



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO
DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

JOSÉ PEDRO NASCIMENTO CARDA

***CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE
DOENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA:
IDENTIFICAÇÃO DE FACTORES DE PROGNÓSTICO***

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE HEMATOLOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
ORIENTADOR: PROF DR^a ANA BELA SARMENTO RIBEIRO
CO-ORIENTADOR: DR^a EMÍLIA CORTESÃO**

SETEMBRO/2011

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE DOENTES COM LEUCEMIA
LINFOCÍTICA CRÓNICA: IDENTIFICAÇÃO DE FACTORES DE PROGNÓSTICO**

Índice	pág.
Resumo _____	iv
Palavras – Chave _____	vi
Abstract _____	vii
Key Words _____	viii
Lista de siglas e abreviaturas _____	ix
I. INTRODUÇÃO _____	1
Objectivos e Repercussões _____	6
II. MATERIAIS E MÉTODOS _____	7
Tipo de estudo _____	8
População-alvo _____	8
Dados recolhidos _____	9
Critérios de exclusão _____	9
Análise estatística _____	9
III. RESULTADOS _____	10
Apresentação de dados e caracterização da amostra _____	11
Correlação de dados clínicos com sobrevivência _____	14
Correlação dos dados clínicos com progressão _____	21
IV. DISCUSSÃO _____	23
V. CONCLUSÃO _____	29
VI. REFERÊNCIAS / BIBLIOGRAFIA _____	31
VII. AGRADECIMENTOS _____	38
VIII. ANEXOS _____	40
Anexo I – Critérios de diagnóstico para LLC – OMS 2008 _____	41
Anexo II – Critérios para tratamento IWG-CLL _____	41

RESUMO/ABSTRACT

RESUMO

Introdução: A Leucemia Linfocítica Crónica é uma das patologias linfoproliferativas mais frequentes no mundo ocidental. É caracterizada por linfocitose monoclonal persistente e adenopatias localizadas ou generalizadas. Apesar da apresentação clínica inicial, a evolução é heterogénea, o que se traduz por uma sobrevivência variável entre 2 a 12 anos. Para além dos factores de prognóstico clínicos, surgem novos marcadores citogenéticos com impacto na sobrevivência livre de doença e sobrevivência global dos doentes com Leucemia Linfocítica Crónica.

Objectivo: Analisar as características clínicas e biológicas ao diagnóstico de doentes com Leucemia Linfocítica Crónica diagnosticados nos Hospitais da Universidade de Coimbra num período de 10 anos (1999-2009), e comparar com a evolução e a sobrevivência global dos doentes.

Metodologia: Foi efectuado um estudo retrospectivo que identificou 159 doentes (90 homens e 69 mulheres) com Leucemia Linfocítica Crónica segundo os critérios de 2008 da Organização Mundial de Saúde, recorrendo a diferentes marcadores biológicos por citometria de fluxo e por FISH (*fluorescence in situ hybridization*). A análise estatística dos dados foi feita recorrendo à versão do SPSS 19.0.

Resultados: Nos 159 doentes estudados, observou-se um predomínio do sexo masculino (M) relativamente ao feminino (F), sendo a relação M/F de 1.3:1 e a idade mediana ao diagnóstico de 73 anos (43-96). A forma de apresentação ao diagnóstico incluiu: linfocitose, com mediana de 15,5 G/L (5,4-173), adenopatias em 78 doentes

(49%) e esplenomegália e/ou hepatomegália em 27 doentes (15%). Pelo sistema de estadiamento Rai, 63% dos doentes (n=100) pertenciam ao grupo de baixo risco, 27% (n=43) ao grupo de risco intermédio e 10% (n=16) ao grupo de alto risco. A expressão de ZAP-70 e CD38 por citometria de fluxo foi efectuada em 110 doentes e mostrou que 15 doentes (17%) tinham positividade para estes dois marcadores (CD38+; ZAP70+). O estudo das alterações cromossómicas por *fluorescence in situ hybridization* revelou que cinquenta e um doentes (32%) não tinham anomalias cromossómicas, cinquenta e um (32%) tinham deleção do 13q, vinte e dois (14%) trissomia 12, dezoito (11%) deleção do 11q e em dezoito doentes (11%) foi identificada a deleção do 17p. Sessenta (36%) doentes apresentaram doença progressiva num período mediano de dezoito meses (0-120). Pelo sistema de estadiamento de Rai modificado a sobrevivência global aos 5 anos foi de 93% para os doentes de baixo risco, 85% para os de risco intermédio e de 15% para os de alto risco. A sobrevivência global aos 5 anos para os doentes com a 13qdel, trissomia do 12, del11q e del17p foi de 90%, 88%, 58% e 49% respectivamente

Conclusão: A Leucemia Linfocítica Crónica é actualmente considerada uma patologia de curso indolente, com um prognóstico favorável, mas com evolução progressiva variável. Este estudo retrospectivo permitiu caracterizar os doentes com Leucemia Linfocítica Crónica seguidos nos HUC nos últimos 10 anos e confirmar a importância da aplicação dos factores de prognóstico com impacto na sobrevivência dos doentes e na definição de grupos de risco.

Palavras Chave: Linfocitose, Leucemia Linfocítica Crónica, Adenopatias, Esplenomegália, Estadiamento de Rai, Binet, FISH, Citogenética

ABSTRACT

Background: Chronic Lymphocytic Leukemia is one of the most frequent chronic lymphoproliferative disorders in Europe. It is characterized by persistent monoclonal lymphocytosis with localized or generalized lymphadenopathy. Despite the initial clinical presentation, it has a heterogeneous natural history, with a survival between 2 and 12 years. Beside clinical prognostic factors, novel cytogenetic markers are recognized to be useful in predicting disease free and overall survival in Chronic Lymphocytic Leukemia.

Aims: To analyse the clinical and biological characteristics at presentation of patients with Chronic Lymphocytic Leukemia diagnosed in the Coimbra University Hospitals in a period of time of 10 years (1999-2009) and compare the evolution and overall survival of the patients.

Methods: In a retrospective study were identified 159 patients (90 males and 69 females) of Chronic Lymphocytic Leukemia according the 2008 World Health Organization criteria, using different biological markers by flow cytometry and FISH (*fluorescence in situ hybridization*). The statistical analysis was made using the 19.0 version of the SPSS.

Results: Amongst 159 patients, there was a predominance of the male sex with a male to female (M/F) ratio of 1.3:1 and a median age of 73 (43-96) years. The presentation at diagnosis included: lymphocytosis, with a median count of 15.5 G/L (5.4-173), adenopathies in 78 patients (49%) splenomegaly and/or hepatomegaly in

twenty seven (15%). By the revised Rai staging system 63% (n=100) patients were included in low risk group, 27% (n=43) in intermediate risk group and 10 % (n=16) in high risk group. The expression of ZAP-70 and CD38 by flow cytometry was performed in 110 patients and revealed fifteen (17%) patients CD38+ and ZAP70+. The study of chromosomal aberrations with *fluorescence in situ hybridization* showed fifty one patients (32%) with no abnormality, fifty one (32%) with 13q deletion, twenty two (14%) with 12 trisomy, eighteen (11%) with 11q deletion and eighteen (11%) with 17p deletion. Sixty (36%) patients showed progressive disease in a median time of eighteen months (0-120). By the revised Rai staging system the overall survival at 5 years was 93% for low risk, 85% for intermediate risk and 15% for high risk patients. The OS at 5 years for the del13q, 12 trisomy, del11q and del17p was 90%, 88%, 58% and 49%, respectively.

Summary: Chronic Lymphocytic Leukemia is currently considered a chronic disorder with a favourable outcome, but with a variable evolution to progressive disease. This retrospective study allowed the characterization of patients with Chronic Lymphocytic Leukemia in HUC in the last 10 years and verifies the applicability of the prognostic factors with impact in survival of patients in the definition of risk groups.

Keywords: Lymphocytosis, Chronic Lymphocytic Leukemia, Adenopathies, Splenomegaly, Rai staging system, Binet staging system, FISH, Cytogenetics

Lista de siglas e abreviaturas

Del – deleção

FISH - *fluorescence in situ hybridization*

Hb – Hemoglobina

IWG-CLL – *International Working Group for CLL*

LDH – Desidrogenase do lactato

LLC – Leucemia Linfocítica Crónica

MO – Medula Óssea

OMS – Organização Mundial de Saúde

SP – Sangue Periférico

Tris - trissomia

ZAP-70 – *Zeta associated protein* com 70 kda

INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) é uma patologia caracterizada pela acumulação de pequenos linfócitos B monoclonais no sangue, medula óssea e tecido linfóide. Essas células expressam normalmente marcadores de superfície como o CD5, o CD19 e o CD23, provando a sua origem na linhagem B, e têm baixa expressão para a Imunoglobulina de Superfície e o CD20^{1,2}.

A LLC tem uma incidência média de 2,7 doentes por 100.000 habitantes/ano em estudos publicados nos Estados Unidos, valor este que aumenta progressivamente com a idade^{3,4}. Tratando-se de uma doença indolente, estima-se que contribua para 1% de todas as neoplasias e 30% das leucemias, sendo a leucemia mais comum nos adultos no mundo ocidental.

Desconhece-se a etiologia desta doença, embora factores de risco genéticos possam contribuir para o seu desenvolvimento. O estudo de familiares em 1º grau de doentes com LLC revelou que 15% de indivíduos saudáveis têm linfócitos B monoclonais, com características muito semelhantes aos da LLC⁵, porém, na população geral a percentagem é menor. Apesar da maioria dos casos de LLC ser esporádico, têm sido publicados múltiplos casos de famílias afectadas^{6,7,8}, verificando-se que os descendentes em 1º grau têm um risco de desenvolver a doença três vezes superior ao da população em geral⁹, sugerindo que factores genéticos ainda não identificados podem estar implicados na leucemogénese desta doença.

A apresentação inicial é variável, assim como o prognóstico. A sobrevivência mediana destes doentes é de 10 anos e nalguns a esperança média de vida mantém-se inalterada. Porém noutros doentes a doença é rapidamente progressiva, com indicação precoce para iniciar tratamento e com diminuição da sobrevivência global.

Os sistemas de estadiamento de Rai e Binet são, ainda hoje, os métodos de

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE DOENTES COM LEUCEMIA
LINFOCÍTICA CRÔNICA: IDENTIFICAÇÃO DE FACTORES DE PROGNÓSTICO**

previsão da sobrevivência mais eficazes. O sistema de estadiamento de Rai¹⁰, publicado em 1975, subdivide os doentes em grupos prognósticos de acordo com a presença de adenomegalias, hepatoesplenomegália, anemia ou trombocitopenia (Tabela I). Os doentes com estádios 0 ou I têm prognóstico favorável, enquanto aqueles com estádios III/IV têm uma sobrevivência global bastante inferior. Apesar de ter validade confirmada¹¹, o sistema de estadiamento de Rai recebeu críticas pelo número excessivo de estádios, pelo que em 1981 Binet¹² propôs um sistema de estadiamento em três estádios de acordo com a massa linfóide total (tabela II). Os doentes no estágio mais avançado C, apresentam anemia e/ou trombocitopenia resultante do envolvimento medular.

Em 1987, Rai reformula o estadiamento previamente publicado em três categorias¹³: baixo risco (estádio 0), risco intermédio (estádio I e II) e alto risco (estádio III e IV).

Tabela I – Sistema de Estadiamento Rai (1975)

Estádio	Características	Sobrevivência global (meses)
0	Linfocitose SP e MO	>150
I	Linfocitose e adenomegalias	101
II	Linfocitose e Hepato ou Esplenomegália	71
III	Linfocitose e Hemoglobina < 11 gr/dL	19
IV	Linfocitose e Plaquetas < 100.000/mm ³	19

Legenda: SP: Sangue Periférico; MO: Medula Óssea (Adaptado de Rai 1975¹⁰)

Tabela II – Sistema de Estadiamento Binet (1981)

Estádio	Características	Sobrevivência global (anos)
A	Hb \geq 10g/dL, plaquetas \geq 100.000/mm ³ , menos de 3 áreas envolvidas	>7
B	Hb \geq 10g/dL, plaquetas \geq 100.000/mm ³ , 3 ou mais áreas envolvidas	<5
C	Hb< 10g/dL ou plaquetas< 100.000/mm ³	<2

Legenda: Hb:Hemoglobina (Adaptado de Binet 1981¹²)

Outros factores de prognóstico têm sido estudados na tentativa de identificar os doentes com baixo risco ou risco intermédio que possam beneficiar de um seguimento mais regular, como por exemplo:

- 1) O tempo de duplicação linfocitário (TDL)^{14,15}: os doentes com duplicação do valor de linfócitos num período de tempo inferior a seis meses apresentam sobrevivência mediana inferior àqueles com linfocitoses estáveis.
- 2) O *status* mutacional do gene da cadeia pesada das imunoglobulinas^{16,17,18}: permite a separação em duas formas distintas de apresentação e evolução. Os doentes com gene não mutado apresentam-se com doença mais agressiva e avançada, sendo associada a pior prognóstico. Estes doentes apresentam maior frequência de atipias celulares, maior percentagem de pró-linfócitos e estão associados à presença de alterações citogenéticas desfavoráveis. Apesar do seu significado, o estudo do *status* mutacional não é possível na maioria dos centros.
- 3) A expressão de CD38^{19,20} e ZAP 70²¹: a marcação para estes marcadores foi

relacionada com o *status* mutacional do gene da cadeia pesada das imunoglobulinas. Assim, a expressão positiva está relacionada com ausência de mutação no gene e, conseqüentemente, com pior prognóstico. Porém, o nível de expressão de CD38 e ZAP70, a partir do qual se deve considerar como positivo não está standartizado, pelo que a aplicabilidade clínica não está estabelecida fora de ensaios clínicos.

- 4) As alterações citogenéticas: Cerca de 90 % dos doentes apresentam alterações citogenéticas em estudos efectuados por *fluorescence in situ hybridization* (FISH). Os doentes com deleção isolada do 13q^{22,23,24} apresentam excelente prognóstico, sem evolução para formas agressivas. Os doentes com deleção (del) 11q ou del 17p²⁵ apresentam uma progressão rápida e são resistentes às terapêuticas convencionais.
- 5) Os marcadores serológicos: Os níveis serológicos de β 2-microglobulina²⁶, CD23 solúvel^{27,28}, CD27 solúvel²⁹ ou Timidina Cinase³⁰ estão relacionados com o prognóstico. A Desidrogenase do lactato (LDH) está aumentada na doença agressiva ou em transformação (Síndrome de Richter)³¹.

Apesar da introdução de novos marcadores com significado prognóstico, o sistema de classificação e estratificação de Rai e Binet, mantém utilidade clínica e valor prognóstico independente, sendo imprescindíveis na decisão terapêutica. Com excepção do tempo de duplicação linfocitária, nenhum dos novos marcadores foi incorporado nas recomendações para decisão sobre início de terapêutica.

Objectivos:

- Caracterizar a população de doentes com LLC num serviço de Hematologia.
- Identificar factores clínicos, analíticos, imunofenotípicos e citogenéticos que se correlacionam com as diferentes formas de apresentação, evolução e prognóstico destes doentes.
- Avaliar o impacto desses factores na decisão de instituição de tratamento e na sobrevivência global dos doentes com LLC.

Repercussões:

- Espera-se comparar a epidemiologia da amostra colhida com a dos estudos publicados.
- Espera-se que o estadiamento de Rai e Binet estratifique o risco de progressão de doença e morte.
- Espera-se que sejam determinados como factores prognósticos adicionais a contagem total de linfócitos, a LDH e a β 2- microglobulina.
- Espera-se que o estudo citogenético por FISH permita a detecção de alterações cromossómicas na maioria dos doentes.
- Espera-se que o estudo citogenético por FISH permita estratificar os doentes por grupos de risco: del 13q, baixo risco; trissomia (tris) 12, risco intermédio e del 11q e 17p, alto risco, para progressão da doença e diminuição da sobrevivência global dos doentes

II - Materiais e Métodos

Tipo de estudo

Tratou-se de um estudo retrospectivo que englobou o levantamento e consulta de 159 processos clínicos de doentes com o diagnóstico de Leucemia Linfocítica Crónica, dos Arquivos dos Hospitais da Universidade de Coimbra, após consulta da base de dados do Serviço de Hematologia.

Características da Amostra

Foram incluídos no estudo 159 doentes com o diagnóstico de Leucemia Linfocítica Crónica, entre 1 de Janeiro de 1999 e 31 de Dezembro de 2009, que cumpriam os critérios de inclusão do National Cancer Institute Working Group revistos pelo *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia* e adoptados pela Organização Mundial de Saúde em 2008, nomeadamente Linfocitose $> 5 \times 10^9/L$, persistente por mais de 3 meses com critérios de monoclonalidade comprovada por citometria de fluxo (Anexo I).

Dados recolhidos

Foram recolhidos os dados clínicos e laboratoriais presentes no processo clínico, em particular os parâmetros hematológicos ao diagnóstico, estadiamento de Rai e Binet, a caracterização citogenética (FISH) e imunofenotípica (citometria de fluxo).

Critérios de exclusão

Foi factor de exclusão o não cumprimento dos critérios de diagnóstico da Organização Mundial de Saúde (OMS) 2008 referidos na população alvo ou a inexistência de todos os dados clínicos ou laboratoriais em estudo.

Análise estatística

A análise dos dados foi efectuada utilizando o Microsoft Excel 2007 e o SPSS versão 19.0.

III- RESULTADOS

1) Apresentação de dados e caracterização da amostra

Foi efectuado levantamento de dados de 159 doentes, os quais apresentavam ao diagnóstico idade mediana de 73 anos (idade mínima 43 anos – idade máxima 96), em média uma relação sexo masculino/sexo feminino de 1.3:1 e linfocitose mediana de 15,5 G/L (5,4-173).

Na Figura 1 está representada a distribuição dos doentes por grupos etários e por sexo, verificando-se que a maior parte dos doentes têm idades compreendidas entre 70 e 80 anos. Além disso, em todos os grupos etários existe maior predomínio de doentes do sexo masculino.

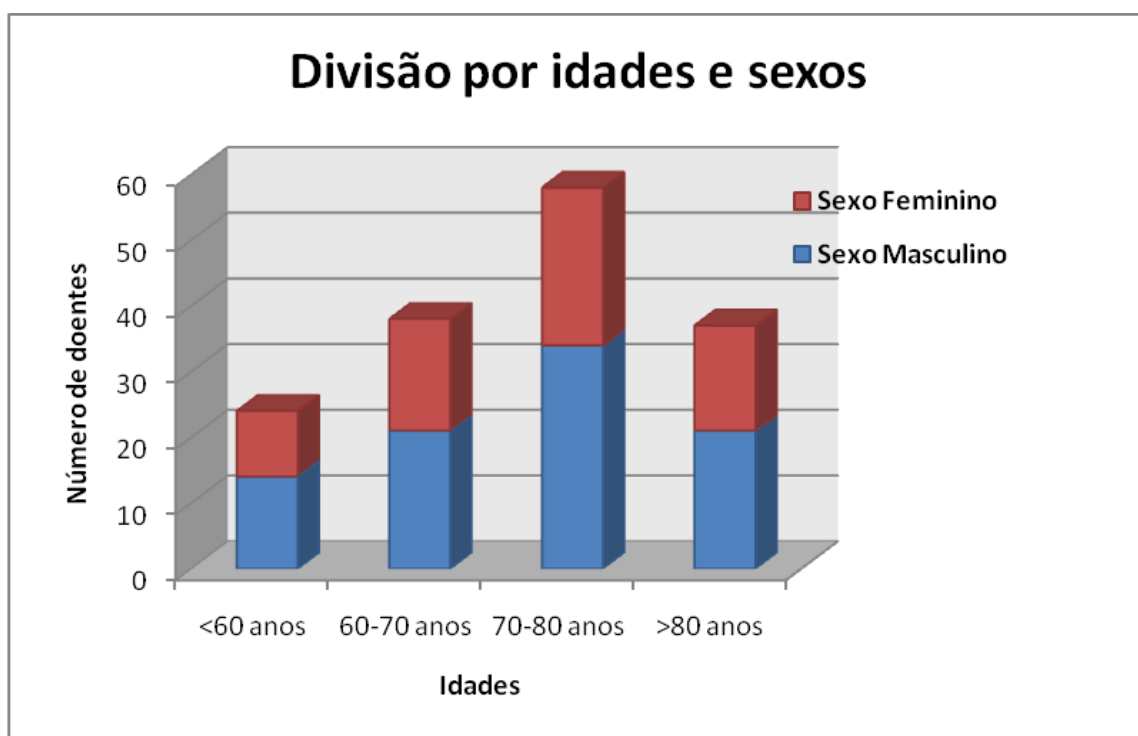


Figura 1 – Distribuição dos doentes com LLC por idades e sexos. Foram analisados 159 doentes com LLC, no período de 1 de Janeiro de 1999 e 31 de Dezembro de 2009. Os resultados apresentados correspondem ao número de doentes em cada faixa etária distribuídos de acordo com o sexo.

Na tabela III estão representadas as características clínicas ao diagnóstico dos doentes com LLC, nomeadamente no que diz respeito à invasão ganglionar (número de áreas afectadas) e à presença de hepato e esplenomegália. Como podemos observar

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE DOENTES COM LEUCEMIA
LINFOCÍTICA CRÓNICA: IDENTIFICAÇÃO DE FACTORES DE PROGNÓSTICO**

49% dos doentes (n=78) tinham adenopatias e 15% (n=27) esplenomegália e/ou hepatomegália.

Tabela III - Áreas ganglionares e órgãos afectados ao diagnóstico nos doentes com LLC

Áreas ganglionares e órgãos afectados	Percentagem	Número absoluto
< 3 áreas ganglionares	35 %	55
≥ 3 áreas ganglionares	14%	23
Esplenomegalias +/- Hepatomegália	15%	27

Pelo sistema de estadiamento modificado de Rai, cem (63%) dos doentes pertenciam ao grupo de baixo risco, quarenta e três (27%) ao grupo de risco intermédio e dezasseis (10%) ao grupo de alto risco.

A expressão de ZAP-70 e CD38 por citometria de fluxo foi analisada em 110 (69%) doentes. Como se pode verificar na tabela IV, na maior parte dos doentes (n=87; 80 %) não se observou expressão de nenhum dos marcadores. Destes, apenas 8 doentes (9%) pertenciam ao grupo de alto risco segundo a classificação modificada de Rai e 7 (8%) doentes tinham a deleção 17 p. Em 23 doentes identificou-se expressão de CD38 e/ou ZAP70 (CD38 + e/ou ZAP 70 +), 15 dos quais duplamente positivos (CD38+ e ZAP70+). Neste grupo de 15 doentes, foi identificada em 6 doentes (40%) a

delecção do braço curto do cromossoma 17 (del 17p), 4 doentes pertenciam ao grupo de baixo risco de Rai, 6 ao risco intermédio e 5 (33%) ao grupo de alto risco.

Tabela IV- Correlação da expressão de ZAP 70 e CD 38 com a del 17p e o estadiamento de alto risco de RAI nos doentes com LLC

	doentes (n°)	alto risco Rai (%)	Del 17p (%)
ZAP 70 - e CD 38 -	87	9%	8%
ZAP 70 + ou CD 38 +	8	12,5%	25%
ZAP 70 + e CD 38 +	15	33%	40%

A expressão de ZAP 70 e CD 38 foi efectuada por citometria de fluxo: + positivo; - negativo; delecção do braço curto do cromossoma 17 (del 17p)

Todos os 159 doentes incluídos no estudo fizeram estudo citogenético por FISH, o qual evidenciou que apenas 51 doentes (32%) não tinham anomalias cromossómicas. De facto, na maior parte dos doentes (n=108; 68%) foram identificadas alterações citogenéticas. Em 78 (49%) doentes foi encontrada apenas uma alteração, 27 (17%) doentes tinham duas alterações citogenéticas e 3 (1,8%) doentes tinham mais de duas alterações.

A delecção do 13q foi a alteração mais frequente, tendo sido identificada em 51 (32%) doentes. Por outro lado, 22 doentes (14%) tinham trissomia 12, 18 doentes (11%) apresentavam a delecção 11q e 18 doentes (11%) a delecção 17p.

De salientar que dos 51 doentes com a del 13q, 62% tinham apenas esta alteração citogenética. Nos restantes 38% esta coexistia com a trissomia 12 em 10 doentes, com a del 11q em 5 doentes, e com a del 17p em 4 doentes (Tabela V).

Dos 18 doentes com a del 17p, apenas 38% tinham esta alteração citogenética isolada. Nos restantes 62% esta coexistia com a del 13q em 3 doentes, com a trissomia 12 em 3 doentes e com a del 11q em 5 doentes (Tabela V).

Tabela V - Incidência de alterações citogenéticas nos doentes com LLC

Alteração Cromossômica	Número absoluto e percentagem (%)
Del13q isolado	31/51 (62%)
Del13q + outras alterações	20/51 (38%)
Tris 12 isolada	12/22 (55%)
Tris 12 + outras alterações	10/22 (45%)
Del11q isolado	8/18 (44%)
Del11q + outras alterações	10/18 (56%)
Del17 p isolado	7/18 (38%)
Del17p + outras alterações	11/18 (62%)

Legenda: Del: deleção; Tris: trissomia

2) Correlação das características clínicas e laboratoriais com sobrevivência

A avaliação da sobrevivência global, após um período de seguimento mediano de 73 meses, foi de 81%, tendo falecido 30 (19%) doentes. Contudo, analisando as curvas de sobrevivência dos doentes, tendo em atenção o sistema de estadiamento modificado Rai, a sobrevivência aos 5 anos foi de 93% para os doentes de baixo risco, 85% para os de risco intermédio e 15% para os de alto risco, sendo estas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) (Figura 2)

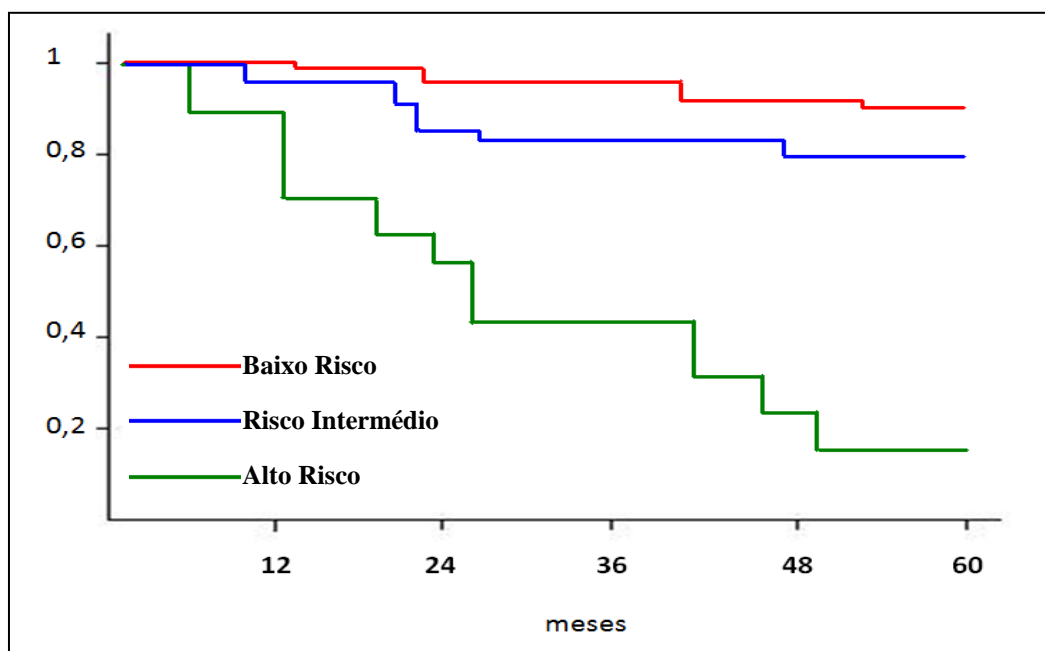


Figura 2 – Curvas de sobrevivência dos doentes com LLC consoante os grupos de risco. Os doentes foram estratificados por grupos de risco pela classificação modificada de Rai em baixo, intermédio e alto risco ($p < 0,01$).

Posteriormente analisámos a influência da expressão de CD38 e ZAP70 e das alterações citogenéticas na sobrevivência dos doentes, como representado nas figuras 3 e 4.

Como podemos observar na figura 3, os doentes que apresentavam expressão aumentada de CD38 e ZAP 70 (CD38 e ZAP70 positivos) têm sobrevivência inferior aos que não expressam estes marcadores (CD38 e ZAP70 negativos). De facto nos primeiros a sobrevivência aos 5 anos foi de 56%, enquanto nos segundos foi de 84 % (Figura 3).

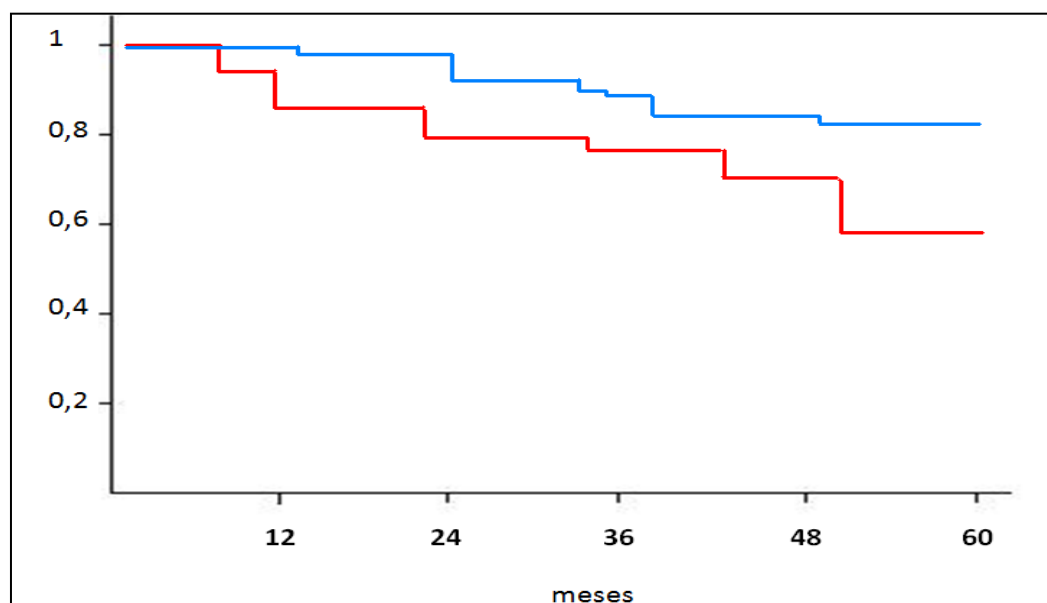


Figura 3 – Curvas de sobrevivência dos doentes com LLC consoante a marcação imunofenotípica para CD38 e ZAP70. Os doentes foram divididos em 2 grupos segundo a positividade (linha vermelha) ou negatividade (linha azul) de expressão para CD38 e ZAP70 ($p < 0,01$).

A sobrevivência global aos 5 anos foi diferente para os diferentes grupos de doentes tendo em conta a identificação de alterações citogenéticas (figura 4). Assim, os resultados mostram que nos doentes que não apresentam alterações citogenéticas e/ou que têm a del 13q ou tris 12 a sobrevivência é maior (89%, 90% e 88%, respectivamente), relativamente aos doentes com a del 11q e 17p. De facto, ao fim de 5 anos, apenas 58% dos doentes com a del 11q e 17p estão vivos (Figura 4 e Tabela VI).

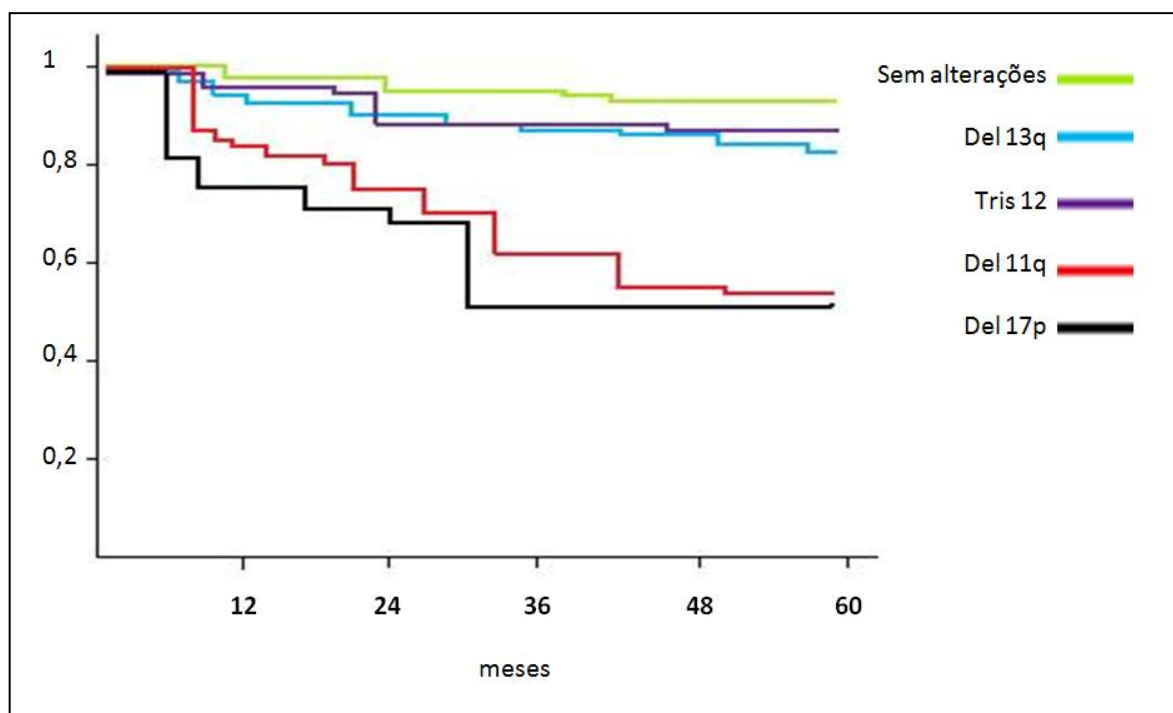


Figura 4 – Curvas de sobrevivência dos doentes com LLC consoante os grupos de risco citogenético. Os doentes foram divididos de acordo com a ausência ou presença de alterações citogenéticas (delecção (del) 13q, trissomia (tris) 12; del 11q e 17p ($p<0,01$)).

Como mencionado, na presença da delecção 17p a sobrevivência global aos 5 anos é de 49% se isolada (figura 4) e, de 51%, se acompanhada de outras alterações (Tabela VI), embora a diferença encontrada, não seja estatisticamente significativa. Estes resultados sugerem que a presença desta delecção anula o prognóstico conferido pelas outras alterações citogenéticas. Pelo contrário, verifica-se o inverso com a delecção do cromossoma 13, em que na delecção isolada obtivemos uma sobrevivência de 90%, mas se acompanhada de trissomia do cromossoma 12q ou delecção 11q a sobrevivência reduz para 81%, e para 60 % se acompanhada da delecção 17p.

Tabela VI – Relação entre as alterações cromossómicas e a sobrevivência global aos 5 anos dos doentes com LLC

Alteração Cromossómica	Sobrevivência global (5 anos)
Sem alterações	89%
Del 13q isolado	90%
Del 13q + tris 12 ou del 11q	81%
Del 13q + del 17q	60%
Tris 12 isolada	88%
Tris 12 + del 11q	69%
Tris 12 + del 17q	58%
11q isolado	58%
11q + outras alterações	56%
17 p isolado	49%
17p + outras alterações	51%

Legenda: Del: deleção; Tris: trissomia

A tabela VII mostra a relação entre os dados clínicos dos doentes e os diferentes grupos de alterações citogenéticas. Como podemos verificar, os doentes sem alterações citogenéticas, com a del 13q ou trissomia do cromossoma 12 de forma isolada têm habitualmente doença em estádios mais precoces e menos agressiva. Os doentes com a deleção 11q ou 17p apresentam-se com formas mais agressivas e sintomáticas da doença. Mais frequentemente apresentam linfocitose elevada, esplenomegália, adenopatias periféricas e sintomas B, como febre, sudorese nocturna e

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE DOENTES COM LEUCEMIA
LINFOCÍTICA CRÓNICA: IDENTIFICAÇÃO DE FACTORES DE PROGNÓSTICO**

perda de peso. Além disso, neste grupo o valor mediano de hemoglobina ao diagnóstico é mais baixo (Tabela VII).

Tabela VII – Características da apresentação clínica dos doentes com LLC consoante as alterações citogenéticas.

	Normal	Del 13q	Tris 12q	Del 11q	Del 17p
Número de doentes	51	51	22	18	18
Idade mediana	70	68	68	71	73
Estadiamento de risco de Rai					
Baixo Risco	70%	61%	59%	43%	39%
Intermédio	21%	29%	31%	34%	31%
Alto Risco	9%	10%	10%	24%	30%
Esplenomegália	6%	7%	18%	50%	55%
Hb mediana (g/dL)	13,6	13,7	13,6	12,6	10,9
Linf. Mediana (G/L)	15,6	17,1	23	23,4	40,1
Sintomas B	9%	7%	20%	21%	29%

Legenda: Hb: hemoglobina; Del: deleção; Tris: Trissomia

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE DOENTES COM LEUCEMIA
LINFOCÍTICA CRÓNICA: IDENTIFICAÇÃO DE FACTORES DE PROGNÓSTICO**

A análise de risco relativo para morte (tabela VIII) permite identificar diferentes factores prognósticos como as alterações citogenéticas, o estadiamento modificado de Rai, a contagem linfocitária, o nível sérico de LDH e o nível sérico de β 2- microglobulina. Dos factores analisados, identificámos a deleção do cromossoma 17p como o factor que implica maior risco relativo, independentemente da presença de alterações cromossómicas adicionais, seguido do estágio de alto risco pela classificação modificada de Rai. Também a deleção do cromossoma 11q tem risco relativo alto, independentemente da idade do doente.

Tabela VIII – Avaliação do risco relativo para morte aos 5 anos nos doentes com LLC

Variável estudada	Risco relativo (IC)
Del 17 isolada	7,13 (4,91 - 13,87)
Del 17 + outras alterações	7,47 (5,02 - 14,32)
Del 11q	3,42 (1,86 - 5,72)
> 65 anos	3,22 (1,71 - 4,91)
< 65 anos	3,79 (1,91 - 5,03)
Rai (Intermédio vs Baixo risco)	1,71 (0,99 - 2,87)
Rai (Alto vs Risco Intermédio)	4,93 (2,17 - 8,64)
ZAP 70 + e CD 38 +	3,91 (1,82 - 5,87)
Linfocitose > 25 G/L	1,41 (0,87- 2,37)
Linfocitose > 50 G/L	2,10 (1,18 - 3,19)
B2-microglobulina > 1xVN	1,19 (0,79 - 2,02)
B2-microglobulina > 2xVN	2,84 (1,63 - 4,96)
LDH > 1 x VN	1,08 (0,61 - 2,03)
LDH > 1,5 x VN	1,34 (0,72 - 2,92)
LDH > 2 x VN	2,01 (1,03 - 3,87)

Legenda: LDH: desidrogenase do lactato; VN: Valor normal; IC: Intervalo de confiança

3) Correlação dos dados analisados com a progressão da doença

Na população de 159 doentes inserida no estudo, 38% apresentaram critérios de progressão, num período mediano de 18 meses, tendo sido instituído tratamento em todos esses doentes de acordo com o critério do clínico. Não foi possível correlacionar a classificação modificada de Rai com a progressão, já que alguns doentes em risco intermédio e todos os doentes de alto risco iniciaram tratamento ao diagnóstico, por decisão do clínico e de acordo com os critérios definidos do National Cancer Institute de 1996 e revistos pelo International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia em 2008³².

Como podemos observar na Tabela IX, o intervalo para progressão foi maior nos doentes sem alterações citogenéticas e nos doentes com a del 13 q isolada (superior a 70 meses em ambos). Nos doentes com a del 11 q e 17p, o intervalo para progressão foi de 21 meses e de 14 meses, respectivamente. Se subdividirmos estes grupos de doentes de acordo com a estratificação modificada de Rai (excluídos os doentes com critérios para tratamento ao diagnóstico), verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas em todas os doentes com alterações citogenéticas, excepto na deleção 17p. Nesta, o tempo para progressão é independente da estratificação de risco (tabela IX).

Tabela IX – Tempo estimado para progressão da doença nos doentes com avaliação das alterações citogenéticas e do risco Rai

Alteração citogenética	Risco Rai	Meses (mediana)	p value
Normal	Baixo Risco	> 70	< 0.01
	Risco intermédio	42	
Del 13q	Baixo Risco	>70	< 0.01
	Risco intermédio	39	
Tris 12q	Baixo Risco	64	< 0.01
	Risco intermédio	32	
Del 11q	Baixo Risco	23	0.02
	Risco intermédio	17	
Del 17q	Baixo Risco	16	0.43
	Risco intermédio	13	

Legenda: Del: deleção; Tris: Trissomia

Também os doentes com $\beta 2$ microglobulina e LDH elevadas parecem progredir mais rapidamente. O tempo mediano para progressão de doentes com elevação superior a 2 vezes o valor normal da $\beta 2$ microglobulina e LDH é de, respectivamente, 56 e 49 meses. No entanto, a diferença em relação aos doentes com valores normais não é estatisticamente significativa.

IV - DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Neste trabalho fizemos uma análise retrospectiva das características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais dos doentes com Leucemia Linfocítica Crónica diagnosticados nos Hospitais da Universidade de Coimbra num período de 10 anos (1999 a 2009), e comparámos com a estratificação do risco, evolução e sobrevivência global dos doentes.

Os estudos publicados por Redaelli (2004)³ e Diehl (1999)⁴ sobre epidemiologia da respectiva população norte americana e europeia, com o diagnóstico de LLC, mostram que este tipo de leucemia/linfoma é uma patologia de doentes idosos com uma mediana de idades de 70 anos. De facto, no nosso estudo, 60% da população estudada tem idade superior a 70 anos, verificando-se em todos os grupos etários predominância do sexo masculino, dado este em concordância com os estudos referidos.

O estadiamento de Rai modificado tem sido um dos sistemas mais utilizados para a estratificação do risco e avaliação do prognóstico dos doentes com LLC¹³. Neste estudo, verifica-se a importância deste sistema de estadiamento na avaliação do prognóstico. De facto, os 10 % de doentes estadiados como alto risco ao diagnóstico, são os que apresentam sobrevivência mais curta (15% aos 5 anos), quando comparados com os outros dois grupos de estratificação de risco de Rai (baixo e intermédio), sendo as diferenças estatisticamente significativas (Figura 2). No entanto, a diferença na sobrevivência aos 5 anos entre os estádios de baixo risco e risco intermédio (90% vs

80%) não é estatisticamente significativa. Por outro lado, o valor de hemoglobina e plaquetas que faz a estratificação dos doentes no grupo de alto risco (se Hb <11gr/dL ou plaquetas <100x10⁹/L) adquire alto valor prognóstico com a associação à sobrevivência reduzida desse grupo de risco Rai. Verifica-se também que 91% dos doentes com cariótipo normal ou com del 13 q apresenta-se em estádios de baixo risco ou intermédio, contrariamente aos doentes com del 11q ou 17p em que 30% pertencem ao grupo de alto risco, demonstrando que os doentes em grupos de maior risco clínico somam marcadores prognósticos adversos adicionais como a del 11q ou del17p.

Outros factores que influenciam o prognóstico e evolução de doentes com LLC é a expressão de CD38 e ZAP70. Apesar de todos os doentes terem a caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo, apenas em 110 doentes foi efectuado o estudo da expressão de ZAP 70 e CD 38.

Sabe-se que a LLC pode surgir em diferentes estágios de maturação da célula, de acordo com a presença de mutações de genes da região variável das cadeias pesadas das imunoglobulinas. A célula não mutada é uma célula B *naive*, mais imatura, que ainda não passou pelos centros germinativos ganglionares e com maior potencial de malignidade. Damle³³ e Hamblin³⁴ demonstraram que os doentes com células não mutadas têm rápida progressão e sobrevivência mais curta.

Na tentativa de suplantar as dificuldades técnicas desta análise, diversos investigadores tentaram relacionar a presença de marcadores imunofenotípicos com o estado mutacional, nomeadamente o CD 38 e ZAP 70^{35,36}. No nosso estudo, 15 doentes tinham expressão positiva para ambos. De facto, de acordo com o descrito na literatura por Damle³³ e Hamblin³⁴, estes doentes têm pior prognóstico, com sobrevivência aos 5 anos de 56%, diferença estatisticamente significativa se

comparado com o grupo sem expressão para nenhum dos marcadores. Além disso, a maior parte destes doentes estão estratificados em alto risco pela classificação modificada de Rai e apresentam a deleção 17p, uma alteração cromossómica associada a pior prognóstico³⁷.

Neste estudo, constatámos que a taxa de alterações cromossómicas recorrentes na população alvo com o diagnóstico de LLC foi de 68%, valor ligeiramente inferior ao descrito por Bentz e Manoir (1995)³⁷ e por Döhner (1999)³⁸. De acordo com o descrito nos estudos publicados por Juliusson (1998)³⁹ e Döhner (2000)⁴⁰, a alteração mais frequente nesta população de doentes foi a deleção do braço longo do cromossoma 13, 13q14, observada em 32% dos casos. A segunda alteração mais frequente foi a trissomia do braço longo do cromossoma 12, em 14 % dos doentes, que nos estudos citados é, também, a segunda alteração mais frequente, seguido da deleção do braço longo do cromossoma 11 (11%) e da deleção do braço curto do cromossoma 17 (11%).

Estudos recentes permitem associar as alterações citogenéticas referidas a defeitos genéticos específicos e sua correlação com o prognóstico associado. Assim, por exemplo, a deleção 13q14 que está associada a bom prognóstico (Döhner 2000)⁴⁰, envolve o gene *RB* o qual codifica uma proteína que desempenha um papel fundamental no controlo da proliferação celular, através da sua função na regulação do ciclo celular³⁹⁻⁴¹. Por outro lado, a deleção 17p13 está associada habitualmente a mutações do gene supressor tumoral, *p53*, e é relacionada com doença mais agressiva e resistente ao tratamento. Sendo assim, os doentes com esta alteração citogenética são os que apresentam pior prognóstico, seguidos dos doentes com deleção do cromossoma 11q, associado à codificação do gene da proteína ataxia –

telangiectasia^{42,43,44}. De facto, neste estudo, estas alterações estão entre os factores com maior influência na sobrevivência. Porém, ao contrário do descrito por Donher e Stilgenbauer (2010)⁴⁵, não se encontrou diferença estatisticamente significativa nos grupos de idades inferior ou superior a 65 anos com del 11q. Os doentes com deleção 17p têm sobrevivência inferior e maior risco relativo de morte, assim como maior taxa de progressão.

O significado prognóstico da trissomia 12q tem sido controverso. Embora, inicialmente apontada como alteração de mau prognóstico^{46,47} na nossa amostra os doentes com Trissomia 12q têm sobrevivência e apresentação clínica semelhante àqueles que têm deleção do cromossoma 13q como únicas alterações citogenéticas.

A apresentação clínica também é diferente de acordo com as alterações citogenéticas. Os doentes com cariótipo normal e deleção 13q têm valores de hemoglobina e plaquetas normais, linfocitose mais baixa e uma pequena percentagem tem esplenomegália (6 %) (Tabela VII). Apenas 7 a 9 % manifestam sintomas B e 60 a 70 % dos doentes encontram-se em estágio de baixo risco pelo estadiamento modificado de Rai. Pelo contrário, as deleções do braço longo do cromossoma 11 (11q) e particularmente do 17 (17p), estão associadas a formas mais agressivas de doença, sendo que 21 a 29% dos doentes apresentam sintomas B. Metade dos doentes tem esplenomegália e a maioria apresenta-se em estágio intermédio ou alto risco pela classificação modificada de Rai. Outro dado relevante a considerar é que os doentes com del 17p apresentam hemoglobina mediana de 10.9 gr/dL, classificando o doente em Alto Risco de Rai pela classificação de 1979¹⁰.

Na análise de risco relativo para morte, a deleção do cromossoma 17p, a deleção do cromossoma 11q, a marcação imunofenotípica para o ZAP 70 e CD 38 e o estadiamento revisto Rai fornecem informações prognósticas estatisticamente significativas, sendo a del 17p o mais forte factor preditivo de sobrevivência, como confirmado em múltiplos estudos desde Geisler em 1997⁴⁷.

Também a duplicação da LDH e da $\beta 2$ microglobulina, marcadores serológicos de determinação fácil e económica, apresentam significado prognóstico estatisticamente significativo, embora com menor peso que os factores já referidos. Tal como nas outras doenças linfoproliferativas crónicas, o aumento destes parâmetros bioquímicos reflecte uma doença mais agressiva e maior carga tumoral. Está normalmente associada a sobrevivência mais curta e progressão mais rápida da doença (Wierda WG, O'Brien 2009)⁴⁸.

Considerando o tempo mediano de progressão verifica-se também diferenças estatisticamente significativas de acordo com as diferentes alterações citogenéticas. Os doentes com deleção 17p e 11q têm evolução mais rápida da doença desde o diagnóstico e necessitam de tratamento mais precoce quando comparados com os doentes com cariótipo normal e com a del 13q, mesmo se estratificados nos grupos de risco intermédio. De facto, os doentes de baixo risco com cariótipo normal e del 13q raramente necessitam de tratamento ao contrário dos doentes com del 17p, independentemente da estratificação de risco de Rai. Neste grupo, a estratificação modificada de Rai perde valor prognóstico, uma vez que os doentes acabam por progredir num curto período de tempo, independentemente do estágio clínico.

V - CONCLUSÃO

CONCLUSÃO:

A Leucemia Linfocítica Crónica é considerada uma doença de curso indolente, com um prognóstico favorável, mas com uma história natural e evolução progressiva variável, com sobrevivências que podem variar entre os 2 e os 15 a 20 anos.

De facto, desde os anos 70 com a introdução do sistema de estratificação de risco por Rai que se classificam todos os doentes de acordo com critérios clínicos, os quais avaliam indirectamente a massa tumoral, subdividem os doentes em diferentes grupos prognósticos e auxiliam na decisão sobre a instituição terapêutica.

Décadas passadas, estes sistemas de estadiamento clínico mantêm aplicabilidade e reprodutibilidade clínica impar, mesmo após inúmeras tentativas de introdução de novos marcadores prognósticos serológicos, imunofenotípicos ou citogenéticos. É inegável o valor prognóstico assumido ao longo da última década pelos marcadores citogenéticos, principalmente as deleções do braço curto do cromossoma 17, porém a relevância na decisão sobre instituição terapêutica fora de ensaio clínico permanece controversa.

Este estudo retrospectivo permitiu caracterizar os doentes com Leucemia Linfocítica Crónica seguidos nos HUC nos últimos 10 anos e confirmar a importância da aplicação dos factores de prognóstico com impacto na sobrevivência dos doentes e na definição de grupos de risco.

VI - BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1) Baldini L, Cro L, Cortelezzi A, et al (1990): Immunophenotypes in "classical" B-cell chronic lymphocytic leukemia. Correlation with normal cellular counterpart and clinical findings. *Cancer* 66: 1738.
- 2) Delgado J, Matutes E, Morilla AM, et al (2003): Diagnostic significance of CD20 and FMC7 expression in B-cell disorders. *Am J Clin Pathol* 120:754.
- 3) Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, et al (2004): The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care (Engl)* 13:279.
- 4) Diehl LF, Karnell LH, Menck HR (1999): The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 86:2684.
- 5) Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, et al (2002): Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of indolent chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood* 100:635.
- 6) Linet MS, Van Natta ML, Brookmeyer R, et al (1989): Familial cancer history and chronic lymphocytic leukemia. A case-control study. *Am J Epidemiol* 130:655.
- 7) Shah AR, Maeda K, Deegan MJ, et al (1999): A clinicopathologic study of familial chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 97:184
- 8) Yuille MR, Houlston RS, Catovsky D (1998): Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 12:1696
- 9) Goldin LR, Pfeiffer RM, Li X, Hemminki K (2004): Familial risk of

lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: Results from the Swedish Family-Cancer Database. *Blood* 104:1850

10) Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al (1975): Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46:219

11) Phillips EA, Kempin S, Passe S, et al (1977): Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia and their implications for therapy. *Clin Haematol* 6:203.

12) Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al (1981): A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48:198.

13) Rai KR: A critical analysis of staging in CLL (1987), in *Chronic Lymphocytic Leukemia: Recent Progress and Future Direction*, edited by RP Gale, KR Rai, p 253. Alan R Liss, New York.

14) Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Vinolas N, Rozman C (1986): Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: Analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 62:567.

15) Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, et al (1999): Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: A single institution study of 204 cases. *Blood* 94:448.

16) Ebeling SB, Schutte ME, Logtenberg T (1993): Molecular analysis of VH and VL regions expressed in IgG-bearing chronic lymphocytic leukemia (CLL): Further evidence that CLL is a heterogeneous group of tumors. *Blood* 82:1626.

17) Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK (1999):

- Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:1848–1854.
- 18) Kröber A, Seiler T, Benner A, et al (2002): V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100:1410.
- 19) Domingo-Domenech E, Domingo-Claros A, Gonzalez-Barca E, et al (2002): CD38 expression in B-chronic lymphocytic leukemia: Association with clinical presentation and outcome in 155 patients. *Haematologica* 87:1021.
- 20) Dürig J, Naschar M, Schmucker U, et al (2002): CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 16:30.
- 21) Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al (2004): ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 351:893.
- 22) Han T, Henderson ES, Emrich LJ, Sandberg AA (1987): Prognostic significance of karyotypic abnormalities in B cell chronic lymphocytic leukemia: An update. *Semin Hematol* 24:257.
- 23) Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al (2002): Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1910.
- 24) Juliusson G, Robert KH, Ost A, et al (1985): Prognostic information from cytogenetic analysis in chronic B-lymphocytic leukemia and leukemic immunocytoma. *Blood* 65:134.
- 25) Shaw GR, Kronberger DL (2000): TP53 deletions but not trisomy 12 are adverse in B-cell lymphoproliferative disorders. *Cancer Genet Cytogenet*

119:146.

- 26) Molica S, Levato D, Cascavilla N, et al (1999): Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and beta2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 62:117.
- 27) Sarfati M, Chevret S, Chastang C, et al (1996): Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 88:4259.
- 28) Knauf WU, Ehlers B, Mohr B, et al (1997): Prognostic impact of the serum levels of soluble CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 89:4241.
- 29) Molica S, Vitelli G, Levato D, et al (1999): CD27 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Cellular expression, serum release and correlation with other soluble molecules belonging to nerve growth factor receptors (NGFr) superfamily. *Haematologica* 83:398.
- 30) Magnac C, Porcher R, Davi F, et al (2003): Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia* 17:133.
- 31) Robertson LE, Pugh W, O'Brien S, et al (1993): Richter's syndrome: A report on 39 patients. *J Clin Oncol* 11:1985.
- 32) Michael Hallek, Bruce D. Cheson, et al (2008), Group 1996 guidelines Working - Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic, *Blood*, 111, 12, 5446

- 33) Damle RN, Wasil T, Fais F, et al.(1999) Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 94:1840-7.
- 34) Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK (1999). Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 94:1848-54.
- 35) Chevallier P, Penther D, et al (2002): CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.*;116(1):142
- 36) Joshi AD, Hegde GV, Dickinson JD, et al (2007), ATM, CTLA4, MND1, and HEM1 in high versus low CD38 expressing B-cell chronic lymphocytic leucemia, *Clin Cancer Res*; 13:5295.
- 37) Bentz M, Huck K, du Manoir S. et al (1995):. Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias reveals a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood*; 85:3610-8.
- 38) Döhner H, Stilgenbauer S, Döhner K, Bentz M, Lichter P (1999) Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med* 1999;77:266
- 39) Juliusson G, Merup M. (1998): Cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*; 25:19-26.
- 40) Döhner H, Stilgenbauer S et al (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Medicine*; 343: 1910-1916

- 41) Kornblau S, Chen N, Del Giglio A, et al (1994). Retinoblastoma protein expression is frequently altered in chronic lymphocytic leukemia, *Cancer Research*
- 42) Neilson JR, Auer R, White D, et al. (1997): Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia*; 11:1929-32.
- 43) Stankovic T, Weber P, Stewart G, et al (1999). Inactivation of ataxia telangiectasi mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*; 353:26-9.
- 44) Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, et al. (1997): 11q Deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*; 89:2516-22.
- 45) Dohner H, Stilgenbauer S (2010), Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia, *NEJM*, 1910-16.
- 46) Escudier SM, Pereira-Leahy JM, Drach JW, et al (1993). Fluorescent in situ hybridization and cytogenetic studies of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 81:2702-7.
- 47) Geisler CH, Philip P, Christensen BE, et al (1997). In B-cell chronic lymphocytic leukaemia chromosome 17 abnormalities and not trisomy 12 are the single most important cytogenetic abnormalities for the prognosis: a cytogenetic and immunophenotypic study of 480 unselected in newly diagnosed patients. *Leuk Res*; 21:1011-23.
- 48) Wierda WG, O'Brien S et al (2009), Characteristics associated with important clinical end points in patients with chronic lymphocytic leukemia at initial treatment. *J Clin Oncol*; 27(10):1637

VII-AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho. Desde logo à Dr^a Emília Cortesão, minha co-orientadora e à Professora Dr^a Ana Bela Sarmiento, minha orientadora, pela incessante disponibilidade, pelo seu empenhamento no esclarecimento de dúvidas, orientação e correcção científica. O meu mais sincero agradecimento pelo apoio e encorajamento que sempre me transmitiram.

Não posso deixar de agradecer também àqueles que me ajudaram na trabalhosa e fundamental etapa de recolha de informação dos processos clínicos, no Serviço de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, a colegas, enfermeiros e administrativos, sem os quais teria sido impossível a obtenção dos dados.

Aos meus pais e ao meu irmão, obrigada pelo incentivo recebido ao longo destes anos, pelo tempo e sorriso que me dedicaram, pelo amor e atenção sem reservas.

Aos meus amigos, pela amizade incondicional.

ANEXO – 1

CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO PARA LLC – OMS 2008

Linfocitose Monoclonal > 5 x G/L

Marcação fraca para imunoglobulinas de superfície com restrição de cadeias leves

Marcação com antígenos de superfície de linfócitos B (CD 19, CD 20, CD 23)

Marcação com antígeno CD 5

Linfócitos atípicos nucleolados < 55%

ANEXO - 2

CRITÉRIOS DE TRATAMENTO PARA LLC – IWG-CLL 2008

- 1- Evidência de falência medular progressiva manifestada pelo aparecimento ou agravamento de anemia ou trombocitopenia
 - 2- Esplenomegália maciça > 6 cm abaixo do rebordo costal esquerdo ou esplenomegália sintomática
 - 3- Adenomegalias maciças > 10 cm de maior diâmetro ou adenomegalias sintomáticas
 - 4- Linfocitose progressiva com aumento de:
 - a) 50% em 2 meses
 - b) 100% em 6 meses (duplicação linfocitária)
 - 5- Anemia hemolítica auto-imune e /ou trombocitopenia
 - 6- Sintomas constitucionais como perda de peso, fadiga com limitação no ECOG, febre ou sudorese noturna
 - 7- Hipogamaglobulinémia sintomática
-

Índice de Figuras

FÍGURA 1 – Distribuição por idade e sexo	11
FÍGURA 2 – Sobrevivência por grupos de risco por risco modificado Rai	15
FÍGURA 3 – Sobrevivência por grupo de marcadores imunofenotípicos	16
FÍGURA 4 – Sobrevivência por grupo de risco citogenético	17

Índice de Tabelas

TABELA I – Estadiamento RAI 1975	3
TABELA II – Estadiamento BINET 1981	4
TABELA III – Áreas ganglionares envolvidas ao diagnóstico	12
TABELA IV – Expressão de ZAP 70 e CD 38 por citometria de fluxo	13
TABELA V – Incidência de alterações citogenéticas	14
TABELA VI – Sobrevivência aos 5 anos por grupo de risco citogenético	18
TABELA VII – Apresentação clínica por grupo de risco citogenético	19
TABELA VIII – Risco relativo para morte aos 5 anos	20
TABELA IX – Tempo estimado para progressão	22