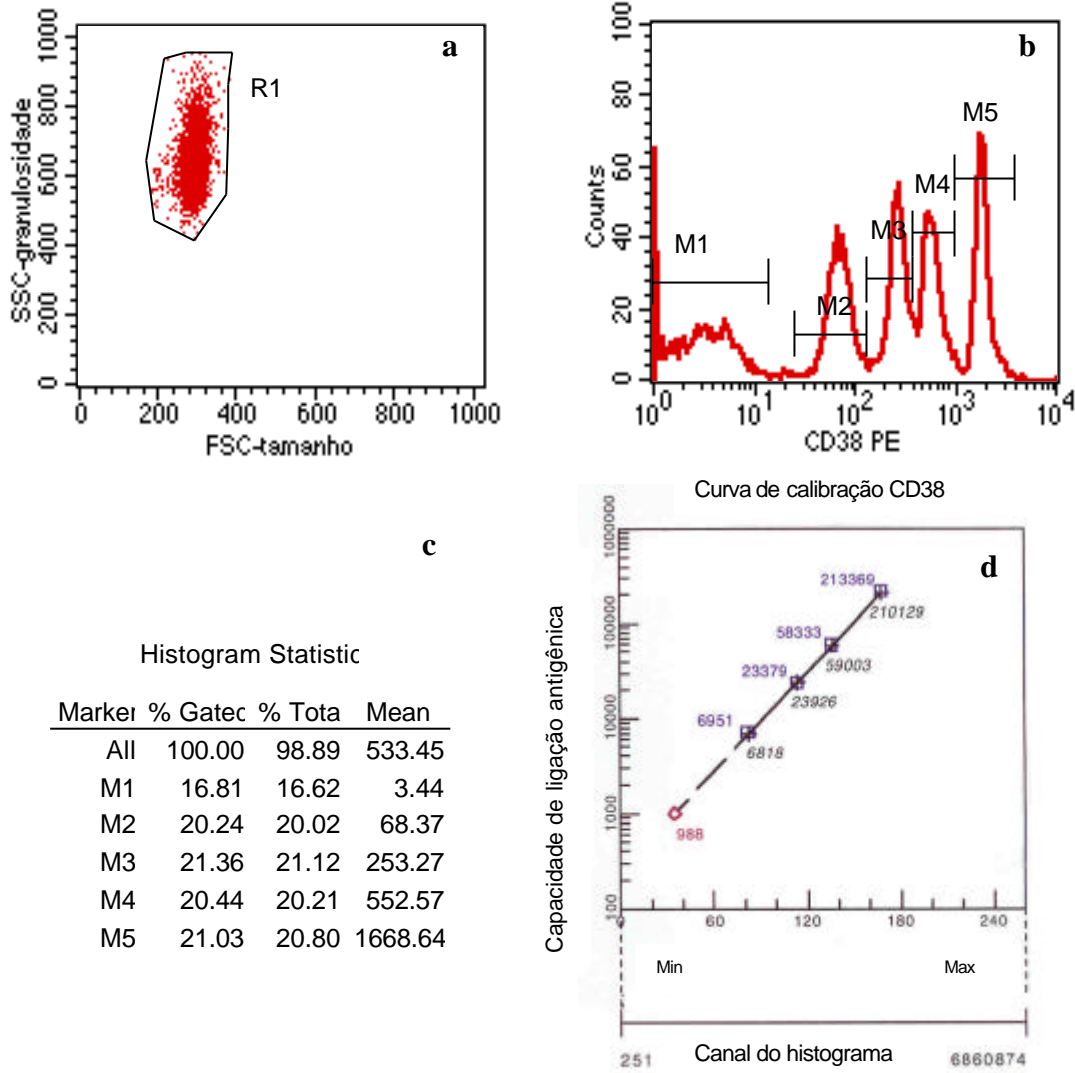


Figura 11 – Curva de calibração para a quantificação do número de moléculas/célula do AcMo anti-CD38 PE através de reagente *Quantum Simply Cellular Microbeads*.

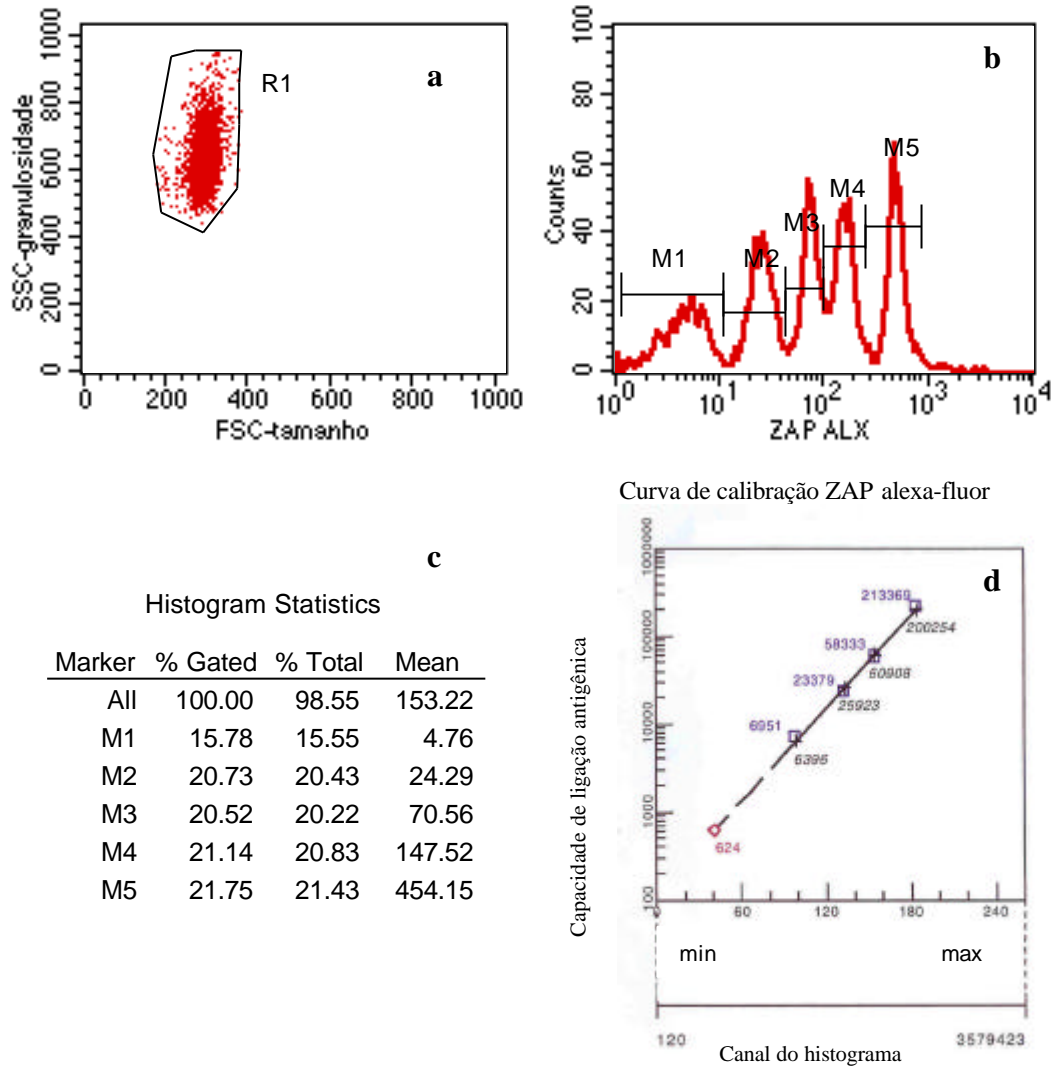


Figura 12. Curva de calibração para a quantificação do número de moléculas/célula do AcMo ZAP-70 AlexaFluor 488 através de reagente *Quantum Simply Cellular Microbeads*.

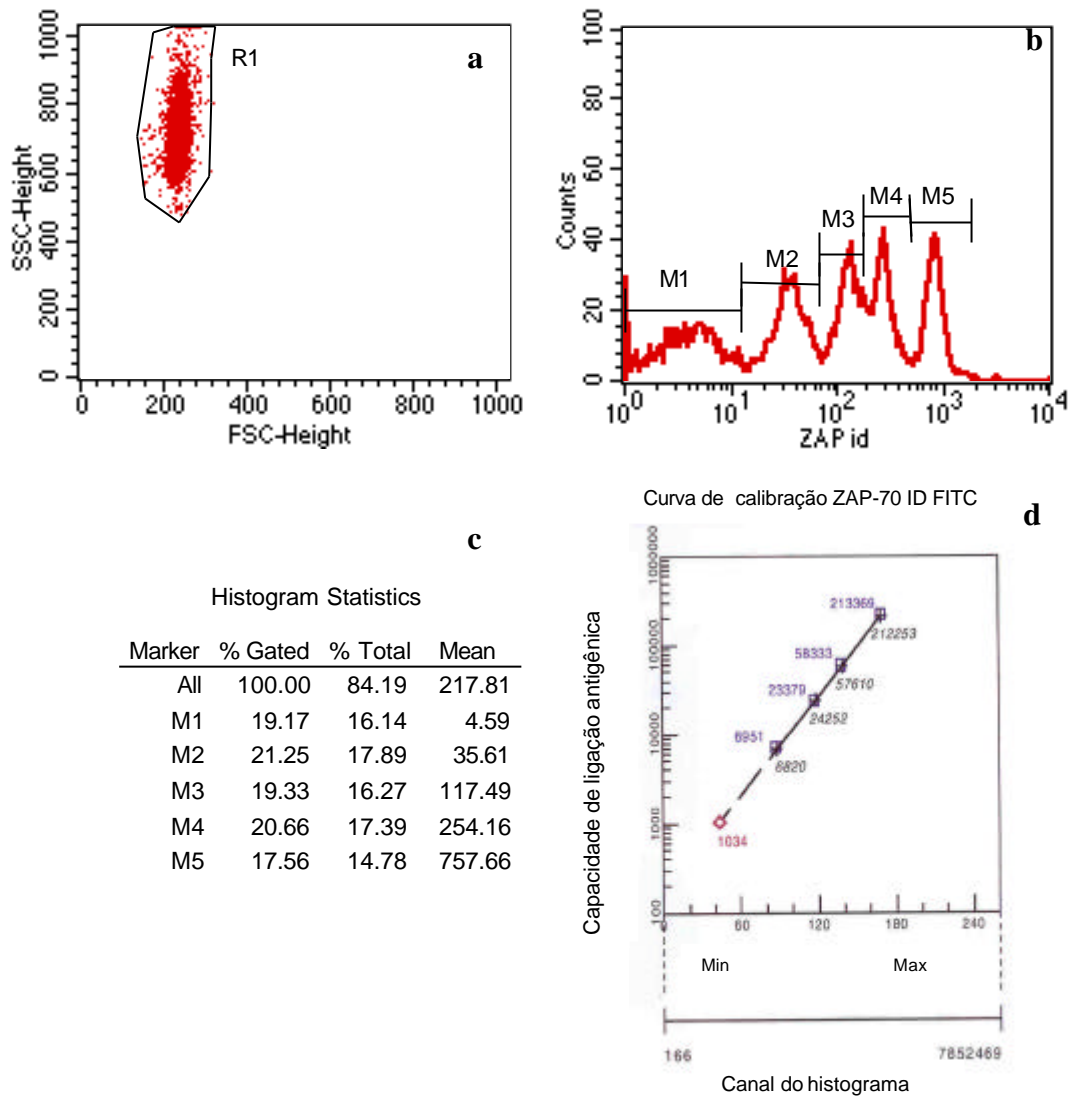


Figura 13 - Curva de calibração para a quantificação do número de moléculas/célula do AcMo anti-Zap-70 ID FITC através do reagente *Quantum Simply Cellular Microbeads*

3.2.7– ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SPSS 10.0 para Windows.

Para a comparação das medianas da porcentagem de expressão, MIF e ABC de Zap -70 e CD38 nos EC-A, EC-B ou EC-C, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney ou o teste de Kruskal-Wallis, quando indicado. A avaliação dos níveis de expressão de Zap-70 e CD38 foram considerados como variáveis categóricas baseadas nos seguintes grupos: 0 a 10%; maior que 10%; 0 a 20%; maior do que 20%; 0 a 30%; maior do que 30%. Estes dados foram avaliados pelo teste de Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher.

A sobrevida global (SG) foi definida como: o tempo decorrido desde o diagnóstico da doença até o óbito por qualquer causa. A sobrevida livre de tratamento (SLT) foi definida como o tempo decorrido do diagnóstico da doença até o início do primeiro tratamento. Na ausência de óbito ou tratamento, os pacientes foram censurados na data do ultimo registro em prontuário. Nestas análises empregou-se o estimador produto-limite de Kaplan-Meier, com elaboração dos respectivos gráficos. A comparação das curvas de sobrevida foi realizada através do teste log-rank e a análise multivariada foi realizada através do modelo de risco proporcional de Cox.

Todos os testes foram bi-caudais com nível de significância definido em 5% ($p = 0,05$).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 – CARACTERÍSTICA DOS PACIENTES

Das 205 amostras de sangue periférico de pacientes portadores de LLC avaliados, 121 (59%) eram do sexo masculino e 84 (41%) do sexo feminino, com razão de sexo H:M de 1,4:1. A idade variou de 37 a 86 anos (mediana de 67 anos). Todos os pacientes foram classificados de acordo com o sistema de estágio clínico (EC) de Binet em A, B e C. Destes, 85 (41%) eram do EC-A; 59 (29%) do EC-B e 61 (30%) do EC-C (Tabela 8).

Tabela 8 – Característica dos pacientes portadores de LLC .

		Estádio Clínico de Binet			
		A	B	C	
Idade					
Mediana (anos)	67	69	67	68	p = 0,29
Variação	37 a 86	37 a 82	53 a 84	42 a 84	
Sexo	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Masculino	121 (59)	45 (37)	34 (28)	42 (35)	p = 0,15
Feminino	84 (41)	40 (48)	25 (30)	19 (23)	
Total	205	85 (41)	59 (29)	61 (30)	

Dos 121 pacientes do sexo masculino, 45 (37%) eram do EC-A, 34 (28%) do EC-B e 42 (35%) do EC-C. Dos 84 pacientes do sexo feminino, 40 (48%) eram do EC-A, 25 (30%) do EC-B e 19 (31%) dos EC-C (p = 0,15) (Tabela 8).

A morfologia dos linfócitos em SP de todos os casos estudados era típica de LLC com linfócitos pequenos de cromatina condensada, sem nucléolo evidente, citoplasma agranular e normalmente escasso. A BMO foi realizada em 80 (39%) amostras, onde foram encontrados os padrões de infiltração difuso em 47 (59%) e não difuso (nodular ou intersticial) em 33 (41%).

4.2 – AVALIAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA EM LLC

A avaliação imunofenotípica com os antígenos CD10, CD19, CD20, CD23, CD103 e com o antígeno da linhagem linfóide T, CD5 foi realizada em todas as amostras de LLC. A expressão dos antígenos CD79b e FMC7 foi realizada em 151 (74%) e 196 (96%) pacientes, respectivamente. Foram consideradas como positivas as expressões desses marcadores com valores $\geq 20\%$ (Figura 12).

Todos os casos estudados expressaram CD19, CD23 e CD5. Positividade para CD79b e FMC7 foi encontrada em 37 (25%) e 54 (28%) dos casos, respectivamente, porém com baixa densidade antigênica. Em nenhuma das amostras estudadas foi observada positividade para os antígenos CD10 e CD103 (Figura 14).

A pesquisa de IgM foi realizada em 141 (69%) e de IgD em 179 (87%) dos 205 casos estudados. Positividade para IgM e IgD, com baixa densidade antigênica foi observada em 94 (67%) e 99 (55%) dos pacientes, respectivamente. Co-expressão de IgM e IgD foi detectada em 62 (44%) dos 141 casos avaliados.

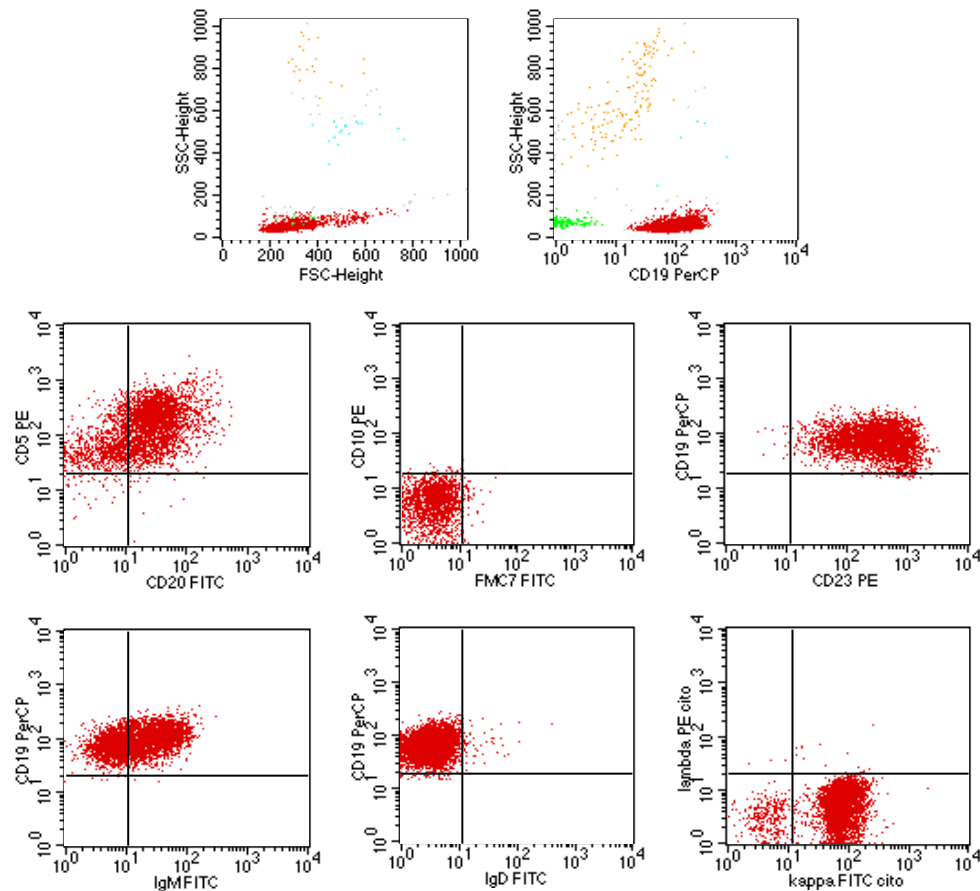


Figura 14 – Exemplo de avaliação imunofenotípica em um paciente com diagnóstico de LLC.

A pesquisa da cadeia leve da imunoglobulina Kappa ou lambda foi realizada nas 205 amostras estudadas. Em 163 (79%) dos casos foi detectada monoclonalidade para kappa ou lambda, de baixa densidade antigênica, na superfície celular. Nos 42 (21%) casos onde não foi observada positividade para kappa ou lambda na superfície celular, a presença desses antígenos foi realizada no citoplasma. Nesses casos monoclonalidade para kappa ou lambda, intracitoplasmática, foi evidenciada em 31 (15%) dos 205 casos estudados. Em 11 (6%) dos casos não foi possível determinar monoclonalidade (Tabela 9).

Tabela 9 – Detecção de monoclonalidade nos 205 casos de LLC

Monoclonalidade	Positivos (%)
Superfície celular	163 (79)
sIg kappa	103 (50)
sIg lambda	60 (29)
Inractivoplasmática	31 (15)
cIg kappa	22 (11)
cIg lambda	9 (4)
Sem Monoclonalidade	11 (6)

sIg = imunoglobulina na superfície celular
cIg = imunoglobulina intracitoplasmática

4.3 – CLASSIFICAÇÃO IMUNOLÓGICA DOS PACIENTES PORTADORES DE LLC

Após a avaliação imunofenotípica os pacientes foram classificados imunologicamente, de acordo com sistema de escore proposto por Matutes et al (1994). A maioria dos pacientes 181 (88%) apresentaram escores 4 e 5 e apenas 24 (12%) pontuaram como escore 3. Não foi observada correlação entre os escores e o EC de Binet ($p = 0,64$) (Tabela 10).

Tabela 10 - Escores imunofenotípicos dos pacientes diagnosticados como LLC e classificados pelo estágio clínico de Binet.

	Escore 3	Escore 4	Escore 5	
Nº de pacientes (n=205)	24 (12%)	86 (42%)	95 (46%)	
Estádio A (n=85)	7 (8%)	39 (46%)	39 (46%)	
Estádio B (n=59)	8 (14%)	25 (42%)	26 (44%)	p = 0,64
Estádio C (n=61)	9 (15%)	22 (36%)	30 (49%)	

4.4 – EXPRESSÃO DE CD38 NAS CÉLULAS B DOS PACIENTES PORTADORES DE LLC

A mediana de expressão de CD38 nos 205 casos estudados foi de 15% \pm 34 (0 – 99). Nos pacientes do EC-A a mediana encontrada foi de 4% \pm 33 (0 – 99), já nos pacientes do EC-B foi de 34% \pm 32 (0 – 99) e no EC-C de 25% \pm 34 (0 – 99).

Houve diferença estatisticamente significativa quando comparada a expressão de CD38 nos pacientes do EC-A e nos EC-B e EC-C ($p < 0,01$) (Figura 15).

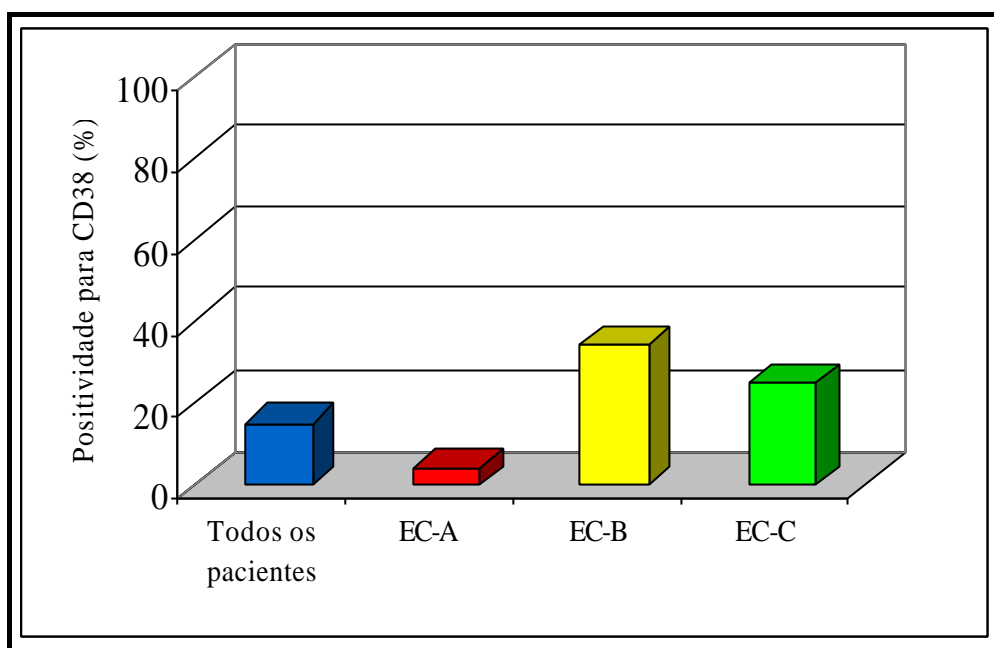


Figura 15 - Expressão de CD38 em todos os pacientes com diagnóstico de LLC e sua correlação com o estágio clínico de Binet.

4.4.1 – PONTO DE CORTE DE CD38 NAS CÉLULAS B DOS CASOS DE LLC DE ACORDO COM O ESTÁDIO CLÍNICO DE BINET.

Com a finalidade de se verificar o melhor ponto de corte a ser utilizado como positivo, a expressão de CD38 foi avaliada considerando-se como positivas as expressões de $CD38 > 10\%$, $CD38 > 20\%$ e $CD38 > 30\%$.

Dos 205 pacientes estudados, considerando o ponto de corte $> 10\%$, 113 (55%) foram $CD38^+$, 88 (43%) com o ponto de corte $> 20\%$ e 79 (38%) com o ponto de corte $> 30\%$. Quando comparado o ponto de corte $> 30\%$ com o $> 20\%$ não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,38$), entretanto quando comparado o ponto de corte $> 30\%$ com o $> 10\%$ a diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$) (Tabela 11).

Tabela 11 – Expressão de CD38, nos estádios clínicos A, B e C, considerando-se como positividade para este marcador com diferentes pontos de corte.

	Estádio Clínico de Binet			
	Total de pacientes (n = 205)	EC-A (n = 85)	EC-B (n = 59)	EC-C (n = 61)
CD38 > 10%	113 (55%)	31 (36%)	40 (68%)	42 (69%)
CD38 > 20%	88 (43%)	24 (28%)	33 (56%)	31 (51%)
CD38 > 30%	79 (38%)	20 (23%)	32 (54%)	27 (44%)

A expressão de CD38, com os diferentes pontos de corte, foi avaliada nos pacientes de LLC do EC-A, B e C (Tabela 11). Comparando a expressão de CD38 nos pacientes do EC-A com os pacientes do EC-B e EC-C, verificamos que, independente do ponto de corte utilizado, a expressão desse marcador foi menor nos pacientes do EC-A do que nos paciente do EC-B e EC-C, sendo essa diferença estatisticamente significante ($p < 0,01$) (Figura 16).

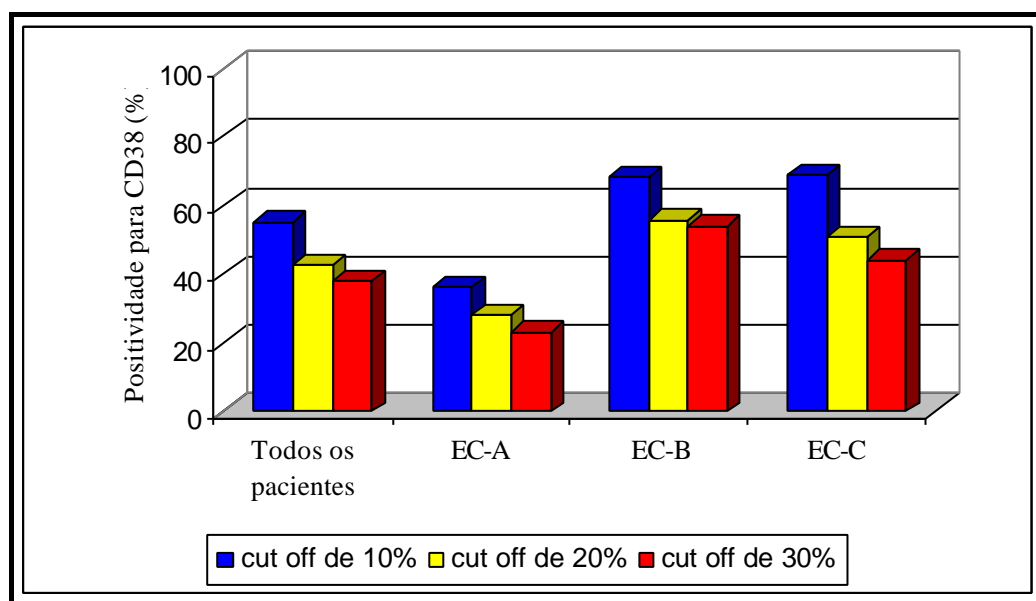


Figura 16 – Expressão de CD38 nos diferentes pontos de corte (*cut off*) e sua correlação com os pacientes do EC-A, EC-B e EC-C.

Foi realizada análise quantitativa da expressão de CD38 pela MIF bem como pelo número de moléculas por célula (mol//cel) ou capacidade de ligação antigênica (CLA) em 196 em 186 amostras, respectivamente. Para esse estudo os pacientes foram distribuídos em 4 categorias, como detalhado na Figura 17.

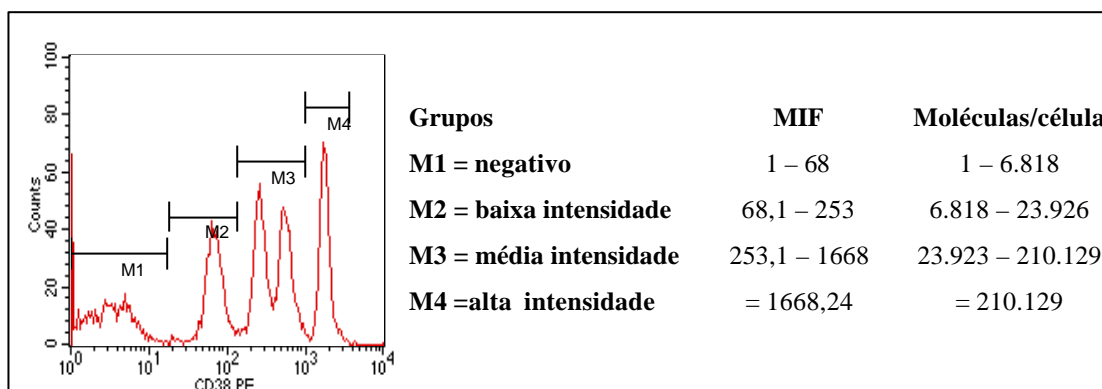


Figura 17- Definição dos grupos de pacientes, distribuídos conforme a intensidade de fluorescência de CD38 e número de moléculas/célula.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as diferentes MIF bem como a CLA de CD38 e os estádios clínicos A, B e C ($p = 0,25$).

4.5 – EXPRESSÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ZAP-70

A avaliação intracitoplasmática da proteína Zap-70, por citometria de fluxo, foi realizada em 144 pacientes. Destes, em 80 (56%) a expressão de Zap-70 foi realizada em SP total imediatamente após a coleta e em 63 (44%) em células mononucleares (CMN) isoladas por gradiente de densidade ficoll-hypaque e criopreservadas em DMSO. Com a finalidade de verificar se houve diferença entre

a expressão de Zap-70 no SP total e nas células criopreservadas, em 10 amostras, a expressão de Zap-70 foi realizada em CMN criopreservadas e em SP total. Tanto nas CMN criopreservadas como no SP total a expressão de Zap-70 foi semelhante ($p = 0,87$).

Neste estudo foi utilizado o AcMo anti-Zap-70 não marcado com fluorocromo (Zap-70 ID FITC) e o AcMo anti-Zap-70 marcado com o fluorocromo Alexa fluor 488 (Zap-70 Alexa) (Tabela 7). Dos 144 pacientes estudados, Zap-70 ID FITC foi utilizado em 75 (52%) e Zap-70 Alexa em 68 (47%) amostras. Para comparar a eficiência destes AcMo, a expressão intracelular de Zap-70 foi avaliada com Zap-70 ID FITC e Zap-70 Alexa em 13 amostras simultaneamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre expressão de Zap-70 quando utilizado Zap-70 ID FITC e Zap-70 Alexa ($p = 0,88$) (Figura 18).

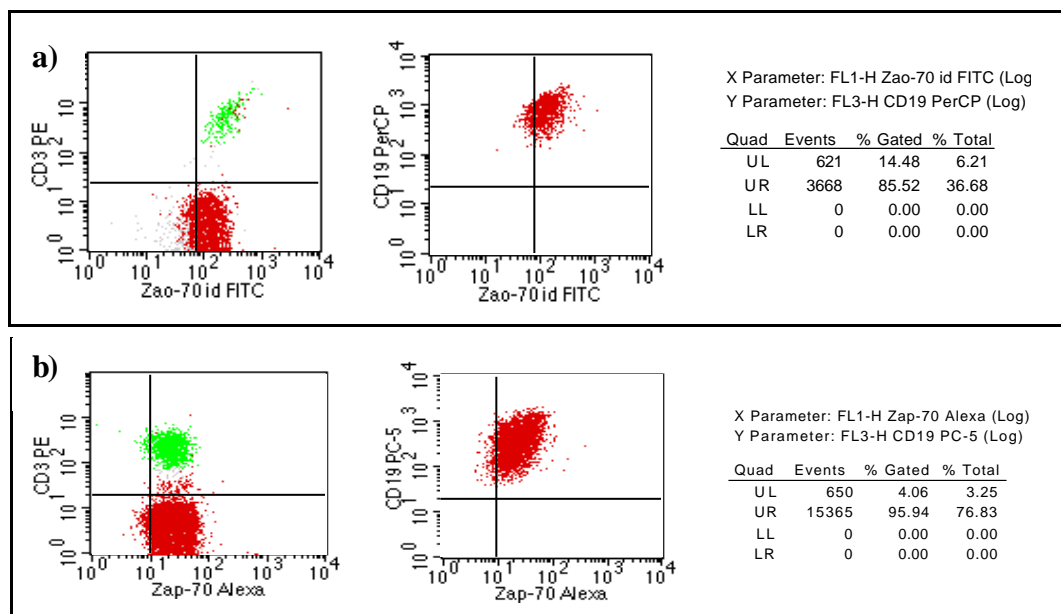


Figura 18 – Avaliação da expressão de Zap-70 na mesma amostra utilizando-se: a) Zap-70 ID FITC e b) Zap-70 Alexa (ambos os casos positivos)

4.5.1 – EXPRESSÃO DE ZAP-70 NAS CÉLULAS B DOS CASOS DE LLC.

A mediana de expressão de Zap-70 nos 144 casos de LLC foi de $46\% \pm 34$ (0 – 99). Quando correlacionada com o EC, nos pacientes do EC-A a mediana de expressão foi de $10\% \pm 34$ (variação 0 – 99), nos do EC-B de $65\% \pm 35$ (0 – 99) e nos EC-C de $50\% \pm 30$ (0 – 99). Houve diferença estatisticamente significativa entre expressão de Zap-70, nos pacientes com EC-A quando comparada com os pacientes em EC-B e EC-C ($p = 0,01$) (Figura 19).

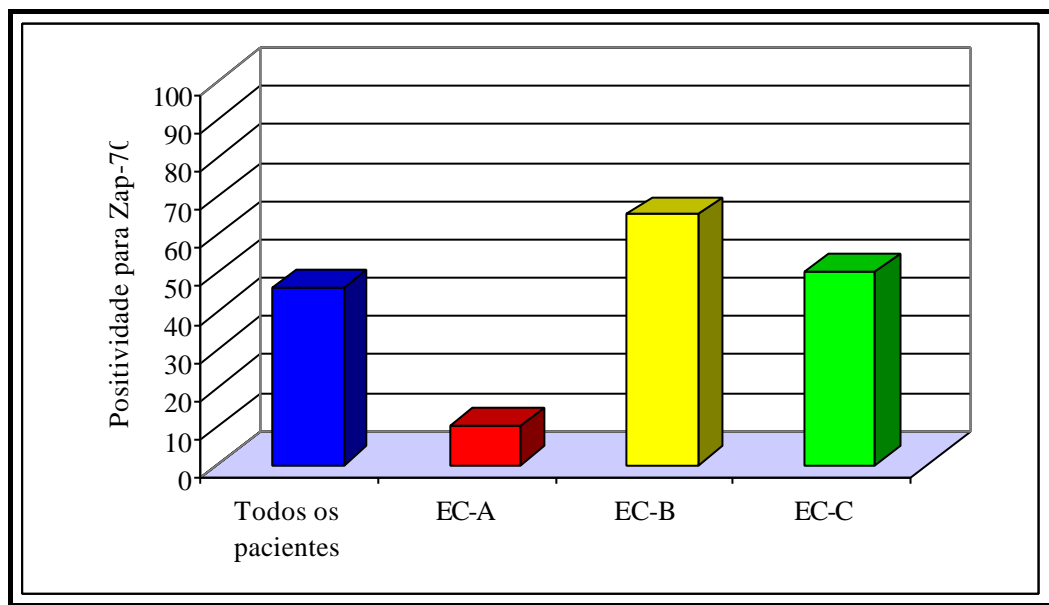


Figura 19 - Expressão de Zap-70 em todos os pacientes portadores de LLC e sua correlação com o EC de Binet.

4.5.2 – PONTO DE CORTE DE ZAP-70 NAS CÉLULAS B DOS CASOS DE LLC DE ACORDO COM O ESTÁDIO CLÍNICO DE BINET.

Com a finalidade de se verificar o melhor ponto de corte a ser utilizado como positivo, na expressão intracelular de Zap-70, foram consideradas como positivas as expressões de Zap-70 > 10% e Zap-70 > 20%.

Dos 144 pacientes estudados, 94 (65%) foram Zap-70⁺ considerando o ponto de corte de 10% e 76 (53%) com o > 20%, Essas diferenças não foram estatisticamente significantes ($p = 0,07$) (Tabela 12).

Tabela 12 – Expressão de Zap-70, nos estádios clínicos A, B e C, considerando-se como positividade para este marcador com diferentes pontos de corte.

	Total de pacientes (n = 144)	Estádio Clínico de Binet		
		EC-A (n = 59)	EC-B (n = 38)	EC-C (n = 47)
Zap-70 > 10%	94 (65%)	28 (47%)	29 (76%)	37 (79%)
ZaP-70 > 20%	76 (53%)	24 (41%)	23 (61%)	29 (47%)

A expressão de Zap70, com os diferentes pontos de corte, foi avaliada nos pacientes do EC-A, B e C (Tabela 12). Quando a expressão de Zap-70 foi comparada entre os pacientes do EC-A e os pacientes do EC-B e EC-C verificamos que a expressão desse marcador foi menor nos pacientes do EC-A, com ambos os pontos de corte ($p = 0,05$) (Figura 20).

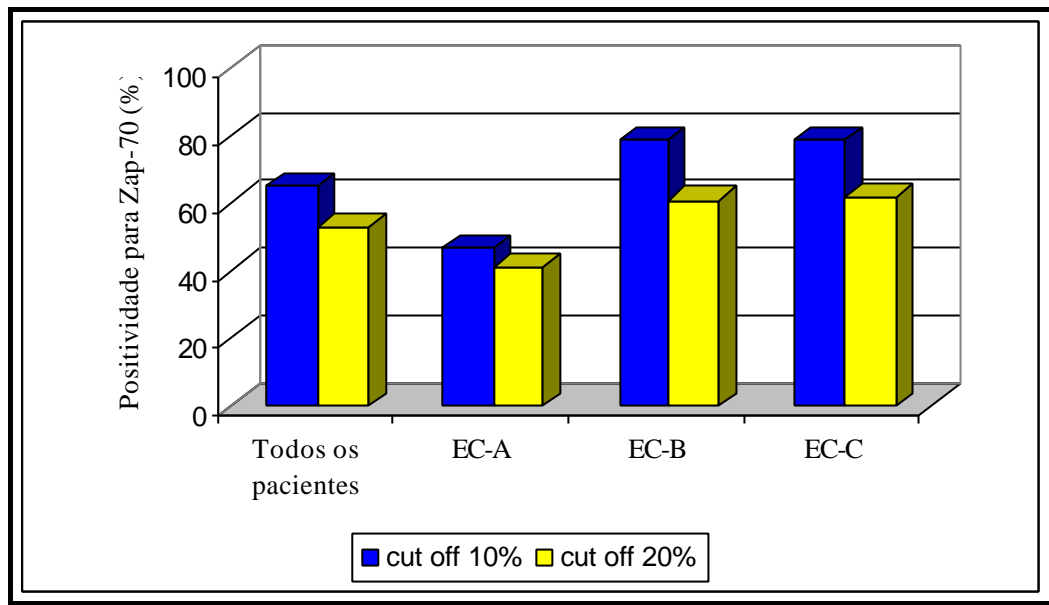


Figura 20 – Expressão de Zap-70 nos diferentes pontos de corte (*cut off*) e sua correlação com EC-A, EC-B e EC-C.

Foi realizada análise quantitativa da expressão de Zap-70 pela MIF, bem como pela CLA. Para este estudo e o da CLA os pacientes foram distribuídos em 4 categorias baseados na intensidade de fluorescência, como mostra na Figura 21.

A MIF de ZAP-70 foi avaliada em 55 amostras utilizando o AcMo anti-Zap-70 Alexa e em 83 amostras com o AcMo anti-Zap-70 ID FITC.

Em relação ao EC de Binet, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as diferentes MIF com o AcMo Zap-70 Alexa ($p = 0,43$) e com o AcMo Zap-70 FITC ID ($p = 0,11$).

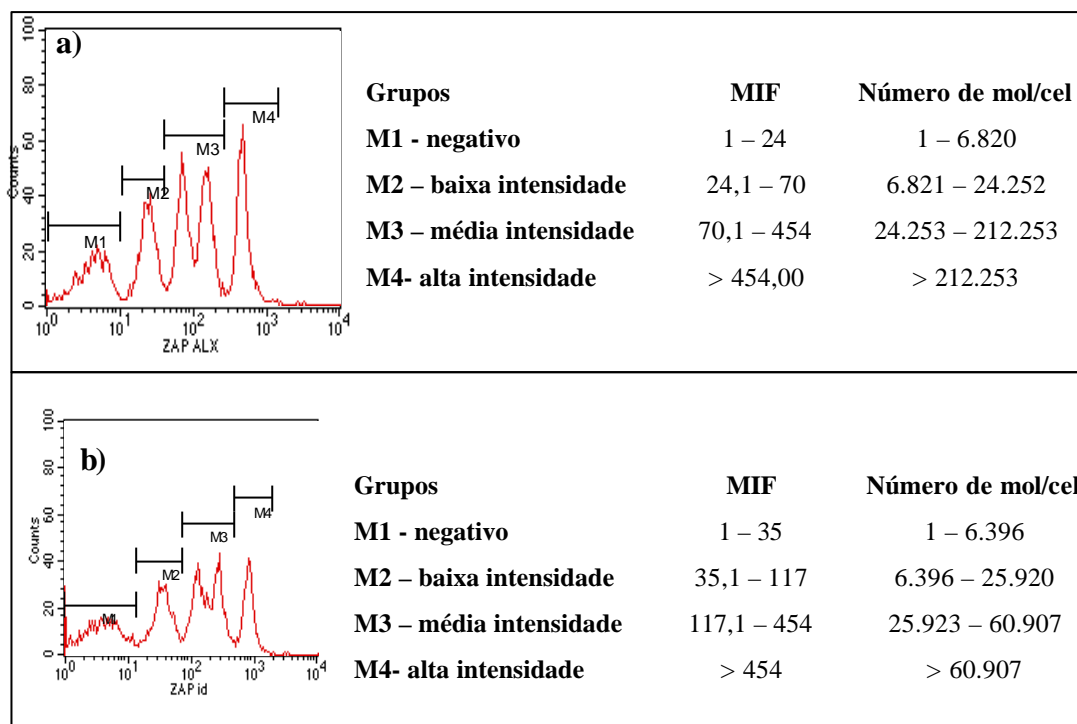


Figura 21 - Definição dos grupos de pacientes, distribuídos conforme a intensidade de fluorescência e número de moléculas/célula de: a) Zap-70 Alexa e b) Zap-70 ID FITC

A MIF de ambos os AcMo utilizados foi convertida em número de moléculas por célula (mol//cel) ou CLA em 54 pacientes estudados com o AcMo Alexa e 78 avaliados com o AcMo ID FITC. Quando comparadas com os estádios clínicos não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a CLA e os EC de Binet tanto com o AcMo anti Zap-70-Alexa como com o anti Zap-70 ID FITC ($p = 0,69$).

4.6 – ASSOCIAÇÃO ENTRE AS EXPRESSÕES DE ZAP-70 E CD38 NAS CÉLULAS B DOS CASOS DE LLC

A associação das expressões da proteína Zap-70 e CD38 foram avaliadas utilizando-se os valores de positividade para Zap-70 > 20% e para CD38 > 30%.

Dos 144 pacientes estudados, 47 (33%) foram Zap-70⁺/CD38⁺; 59 (41%) Zap-70⁻/CD38⁻; 29 (20%) Zap-70⁺/CD38⁻ e 9 (6%) Zap-70⁻/CD38⁺. Portanto, 106 (74%) pacientes apresentaram fenótipo concordante (Zap-70⁻/CD38⁻ ou Zap-70⁺/CD38⁺) e 38 (26%) fenótipo discordante (Zap-70⁺/CD38⁻ ou Zap-70⁻/CD38⁺) (Tabela 13).

Tabela 13 – Expressão de Zap-70 > 20% e CD38 > 30% nos 144 casos de LLC de acordo com estágio clínico de Binet.

	Concordantes		Discordantes		
	Zap70 ⁺ /CD38 ⁺ n (%)	Zap70 ⁻ /CD38 ⁻ n (%)	Zap70 ⁺ /CD38 ⁻ n (%)	Zap70 ⁻ /CD38 ⁺ n (%)	
Nº de pacientes (n=144)	47 (33)	59 (41)	29 (20)	9 (6)	
	106 (74)		38 (26)		
EC-A (n = 59)	14 (24)	33 (56)	10 (17)	2 (3)	p = 0,01
EC-B (n = 38)	13 (34)	10 (26)	10 (26)	5 (14)	
EC-C (n = 47)	20 (43)	16 (34)	9 (19)	2 (4)	

Considerando-se o EC, verificou-se que 56% dos casos em EC-A foram Zap-70⁻/CD38⁻. Por outro lado, 34 % dos pacientes em EC-B e 43% daqueles em EC-C foram Zap-70⁺/CD38⁺. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre a associação das expressões de Zap-70 e CD38 nos EC-A quando comparados aos EC-B e C (p = 0,01) (Tabela 13).

Para o melhor entendimento das expressões de Zap-70 e CD38, nos pacientes dos estádios clínicos A, B e C, esses foram distribuídos em dois grupos:

Grupo I - casos com negatividade para Zap-70 e CD38 (Zap-70⁻/CD38⁻)

Grupo II – casos com positividade para Zap-70 ou CD38. Esse grupo incluiu Zap-70⁺/CD38⁻, Zap-70⁻/CD38⁺ e aqueles com positividade para ambos os marcadores (Zap-70⁺/CD38⁺).

Dos 144 pacientes estudados 85 (59%) apresentaram positividade para Zap-70 ou CD38. Comparando as expressões de Zap-70 e CD38 entre os pacientes do EC-A e os EC-B e C verificamos que 44% dos pacientes do EC-A, 74% do EC-B e 66% do EC-C apresentaram positividade para um desses marcadores (Zap-70⁺ ou CD38⁺), sendo essas diferenças estatisticamente significante ($p < 0,01$) (Tabela 14).

Tabela 14 – Expressão de Zap-70 e CD38 nos 144 casos de LLC de acordo com estágio clínico de Binet.

	Zap70 ⁻ e CD38 ⁻ n (%)	Zap70 ⁺ ou CD38 ⁺ n (%)	
Estádio A (n=59)	33 (56)	26 (44)	
Estádio B (n=38)	10 (26)	28 (74)	p < 0,01
Estádio C (n=47)	16 (34)	31 (66)	
Total de pacientes (n=144)	59 (41)	85 (59)	

4.7 – ANÁLISE DA SOBREVIDA LIVRE DE TRATAMENTO (SLT)

A análise univariada do tempo médio entre o diagnóstico e o início da terapia (SLT) ou a progressão da doença foi realizada apenas nos pacientes do EC-A,

já que os casos dos estádios B e C foram tratados imediatamente após o diagnóstico. Não foi possível estimar o tempo mediano de SLT, pois ocorreram menos de 50% dos óbitos durante o período de estudo. A média de SLT dos pacientes do sexo feminino foi de 143 (114 – 172) meses e do masculino de 117 (80 – 154) meses ($p = 0,07$). Em relação ao estágio clínico, nos pacientes do EC-A, a média de SLT foi de 135 (111 – 160) meses. A SLT foi correlacionada ao sexo, estágio clínico, expressão de CD38 e da proteína Zap-70, com intervalo de 95% de confiança.

4.7.1 – ANÁLISE DA SLT RELACIONADA A EXPRESSÃO DE CD38

A média de SLT nos pacientes do EC-A, em relação a expressão de CD38 foi avaliada utilizando-se o ponto de corte $> 10\%$, $> 20\%$ e $> 30\%$. Quando utilizado o ponto de corte $> 10\%$, a média de SLT foi de 162 (139 – 185) meses para os pacientes CD38⁻ e de 63 meses (40 – 86) nos casos CD38⁺ ($p < 0,01$). Com o ponto de corte $> 20\%$, a média de SLT foi de 152 meses (127 – 176) para os casos CD38⁻ e de 46 meses (36 – 55) para os CD38⁺ ($p < 0,01$). Considerando o ponto de corte $> 30\%$, a média de SLT dos pacientes CD38⁻ foi de 146 (121 – 170) meses e para os CD38⁺ de 48 (38 – 58) meses ($p = 0,05$). Portanto, quando comparada a média de SLT dos pacientes CD38⁺ com os CD38⁻, independente do ponto de corte utilizado, as diferenças foram estatisticamente significantes (Figura 22).

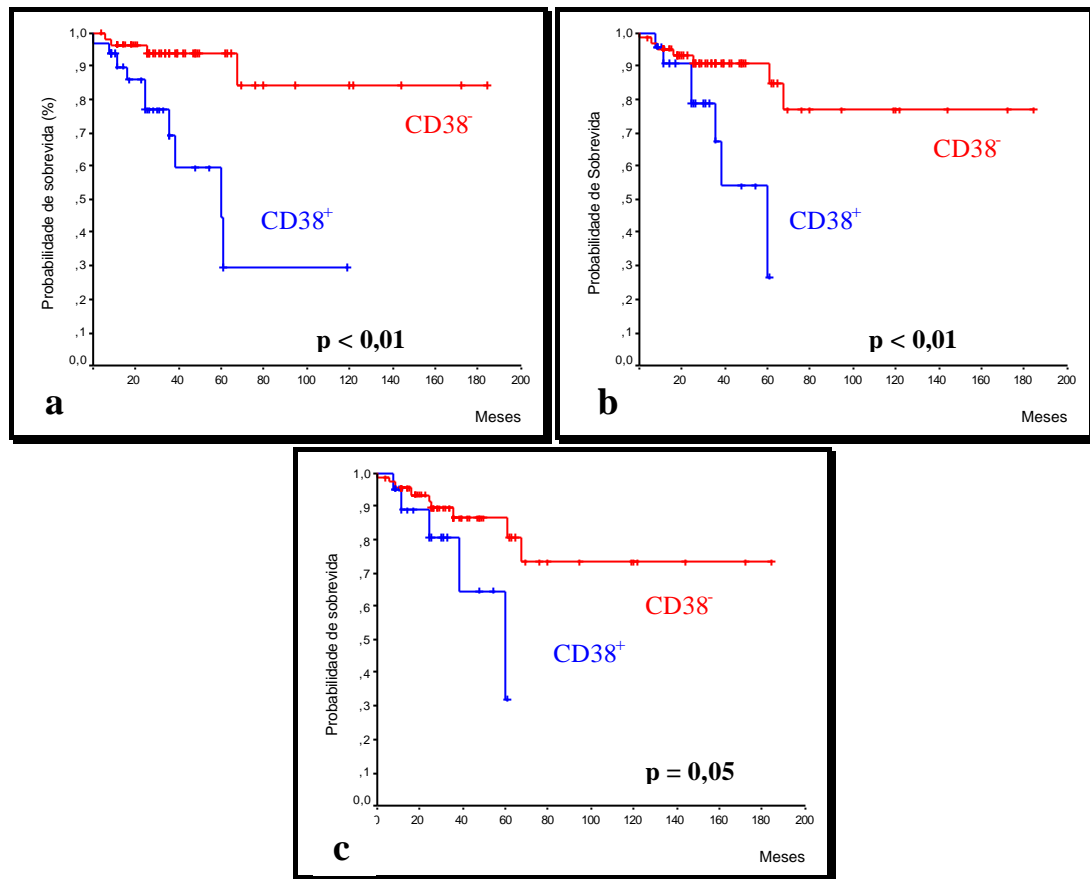


Figura 22 - Curva Kaplan-Meier da SLT dos 85 pacientes do estágio clínico A LLC em relação a expressão de CD38: a) > 10%; b) > 20%; c) > 30%.

4.7.2 – ANÁLISE DA SLT RELACIONADA A EXPRESSÃO DE ZAP-70

Em relação a expressão de Zap-70, a SLT, nos pacientes do EC-A foi avaliada considerando-se os pontos de corte > 10% e > 20%. Quando utilizado o ponto de corte > 10% a SLT dos pacientes Zap-70⁻ foi maior que 180 meses e dos pacientes Zap-70⁺ foi de 67 (43 – 92) meses ($p < 0,01$). De modo semelhante, com o ponto de corte > 20% a SLT dos pacientes Zap-70⁻ foi maior que 180 meses e dos Zap-70⁺ foi de 44 (31 – 58) meses ($p < 0,01$). A análise da curva de SLT mostrou

diferença estatisticamente significativa, independente do ponto de corte utilizado (Figura 23).

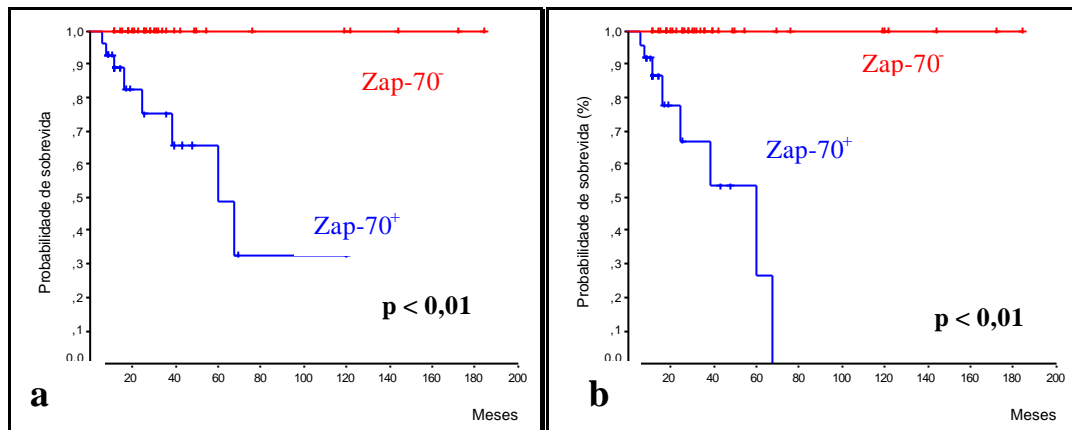


Figura 23 - Curva Kaplan-Meier da SLT dos 85 pacientes do estágio clínico A LLC em relação a expressão de Zap-70: a) > 10%; b) > 20%.

4.7.3 – ANÁLISE DA SLT RELACIONADA A EXPRESSÃO DE ZAP-70 e CD38

A média de SLT dos pacientes do EC-A também foi avaliada considerando-se a expressão conjunta de Zap-70 e CD38, (intervalo de 95% de confiança). Nos pacientes do EC-A com fenótipo Zap-70⁻/CD38⁻ a SLT foi maior que 180 meses. Nos pacientes Zap⁺/CD38⁺ a SLT foi de 40 (25 – 56) meses e para os Zap-70⁺ ou CD38⁺ de 54 (34 - 74) meses. A análise estatística da curva de SLT mostrou diferença estatisticamente significativa entre esses grupos ($p < 0,01$) (Figura 24).

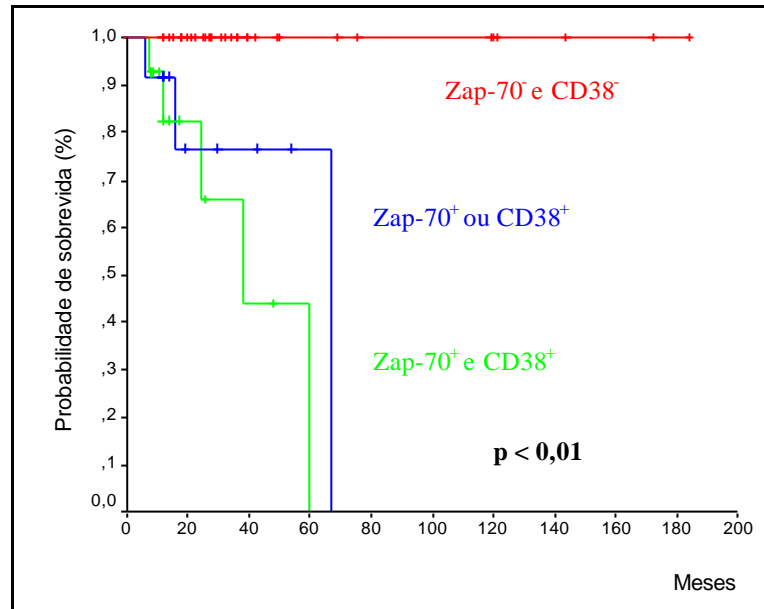


Figura 24 – Curva Kaplan-Meier da SLT dos 85 pacientes do estágio clínico A distribuídos em 3 grupos: Zap-70⁻ e CD38⁻; Zap-70⁺ ou CD38⁺; Zap-70⁺ e CD38⁺.

Ainda, quando os pacientes foram divididos em dois grupos, a SLT dos pacientes Zap-70⁻/CD38⁻ foi > 180 meses e dos Zap-70⁺ ou CD38⁺ foi de 47 (34 - 59) meses, sendo essa diferença estatisticamente significante (p < 0,01) (Figura 25).

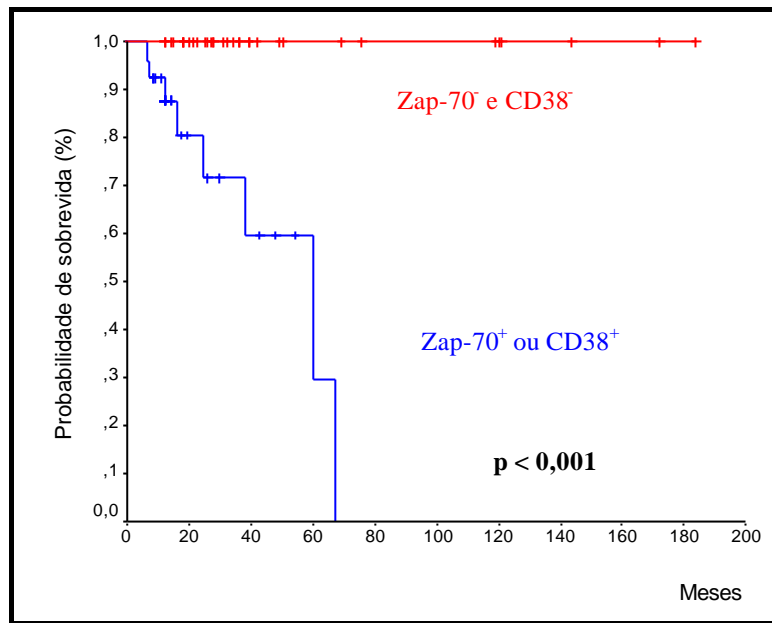


Figura 25 – Curva Kaplan-Meier da SLT dos 85 pacientes do estágio clínico A distribuídos em 2 grupos: Zap-70⁻ e CD38⁻ e Zap-70⁺ ou CD38⁺

4.8 – ANÁLISE DA SOBREVIDA GLOBAL

Foi realizada análise univariada da sobrevida global (SG) dos pacientes e correlacionados ao sexo, estágio clínico (A, B e C), expressão de CD38 e da proteína Zap-70. Foi avaliada a média do tempo de SG em todos os grupos, entretanto, não foi possível estimar o tempo mediano de SG, pois ocorreram menos de 50% dos óbitos durante o período de estudo.

A média do tempo de SG de todos os pacientes estudados foi de 117 meses (intervalo de 95% de confiança e variação de 99 a 134 meses). Os pacientes do sexo feminino apresentaram média de SG de 109 meses e os do sexo masculino de 116

meses. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes do sexo feminino e masculino ($p = 0,32$) (Tabela 15).

Tabela 15 - Sobrevida global dos pacientes com LLC segundo sexo, e estágio clínico.

	Média de SG Meses (IC*95%)	Variação (var)	
Todos os pacientes	117	99-134	
Sexo			
Masculino	109		$p = 0,32$
Feminino	116		
Estádio			
Estádio A	160	136-185	$p < 0,01$
Estádio B	72	60-84	
Estádio C	48	37-60	
Estádio			
Estádio A	160	136-185	$p < 0,01$
Estádio B+C	61	52-70	

*IC = Intervalo de confiança

Em relação ao estágio clínico, a media da SG dos pacientes do EC-A foi de 160 meses, os do EC-B de 72 meses e os do EC-C de 48 meses ($p < 0,01$). Quando comparados os pacientes do EC-A com os dos estádios clínicos B + C, a diferença estatisticamente significativa se manteve ($p < 0,01$) (Figura 26) (Tabela 15).

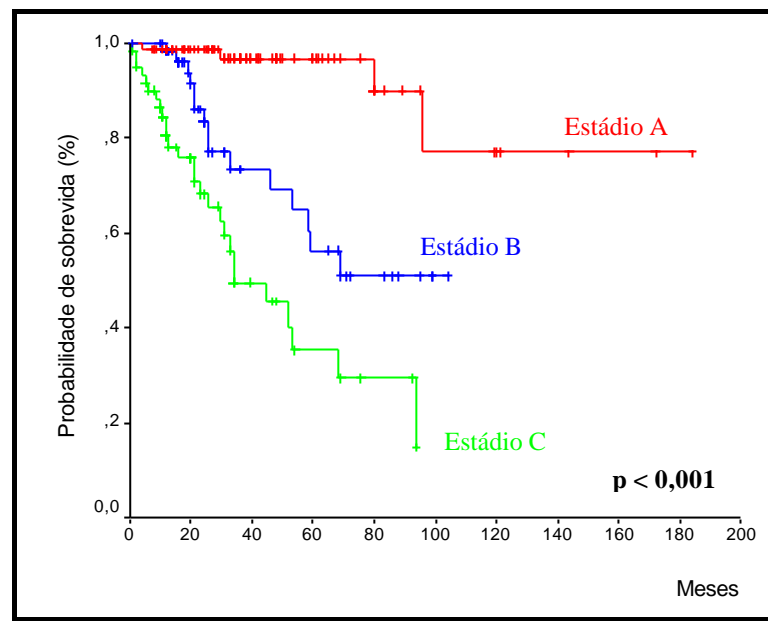


Figura 26 – Curva Kaplan-Meier da SG dos 205 pacientes com diagnóstico de LLC em relação ao estágio clínico de Binet A, B e C.

4.8.1 – ANÁLISE DA SG RELACIONADA A EXPRESSÃO DE CD38

Comparamos a média do tempo de SG dos pacientes $CD38^+$ com os $CD38^-$, considerando como positivo as expressões de $CD38 > 10\%$, $CD38 > 20\%$ e $CD38 > 30\%$.

Quando utilizado o ponto de corte $> 10\%$, a média da SG dos pacientes $CD38^-$ foi de 154 (132 -175) meses e de 70 (59 - 81) meses para aqueles com $CD38^+$ ($p < 0,01$). Utilizando-se o ponto de corte $> 20\%$ a média da SG observada foi de 132 (111-154) meses nos pacientes $CD38^-$ e de 64 (54-74) meses no grupo $CD38^+$ ($p < 0,01$). Com o ponto de corte $> 30\%$ a média da SG foi de 130 (109-152) meses nos pacientes $CD38^-$ e de 63 (53-73) meses nos $CD38^+$ ($p < 0,01$). Independente do ponto

de corte utilizado houve diferença estatisticamente significante, quando foi comparada a média de SG dos pacientes $CD38^+$ com os $CD38^-$ (Figura 27).

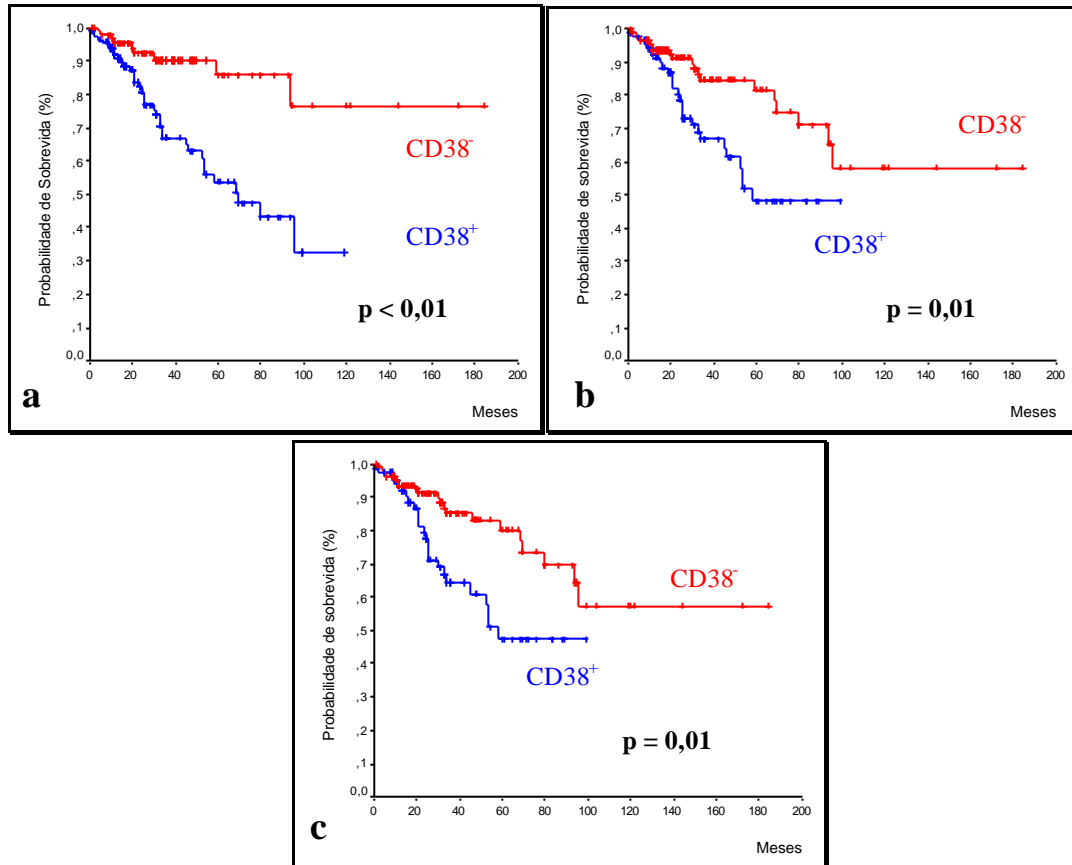


Figura 27 - Curva Kaplan-Meier da SG dos 205 pacientes de LLC em relação a expressão de CD38: a) $> 10\%$; b) $> 20\%$; c) $> 30\%$.

Foi realizada também a comparação da média da SG dos pacientes $CD38^+$ com os $CD38^-$, utilizando os diferentes pontos de corte, nos pacientes do EC-A e do EC-B+C. Verificamos que, independente do ponto de corte utilizado, não foi observada diferença estatisticamente significante entre as expressões de CD38 nos pacientes do EC-A e nos EC-B + C (Tabela 16).

Tabela 16 – Sobrevida global dos pacientes com LLC do estágio clínico A e B+C segundo a expressão de CD38.

	Média de SG em Meses (variação)		
	CD38 ⁺	CD38 ⁻	
CD38 >10%			
EC-A	98 (83 – 114)	181 (174 – 187)	p = 0,10
EC- B+C	54 (45 – 64)	76 (60 – 92)	p = 0,11
CD38 > 20%			
EC-A	84 (76 – 93)	161 (136 – 187)	p = 0,66
EC- B+C	55 (44 – 66)	68 (55 – 81)	p = 0,25
CD38 > 30%			
EC-A	83 (72 – 94)	161 (136 – 187)	p = 0,53
EC- B+C	56 (44 – 67)	65 (53 – 79)	p = 0,34

4.8.2 – ANÁLISE DA SG RELACIONADA A EXPRESSÃO DE Zap-70

A média do tempo de SG dos pacientes Zap-70⁺ foi comparada com os Zap-70⁻, considerando como positivo as expressões de Zap-70 > 10% e Zap-70 > 20%.

Quando utilizado o ponto de corte > 10%, a média da SG foi de 168 (149 a 187) meses para os pacientes Zap-70⁻ e de 72 (59 – 85) meses para os Zap-70⁺ (p < 0,01). Com o ponto de corte > 20% a média da SG dos pacientes Zap-70⁻ foi de 145 (119 – 172) meses e no grupo Zap-70⁺ de 63 (52 – 74) meses (p < 0,01) (Figura 28).

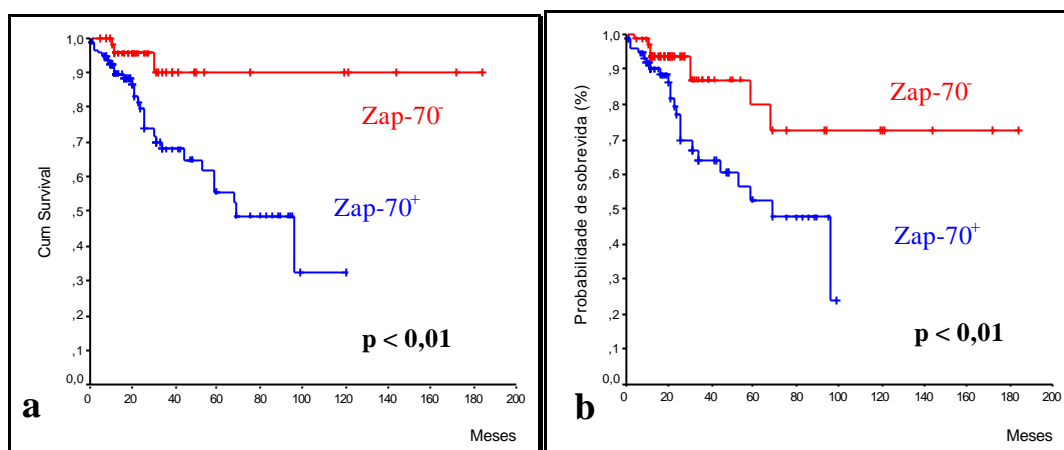


Figura 28 - Curva Kaplan-Meier da SG dos 143 pacientes de LLC em relação a expressão intracelular da proteína Zap-70: a) > 10%; b) > 20%.

Realizamos também a comparação da média de SG dos pacientes Zap-70⁺ com os Zap-70⁻, utilizando os diferentes pontos de corte nos pacientes do EC-A e nos pacientes do EC-B+C (Tabela 17). Não houve diferença estatisticamente significante.

Tabela 17 - Sobrevida global dos pacientes do estágio clínico A e B+C segundo a expressão de Zap-70.

Zap-70 > 10%	Média de SG em Meses (variação)		
	Zap-70 ⁺	Zap-70 ⁻	
EC-A	109 (91 – 125)	174 (156 – 193)	p = 0,69
EC- B+C	54 (43 – 65)	35 (31 – 40)	p = 0,43
Zap-70 > 20%			
EC-A	96 (96 – 96)	176 (162 – 191)	p = 0,34
EC- B+C	52 (40 – 65)	64 (47 – 81)	p = 0,31

4.8.3 – ANÁLISE DA SG RELACIONADA A EXPRESSÃO DE ZAP-70 e CD38

Foi avaliada a média da SG dos pacientes com a expressão conjunta de Zap-70 e CD38. Para esta análise os paciente foram divididos em 3 grupos: Zap-70⁺/CD38⁺; Zap-70⁺ ou CD38⁺; Zap-70⁻/CD38⁻.

A média de SG dos pacientes Zap-70⁻/CD38⁻ foi 156 meses (133 – 179), para os Zap-70⁺/CD38⁺ foi 58 (44 -73) meses e naqueles com fenótipo discordante (Zap⁺/CD38⁻ e Zap⁻/CD38⁺) de 69 (54 - 84) meses. Houve diferença estatisticamente significativa na média da SG quando comparados os três grupos de pacientes ($p < 0,01$) (Figura 29).

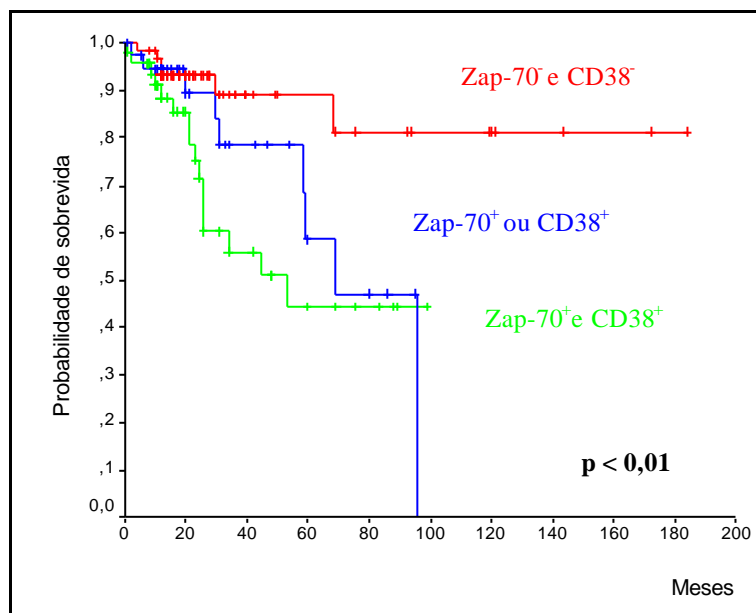


Figura 29 – Curva Kaplan-Meier da SG dos 144 pacientes estudados distribuídos em 3 grupos: Zap-70⁻ e CD38⁻; Zap-70⁺ ou CD38⁺; Zap-70⁺ e CD38⁺.

Em relação ao estágio clínico, nos pacientes do EC-A com o fenótipo concordante e negativos para Zap-70⁻/CD38⁻ a média da SG foi maior que 180 meses, entretanto nos paciente Zap-70⁺ ou CD38⁺ a média da SG foi de 85 (57-117) meses ($p < 0,01$). Todos os pacientes desse grupo foram censurados pela análise estatística. (Tabela 18). Nos pacientes do EC-B+C não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos de pacientes: Zap-70⁺/CD38⁺; Zap-70⁺ ou CD38⁺ e Zap-70⁻/CD38⁻ ($p = 0,31$).

Tabela 18– SG dos 144 casos de LLC distribuídos em 3 grupos de acordo com a expressão de Zap-70 e CD38 e estratificado pelo estágio clínico A e B+C.

	Média de SG em Meses (variação)		
	Zap70 ⁻ /CD38 ⁻	Zap70 ⁺ ou CD38 ⁺ (Zap70 ⁺ /CD38 ⁻ e Zap-70 ⁻ /CD38 ⁺)	Zap70 ⁺ /CD38 ⁺
EC-A (n = 59)	>180	85 (57 –117)	Não avaliado
EC-B + C (n = 85)	65 (46 a 84)	62 (45 – 78)	47 (32 - 62)

Também foi comparada a média da SG dos pacientes com negatividade para ambos os marcadores (Zap-70⁻ e CD38⁻) e aqueles com positividade para um dos marcadores (Zap-70⁺ ou CD38⁺) ou ambos. Nessa análise, a média de SG do primeiro grupo foi de 156 (133 – 179) meses e do segundo de 63 (53 – 73) meses, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) (Figura 30).

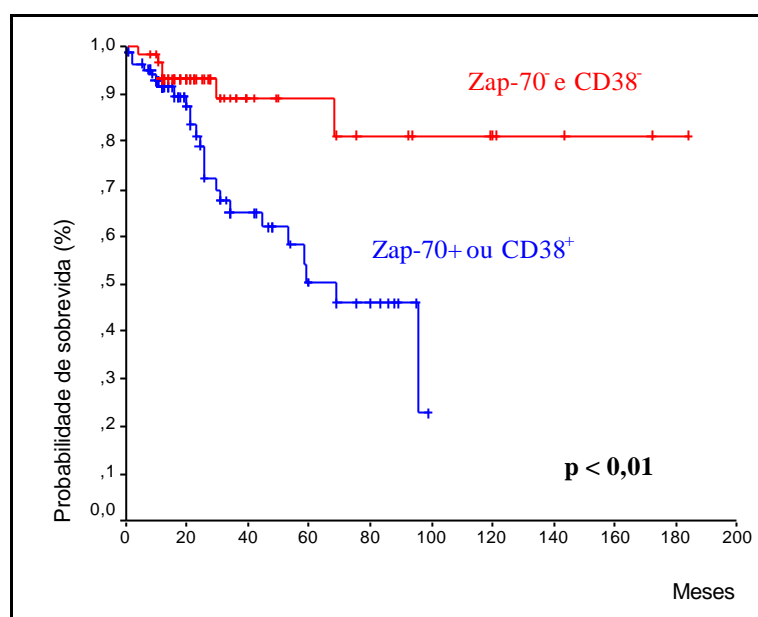


Figura 30 – Curva Kaplan-Meier da SG dos 144 pacientes estudados divididos em 2 grupos: Zap-70⁻ e CD38⁻ ; Zap-70⁺ ou CD38⁺.

Nos pacientes do EC-A, a média de SG dos casos Zap-70⁻/CD38⁻ foi >180 meses e nos Zap-70⁺ ou CD38⁺ foi de 90 (74 – 106) meses, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p = 0,01$). Por outro lado, nos pacientes do EC-B+C e Zap-70⁻/CD38⁻ a média de SG foi de 65 meses (46 – 84) e os Zap-70⁺ ou CD38⁺ de 53 (41 - 65) meses ($p = 0,49$) (Tabela 19).

Tabela 19 – SG dos 144 casos de LLC distribuídos em 2 grupos de acordo com a expressão de Zap-70 e CD38 e estratificado pelo estágio clínico A e B+C.

	Média de SG em Meses (variação)		
	Zap70 ⁻ e CD38 ⁻	Zap70 ⁺ ou CD38 ⁺	
EC-A (n=59)	>180	90 (74 – 106)	$p = 0,01$
EC-B + C (n=85)	65 (46 a 84)	53 (41 – 65)	$p = 0,49$

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A LLC é uma doença heterogênea, com curso clínico bastante variável. Devido a esses aspectos, sistemas de estadiamento clínico foram propostos para identificar a extensão da doença, avaliar o prognóstico e programar melhor a estratégia terapêutica (Geisler et al, 1991). Entretanto, nenhum deles foi eficiente como indicador prognóstico nos estádios iniciais da doença. No final da década de 90, vários estudos mostraram que o estado mutacional do gene da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina (V_H Ig) tem valor prognóstico, porém sua detecção é tecnicamente difícil e somente disponível em alguns laboratórios de pesquisa (Hamblin et al, 1999). Recentemente, a expressão do antígeno CD38 (Damle et al, 1999; Hamblin et al, 2000; Ibrahim et al, 2001; Del Poeta et al 2001 e Hamblin et al, 2002) e da proteína tirosina kinase Zap-70 (Dürig et al, 2003; Crespo et al, 2003; Rassenti et al, 2004) foram sugeridos como marcadores substitutos do estado mutacional do gene V_H Ig. No Brasil, não existe nenhum estudo, por citometria de fluxo, correlacionando as expressões de CD38 ou Zap-70 e o prognóstico nos pacientes de LLC.

No presente estudo, foi avaliada a expressão de CD38 e Zap-70, por citometria de fluxo, em três grupos de pacientes portadores de LLC de acordo com o EC de Binet. Em todos os pacientes o perfil imunofenotípico foi compatível com o proposto por Matutes et al (1994), onde a maioria dos pacientes pontuaram com escore 4 e 5. A frequência dos pacientes em EC-A de 41% foi menor do que a descrita nos estudos realizados em países desenvolvidos (Molica, 1991, Rozman & Montserrat, 1995, Byrd et al 2004). Essa diferença pode ser explicada pela

dificuldade de se realizar o diagnóstico precoce devido às características sócio culturais da população brasileira.

Damle et al (1999) inicialmente observaram que os pacientes com LLC, que expressam CD38 e sem mutações do gene $V_{H}Ig$, apresentavam curso clínico mais agressivo e menor sobrevida. Esses resultados foram corroborados por outros estudos publicados por Ibrahim et al (2001) e Del Poeta et al (2001). Entretanto, estudos realizados por Hamblin et al (2000) e Matrai et al (2001) demonstraram que a expressão de CD38 e o estado mutacional são fatores de prognóstico independentes.

Também o ponto de corte a ser considerado como positivo, na literatura, para a expressão de CD38 é variável. O ponto de corte de 30%, utilizado na maioria dos estudos, (Damle et al, 1999; Del Poeta et al, 2001; Hamblin et al 2001; Thurnberg et al, 2001; Ghia et al 2003) foi baseado na homologia com o estado mutacional. Entretanto, Ibrahim et al (2001) e Dürig et al, (2002) utilizaram um ponto de corte de 20%, escolhido de maneira arbitrária. Apenas um estudo mostrou que o ponto de corte de 7% (Kröber et al, 2002) também estava correlacionado com o estado mutacional do gene $V_{H}Ig$.

Devido a essas discrepâncias, no presente estudo, a expressão de CD38 foi avaliada considerando-se como positivas as expressões de $CD38 > 10\%$, $CD38 > 20\%$ e $CD38 > 30\%$. Como observado por Domingo-Doméneci et al (2002), não houve diferença estatisticamente significativa, na avaliação da expressão de CD38, quando formam comparados os pontos de corte de 30% e 20% ($p = 0,38$). Porém, quando comparado o ponto de corte 30% e 10% a diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Isto sugere que quando é utilizado o ponto de corte de 10%

podem estar sendo incluído casos falsos positivos. Deste modo, foi escolhido o ponto de corte de 30% como valor de positividade para CD38, valor este demonstrado pela maioria dos pesquisadores pela sua homologia com o estado mutacional do gene $V_{H}Ig$ (Damle et al, 1999; Del Poeta et al, 2001; Hamblin et al 2002; Thurnberg et al, 2001; Ghia et al 2003).

Ainda, em nosso estudo, observamos que a mediana de expressão de CD38 foi menor (4%) nos estádios precoces (EC-A) da doença quando comparada com os estádios mais avançados (EC-B 34%; EC-C 25%). Esses dados sugerem, como proposto por Hamblin et al (2002), que a expressão de CD38 pode variar durante o curso clínico da doença.

Nossos dados também mostraram que a expressão de CD38 pode estar correlacionada com um pior curso clínico da doença desde que, independente do ponto de corte utilizado, encontramos diferença estatisticamente significativa entre a expressão de CD38 nos pacientes do EC-A e nos do EC-B e C ($p < 0,01$). Verificamos também que os pacientes $CD38^{+}$ apresentam menor SG, quando comparado com os $CD38^{-}$. Esses dados estão em concordância ao encontrados na literatura (Ibrahim et al, 2001; Del Poeta et al, 2001; Dürig et al, 2002; Domingo-Doménci et al, 2002). Contudo, quando avaliamos a média de SG dos pacientes $CD38^{+}$, estratificada pelo EC, verificamos que a SG está associada ao estágio clínico e não com a expressão de CD38.

Para avaliar a sobrevida livre de tratamento (SLT) foram estudados apenas os pacientes do EC-A, desde que esses pacientes não são tratados até que ocorra a progressão clínica da doença. Nossos resultados mostraram que, independente do ponto de corte utilizado a SLT foi menor nos pacientes $CD38^{+}$ e esses dados estão

em concordância com os publicados na literatura (Damle et al, 1999; Del Poeta et al, 2001; Dürig et al, 2002; Hamblin et al 2002). Tanto na avaliação da SG como na SLT não foi possível estimar a mediana por terem ocorrido menos de 50% dos óbitos durante o período de estudo.

Recentemente, Rosenwald et al (2001) observaram a presença de um pequeno grupo de genes, incluindo o ZAP-70 que é capaz de discriminar os dois subgrupos da LLC, MV_HIg e NMV_HIg. De acordo com os relatos de vários autores, a maioria dos pacientes com células NMV_HIg apresentam alta expressão de Zap-70 e pior prognóstico (Crespo et al, 2003; Wiestner et al, 2003; Rassenti et al, 2004).

Como proposto por alguns autores (Crespo et al, 2003; Rassenti et al, 2004) o melhor ponto de corte a ser utilizado para diferenciar os pacientes NMV_HIg dos MV_HIg é de 20%, entretanto no estudo realizado por Orchard et al (2004) foi demonstrado que a expressão de Zap-70 > 10% teria maior homologia com o estado mutacional do gene V_HIg. Considerando essas publicações, avaliamos a expressão de Zap-70 como positivas >10% e >20%. Não encontramos diferença estatisticamente significativa na expressão de Zap-70, quando comparados os pontos de corte de 20% e o de 10% (p = 0,07). Deste modo, como a maioria dos autores (Crespo et al, 2003; Dürig et al, 2003; Wiestner et al; Rassenti et al, 2004; Schroers et al, 2005) definiram que o ponto de corte de 20% melhor diferencia os 2 subgrupos de LLC, nós utilizamos este valor para as avaliações posteriores.

Em nossa casuística, 53% dos pacientes apresentaram positividade para esse Zap-70, dados esses em concordância com a literatura (Dürig et al, 2003; Rassenti et al, 2004 e Schroers et al 2005). Entretanto, observamos que a expressão de Zap-70 parece ser menor nos estádios mais precoces da doença. Conforme relato

de Dürig et al (2003) a SG dos pacientes Zap-70⁺ foi menor que a dos Zap-70⁻. Nossos dados são concordantes com os publicados por esses autores, porém quando é avaliada a expressão de Zap-70 nos casos do EC-A e naqueles em EC-B e C, observamos que a SG está correlacionada com o estágio clínico e não com a expressão de Zap-70. Nosso estudo também mostrou que a média de SLT, nos pacientes do EC-A e Zap-70⁺ foi menor quando comparada com os casos Zap-70⁻ ($p < 0,01$); dados esses similares aos publicados na literatura (Crespo et al, 2003; Dürig et al, 2003; Wiestner et al; Rassenti et al, 2004; Schroers et al, 2005).

Esse estudo também mostrou que nos pacientes do EC-A a mediana de expressão deste marcador foi de 10% e nos pacientes dos EC-B e C de 65% e 50%, respectivamente. Esses dados sugerem que a expressão desse marcador também pode variar conforme a evolução clínica da LLC. Porém, como não há dados na literatura para compararmos nossos resultados, estudos adicionais devem ser realizados, inclusive com acompanhamento clínico e avaliação laboratorial seriada para validar nossos resultados.

Estudos recentes têm demonstrado que análise quantitativa da expressão antigênica de CD38 pela média de intensidade de fluorescência (MIF), bem como, pela capacidade de ligação antigênica (CLA) está correlacionada com o prognóstico na LLC (Morabito et al, 2001; Mainou-Fowler et al, 2004). No presente estudo, a grande maioria dos pacientes apresentou MIF de CD38 baixa, entretanto não foi encontrada correlação entre a MIF ou CLA com o estágio clínico. Em relação a análise quantitativa de Zap-70, tanto pela MIF como pela CLA, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre esses parâmetros e o EC. Esses últimos resultados devem ser avaliados com cautela, uma vez que foram

utilizados AcMo diferentes para a avaliação de Zap-70 e não há na literatura qualquer estudo sobre a análise quantitativa de Zap-70 tanto pela MIF como pela CLA.

Após termos verificado que as expressões de CD38 e Zap-70 estão correlacionadas com a SLT nos pacientes do estágio clínico A e não com a SG, avaliamos se a expressão associada de CD38 e Zap-70 poderia implementar a relevância clínica desses marcadores. A análise combinada de CD38 e Zap-70, identificou 4 grupos de pacientes, Zap-70⁺/CD38⁺ (33%), Zap-70⁻/CD38⁻ (41%), Zap-70⁺/CD38⁻ (20%) e Zap-70⁻/CD38⁺ (6%). Nossos resultados foram semelhantes aos encontrados por Schroes et al (2005), quando a mesma análise foi empregada. Adicionalmente, encontramos diferença estatisticamente significativa quando foi avaliada a expressão combinada desses marcadores nos EC A, B e C ($p = 0,02$).

Posterior estratificação na tentativa de entender melhor a expressão desses marcadores em relação ao estágio clínico foi realizada e os pacientes divididos em dois grupos: pacientes Zap-70⁻/CD38⁻ e Zap-70⁺ ou CD38⁺. Observamos que a expressão positiva desses dois marcadores estava associada ao estágio clínico, uma vez que a grande maioria dos pacientes dos estágios B (74%) e C (66%) expressam Zap-70 ou CD38. Também, a SG nos pacientes do EC-A Zap-70⁺ ou CD38⁺ foi menor que os Zap-70⁻/CD38⁻. Entretanto essa diferença não foi observada nos pacientes do EC-B e do EC-C. Vale ressaltar que esses dois grupos de pacientes (Zap-70⁻/CD38⁻ e Zap-70⁺ ou CD38⁺) parecem ser diferentes clinicamente, isto é, o intervalo entre o diagnóstico e início da terapia nos pacientes no EC-A, Zap-70⁺ ou CD38⁺ foi menor quando comparada com os Zap-70⁻/CD38⁻. Esses dados são consistentes com os da literatura (Dürig et al, 2003; Schroes et al, 2005).

No momento, todos os dados sugerem que existem 2 grupos de pacientes com LLC, o que poderia explicar a variabilidade clínica e as diferentes sobrevidas observadas nessa neoplasia. Pelo fato de existir controvérsia em relação a significância prognóstica desses marcadores, informações adicionais são necessárias. Se a utilização desses marcadores for validada em ensaios clínicos, tratamento adequado poderá ser instituído em pacientes nos estádios clínicos iniciais dessa doença.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Houve diferença estatisticamente significativa quando comparada a mediana de expressão de Zap-70 e CD38 entre os pacientes do EC-A e EC-B e EC-C.
- A expressão de CD38 e Zap-70 foi menor nos pacientes do EC-A do que nos pacientes do EC-B e EC-C, independente do ponto de corte utilizado.
- Não houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes MIF bem como de CLA de Zap-70 e CD38 nos estádios clínicos A, B e C.
- O tempo entre o diagnóstico e início da terapia (SLT) nos pacientes do estágio clínico A foi menor nos pacientes Zap-70⁺ou CD38⁺ e nos Zap-70⁺/CD38⁺
- A média de SG dos pacientes Zap-70⁺ou CD38⁺ foi menor que os Zap-70⁻ e CD38⁻, entretanto quando correlacionada a expressão desses marcadores com o estágio clínico não foi observada diferença estatisticamente significativa.
- A média de SG dos pacientes do estágio clínico A Zap-70⁺ou CD38⁺ foi menor quando comparada com os Zap-70⁺ou CD38⁺.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Houve diferença estatisticamente significativa quando comparada a mediana de expressão de Zap-70 e CD38 entre os pacientes do EC-A e EC-B e EC-C.
- A expressão de CD38 e Zap-70 foi menor nos pacientes do EC-A do que nos pacientes do EC-B e EC-C, independente do ponto de corte utilizado.
- Não houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes MIF bem como de CLA de Zap-70 e CD38 nos estádios clínicos A, B e C.
- O tempo entre o diagnóstico e início da terapia (SLT) nos pacientes do estágio clínico A foi menor nos pacientes Zap-70⁺ ou CD38⁺ e nos Zap-70⁺/CD38⁺
- A média de SG dos pacientes Zap-70⁺ ou CD38⁺ foi menor que os Zap-70⁻ e CD38⁻, entretanto quando correlacionada a expressão desses marcadores com o estágio clínico não foi observada diferença estatisticamente significativa.
- A média de SG dos pacientes do estágio clínico A Zap-70⁺ ou CD38⁺ foi menor quando comparada com os Zap-70⁺ ou CD38⁺.

ANEXOS

ANEXO I – PACIENTES DO ESTÁDIO CLÍNICO A

Nº	Paciente	ESCORE	CD38	ZAP-70	HB	GB	Linf/mm ³	Plaquetas
1	MAB	4	0%	7%	13,0	70000	41300	270000
2	LCS	3	30%	NR	14,3	13000	9750	372000
3	DPB	5	0%	17%	14,8	16500	10395	177000
4	FC	4	11%	76%	14,2	41000	35670	318000
5	RFLB	5	13%	NR	11,4	16100	11592	334000
6	EDN	3	0%	NR	12,4	23000	16100	332000
7	AMC	5	3%	76%	15,6	48600	42042	282000
8	LGC	3	16%	NR	14,2	23600	14396	320000
9	PDSS	3	0%	14%	13,0	20900	17556	178000
10	IRC	4	0%	NR	12,7	21100	18779	149000
11	JD	3	0%	NR	13,2	23000	10350	350000
12	TRM	4	64%	NR	12,4	25000	13000	165000
13	JL	5	4%	5%	16,9	28930	1025024	267000
14	MC	5	27%	NR	10,2	17700	13806	214000
15	JCS	4	0%	NR	11,6	21700	14756	350000
16	JCS	5	0%	NR	16,6	21800	15914	122000
17	BCM	4	0%	5%	13,2	26400	18480	214000
18	BFO	4	24%	NR	13,2	32300	25840	213000
19	JBT	5	0%	NR	12,8	39600	34848	137000
20	DBG	4	69%	2%	12,2	13680	9302	113000
21	FRC	4	40%	NR	17,0	31300	25979	183000
22	NCD	5	59%	56%	12,5	10000	8000	214000
23	BAA	4	0%	12%	15,4	21000	17010	191000
24	JL	4	0%	NR	14,5	19300	11750	193000
25	AISM	4	0%	NR	12,5	74000	63640	174000
26	JPS	4	0%	NR	12,5	68000	66000	195000
27	MLOO	5	9%	NR	14,0	48700	37499	293000
28	BVLA	4	7%	36%	13,0	10000	7800	120000
29	AMBC	5	4%	NR	12,1	31000	21700	312000
30	APS	5	14%	0%	12,9	47500	41800	313000
31	SFC	5	0%	NR	13,3	40000	36000	146000
32	MV	3	98%	NR	13,6	13900	10981	119000
33	DPB	4	6%	NR	14,2	26500	18020	251000
34	JSA	5	2%	NR	14,0	24500	20825	170000
35	LAS	4	0%	NR	12,7	24300	18468	213000
36	ENS	4	1%	NR	10,9	84250	80051	186000
37	LCS	4	1%	NR	12,50	19000	13500	157000
38	JFN	5	91%	NR	15,0	16000	7300	174000
39	AVC	5	75%	47%	14,0	24000	18000	170000
40	OIF	4	2%	1%	13,8	59000	51800	138000
41	MAS	5	89%	85%	14,9	105000	90300	121000
42	LNFV	4	5%	73%	12,9	79400	44774	175000
43	LSC	4	3%	10%	12,8	50200	41666	192000
44	WAF	5	12%	13%	12,4	14500	6700	200000
45	JAS	5	6%	3%	14,1	24900	20419	190000
46	MLC	4	71%	88%	13,6	17300	11418	250000
47	MBM	4	1%	2%	13,0	33000	14520	244000
48	GS	4	0%	6%	15,3	46210	41900	147000
49	JM	5	0%	1%	14,7	12400	7812	226000
50	RFLB	4	42%	60%	11,5	60000	48000	118000
51	OAN	4	23%	1%	12,0	17000	13600	130000
52	LHS	4	5%	5%	12,7	32500	11560	164000
53	GD	5	6%	1%	15,4	19200	13440	129000
54	OCC	5	5%	90%	16,4	23900	15774	160000
55	AVF	5	77%	51%	14,1	28300	23206	191000
56	MCA	4	45%	45%	14,7	37500	48400	206000
57	MAS	4	67%	67%	12,8	23900	16013	356000
58	MPS	5	8%	8%	13,5	50000	45000	220000
59	CAM	5	3%	3%	12,0	10300	8755	143000
60	APC	5	44%	99%	13,8	15300	9333	161000
61	JSA	5	3%	4%	13,9	19000	16318	210000
62	JPSCF	5	2%	54%	17,2	34700	14574	254000
63	JPV	5	8%	3%	13,4	23000	17940	253000
64	ANJ	5	2%	2%	10,5	43900	40827	15000

ANEXO I – PACIENTES DO ESTÁDIO CLÍNICO A - continuação

Nº	Paciente	Escore	CD38	ZAP-70	HB	GB	Linf/mm ³	Plaquetas
65	JSG	4	73%	67%	12,6	20200	15352	328000
66	LPS	4	4%	89%	14,9	49380	41973	200000
67	CM	4	82%	83%	12,0	75000	35250	142000
68	NA	5	3%	3%	14,7	14100	10100	184000
69	AAO	4	13%	2%	13,6	47000	29000	179000
70	MMO	4	61%	66%	11,5	47800	32582	365000
71	GP	4	2%	9%	10,0	27400	22468	166000
72	FC	5	2%	94%	12,0	36000	28080	160000
73	HTM	5	2%	6%	11,3	21500	19780	163000
74	BJS	3	99%	6%	16,3	28900	21400	269000
75	HAS	4	93%	51%	13,1	31470	29000	179000
76	SSS	5	42%	80%	10,2	32000	27000	168000
77	IMF	4	3%	5%	13,5	18820	10500	255000
78	ARLC	5	99%	61%	12,3	19370	10847	295000
79	DPA	5	0%	7%	12,5	30000	17100	180000
80	MLD	4	2%	55%	12,0	21200	19080	273000
81	SVC	5	15%	0%	13,0	13900	8062	310000
82	MAS	5	1%	4%	12,9	25270	20974	269000
83	AM	5	2%	3%	11,3	23000	19550	26200
84	NR	5	2%	7%	13,5	16100	14007	171000
85	ASM	4	5%	2%	11,3	24540	20900	226000

ANEXO II – PACIENTES DO ESTÁDIO CLÍNICO B

Nº	Paciente	Escore	CD38	ZAP-70	HB	GB	Linf/mm ³	Plaquetas
1	APM	4	74%	14%	12,2	25600	24320	131000
2	WIS	4	1%	71%	14,5	45700	37931	287000
3	JLB	4	0%	88%	10,9	94000	81780	200000
4	ADB	4	71%	NR	11,1	108000	92880	140000
5	AU	4	63%	80%	13,0	144000	128160	338000
6	JBSB	4	20%	NR	15,4	14900	9236	290000
7	NVF	5	11%	62%	13,8	86800	73780	193000
8	JC	5	96%	NR	12,3	52300	36087	152000
9	WS	3	98%	65%	13,6	41500	32785	204000
10	MMD	3	86%	65%	10,6	16400	11572	183000
11	EFN	3	0%	NR	13,2	86800	33816	183000
12	AHL	3	2%	NR	11,0	52000	41600	134000
13	MPS	5	3%	98%	13,2	65300	54852	151000
14	CAD	4	64%	NR	11,5	111200	75616	121800
15	JDS	5	36%	NR	14,3	52400	32488	170000
16	IDA	4	37%	NR	11,8	71900	60396	105000
17	CEN	3	98%	NR	10,4	12400	9920	197000
18	SPS	4	91%	NR	13,0	59200	49136	140000
19	AAD	4	30%	NR	15,2	36600	32574	157000
20	JBF	5	87%	NR	15,5	32700	26814	224000
21	SAS	5	45%	NR	10,5	41500	10375	163000
22	GSS	4	0%	77%	12,0	35000	26250	170000
23	VS	5	44%	NR	10,6	60000	52200	115000
24	RP	5	0%	91%	14,1	44800	22400	180000
25	MDS	4	79%	NR	10,9	44700	38880	168000
26	FRC	5	0%	NR	10,9	86910	80826	188900
27	MSO	5	0%	16%	11,0	87500	80500	170000
28	AC	4	67%	NR	13,3	18440	9220	515000
29	AAS	4	95%	75%	10,0	160000	80500	225000
30	CTF	4	36%	NR	10,4	41200	32960	129000
31	JLA	5	34%	84%	11,4	9300	6200	108000
32	CLS	3	19%	17%	11,3	10100	5353	197000
33	MRS	4	0%	NR	11,0	85000	72250	158000
34	MAS	4	8%	14%	11,4	160000	140000	217000
35	LGL	4	58%	90%	11,7	125000	110000	151000
36	ASB	5	87%	78%	11,3	310000	300700	160000
37	JFB	5	76%	71%	11,8	113000	105090	118000
38	MCB	5	8%	NR	12,2	21900	12702	109000
39	SFO	3	50%	72%	12,2	242000	205700	86000
40	ARC	3	98%	80%	14,5	24200	18600	258000
41	VSM	5	18%	1%	10,2	46200	41580	162000
42	ECS	5	19%	94%	10,1	16200	9882	137000
43	AR	4	72%	31%	12,7	74300	68356	196000
44	MIMM	5	10%	1%	12,5	32600	26406	105000
45	SCDPM	5	54%	7%	11,2	14100	10998	119000
46	VDL	5	10%	72%	12,6	96100	57660	28000
47	RFA	5	13%	5%	10,9	24000	16055	382000
48	ZSF	4	48%	90%	11,2	56200	51720	206000
49	TG	4	7%	1%	12,2	16900	151211	173000
50	AAO	5	91%	NR	13,4	75800	65188	133000
51	JSA	5	63%	53%	12,0	53000	43990	220000
52	JGF	4	7%	55%	11,4	72200	62092	266000
53	ESS	4	53%	8%	12,9	58800	43512	162000
54	ARR	5	0%	15%	13,8	12900	6579	165000
55	MA	4	45%	0%	13,8	40000	27600	187000
56	EMA	5	0%	78%	14,1	72600	62436	230000
57	BAES	5	1%	4%	12,6	52000	40040	148000
58	ESR	4	15%	4%	13,4	123560	105026	200000
59	AMF	5	54%	14%	13,1	783000	63423	145000

ANEXO III – PACIENTES DO ESTÁDIO CLÍNICO C

Nº	Paciente	Escore	CD38	ZAP-70	HB	GB	Linf/mm ³	Plaquetas
1	JC	5	57%	80%	6,80	44600	40140	27000
2	MRH	3	84%	70%	9,70	78400	68992	105000
3	NDSS	5	14%	16%	8,60	52000	43680	92000
4	JBO	5	19%	NR	9,70	4100	2132	105000
5	DPP	3	95%	71%	10,00	20400	16320	70000
6	MQC	4	0%	14%	9,80	170000	157300	75000
7	JASO	4	96%	94%	7,80	32000	31040	33000
8	OJR	5	18%	17%	11,00	26700	20292	46000
9	IFJS	4	65%	50%	6,50	134000	11658	101000
10	ATSB	3	46%	NR	9,70	56800	52256	78000
11	GAS	3	29%	92%	8,80	231000	217140	47000
12	FPS	4	19%	18%	9,50	88500	85845	46000
13	OBS	5	91%	NR	6,50	58000	55680	157000
14	VRVA	3	3%	12%	9,60	41900	39805	111000
15	JMS	4	3%	NR	8,20	30000	27000	120000
16	SM	5	16%	55%	9,20	83100	55677	126000
17	EBS	5	12%	68%	9,20	56000	40880	118000
18	JAR	5	91%	46%	7,90	14650	12771	76000
19	LNS	4	6%	NR	6,00	29800	28906	116000
20	RA	3	5%	NR	8,20	3200	9309	93000
21	AFS	5	0%	NR	7,50	50700	48670	200000
22	RAL	5	67%	55%	7,00	300000	120000	100000
23	PV	5	0%	NR	13,00	60400	57984	75000
24	RDS	4	0%	NR	7,30	83100	73635	81000
25	JG	5	82%	75%	14,70	15650	8764	81000
26	DA	5	0%	NR	12,30	61200	54468	81000
27	MMS	4	99%	59%	10,40	58600	56842	82000
28	EG	4	22%	96%	6,90	19930	14548	131000
29	JES	4	94%	NR	10,00	38000	34200	21000
30	AC	5	14%	65%	7,90	27440	24147	81000
31	AS	4	15%	NR	11,80	25800	17544	70000
32	OAJ	4	61%	48%	5,70	81300	78048	150000
33	CMAS	5	48%	50%	8,80	152900	136000	97000
34	GRS	5	93%	NR	7,60	120000	103200	70000
35	JAR	4	3%	65%	10,90	86910	80826	88900
36	JNSS	4	72%	86%	7,30	65800	59220	82000
37	JMS	5	18%	53%	8,67	75200	72944	133000
38	MGS	3	89%	55%	7,50	17500	10500	92000
39	DCF	4	18%	5%	9,50	19326	17586	83000
40	IFC	5	0%	70%	13,20	10000	5000	71000
41	APO	5	17%	7%	7,00	207000	183000	63000
42	APB	5	0%	15%	11,60	260000	192400	65000
43	JSR	5	3%	0%	9,70	77800	67689	98000
44	PR	4	99%	47%	11,10	75000	57750	75000
45	JBR	3	94%	47%	7,00	83800	75420	103000
46	EMS	4	80%	93%	9,50	5400	3402	63000
47	SMC	4	0%	5%	10,00	30300	16643	61300
48	OBL	5	22%	18%	10,60	100000	94000	25600
49	NMT	3	99%	NR	9,30	60000	48000	96000
50	TTS	5	8%	1%	9,8	83900	64603	181000
51	DCB	5	35%	67%	8,20	75000	62250	105000
52	AGS	4	41%	86%	8,80	117000	113490	41700
53	BS	5	43%	77%	9,50	7900	6952	98000
54	EPM	4	0%	5%	10,60	400000	372000	72000
55	OB	5	22%	3%	8,00	21200	19716	94000
56	DFC	4	5%	77%	10,20	19800	12870	90000
57	ANA	5	3%	3%	8,80	70000	82352	197000
58	MJS	5	0%	2%	11,30	46200	44814	67200
59	EAP	5	42%	43%	11,00	42000	41500	67000
60	MGSF	4	89%	6%	7,80	16000	4960	102000
61	SR	5	37%	17%	10,00	727000	661570	62300

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADMIRAND, J. H.; RASSIDAKIS, G. Z.; ABRUZZO, L.V.; VALBUENO, J. R.; JONES, D.; JEFFREY M. L. Immunohistochemical detection of ZAP-70 in 341 cases of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. **Mod. Pathol.**,v. 17, p.954-61, 2004.

BARNABAS, N.; SHURAF, M.; VAN DYKE, D.L.; WOLMAN, S.R.; CLARK, D.; WORSHAM, M.J. Significance of p53 mutations in patients chronic lymphocytic leukemia: a sequential study of 30 patients. **Cancer**, v. 91, n. 2, p. 285-93, 2001.

BARNETT, D.; STORIE, T.; GRANGER, V.; WHITBY, L.; REILLY, J. T.; BROUGH, S. et al. Standardization of lymphocyte antibody binding capacity-a multi-centre study. **Clinical and Laboratory Haematology**, v.22, p.89-96, 2000.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D.A.G.; GRALNICK, H.R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. **J. Clin. Path.** v.42, p.567-584, 1989.

BINET, J.L.; AUQUIER, A.; DIGHIERO, G.; CHASTANG, C.; PIGUET, H.; GOASGUEN, J.; VAUGIER, G.; POTRON, G.; COLONA, P.; OBERLING, F.; THOMAS, M.; TCHERNIA, G.; JACQUILLAT, C.; BOIVIN, C.; LESTY, C.; DUAULT, M.T.; MONCONDUIT, M.; BELABBES, S.; GREMYU, F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. **Cancer**, v.48, p.198-206, 1981.

BOOGS, D.R.; SOFFERMAN, S.A.; WINTROBE, M.M. Factors influencing the duration of survival of patients with chronic lymphocytic leukemia. **Am. J. Med.**, v.40, p.243-54, 1966.

BYRD JC, STILGENBAUER S, FLINN IW. Chronic lymphocytic leukemia. **Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)**, p.163-83, 2004

CATOVSKY, D.; FOOKS, J.; RICHARDS, S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: The importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. **Br. J. Haematol.** v.72, p.141-49, 1989

CHAN, A. C.; van Oers, N. S. C.; TRAN, A.; TURKA, L.; LAW, C-L.; RYAN, J.C.; CLARK, E. A.; WEISS, A. Differential expression of ZAP-70 and syk protein tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. **Journal of Immunology**, v.152, p.4758-66, 1994.

CHEN, L.; WIDHOPF, G.; HUYNH, L.; RASSENTI, L.; RAI, K.R.; WEISS, A.; KIPPS, T.J. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v.100, n.15, p.4609-14, 2002.

CHESON, B. D.; BENNETT, J.M.; GREVER, M.; KAY, N.; KEATING, M. J.; O'BRIEN, S.; RAI, K.R. National Cancer Institute - Sponsored working group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. **Blood**, v.87, n.12, p.4990-97, 1996.

CLARK, E. A.; LANE, P. J. Regulation of human B-cell activation and adhesion. **Annu Rev. Immunol.**, v.9, p.97, 1991.

CRESPO, M.; BOSCH, F.; VILLAMOR, N.; BELLOSILLO, B.; COLOMER, D.; ROZMAN, M.; MARCE, S.; LOPEZ-GUILLERMO, A.; CAMPO, E.; MONTSERRAT, E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**, v. 348, n. 18, p.1764-75, 2003

CRESPO, M.; BOSCH, F.; VILLAMOR, N.; BELLOSILLO, B.; COLOMER, D.; ROZMAN, M.; MARCÉ, S.; LÓPEZ-GUILLERMO, A.; CAMPO, E.; MONTSERRAT, E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**, v.348, n.18, p.1764-75, 2003.

D'ARENA, MUSTO, P.; CASCAVILLA, N.; DELL'OLIO, M.; DI RENZO, N.; CAROTENUTO, M.; Quantitative flow cytometry for the differential diagnosis of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. **Am. J. Hematol.**, v.64, n.4, p.275-81, 2000.

D'ARENA, G.; MUSTO, P.; CASCAVILLA, N.; DELL'OLIO, M.; DI RENZO, N.; PERLA, G.; SAVINO, L.; CAROTENUTO, M.; CD38 expression correlates with adverse biological features and predicts poor clinical outcome in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Leuk. Lymphoma**, v.42, n.1-2, p.109-14, 2001.

DAMESHEK, W. Chronic lymphocytic leukemia - an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. **Blood**, v.29, n.4, p.566-84, 1967.

DAMLE, R.N.; WASIL, T.; FAIS, F.; GHIOTTO, F.; VALETTO, A.; ALLEN, S.L.; BUCHBINDER, A.; BUDMAN, D.; DITTMAR, K.; KOLITZ, J.; LICHMAN, S.M.; SCHULMAN, P.; VINCIGUERRA, V.P.; RAI, K.R.; FERRARINI, M.; CHIORAZZI, N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v.94, n.6, p.1840-7, 1999.

DEL POETA, G.; MAURILLO, L.; VENDITTI, A.; BUCCISANO, F.; EPICENO, A.M.; CAPELLI, G.; TAMBURINI, A.; SUPPO, G.; BATTAGLIA, A.; DEL PRINCIPE, M.I.; DEL MORO, B.; MASI, M.; AMADORI, S. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v.98, n.9, p.2633-9, 2001.

DIGHIERO, G.; JACQUES-LOUIS, B. When and how to treat chronic lymphocytic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v.343, n.24, p.1799-1801, 2000.

DOHNER, H.; STILGENBAUER, S.; DOHNER, K.; BENTZ, M.; LICHTER, P. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. **J Mol Med**, v.77, n.2, p.266-81, 1999.

DOMINGO-DOMÈNECH, E.; DOMINGO-CLARÓS, A.; GONZALEZ-BARCA, E.; BENEITEZ, D.; ALONSO, E.; RAMAGOSA, V.; de SANJOSÉ, S.; PETIT, J.; GRANENA, A.; SEVILLA, A. F. CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: association with clinical presentation and outcome in 155 patients. **Haematologica**, v.87, p.1021-27, 2002.

DONEDA, L.; CARTORINA, P.; TEDESCHI, A. INTROPIDO, L.; MORRA, E.; MONTILLO, M.; LARIZZA, L. Multicolor FISH in chronic lymphocytic leukemia. An interphase study of patients with early-onset disease. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 125, n.1, p.63-9, 2001.

DÜRIG, J.; NASCHAR, M.; SCHMUCKER, U.; RENZING-KOHLER, K.; HOLTER, T.; HUTTMANN, A.; DUHRSEN, U. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. **Leukemia**, v.16, n.1, p.30-5, 2002.

DÜRIG, J.; NUCKEL, H.; CREMER, M.; FUHRER, A.; HALFMEYER, K.; FANDREY, J.; MOROY, T.; KLEIN-HITPASS, L.; DUHRSEN, U.; ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, v. 17, n. 12, p. 2426-34, 2003.

DÜRIG, J.; NUCKEL, H.; HUTTMANN, A.; KRUSE, E.; HOLTER, T.; HALFMEYER, K.; FUHRER, A.; RUDOLPH, R.; KALHORI, N.; NUSCH, A.; DEAGLIO, S.; MALAVASI, F.; MOROY, T.; KLEIN-HITPASS, L.; DUHRSEN, U. Expression of ribosomal and translation-associated genes is correlated with a favorable clinical course in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v, 101, n. 7, p.2748-55, 2003.

FAIS, F.; GHIOTTO, F.; HASHIMOTO, S.; SELLERS, B.; VALETTO, A.; SCHULMAM, P.; VICINGUERRA, V.P.; RAI, K.; RASSENTI, L.Z.; KIPPS, T.J.; DIGUIERO, G.; SCHROEDER, H.W.Jr; FERRANI, M.; CHIORAZZI, N. Chronic

lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. **J. Clin. Invest**, v.102, p.1515-25, 1998.

FARAHAT, N.; LENS, L.; ZOMAS, N.; MORRILA, R.; MATUTES, E; CATOVSKY. Quantitative flow cytometry can distinguish between normal and leukaemic B-cell precursors. **Br. J. Haematol.**, v.91, p.640-46, 1995.

FOERSTER, J. Chronic lymphocytic leukemia. In: LEE, G. R.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. Wintrobe's Clinical Hematologic. 9. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. Cap.78, p.2034-2037.

GALTON, D. A. G; GOLDMAN, J. M.; WILTSHAW, E.; CATOVSKY, D.; HENRY, K.; GOLDENBERG, G. J. Prolymphocytic leukemia. **Br. J. Haematol.**, v.27, p.7-23, 1974.

GALTON, D. A. G. The Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia. **Canad. Med. Ass. J**, v.94, p.1005-10, 1966.

GEISLER, C.; RALFKIAER, E.; HANSEN, M.M.; HOU-JENSEN, K.; LARSEN, S.O. The bone marrow histological pattern has independent prognostic value in early stage chronic lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol**, v.62, n.1, p.47-54, 1986.

GHIA, P.; GUIDA, G.; STELLA, S.; GOTTARDI, D.; GEUNA, M.; STROLA, G.; SCIELZO, C.; CALIGARIS-CAPPIO, F. The pattern of Cd38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. **Blood**, v.101, n.4, p.1262-69, 2003.

HALLEK, M.; LANGENMAYER, I.; NERL, C.; KNAUF, W.; DIETZFELBINGER, H.; ADORF, D.; OSTWALD, M.; BUSH, R.; KUHN-HALLEK, I.; THIEL, E.; EMMERICH, B. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v.93, n.5, p.1732-7, 1999.

HAMBLIN, T.J.; DAVIS, Z.; GARDINER, A.; OSCIER, D.G.; STEVENSON, F.K. Unmutated Ig V_H are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v.94, n.6, p.1848-54, 1999.

HAMBLIN, T.J.; ORCHARD, J.A.; GARDINER, A.; OSCIER, D.G.; DAVIS, Z.; STEVENSON, F.K. Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. **Blood**, v.95, n.7, p.2455-7, 2000.

HAMBLIN, T.J.; ORCHAD, J.A.; IBBOTSON, R.E.; DAVIS, Z.; THOMAS, P.W.; STEVENSON, F.K., OSCIER, D.G. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. **Blood**, v.99, n.3, p.1023-9, 2002.

HSI, E.D.; KOPECKY, K.J.; APPELBAUM, F.R.; BOLDT, D.; FREY, T.; LOFTUS, M.; HUSSEIN, M.A. Prognostic significance of CD38 and CD20 expression as assessed by quantitative flow cytometry in chronic lymphocytic leukaemia. **Br. J. Haematol.**, v.120, p. 1017-25, 2003.

IBRAHIM, S.; KEATING, M.; DO, K.A.; O'BRIEN, S.; HUH, Y.O.; JILANI, I.; LERNER, S.; KANTARJIAN, H.M.; ALBITAR, M. CD38 expression as an

important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v.98, n.1, p.181-86, 2001.

JAFFE, E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J.W., ed. Pathology and genetics tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, IARC Press, 2001. 351p.

JELINEK, D.F.; TSCHUMPER, R.C.; GEYER, S.M.; BONE, N.D.; DEWALD, G.W.; HANSON, C.A; STENSON, M.J.; WITZIG, T.E.; TEFFERI, A.; KAY, N.E. Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia. **Br. J. Haematol.**, v.115, n.4, p.854-61, 2001.

JULIUSSON, G.; OSCIER, D.G.; FITCHETT, M.; ROSS, F.M.; STOCKDILL, G.; MACKIE, M.J.; PARKER, A.C.; CASTOLDI, G.L.; GUNEO, A.; KNUUTILA, S. Prognostic subgroups in B-Cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. **N Engl J Med**, v.323, n.11, p.720-4, 1990.

KALIL, N.; CHESON, B.D.; Management of chronic lymphocytic leukaemia. **Drugs Aging**, v.16, n.1, p.9-27, 2000.

KAY, N.E.; HAMBLIN, T.J.; JELINEK, D.F.; DEWALD, G.W.; BYRD, J.C.; FARAG, S.; LUCAS, M.; LIN, T. Chronic lymphocytic leukemia. In: American Society of Hematology. Education program book. Philadelphia, ASH, 2002, p.193-213.

KEATING, M.; LERNER, S.; KANTARJIAN, H.; FREIREICH, E.J.; O'BRIEN, S. The serum β 2-microglobulin (β 2M) level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia [ab-stract]. **Blood**, v.86, p.606a., 1995

KELSOE, G. Life and death in germinal centers (redux). **Immunity**, v.4, p.107-11, 1996.

KIPPS, T.J. Chronic lymphocytic leukemia. **Curr Opin Hematol**, v.7, n.4, p.223-34, 2000.

KRÖBER, A.; SEILER, T.; BENNER, A.; BULLINGER, L.; BRÜCKLE, E.; LICHTER, P.; DÖHNER, H.; STILGENBAUER, S. V_H mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v.100, n.4, p.1410-16, 2002.

LAVABRE-BERTRAND, T.; DUPERRAY, C.; BRUNET, C. PONCELET, P.; EXBRAYAT, C.; BOURQUARD, P.; LAVABRE-BERTRAND, C.; BROCHIER, J.; NAVARRO, M. JANOSSY, G. Quantification of CD24 and CD45 antigens in parallel allows a precise determination of B-cell maturation stage: relevance for the study of B-cell neoplasias. **Leukemia**, v.8, n.3, p.402-408, 1994.

LEGAC, E.; CHASTANG, C.; BINET, J.L., MICHEL, A.; DEBRE, P.; MERLEBERAL H. Proposal for a phenotypic classification of B-chronic lymphocytic leukemia: relationship with prognostic factors. **Leuk Lymph**, v.5(suppl 1), p.53-58, 1991.

LINET, M.S.; CARTWRIGHT, R.A. Chronic lymphocytic leukemia: epidemiology and etiologic findings. **Nouv Rev Fr. Hematol**, v.30, n.5-6, p.353-7, 1988.

MAINOU-FOWLER T, DIGNUM HM, PROCTOR SJ, SUMMERFIELD GP. The prognostic value of CD38 expression and its quantification in B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). **Leuk Lymphoma**, v.45, n.3, p.455-62, 2004.

MARTI, G. E.; RAWSTRON, A. C.; GHIA, P.; HILLMEN, P.; HOULSTON, R. S.; KAY, N.; SCHLEINITZ, T. A., CAPORASO, N. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. **Br. J. Haematol.**, v.130, p.325-332, 2005.

MATRAI, Z.; LIN, K.; DENNIS, M.; SHERRINGTON, P.; ZUZEL, M.; PETTITT, A. R.; CAWLEY, J. C. CD38 expression and Ig V_H gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v.97, n.6, p.1902-03, 2001.

MATUTES, E.; OWUSU-ANKOMAH, K.; MORILLA, R.; MARCO, J.G.; HOULIHAMA.; QUE, T.E.; CATOVSKY, D. The immunological profile off B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. **Leukemia**, v.8, n.10, p.1640-45, 1994.

MATUTES, E.; MORILLA, R.; OWUSU-ANKOMAH, K.; HOULIHAN, A.; CATOVSKY, D. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. **Blood**, v.83, p.1558-62, 1994b.

MATUTES, E.; POLLIACK, A.; Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. **Rev. Clin. Exp. Hematol.**, v.4, n.1, p.22-47, 2000.

MOLICA, S.; ALBERT, A. Prognostic value of lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. **Cancer**, v.60, p.2712-16, 1987

MOLICA, S. Progression and survival studies in early chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v.78, n.4, p.895-899, 1991.

MOLICA, S.; DE ROSSI, G.; LUCIANI, M.; LEVATO, D. Prognostic features and therapeutical approaches in B-cell chronic lymphocytic leukemia: na update. **Haematologica**, v.80, n. 2, p.176-93, 1995.

MONTSERRAT, E.; SANCHEZ-BISONO, J.; VIÑOLAS, N.; ROZMAN, C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. **Br. J. Haematol**, v.62, p.567-76, 1986.

MORABITO, F.; MANGIOLA, M.; OLIVA, B.; STELITANO, C.; CALLEA, V.; DEAGLIO, S.; IACOPINO, P.; BRUGIATELLI, M.; MALAVASI, F. Peripheral blood CD38 expression predicts survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Leuk. Res.**, v.25, n.11, p. 927-32, 2001.

NAYLOR, M.; CAPRA, J.D. Mutational status of ig V_H genes provides clinically valuable information in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v.94, n.6, p.1837-9, 1999.

ORCHARD, J.A.; IBBOTSON, R.E.; DAVIS, Z.; WIESTNER, A.; ROSENWALD, A.; THOMAS, P.W.; HAMBLIN, T.J.; STAUDT, L.M.; OSCIER, D.G. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. **The Lancet**, v.363, p.105-11, 2004.

PANGALIS, G. A.; ANGELOPOULOU, M. K.; VASSILAKOPOULOS, T. P.; SIAKANTARIS, M. P.; KITTAS, C. B-chronic lymphocytic leukemia, small lymphocytic lymphoma, and lymphoplasmacytic lymphoma, including waldenström's macroglobulinemia: A clinical morphologic, and biologic spectrum of similar disorders. **Semin in Hematol**, v. 36, n.2, p.104-14, 1999.

PRITSCH, O.; MAGNAC, C.; DUMAS, G.; EGILE, C.; DIGHIRO, G. V gene usage by seven hybrids derived from CD5+ B-cell chronic lymphocytic leukemia and displaying autoantibody activity. **Blood**, v.82,p.3103-12, 1993.

RAI, K.R.A.; SAWISTKY, A.; CRONKITE, E.P.; CHANANA, A. D., LERY, R.N. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v.46, n.2, p.219-34, 1975.

RAI, K.R.A critical analysis of staging of CLL. In: GALE, R. P.; RAI, K. R.; (eds): **Chronic Lymphocytic Leukemia: Recent Progress and Future Directions**. New York : Alan R. Liss, p.253-64, 1987.

RAI, K.R.; WASIL, T.; IQBAL. U.; DRISCOLL, N.; PATEL, D.; JANSON, D.; MEHROTRA, B. Clinical staging and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. **Hematol Oncol Clin N. Am**, v.18, p.795-805, 2004.

RAJEWSKY,K.; GU,H.; KUHN, R.; BETZ, U.A.; MULLER,W.; ROES, J.; SCHWENK. F. Clonal selection and learning in the antibody system. **Nature** v.381, p.751-58, 1996.

RASSENTI, L.Z.; HUYNH, L.; TOY, T.L.; CHEN, L.; KEATING, M.J.; GRIBBEN, J.G.; NEUBERG, D.S.; FLINN, I.W.; RAI, K.R.; BYRD, J.C.; KAY,

N.E.; GREAVES, A.; WEISS, A.; KIPPS, T.J. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**, v.351, n.9, p.893-901, 2004.

ROWAN, R. M.; BAIN, B.J.; ENGLAND, J. M.; HYDE, K.; MATUTES, E.; STEPHENS, A. D.; LEWIS, S. M.; SHINTON, N. K.; MURPHY, M. F.; WOOD, J. K. General haematology task forces of BCSH. Immunophenotyping in the diagnosis of chronic lymphoproliferative disorders. **J. Clin. Pathol.**, v.47, p.871-5, 1994.

ROZMAN, C.; MONTSERRAT, E.; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J.M.; AYATS R.; VALLESPÍ, T.; PARODY, R.; RÍOS, A.; PRADOS. D.; MOREY. M.; GOMIS, F.; ALCALÁ, A.; GUTIÉRREZ, M.; MALDONATO, J.; GONZÁLEZ, C.; GIRALT, M.; HERNÁNDEZ-NIETO, L.; CABRERA, A. FERNÁNDEZ-RANÁDA, J.M. Bone marrow histological pattern - The best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. **Blood**, v.64, n.3, p.642-49, 1984.

ROZMAN, C.; MONTSERRAT, E. Chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**, v.333, n.16, p.1052-57, 1995.

SARFATI, M.; CHEVRET, S.; CHASTANG, C.; BIRON, G.; STRYCKMANS, P.; DELESPESE, G.; BINET, J-L.; MERLE-BERAL, H.; BRON, D. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v.88, n.11, p.4259-64, 1996.

SCHROEDER, H. W. JR.; DIGHIRO, G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: Analysis of the antibody repertoire. **Immunol Today**, v.15, p.288, 1994.

SCHWARTZ, A.; MARTI, G. E.; POON, R.; GRATAMA, J. W.; FERNANDEZ-REPOLLET, E. Standardized flow cytometry: a classification system of fluorescence standards used for flow cytometry. **Cytometry**, v.33, p.106-114, 1998.

STILGENBAUER, S.; BULLINGER, L.; LICHTER, P.; DÖHNER, H. Genetics in chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V_H gene mutation status in pathogenesis and clinical course. **Leukemia**, v. 16, p. 993-1007, 2002.

THUNBERG, U.; JOHNSON, A.; ROOS, G.; THORN, I.; TOBIN, G.; SALLSTROM, J.; SUNDSTROM, C.; ROSENQUIST, R. CD38 expression is a poor predictor for V_H gene mutational status and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v.97, n.6, p.1892-4, 2001.

WIESTNER A, ROSENWALD A, BARRY TS, WRIGHT G, DAVIS RE, HENRICKSON SE, ZHAO H, IBBOTSON RE, ORCHARD JA, DAVIS Z, STETLER-STEVENSON M, RAFFELD M, ARTHUR DC, MARTI GE, WILSON WH, HAMBLIN TJ, OSCIER DG, STAUDT LM. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. **Blood**, v. 101, n. 12, p. 4944-51, 2003.

YUILLE, M.R.; MATUTES, E.; MAROSSY, A.; HILDITCH, B.; CATOVSKY, D.; HOULSTON, R.S. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published. **Br J Haematol**, v. 109, n.4, p. 794-9, 2000.