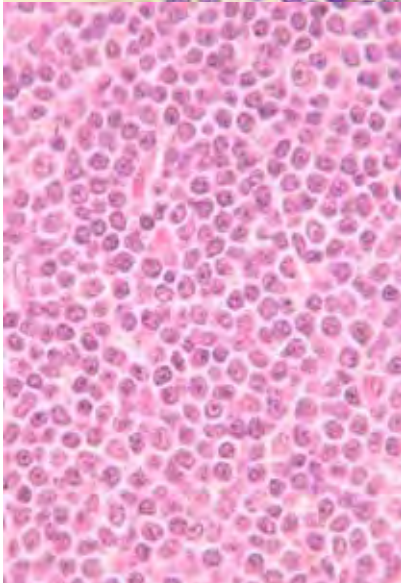
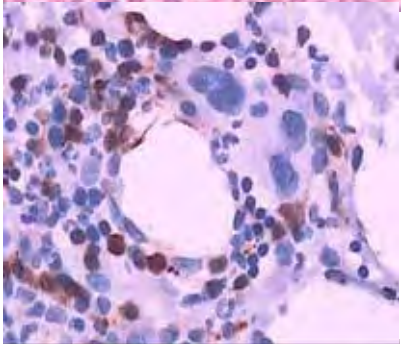




Pollyanna Domeny Duarte



**LEUCEMIA LINFÓIDE CRÔNICA:
ANÁLISE CLÍNICO-MORFOLÓGICA
E IMUNO-HISTOQUÍMICA
E CORRELAÇÃO COM FATORES
PROGNÓSTICOS CLÍNICOS**



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica, curso de Mestrado Profissionalizante do Hemocentro/Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção de título de Mestre em Biotecnologia Médica.



Botucatu
2009

Pollyanna Domeny Duarte

**LEUCEMIA LINFÓIDE CRÔNICA: ANÁLISE CLÍNICO-
MORFOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA E
CORRELAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS
CLÍNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica, curso de Mestrado Profissionalizante do Hemocentro/Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção de título de Mestre em Biotecnologia Médica.

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. LÍGIA NIÉRO-MELO
CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA CUSTÓDIO
DOMINGUES**

**Botucatu
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Duarte Pollyanna Domeny.

Leucemia linfóide crônica: análise clínico-morfológica e imuno-histoquímica e correlação com fatores prognósticos clínicos / Pollyanna Domeny Duarte. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2009.

Orientadora: Lígia Niero-Melo

Co-orientadora: Maria Aparecida Custódio

Assunto CAPES: 40101053

1. Leucemia linfóide - Prognóstico 2. Biotecnologia médica

CDD 616.99243

Palavras-chave: AMO; Estádio clínico; LLC/LL; Reticulina; ZAP-70

Dedico esta dissertação a cada paciente
que passou e passará por minha vida,
por seus ensinamentos,
especialmente de que é preciso fazer
tudo que é possível,
sem hesitar, a cada momento.

Agradecimentos especiais

À minha orientadora, querida Professora Lígia, pelos ensinamentos profissionais, onde é tão profunda e rigorosamente dedicada; pela preciosa semente do gosto pela morfologia, plantada e regada a cada dia e, principalmente, pelos ensinamentos pessoais, de forte guerreira, de coração materno e pulso firme – muito obrigada!

À minha co-orientadora, Dra. Maria, pela dedicação e precioso auxílio,
muito obrigada!

Aos professores da Escola de Medicina da Universidade Federal de Sergipe, especialmente o Professor Dr. Ricardo Scher – pelo zelo em minha iniciação científica – e a Professora Dra. Rosana Cipolotti – pelo incentivo constante, muito obrigada!

Aos meus pais, Domingos e Eny, alicerces firmes da minha formação, que dentro de sua preciosa simplicidade, abriram-me as portas do saber e me ensinaram como é importante lutar por aquilo que sonhamos, minha eterna gratidão!

Aos meus irmãos, Sellyanna e Adriano, por todos os momentos partilhados e tão significativos em minha vida, minha especial admiração.

Ao meu marido, Ívison, fiel companheiro, mesmo nos momentos mais difíceis, todo meu amor.

Agradecimentos

Aos docentes, residentes e internos que assistiram os pacientes deste trabalho, especialmente a aluna Ludmilla, por tão grande auxílio na revisão dos prontuários;

Aos colegas médicos de outras instituições que participaram dos cuidados de pacientes deste trabalho;

Aos Hematologistas das duas Instituições, pela assistência a muitos destes pacientes, e pessoalmente, aos amigos Lucilene e Rafael pela importante contribuição na minha vida profissional – seus ensinamentos valem diamante!

Aos Residentes de Hematologia, responsáveis pelas coletas de medula óssea;

Aos Docentes e Residentes do Departamento de Patologia, pela contribuição no diagnóstico destes doentes;

Aos funcionários do Hemocentro, que me tratam com tanto carinho;

Aos técnicos do Departamento de Patologia, que viabilizaram este estudo;

À Dra. Maura Moscardi Bacchi, pelos preciosos ensinamentos em Hematopatologia e, especialmente, pela singular e preciosa oportunidade.

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.

Fernando Pessoa

Resumo

Leucemia Linfóide Crônica (LLC) é uma neoplasia maligna de linfócitos B maduros com aspecto monomórfico, que se acumulam em tecidos linfóides secundários, medula óssea e sangue periférico. O diagnóstico é realizado com base em achados clínico-morfológicos e imunofenotípicos. Os pacientes com LLC são estratificados conforme o estadiamento clínico para definição de terapêutica; atualmente a descoberta de marcadores prognósticos, como ZAP-70, trouxe novas perspectivas ao tratamento, principalmente no estágio precoce. Os objetivos deste estudo foram: avaliar a eficácia da pesquisa da ZAP-70 em biópsia de medula óssea (BMO) e em inclusão do coágulo, utilizando-se a técnica de imuno-histoquímica; avaliar possíveis correlações deste marcador na BMO com evolução clínica e risco de progressão; correlacionar a imuno-expressão da ZAP-70 com o arcabouço reticulínico das BMO; avaliar se este arcabouço possui correlação com o prognóstico da doença e, por fim, traçar um perfil epidemiológico dos pacientes com LLC atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB). Foram selecionados 153 pacientes com LLC, atendidos no ambulatório do Serviço de Hematologia da FMB-UNESP, de 1980 a 2008, e 9 pacientes assistidos no Serviço de Onco-Hematologia do Hospital Amaral Carvalho-Jaú, no período de 2000 a 2008, com o mesmo diagnóstico, perfazendo 162 casos. Destes, 79 possuíam prontuários que foram revisados, bem como dados morfológicos da BMO e AMO. Foi realizada a pesquisa da ZAP-70 pela técnica de imuno-histoquímica nas amostras parafinadas de BMO e inclusão do coágulo. Observou-se que 55,7% dos pacientes eram do sexo masculino; 86,1% de etnia branca; a mediana de idade foi 65 anos; relação homem:mulher de 1,2:1. 40,5% dos pacientes tiveram diagnóstico por achado incidental e 73,4%, já com adenopatia secundária à admissão. 17,2% apresentaram-se em estágio precoce e 15% da casuística teve remissão prolongada. Na morfologia de BMO e AMO, observou-se que 94,8% dos pacientes tinham celularidade aumentada; 36,4% tinham padrão de infiltração difuso e 28,4% crescimento pseudo-folicular e presença de prolinfócitos. Na avaliação do arcabouço reticulínico, observou-se que 70,4% das BMOs apresentavam-se com graus II ou III. 143 pacientes foram avaliados segundo imuno-expressão da ZAP-70, e destes 18,2% foram positivos. Concluiu-se que a pesquisa da ZAP-70 pela técnica de imuno-histoquímica é adequada; a citoinclusão do coágulo de medula óssea é uma técnica de amostragem eficaz, reproduzindo os dados observados à BMO, bem como possibilitando a pesquisa de marcadores e avaliação reticulínica. Os demais dados observados foram concordantes com a literatura e inovaram ao mostrar o perfil epidemiológico da LLC na população atendida pelo HC da FMB-UNESP.

Palavras-chave: LLC, ZAP-70, reticulina, AMO, BMO.

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a malignant neoplasm consisting of mature monomorphic B lymphocytes that accumulate in secondary lymphoid tissues, bone marrow and peripheral blood. Diagnosis is based on clinical, morphological and immunophenotypic findings. CLL patients are categorized according to clinical aspects for treatment management and currently, certain tools, such as prognostic marker ZAP-70, have determined new treatment perspectives, especially for patients in early stages. The study aimed to evaluate the efficiency of ZAP-70 investigation in bone marrow biopsies (BMBs) and inclusion coagulate using immunohistochemistry; identify possible correlations of this marker in clinical evolution and risk of progression; correlate the immunoexpression of ZAP-70 with BMB reticulin network; evaluate whether this network correlates with disease prognosis and; outline an epidemiological profile of patients with CLL attended in the Clinics Hospital of Botucatu Faculty of Medicine (FMB). The sample consisted of 153 CLL patients attended at hematology outpatient clinic of the FMB-UNESP, from 1980 to 2008, and 9 CLL patients attended at the oncohematology service of the Amaral Carvalho Hospital, Jaú, from 2000 to 2008, totaling 162 cases. In 79 cases, medical records including BMB and bone marrow aspirate (BMA) morphological data were reviewed. Immunohistochemistry for ZAP-70 was conducted on paraffinated samples of BMB and inclusion coagulate. Observation revealed that: 55.7% were male, 86.1% white, with a median age of 65 years-old; 40.5% of cases were diagnosed by incidental findings in routine blood smears; 73.4% were diagnosed with peripheral adenomegaly on admission. 17.2% were diagnosed in the early stages and 15% of cases showed prolonged remission. BMB and BMA morphology revealed that 94.8% of patients presented increased cellularity; 36.4% presented a pattern of diffuse infiltration and 28.4% presented pseudofollicular growth and prolymphocytes. Evaluation of the reticulin network showed that 70.4% of BMBs presented grade II or III. 143 patients were evaluated for ZAP-70 immunoexpression and 18.2% were positive. In conclusion, the study of ZAP-70 expression by immunohistochemistry was adequate; BMA cytoinclusion is an efficient sample analysis technique that reproduced data observed in the BMB and permitted the investigation of markers and reticulin evaluation. The remaining data observed were in agreement with the literature and innovated by outlining an epidemiological profile of CLL in the population attended at FMB-UNESP.

Keywords: CLL, ZAP-70, reticulin, BMA, BMB.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Distribuição de pacientes de acordo com Estadiamento Clínico (Rai, Binet modificados).

Figura 2. Distribuição de pacientes de acordo com Evolução Clínica.

Figura 3. Distribuição de pacientes de acordo com Celularidade e Padrão de Infiltração da Medula Óssea.

Figura 4 – **a**: medula óssea hipocelular. BMO, HE, 200x; **b**: medula óssea normocelular. BMO, HE, 400x; **c**: medula óssea hiperclular. BMO, HE, 400x.

Figura 5 – **a**: infiltração de medula óssea, padrão intersticial e nodular. BMO, HE, 400x.

Figura 5 – **b**: infiltração de medula óssea, padrão difuso/maciço. BMO, HE, 400x.

Figura 6 – formação de pseudofolículos na medula óssea. BMO, HE, 400x.

Figura 7 – Estudo histoquímico de impregnação argêntica de fibras de reticulina; **a**: grau I, BMO, 400x; **b**: grau I, AMO do caso anterior, 400x; **c**: grau II, BMO, 400x; **d**: grau II, AMO correspondente ao caso anterior, 400x; **e**: grau III, BMO, 400x; **f**: grau III, AMO correspondente ao caso **e**, 400x; **g**: detalhe de grande vaso, BMO, 400x; **h**: detalhe de fibras reticulínicas pericapilares, AMO, 400x.

Figura 8 – **a**: infiltração de medula óssea, padrão difuso/maciço. AMO, HE, 400x.

Figura 8 – **b**: infiltração de medula óssea, padrão difuso/maciço. BMO, HE, 400x.

Figura 9 – Estudo imuno-histoquímico de expressão da proteína ZAP-70; **a**: ZAP-70 positivo, infiltração intersticial, em caso arquivado há 11 anos, BMO, 400x; **b**: ZAP-70 positivo, infiltração padrão difuso/maciço, BMO, 400x; **c**: ZAP-70 positivo, BMO, 400x; **d**: ZAP-70 positivo, AMO correspondente ao caso anterior, 400x; **e**: ZAP-70 negativo, controle interno de reação IHQ em linfócitos T, AMO, 400x.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estratificação de risco clínico segundo Rai e Binet

Tabela 2. Escala de Bauermeister modificada para grau de impregnação argêntica de fibras de reticulina

Tabela 3. Medidas descritivas dos participantes segundo variáveis quantitativas

Tabela 4. Distribuição do grau do retículo segundo motivo do diagnóstico

Tabela 5a. Distribuição de estratificação de risco segundo padrão de infiltração ao diagnóstico

Tabela 5b. Distribuição do padrão de infiltração da medula óssea ao diagnóstico segundo estratificação de risco

Tabela 6. Distribuição da presença de pseudofolículos e prolinfócitos (P/P) segundo estratificação de risco

Tabela 7. Distribuição da evolução clínica segundo risco ao diagnóstico

Tabela 8. Distribuição do grau do retículo de AMO segundo BMO

Tabela 9. Distribuição de celularidade da medula óssea segundo grau do retículo

Tabela 10. Distribuição do padrão de infiltração segundo grau do retículo

Tabela 11. Distribuição do ZAP-70 segundo celularidade da BMO

Tabela 12. Distribuição do ZAP-70 segundo padrão de infiltração à BMO

Tabela 13. Distribuição do ZAP-70 segundo formação de pseudofolículos e prolinfócitos à BMO

Tabela 14. Distribuição do ZAP-70 segundo graus de retículo à BMO

Tabela 15. Distribuição do ZAP-70 segundo graus de retículo à AMO

Tabela 16. Medidas descritivas da idade segundo os graus de retículo

Tabela 17. Medidas descritivas de DHL segundo os graus de retículo

Tabela 18. Medidas descritivas de β 2microglobulina segundo os graus de retículo

Tabela 19. Medidas descritivas de linfocitose segundo evolução clínica

Tabela 20. Medidas descritivas de creatinina sérica segundo evolução clínica

Tabela 21. Mediana e valores mínimo e máximo das variáveis (Grau de retículo e Risco) segundo óbitos

Tabela 22. Distribuição do grau de retículo segundo gênero

Tabela 23. Distribuição do grau de retículo segundo sintomas B

Tabela 24. Distribuição do grau de retículo segundo comprometimento de órgãos linfóides secundários

Tabela 25. Distribuição de presença de infecção ao diagnóstico segundo grau de retículo

Tabela 26. Distribuição do grau de retículo segundo estratificação de risco de Rai e Binet, modificados

Tabela 27. Distribuição de pico monoclonal, na eletroforese de proteínas séricas, segundo grau de retículo

Tabela 28. Distribuição da estratificação de risco segundo padrão de infiltração grau de retículo segundo celularidade da medula óssea

SUMÁRIO

Lista de Ilustrações

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

Introdução	21
Objetivos	29
Casuística e Métodos	31
Procedimentos para coleta de medula óssea	32
Processamento do material citológico	34
Processamento do material histológico	35
Revisão e Análise das Lâminas	36
Resultados	38
Achados Clínico-Laboratoriais	38
Achados de Análise de AMO e BMO	45
Discussão	51
Considerações Finais	72
Bibliografia	76
Apêndice	83
Anexos	84

INTRODUÇÃO

A leucemia linfóide crônica (LLC) é neoplasia composta de pequenos linfócitos monomórficos, caracterizada pelo acúmulo de clone maligno em tecidos linfóides secundários, medula óssea e sangue periférico. As células neoplásicas imunoexpressam marcadores de tecido linfóide *naive* (que abandonou a medula óssea sem estímulo antigênico), CD5, um antígeno de ativação, e co-expressam marcadores de linfócitos B, na sua maioria CD19, CD23, baixos níveis de imunoglobulinas de superfície (IgM e IgD), CD21, CD22 e CD79b¹. A célula B é assim definida ainda em sua origem medular óssea, quando ocorre inicialmente a síntese de cadeia pesada (em geral μ), que nesse momento lhe confere o fenótipo de linfócito pró-B, e adquire CD19, CD24, CD10 e CD79a². A partir de então, há síntese de cadeia leve, formando a imunoglobulina completa, caracterizando-a como pré-B e passando a expressar CD20 e CD22. Quando da exposição desta imunoglobulina, anteriormente citoplasmática, para a superfície da célula como receptor de antígeno, adquire o fenótipo de célula B, caracterizada como B imatura e ganhando expressão de CD21². Daí depreende-se que a síntese de cadeia pesada, início da definição de linhagem, é marco fundamental na fisiomorfologia destas células^{1,2}. LLC é morfológica e imunofenotipicamente indistinguível do linfoma linfocítico (LL), motivo pelo qual as duas entidades são categorizadas juntas, constituindo o diagnóstico LLC/LL (CID 9823/3, WHO 2008)^{3,4}. A diferença indiscutível entre LLC e LL é que, no segundo, os linfócitos maduros apresentam-se sob forma tumoral infiltrando linfonodos e, ocasionalmente, o baço, e comprometem a medula óssea em apenas 30% dos casos³⁻⁷.

A LLC ocupa o primeiro lugar dentre as leucemias do mundo ocidental e tem incidência de 2-6 casos por 100.000 habitantes por ano, nos Estados Unidos, o

que aumenta com a idade, chegando a 20,6/100.000 após os 65 anos^{1,3-6,8}. A mediana de idade ao diagnóstico é de 60 anos, entretanto estudos identificaram vários casos em pacientes mais jovens^{3,9}, alguns com diagnóstico de LLC familiar, subtipo com características peculiares. Não há descrição de LLC em crianças. A sobrevida e o prognóstico são variáveis, desde evolução indolente com mediana de até dez anos de sobrevida, até rápida progressão e morte prematura. Aparentemente, tanto LLC quanto LL podem evoluir, de forma semelhante: um terço dos casos de forma agressiva, um terço intermediário e o restante de curso indolente⁷.

A apresentação clínica pode ser desde pacientes assintomáticos, com descoberta fortuita em exames laboratoriais de avaliações médicas de rotina, até manifestação de espectro das doenças linfoproliferativas, ou seja, presença de massa tumoral e suas conseqüências, bem como disfunção imunológica, tais como fadiga, anemia hemolítica auto-imune, síndrome purpúrica, infecções, esplenomegalia, hepatomegalia, adenopatias ou infiltrados extra-nodais. O diagnóstico deve preencher critérios mínimos que incluem confirmação de linfocitose monoclonal sustentada (maior que 5000 a 10000/mm³, em duas tomadas com intervalo mínimo de um mês entre cada uma), em sangue periférico, mesmo em indivíduos assintomáticos, bem como confirmação de carga tumoral clínica ou em medula óssea¹⁰, visto que é doença essencialmente acumulativa. Diagnóstico diferencial entre as demais neoplasias linfóides B de pequenas células pode ser feito associando-se a morfologia dos linfócitos, o padrão de infiltração e a marcação imunofenotípica^{4,11} (anexo 1). Da diversidade de apresentação clínica surgem as controvérsias e opiniões acerca da conduta e orientação destes pacientes³, com opções terapêuticas que devem visar o controle da doença e prolongamento de

sobrevida, sem grandes anseios pela cura, uma vez que se trata de patologia prevalente em pacientes mais idosos, com menor reserva orgânica, e que muitos morrerão por outras causas não relacionadas a LLC/LL; ao que se soma a cinética de acúmulo predominante sobre a proliferação celulares.

Por muito tempo, fatores clínicos eram os únicos critérios para indicar ou não o início de quimioterapia, com base essencialmente em quantidade de massa tumoral, conforme Rai et al (1977)^{12,13} e Binet et al (1982)^{12,13} que definiram estágios: a) precoce (Rai 0, Binet A); b) intermediário (Rai I/II, Binet B); c) avançado (Rai III/IV, Binet C), conforme visto na tabela 1. Contudo, estes sistemas falham em não considerar a idade do paciente ao estabelecer níveis de hemoglobina como preditor de envolvimento da medula óssea e não identificarem fatores de progressão da doença em estágios precoces, onde se encontra cerca de 60% dos pacientes ao diagnóstico. Nos últimos anos, estudos têm buscado identificar fatores prognósticos em LLC/LL^{8,14-19} e o estado mutacional do gene da cadeia pesada variável de imunoglobulina (IgV_H), como processo determinante de formação de receptor da célula B, é, sem dúvida, um marco definidor deste aspecto.

Quando um antígeno de adequada afinidade é reconhecido pelo seu receptor, a célula entra no centro germinativo dos folículos linfóides, onde, como centroblasto, rapidamente se divide e os genes que codificam suas porções variáveis sofrem hipermutação somática. Esse processo determina mutações no segmento gênico rearranjado V_HDJ_H e V_LJ_L (cadeias pesada e leve, respectivamente) e conseqüente codificação do sítio receptor. Através dessas mutações, os receptores das células B descendentes, chamados centrócitos, adquirem novas propriedades, inclusive CD23 e negatividade ou fraca expressão de CD22², e aqueles que apresentam disfunção, normalmente são eliminados²⁰. Este estímulo e a via

selecionada usualmente requerem ajuda de linfócitos T, especialmente via interleucinas, fato este ocorrendo em nível de centro germinativo; entretanto, pode acontecer sem estes auxílios, como, por exemplo, na zona marginal ao redor do folículo, principalmente em resposta a carboidratos de vírus ou bactérias encapsuladas. Ambos processos levam ao desenvolvimento de plasmócitos (com perda de HLA-DR, CD19, CD20, CD24, CD45 e aquisição de CD38, CD138 e da capacidade de produção de imunoglobulinas no seu citoplasma, com expressão em superfície das cadeias leves, kappa e lambda) ou células B de memória (expressando HLA-DR, FMC7, CD20, CD22, CD23, CD79, CD19 e perdendo CD5, CD10 e CD24)^{2,20,21}. O antígeno CD38 é expresso em algumas células progenitoras, junto ao CD34 e costuma ser perdido durante a diferenciação dos linfócitos, podendo voltar a ser expresso na fase de plasmócito^{2,12,13}.

Tabela 1. Estratificação de risco clínico segundo Rai e Binet^{12,13}

Estágio	Achados clínicos	Rai modificado, 1977	Binet, 1982	Sobrevida
Precoce	Linfocitose somente ou linfadenopatia <3áreas	0	A	>10 anos
Intermediário	Linfadenopatia (>3áreas)	I	B	5-7 anos
	Hepato e/ou esplenomegalia	II		
Avançado	Hb < 10-11g/dl	III	C	1-3 anos
	Pqt < 100000/mm ³	IV		

Concomitantemente à ativação da célula B, há mudanças em sua superfície que a ajudam a interagir com outras células e mediadores solúveis, resultando em aumento do número ou maturação em plasmócitos produtores de anticorpos. Uma dessas moléculas de superfície é o CD38, com atividade adenosina difosfato-ribose ciclase e função de melhoria da sinalização dos receptores de célula B, desencadeando os sinais que regulam sua apoptose. Sinais recebidos através dela são transferidos ao núcleo através de uma cascata de interação entre moléculas, cujas estruturas são modificadas temporariamente durante este

processo^{20,21} e que freqüentemente envolvem ação de enzimas específicas, como Syk e Lyn, membros da família Src de proteínas “tirosino-kinases”. Nos linfócitos T, a proteína kinase associada à cadeia zeta, de 70kDa – ZAP-70 – faz este papel, sinalizando o início da ativação subsequente da célula T, além de envolver-se com apoptose e migração celular²².

Células de LLC que possuem genes IgV_H não-mutados podem ser distintas daquelas que expressam genes IgV_H mutados, sendo isto sinal de diferenciação e transcrição de um pequeno número, embora fundamental, de genes. Um desses genes codifica a proteína ZAP-70, que é uma proteína kinase (PTK) predominantemente envolvida com o receptor de célula T (TCR); apesar de antes acreditar-se ser exclusiva destas células; recentemente, tem se mostrado estar envolvida com receptor de célula B (BCR) sinalizando pior prognóstico em LLC/LL²²⁻²⁶ e, ainda, em fases mais precoces de desenvolvimento de linfócitos B, provavelmente entre a transição de célula pró-B para pré-B²⁷⁻²⁹.

O gene ZAP-70 localiza-se no cromossomo 2q11.2 e é composto de 14 éxons, que codificam uma proteína de mesmo nome, a qual compreende três domínios, dois Src homólogos (SH2) na posição amino-terminal e um tirosino-kinase, carboxi-terminal. Os dois domínios SH2 são separados pelo interdomínio A, e o interdomínio B os conecta à porção tirosino-kinase. A proteína ZAP-70 pode estar normalmente expressa, assim como CD5¹³, em células B tonsilares e esplênicas, com fenótipo ativado, em células pró-B da medula óssea, pulmão e células epiteliais, além das células B tumorais de LLC/LL, leucemia linfoblástica aguda, linfoma das células do manto, linfoma de Burkitt e linfoma da zona marginal nodal³⁰. ZAP-70 foi o primeiro marcador reconhecido como potencial preditor do estado mutacional IgV_H, uma vez que o comportamento clínico de progressão da doença é bem distinto entre

pacientes com e sem sua expressão. As células ZAP-70 positivas são mais responsivas a sinais derivados do seu próprio microambiente, o que poderia promover fácil acesso e grande proliferação em centros pseudo-germinativos³⁰, explicando em parte a natureza mais agressiva das LLC/LL ZAP-70 positivas; contudo, tais evidências ainda não podem ser provadas. Além disso, é sugerido que a proteína ZAP-70 não é restrita à sinalização do receptor de célula B e pode estar envolvida em outros mecanismos de sinalização, em alguns casos de LLC/LL²⁹.

Em relação ao estado de hipermutação somática do gene IgV_H, outro fator prognóstico já identificado é o encurtamento de telômero; que, capaz de predizer a história replicativa da célula tumoral, ao traduzir maior atividade proliferativa, mostra-se mais curto nas células com estado não mutado de IgV_H, resultante de maior atividade da telomerase¹.

LLC/LL deriva de uma maior predisposição genética dentre as neoplasias hematológicas, sendo a predisposição familiar documentada em 5-10% dos pacientes, baseada em achados em dois ou mais casos na mesma família. O risco é 2-7 vezes maior em parentes de primeiro grau e a idade ao diagnóstico costuma ser menor que 40 anos. Cerca de 80% dos casos tem anormalidades genéticas detectadas por FISH (devido à sua maior sensibilidade em relação à citogenética convencional)⁴. Até 50% dos pacientes têm del 13q14.3, 20% apresentam trissomia do cromossomo 12 e, menos comumente, deleções de 11q22-23, 17p13 e 6q21, variando de acordo com o estado mutacional.

Além dos fatores associados à própria célula tumoral e suas interações, o microambiente também parece ter importante papel na fisiopatogenia da LLC/LL. Após a fixação de biópsias de medula óssea, antes e depois do procedimento de descalcificação, estudos estruturais notaram desorganização celular, ativação de

fibroblastos, transformação de miofibroblastos, acúmulo de colágeno e matriz amorfa extracelular, como ocorre em várias outras neoplasias hematopoéticas^{31,32}, sugerindo que proliferação policlonal de fibroblastos e acúmulo de matriz extracelular podem estar relacionados à inflamação resultante de excessiva morte celular. Alterações estromais da medula óssea foram estudadas em 96 pacientes com leucemia³³, evidenciando variações de apresentação das fibras reticulínicas (escala de Bauermeister modificada, tabela 2), de colágeno tipo III, relacionadas à proliferação intramedular, abundância de capilares hiperplásticos e arteríolas, frequentemente vistos em leucemias linfóides, além de aumento focal de impregnação argêntica em leucemias agudas indiferenciadas. Nas neoplasias mieloproliferativas, sobretudo na Mielofibrose Primária, a fibrose representa um processo reativo mediado por citocinas produzidas pelos componentes celulares da proliferação clonal³⁴. A angiogênese tem significado fisiopatológico na biologia das células de LLC/LL, inclusive com implicações prognósticas³⁵⁻³⁷, e até certa redução do número de neovasos já foi observada em pacientes com LLC/LL tratados com fludarabina³⁷.

Tabela 2. Escala de Bauermeister modificada para grau de impregnação argêntica de fibras de reticulina (Bain *et al*, 2001)³⁸

Grau	Apresentação das fibras reticulínicas
0	Sem fibras reticulínicas demonstráveis
1	Fibras individuais finas e focais
2	Fibras finas atravessam a maior parte do material, mas não se cruzam
3	Fibras difusas, espessas, mas não colágeno maduro
4	Fibras difusas, com áreas de colageinização

Nem todos os serviços de diagnóstico têm acesso a metodologias de alto custo, como citometria de fluxo, FISH, cariótipos, entre outros; entretanto, muitos

protocolos diagnósticos e prognósticos em doenças onco-hematológicas são descritos com estas tecnologias. Uma vez que em LLC/LL tem-se admitido melhor evolução clínica de pacientes tratados em estadiamento precoce, desde que, apesar de assintomáticos, tenham fatores de pior prognóstico^{13,17,39}, fazem-se necessários estudos de metodologias já utilizadas na rotina diagnóstica, como impregnação argêntica de Gomori em BMO e análise imuno-histoquímica, como ferramentas alternativas na determinação de fatores evolutivos e prognósticos nas doenças linfoproliferativas. Em nosso Serviço, a inclusão do coágulo proveniente do aspirado de medula óssea é usada, de longa data, como fonte de material para avaliação morfológica. Assim, objetivamos avaliar a importância da expressão de ZAP-70 por imuno-histoquímica em biópsia de medula óssea, comparado à técnica de citometria de fluxo, e identificar possíveis correlações com evolução clínica, risco de progressão ao diagnóstico e alterações do arcabouço reticulínico; além da magnitude dos dados que podem ser extraídos de amostras histológicas da citoinclusão do coágulo de medula óssea.

OBJETIVOS GERAIS

Avaliar pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide crônica quanto a dados clínicos admissionais, evolução clínica, achados laboratoriais de aspirado e biópsia de medula óssea, bem como estabelecer possíveis correlações clínico-morfológica, histoquímica e imuno-histoquímica, nestes doentes, baseando-se em fatores prognósticos estudados na literatura.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar, clínica e laboratorialmente, através de estudo retrospectivo, os achados admissionais de pacientes com LLC/LL, assistidos por estas Instituições nos últimos 28 anos;
- 2) Correlacionar evolução clínica com fatores prognósticos, descritos na literatura, identificados nestes pacientes;
- 3) Identificar possível relação entre variações da coloração argêntica, evolução clínica e prognóstico dos pacientes com diagnóstico de LLC/LL;
- 4) Estabelecer a importância do arcabouço reticulínico como possível marcador prognóstico;
- 5) Estudar a correlação entre pesquisa de ZAP-70 por imuno-histoquímica e citometria de fluxo, nos pacientes atendidos no Hospital Amaral Carvalho;
- 6) Estabelecer o valor da impregnação argêntica nos cortes histológicos de coágulo e BMO como possível preditor da imunoexpressão do ZAP-70;

- 7) Correlacionar a imunexpressão do marcador ZAP-70 com os graus de reticulina (colágeno III), nos fragmentos de biópsia de medula óssea (BMO) e coágulo de MO;
- 8) Avaliar a eficácia da imunexpressão do ZAP-70 pesquisado em coágulo de MO;
- 9) Avaliar a importância da pesquisa do ZAP-70 por imuno-histoquímica, no coágulo de medula óssea (MO) e correlacionar com evolução clínica (prognóstico).

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Inicialmente, foram identificados os registros de 225 pacientes com diagnóstico de LLC/LL, de acordo com os critérios diagnósticos clínicos e morfológicos admitidos na literatura, sendo 216 atendidos pelo Serviço de Hematologia da Universidade Estadual Paulista e nove pelo Departamento de Hematologia/Oncologia do Hospital Amaral Carvalho – Jaú, entre maio de 1980 e maio de 2008. Deste total, eram disponíveis para análise prontuários completos de 87 pacientes, dos quais 79 amostras de medula óssea eram avaliáveis e oito, material insuficiente; 138 pacientes tinham apenas os dados clínicos da admissão, dos quais 83 amostras de medula óssea eram analisáveis e 55, material insuficiente (figura 1).

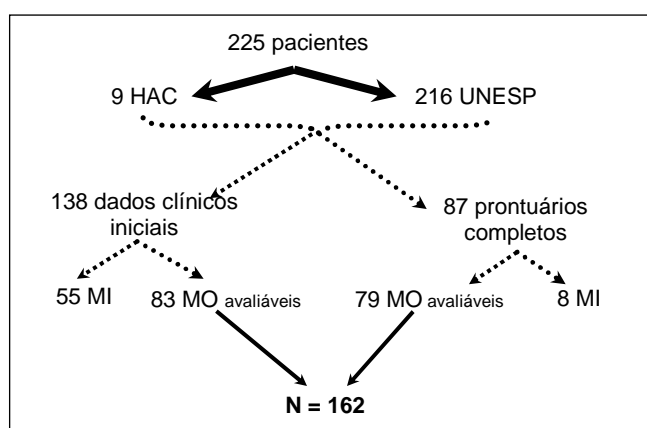


Figura 1. Casuística do trabalho
 HAC: Hospital Amaral Carvalho – Jaú;
 UNESP: Universidade Estadual Paulista;
 MI: material insuficiente.

De 79 pacientes, foram revisados prontuários médicos, para obtenção de dados clínicos (idade, gênero, etnia, presença de sintomas constitucionais – definidos como febre, sudorese noturna e/ou perda ponderal maior que 10% do peso usual em seis meses – além de dados do exame físico), laboratoriais de admissão (hemograma, marcadores de carga tumoral e síndrome de lise tumoral), evolução

clínica e terapêutica, conforme ficha de avaliação (apêndice 1), desenhada a partir de revisão da literatura.

De 162 pacientes, dos quais eram disponíveis os blocos de parafina de citoinclusão do coágulo de aspirado de medula óssea (AMO) e/ou biópsia de medula óssea (BMO) ao diagnóstico, foram revistas, em caráter duplo-cego, por dois observadores, simultânea ou separadamente, as lâminas de AMO e BMO, para avaliação de celularidade/gordura – hipo (< 20% de celularidade), normo (20 – 50%) ou hiper celular (> 50%); grau (percentual relativo à celularidade) e padrão de infiltração (nodular/intersticial ou difuso maciço); presença de formação de pseudofolículos e prolinfócitos; grau de impregnação argêntica (tabela 2) e estudo imuno-histoquímico do marcador ZAP-70 (positividade requerendo 20% ou mais das células neoplásicas coradas, padrão nuclear). Nove destes pacientes tinham pesquisa de ZAP-70 também por citometria de fluxo (cujo critério de positividade é semelhante ao adotado na técnica de imuno-histoquímica).

Procedimentos para Coleta de Medula Óssea (MO)⁴⁰

A coleta de MO foi realizada de acordo com os seguintes procedimentos:

Escolha da Topografia de coleta:

- ETERNAL: na linha longitudinal mediana do manúbrio esternal, um centímetro abaixo da fúrcula, com paciente em decúbito dorsal horizontal (para AMO de adultos);
- Crista ilíaca pósterio-superior: paciente posicionado em um dos decúbitos laterais, com coxas e pernas fletidas (para BMO em qualquer idade).

Antissepsia e anestesia:

- Desnudamento da área escolhida;
- Antissepsia local com álcool iodado/cloroexidina e gaze estéril, colocação de campo oftálmico, também estéril, sobre a área;
- Anestesia local com injeção de 1 ml de cloridrato de lidocaína, utilizando-se seringa plástica e agulha de insulina descartáveis.

Realização de AMO:

- Utilização de agulha de aço inoxidável hipodérmica com mandril, tamanho 40 x 12, estéril, introduzida perpendicularmente ao esterno ou na crista ilíaca pósterio-superior, através de movimentos rotatórios, atingindo-se a MO;
- Retirada do mandril da agulha, com conexão de seringa plástica descartável ao canhão da mesma. Aspiração de aproximadamente 1ml de MO;
- Realização de 6 a 8 esfregaços de MO em lâminas de vidro para microscopia óptica, secos em ar ambiente;
- Colocação do coágulo de MO, excedente aos esfregaços, em frasco de vidro identificado, contendo formol tamponado.

Encaminhamento dos respectivos materiais:

- Os materiais citológicos (lâminas de esfregaços e *imprints*), juntamente com o pedido de mielograma, foram entregues no Laboratório de Citologia

e Citoquímica da Disciplina de Hematologia, para os procedimentos de rotina;

- Os materiais histológicos (coágulo e fragmento de BMO), juntamente com o pedido de exame anátomo-patológico, foram entregues no Departamento de Patologia para o mesmo fim.

Processamento do material citológico (esfregaços e *imprints*) no Laboratório de Citologia e Citoquímica da disciplina de Hematologia

Depois de secas, duas lâminas de esfregaço e duas de *imprints* de cada caso foram coradas pelo Leishman. As lâminas foram analisadas, sob aspectos qualitativos e quantitativos, quanto à celularidade global, compartimentos celulares (eritróide, granulocítico, megacariocítico e imune-estromal) e presença de elementos estranhos à MO, seguindo normas de rotina hematológica, com elaboração de laudo de mielograma. Os parâmetros normais de MO seguiram o estabelecido por Perkins⁴¹ para pacientes da faixa etária em estudo. Em cada laudo foram registrados dados de identificação do doente, incluindo nome, registro hospitalar, idade, diagnóstico e código do arquivo (inicial do último sobrenome do doente seguido de número arábico, em ordem crescente, único para cada paciente).

Após análise, as lâminas citológicas foram arquivadas em cartelas de cartolina contendo os respectivos códigos de arquivo de cada caso. Lâminas histológicas correspondentes aos esfregaços e *imprints* (coágulos de AMO e fragmentos de BMO, respectivamente) foram fornecidas pelo Departamento de Patologia e também arquivadas nas mesmas cartelas. Lâminas citológicas

excedentes, não coradas, foram acondicionadas em papel alumínio e guardadas para eventuais estudos adicionais.

Os laudos elaborados, também codificados, de todos os casos, tiveram uma via encadernada em livros de laudos de mielogramas, na exata cronologia em que as respectivas MO foram colhidas e outra via encaminhada para o prontuário do paciente. Os arquivos de laudos e de lâminas de MO, da disciplina de Hematologia, permitiram a identificação e estudo cito-histológico dos pacientes desse estudo.

Processamento do material histológico pelo Departamento de Patologia

Os coágulos de AMO e fragmentos de BMO, colhidos dos pacientes, foram recebidos na sala de macroscopia do Departamento de Patologia, sendo colocadas em solução fixadora contendo mistura de álcool etílico a 80%, formol a 40%, ácido pícrico e ácido acético glacial, por 12 horas. A seguir, os fragmentos de BMO foram descalcificados em ácido nítrico a 7% durante uma hora. Tanto os materiais descalcificados (BMO) quanto os coágulos de AMO, que não necessitam de descalcificação, foram incluídos em blocos de parafina, procedendo-se a cortes histológicos de três a cinco micrômetros de espessura, em micrótomos marca Microtome, modelo 820, ou marca Leica, modelo RM 2145.

Montaram-se lâminas histológicas de vidro para microscopia óptica, coradas pela hematoxilina-eosina (HE), impregnação argêntica de Gomori (retículo, anexo 2) e imuno-histoquímica anti-ZAP-70 (anexo 3). Após, os materiais foram recobertos por lamínula de vidro e analisados em microscópios ópticos daquele Departamento. O laudo descritivo teve uma via arquivada em livros de biópsia até

1997 (em ordem cronológica exata de coleta) e arquivo digital a partir de então, e outra via encaminhada ao prontuário do paciente. As lâminas foram arquivadas no Departamento de Patologia.

Revisão e análise das lâminas citológicas e histológicas de MO

Os materiais citológicos (esfregaços e/ou *imprints*), corados pelo Leishman, foram revisados e analisados quanto à representatividade do material, celularidade, grau de linfocitose, formação de agregados linfóides, presença de prolinfócitos e citologia das células neoplásicas.

As lâminas histológicas correspondentes (coágulo e/ou fragmento de BMO), coradas pela HE, foram revisadas e estudadas conforme critérios já descritos. Aquelas coradas através de impregnação pela prata foram revisadas e analisadas segundo escala de Bauermeister modificada³⁸ e aquelas coradas por técnica de imuno-histoquímica, quanto à positividade ou negatividade para marcação nuclear das células neoplásicas para ZAP-70. Como controle interno, de ocorrência da reação imuno-histoquímica, foram observados linfócitos T positivos, em todas as lâminas.

Os campos de maior interesse de cada material, nas diferentes colorações, foram fotografados em fotomicroscópio marcas Jena-Zeiss e Olympus, com aumento final variando entre 100 a 1000 vezes.

Para permitir o caráter cego do estudo, as lâminas histológicas de HE, retículo e imuno-histoquímica, do mesmo paciente, foram analisadas em momentos diferentes. Todos os dados clínicos e laboratoriais foram tabulados em planilha de Excel (Microsoft Excel 2008).

A análise estatística utilizou os programas SigmaStat e MANAP, e baseou-se nos seguintes testes:

- a) Medidas descritivas de variáveis quantitativas;
- b) Teste de Kruskal-Wallis (SigmaStat) para análise de variância não paramétrica, usando intervalo de confiança de 95%;
- c) Teste de Goodman^{42,43} (MANAP) para estudo de contraste entre e dentro de populações multinomiais, utilizando-se letras minúsculas para indicar os resultados das comparações entre linhas, fixada a categoria de resposta; e letras maiúsculas, nas comparações das categorias de resposta, dentro da linha. Para a interpretação das letras, deve-se proceder da seguinte maneira:
 - i) duas proporções seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem quanto às respectivas linhas, na categoria de resposta em consideração;
 - ii) duas proporções seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula não diferem quanto às respectivas categorias de resposta, dentro da linha em consideração.

Todas as conclusões, no presente trabalho, foram discutidas em nível de 5% de significância.

O presente estudo foi aprovado pelos comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (CEPFMB 92/08) e do Hospital Amaral Carvalho de Jaú (CEPFHAC 71/08).

RESULTADOS

- *Achados Clínico-Laboratoriais*

Dos 79 pacientes, 44/79 (55,7%) eram do sexo masculino, 68/79 (86,1%) de etnia branca, 32/79 (40,5%) foram identificados a partir de achado ocasional de linfocitose em hemograma de rotina; entretanto, 45/79 (57,1%) já apresentavam sintomas constitucionais e 58/79 (73,4%) tinham adenomegalias periféricas e/ou hepatoesplenomegalia ao diagnóstico. Segundo a classificação para estadiamento clínico de LLC/LL, modificada, de Rai (1977)^{12,13} e Binet (1982)^{12,13}, 15/79 (17,9%) tinham baixo risco para progressão de doença; 40/79 (51,3%), risco intermediário e 24/79 (30,8%), alto risco (figura 1). Com relação a comorbidades infecciosas à admissão, 18/79 (23,1%) chegaram com comprometimento infeccioso respiratório. Cinquenta e um dos 79 pacientes (64,5%) tinham evidência de pico monoclonal em região de beta ou gamaglobulina, em eletroforese de proteínas séricas. A conduta clínica inicial foi de observação (“*watch and wait*”) em 17/79 (21,5%) casos e início de quimioterapia nos demais, sendo utilizados como esquemas terapêuticos: i) ciclofosfamida, vincristina e prednisona (CVP), a cada 21-28 dias, em 32/79 (40,5%) dos pacientes; ii), clorambucil em 27/79 (34,2%); e iii) corticoterapia em pulsos (dexametasona), em 3/79 (3,8%) dos casos. A evolução destes pacientes foi classificada em: a) remissão prolongada (sobrevida livre de doença em dois anos, sem necessidade de (re)introdução de quimioterapia); b) evolução para estágio de alto grau (Linfoma de Grandes Células/Leucemia Aguda, OMS); e c) refratariedade à terapêutica, com introdução de múltiplos esquemas quimioterápicos, conforme figura 2. Doze (15,2%) pacientes morreram, sendo 8/79 (10,1%) por causa relacionada a

LLC/LL. Apenas 4 (5,1%) pacientes perderam seguimento, por abandono de tratamento.

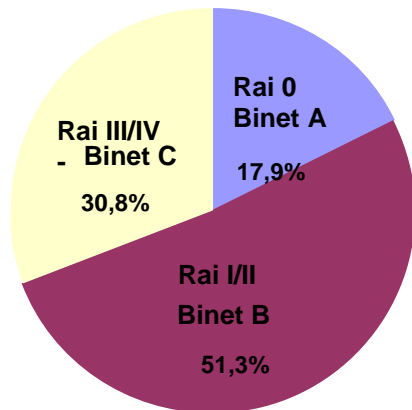


Figura 1. Distribuição de pacientes de acordo com Estadiamento Clínico (Rai, Binet modificados).

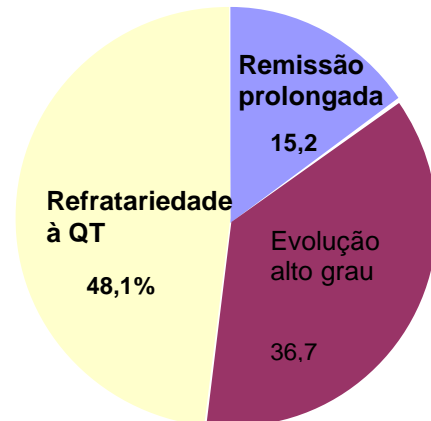


Figura 2. Distribuição de pacientes de acordo com Evolução Clínica.

Em relação ao estudo histológico da medula óssea, 3/79 (4,2%) pacientes tinham celularidade baixa (normal para idade); 31/79 (38,9%), intermediária e 45/79 (56,9%), alta/hipercelular (figuras 3 e 4). Quanto ao padrão de infiltração, a amostra foi dividida entre intersticial e/ou nodular (45/79 pacientes, 62,5%) e difuso/maciço (figuras 3 e 5). Vinte dos 79 pacientes (25,3%) apresentavam formação de pseudofolículos, com prolinfócitos, nas áreas de infiltração neoplásica da medula óssea (figura 6). Com relação à distribuição segundo graus de retículo na BMO, 19/79 (24,5%) pacientes apresentaram grau I (figura 7a); 28/79 (35,1%), grau II (figura 7c) e 32/79 (40,4%) tinham reticulina grau III (figura 7e).

As medidas descritivas quanto à idade, tempo de evolução, leucometria, linfometria, desidrogenase láctica (DHL), beta2microglobulina, ácido úrico, creatinina, glicemia e percentual de infiltração da MO dos participantes segundo as variáveis quantitativas analisadas são apresentadas na tabela 3.

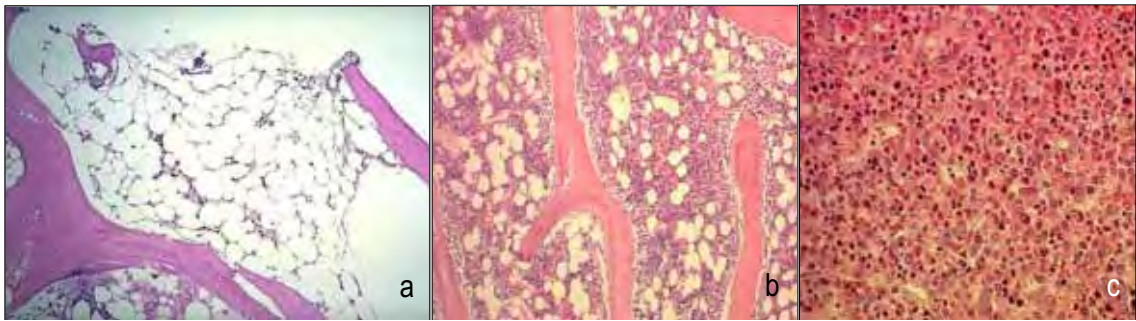


Figura 4 – a: medula óssea hipocelular. BMO, HE, 200x; b: medula óssea normocelular. BMO, HE, 400x; c: medula óssea hipercelular. BMO, HE, 400x.

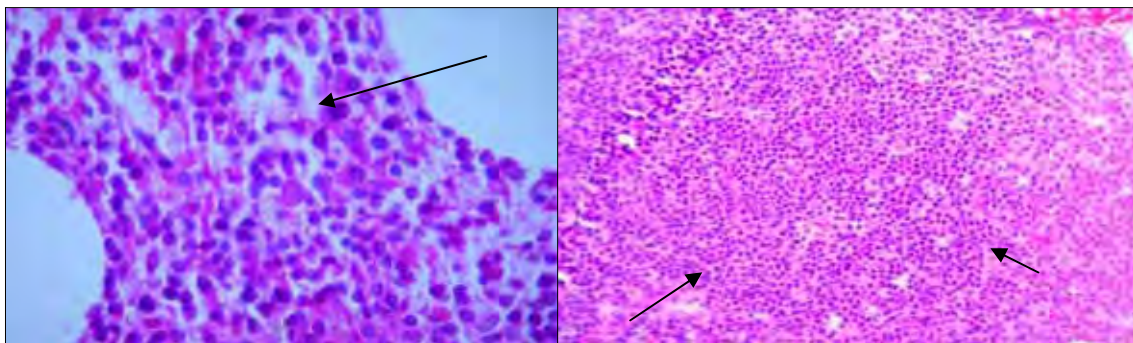


Figura 5 – a: infiltração de medula óssea, padrão intersticial e nodular. BMO, HE, 400x.

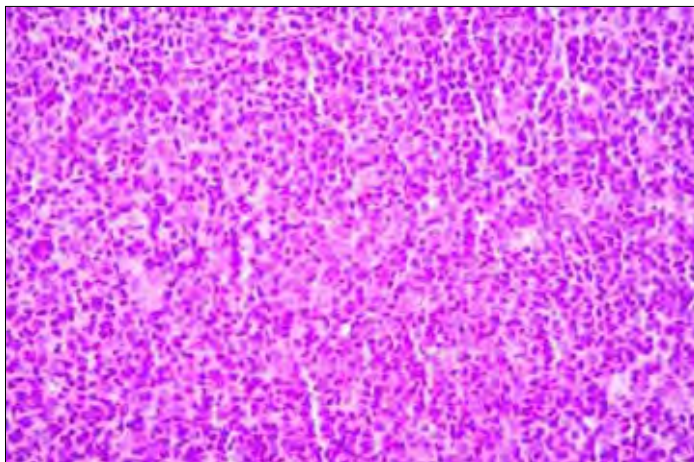


Figura 5 – b: infiltração de medula óssea, padrão difuso/maciço. BMO, HE, 400x.

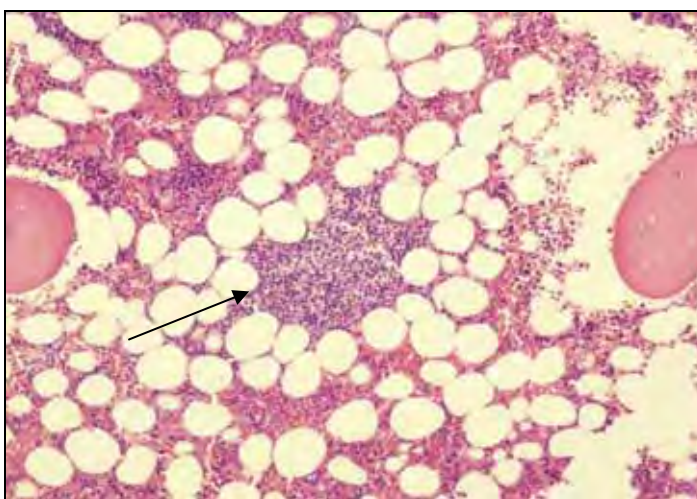


Figura 6 – formação de pseudofolículos na medula óssea. BMO, HE, 400x.

Medida Descritiva	VARIÁVEL									
	Idade (anos)	Tempo de evolução (meses)	Leucometria (/mm ³)	Linfometria (/mm ³)	DHL (U/l)	β 2microglobulina (mg/dl)	Ácido Úrico (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Glicemia (mg/dl)	Infiltração (%)
Valor Mínimo	28	0,10	600	180	90	0,17	2,10	0,10	52	10
1º Quartil	59	2,00	10600	5325	168	1,43	3,60	0,81	86,50	60
Mediana	65	4,00	24000	17103	293	2,21	4,90	1,00	100	80
3º Quartil	72	9,00	68550	54000	510	3,37	6,90	1,31	116,75	90
Valor Máximo	87	24,00	316940	210000	3900	14,50	13,60	2,77	421	100
Média	64,8	6,50	57249,70	38837,50	427,50	2,75	5,40	1,10	112,49	72,63
Desvio Padrão	11,3	6,99	68184,80	48034,20	517	2,43	2,41	0,44	56,28	22,70

Tabela 3. Medidas descritivas dos participantes segundo variáveis quantitativas

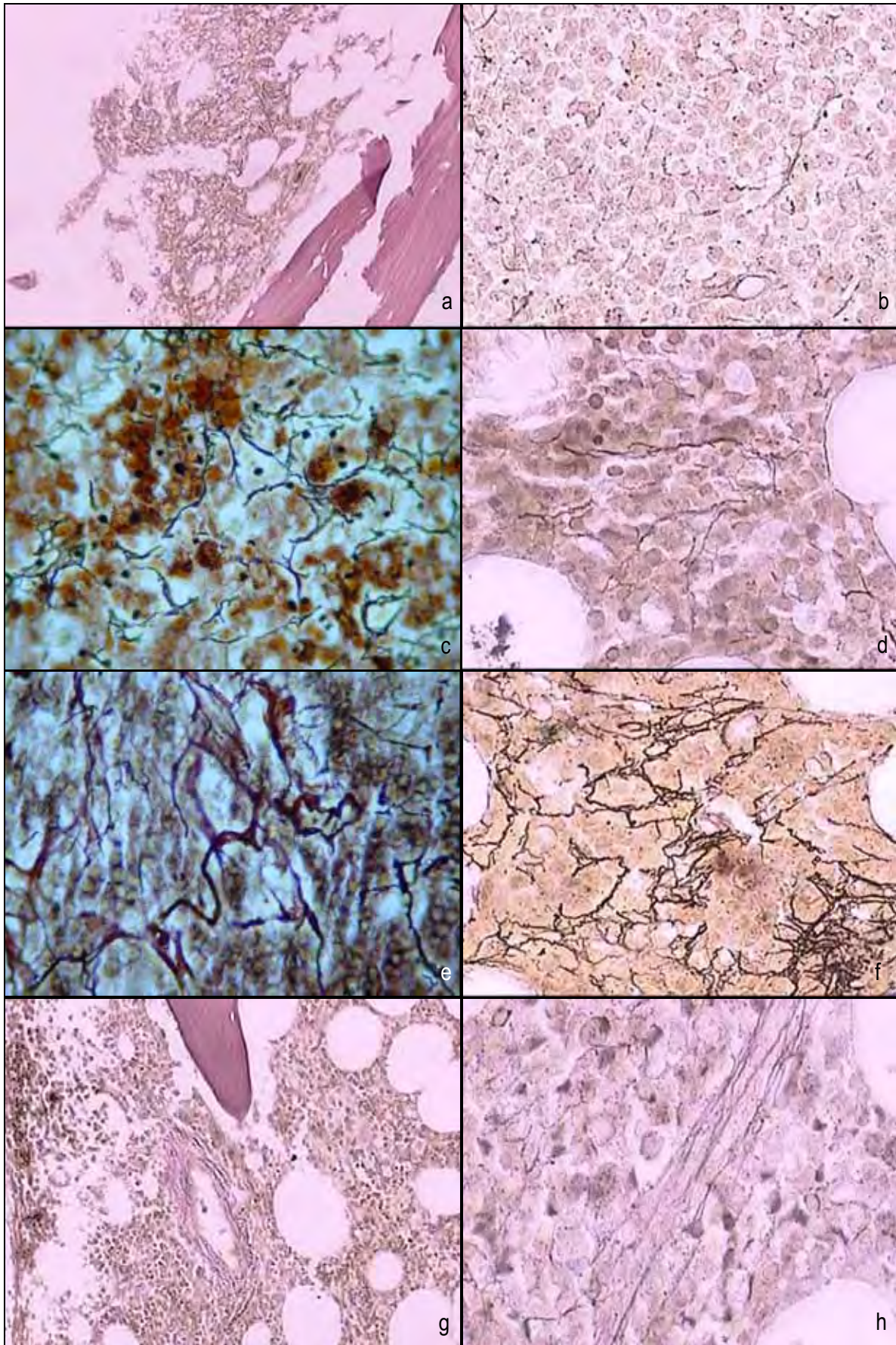


Figura 7 – Estudo histoquímico de impregnação argêntica de fibras de reticulina; **a**: grau I, BMO, 400x; **b**: grau I, AMO do caso anterior, 400x; **c**: grau II, BMO, 400x; **d**: grau II, AMO correspondente ao caso anterior, 400x; **e**: grau III, BMO, 400x; **f**: grau III, AMO correspondente ao caso e, 400x; **g**: detalhe de grande vaso, BMO, 400x; **h**: detalhe de fibras reticulínicas pericapilares, AMO, 400x.

Resultados

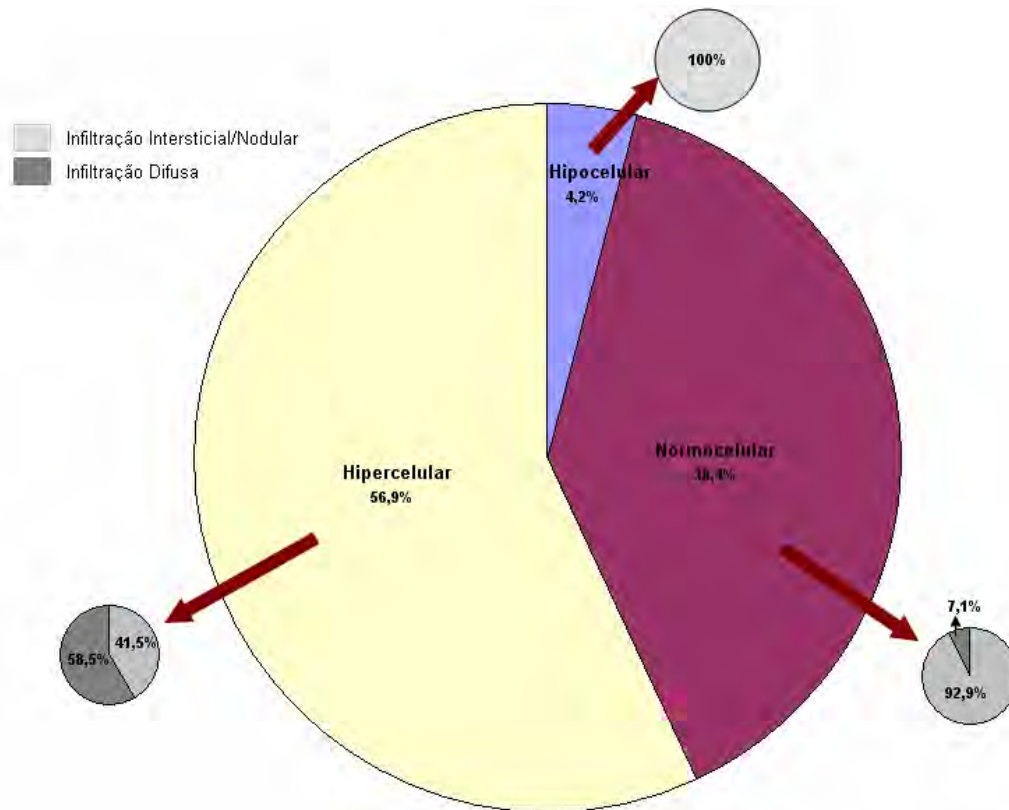


Figura 3. Distribuição de pacientes de acordo com Celularidade e Padrão de Infiltração da Medula Óssea.

A análise de variância não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis não mostrou significância estatística ao comparar idade, níveis de DHL e beta2microglobulina entre os diferentes graus de retículo na BMO. Pelo mesmo teste, níveis de linfometria e creatinina não variaram estatisticamente nos pacientes para os diferentes tipos de evolução clínica (anexo 4).

Os estudos de associação entre:

a) grau de retículo em BMO segundo:

* gênero,

* motivo do diagnóstico,

* presença de sintomas constitucionais,

* comprometimento de órgãos linfóides secundários,

Resultados

* classificação clínica de Rai e Binet modificados,

* celularidade,

* padrão de infiltração da medula óssea;

b) presença de infecção ao diagnóstico e pico monoclonal sérico segundo graus de retículo;

c) grau de retículo em citoinclusão de coágulo de AMO segundo BMO;

d) evolução clínica, óbitos relacionados a LLC/LL, padrão de infiltração, presença de pseudofolículos e prolinfócitos segundo risco (Rai e Binet modificados);

foram realizados utilizando o teste de Goodman^{42,43} para contrastes entre e dentro de populações multinomiais e as tabelas resultantes, cujo intervalo de confiança foi menor que 95%, estão demonstradas no anexo 4. Os resultados significativos estatisticamente ($p < 0,05$), são apresentados conforme as tabelas 4 a 7, a seguir:

Tabela 4. Distribuição do grau do retículo segundo motivo do diagnóstico ($p < 0,05$)

Motivo do diagnóstico	Grau I	Grau II	Grau III	Total
Achado laboratorial	7 (31,82%) ^{a,A}	10 (45,45%) ^{a,A}	5 (22,73%) ^{a,A}	22
Manifestações Clínicas	7 (21,21%) ^{a,A}	9 (27,27%) ^{a,A}	17 (51,52%) ^{a,B}	33

a (letra minúscula): compara motivo do diagnóstico em um mesmo grau de retículo; *A, B* (letras maiúsculas): compara graus de retículo, dentro do mesmo motivo de diagnóstico.

Tabela 5a. Distribuição de estratificação de risco segundo padrão de infiltração ao diagnóstico ($p < 0,05$)

Padrão de Infiltração	Risco baixo	Risco Intermediário	Risco alto	Total
Intersticial/Nodular	11 (25,00%) ^{a,A}	21 (47,73%) ^{a,A}	12 (27,27%) ^{a,A}	44
Difuso maciço	2 (7,41%) ^{a,A}	15 (55,56%) ^{a,B}	10 (37,04%) ^{a,AB}	27

a, b (letras minúsculas): compara padrões de infiltração dentro de um mesmo risco; *A, B* (letras maiúsculas): compara tipos de risco, dentro de um mesmo padrão de infiltração.

Resultados

Tabela 5b. Distribuição do padrão de infiltração da medula óssea ao diagnóstico segundo estratificação de risco ($p < 0,05$)

Estratificação de Risco	Intersticial/Nodular	Difuso maciço	Total
Baixo	11 (84,62) ^{a,B}	2 (15,38) ^{a,A}	13
Intermediário	21 (58,33) ^{a,A}	15 (41,67) ^{a,A}	36
Alto	12 (54,55) ^{a,A}	10 (45,45) ^{a,A}	22

a (letra minúscula): compara tipos de risco em um mesmo padrão de infiltração; *A,B* (letras maiúsculas): compara padrões de infiltração, dentro do estrato de risco em consideração.

Tabela 6. Distribuição da presença de pseudofolículos e prolinfócitos (P/P) segundo estratificação de risco ($p < 0,05$)

Estratificação de Risco	Presença P/P	Ausência P/P	Total
Baixo	3 (23,08%) ^{a,A}	10 (76,92%) ^{a,B}	13
Intermediário	9 (25,00%) ^{a,A}	27 (75,00%) ^{a,B}	36
Alto	7 (31,82%) ^{a,A}	15 (68,18%) ^{a,A}	22

a (letra minúscula): compara estratos de risco entre presença ou ausência de pseudofolículos e prolinfócitos; *A,B* (letras maiúsculas): compara categorias de resposta (pseudofolículos e prolinfócitos), dentro de um mesmo grupo de risco.

Tabela 7. Distribuição da evolução clínica segundo risco ao diagnóstico ($p < 0,05$)

Estratificação de Risco	Remissão Prolongada	Evolução alto grau	Refratariedade à QT	Total
Baixo	4 (28,57%) ^{a,A}	4 (28,57%) ^{a,A}	6 (42,86%) ^{a,A}	14
Intermediário	6 (15,00%) ^{a,A}	15 (37,50%) ^{a,AB}	19 (47,50%) ^{a,B}	40
Alto	2 (8,33%) ^{a,A}	10 (41,67%) ^{a,B}	12 (50,00%) ^{a,B}	24

a (letra minúscula): compara tipos de estratificação de risco em uma mesma forma de evolução clínica; *A, B* (letras maiúsculas): compara as formas de evolução clínica, dentro do mesmo risco.

- *Achados de Análise de AMO e BMO*

Dos 162 pacientes, em 101/162 (62,4%) foi possível análise da citoinclusão de coágulo de AMO em conjunto com a BMO (figura 8); 8/162 (5,2%) apresentaram celularidade baixa (normal para idade, figura 4a); 65/162 (40,0%), intermediária (figura 4b) e 89/162 (54,8%), alta/hipercelular (figura 4c); 103/162

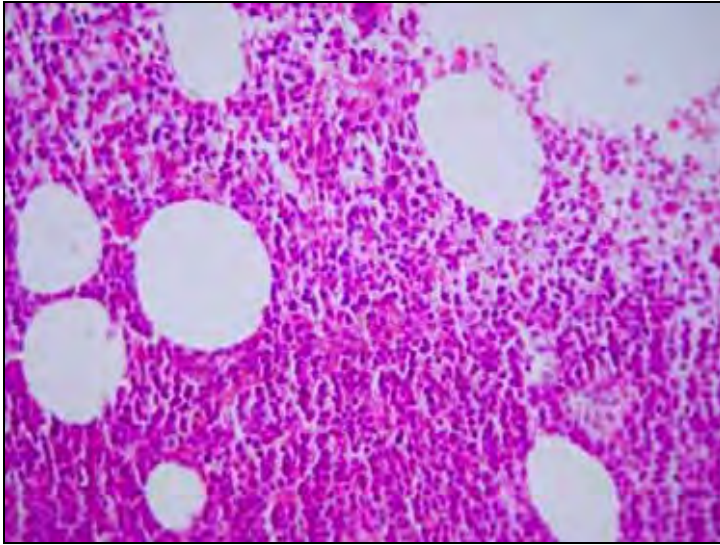


Figura 8 – a: infiltração de medula óssea, padrão difuso/macizo. AMO, HE, 400x.

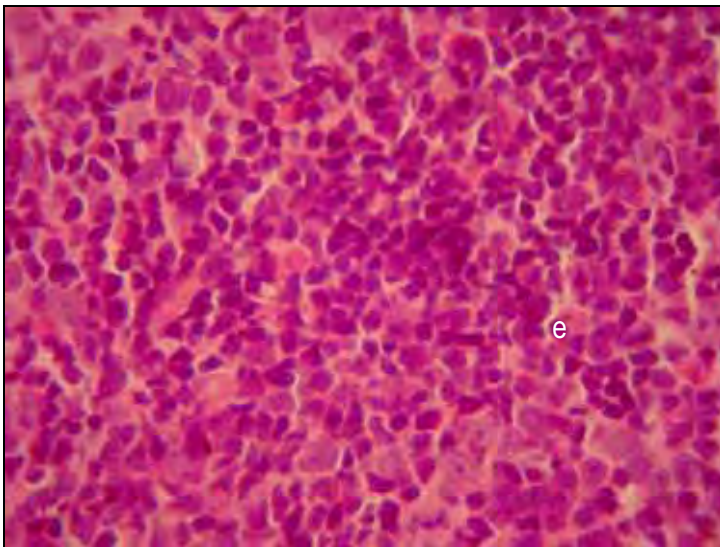


Figura 8 – b: infiltração de medula óssea, padrão difuso/macizo. BMO, HE, 400x.

Resultados

(63,6%) tinham padrão de infiltração intersticial e/ou nodular (figura 5a) e 59/162 (36,4%), difuso/maciço (figura 5b), repetindo a mesma distribuição evidenciada quando a casuística era de 79 pacientes, na análise clínica conjunta. A presença de formação de pseudofolículos, com prolinfócitos (figura 6), nas áreas de infiltração neoplásica da medula óssea, ocorreu em 47/162 (28,9%). O estudo histoquímico de impregnação pela prata foi realizado em 115/162 (71,0%) pacientes e a distribuição, segundo graus de retículo na BMO, foi de 34/115 (29,6%) com grau I (figura 7a); 39/115 (33,9%), grau II (figura 7c) e 42/115 (36,5%, figura 7e) tinham reticulina grau III. 143/162 foram estudados quanto à expressão da proteína ZAP-70, pela técnica de imuno-histoquímica, tendo sido encontrados 26/143 (18,2%) positivos (figura 9).

O estudo de associação entre:

a) grau de retículo em BMO segundo:

* celularidade,

* padrão de infiltração da medula óssea;

b) grau de retículo em citoinclusão de coágulo de AMO segundo BMO;

c) estudo imuno-histoquímico de proteína ZAP-70 segundo:

* grau de retículo em BMO;

* grau de retículo em citoinclusão de coágulo de AMO;

* presença de pseudofolículos e prolinfócitos;

* padrão de infiltração de BMO;

* celularidade;

foi realizado utilizando teste de Goodman^{42,43} para contrastes entre e dentro de populações multinomiais e as tabelas resultantes, cujos resultados foram todos significativos estatisticamente ($p < 0,05$), são apresentados conforme as tabelas 8 a 15, a seguir:

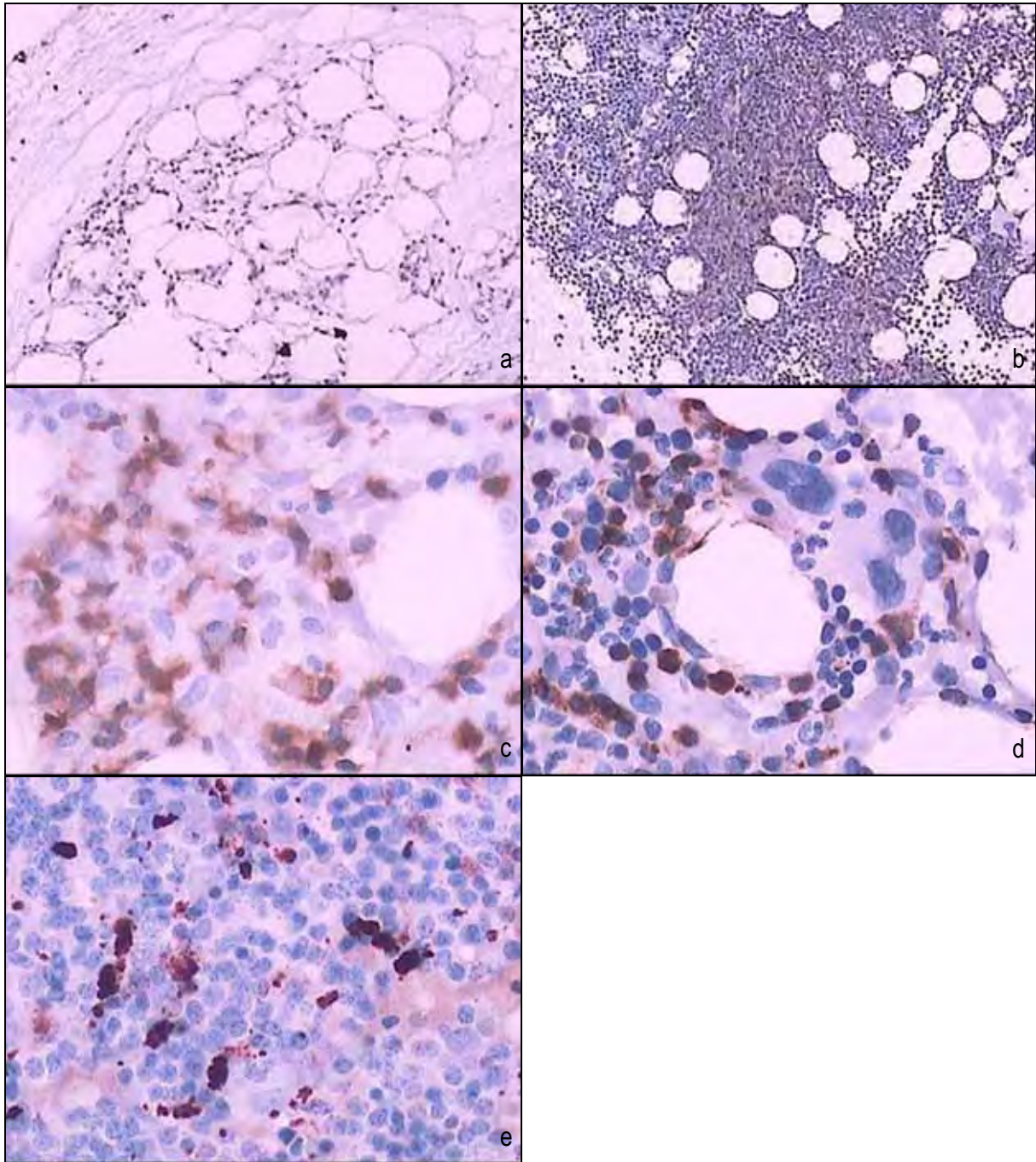


Figura 9 – Estudo imuno-histoquímico de expressão da proteína ZAP-70; **a**: ZAP-70 positivo, infiltração intersticial, em caso arquivado há 11 anos, BMO, 400x; **b**: ZAP-70 positivo, infiltração padrão difuso/macizo, BMO, 400x; **c**: ZAP-70 positivo, BMO, 400x; **d**: ZAP-70 positivo, AMO correspondente ao caso anterior, 400x; **e**: ZAP-70 negativo, controle interno de reação IHQ em linfócitos T, AMO, 400x.

Resultados

Tabela 8. Distribuição do grau do retículo de AMO segundo BMO ($p < 0,05$)

Retículo BMO/AMO	Grau I	Grau II	Grau III	Total
Grau I	35 (97,22%) ^{b,B}	1 (2,78%) ^{a,A}	0 (0,00%) ^{a,A}	36
Grau II	5 (5,15%) ^{a,A}	26 (78,79%) ^{b,B}	2 (6,06%) ^{a,A}	33
Grau III	2 (6,25%) ^{a,A}	3 (9,38%) ^{a,A}	27(84,38%) ^{b,B}	32

a, b (letras minúsculas): compara graus de retículo à BMO em um mesmo grau de retículo ao AMO; A, B (letras maiúsculas): compara graus de retículo ao AMO, dentro do mesmo grau de retículo à BMO.

Tabela 9. Distribuição de celularidade da medula óssea segundo grau do retículo ($p < 0,05$)

Retículo BMO	Hipocelular	Normo ou Hiper celular	Total
Grau I	2 (5,90%) ^{a,A}	32 (94,10%) ^{a,B}	34
Grau II	4 (10,30%) ^{a,A}	35 (89,70%) ^{a,B}	39
Grau III	0 (0,00%) ^{a,A}	42 (100,00%) ^{a,B}	42

a, b (letras minúsculas): compara graus de retículo à BMO no tipo de celularidade em consideração; A, B (letras maiúsculas): compara tipos de celularidade, dentro do mesmo grau de retículo à BMO.

Tabela 10. Distribuição do padrão de infiltração segundo grau do retículo ($p < 0,05$)

Retículo BMO	Nodular/Intersticial	Difuso/maciço	Total
Grau I	26 (76,50%) ^{a,B}	8 (23,50%) ^{a,A}	34
Grau II	21 (53,80%) ^{a,A}	18 (46,20%) ^{a,A}	39
Grau III	26 (61,90%) ^{a,A}	16 (38,10%) ^{a,A}	42

a (letra minúscula): compara graus de retículo à BMO em um mesmo padrão de infiltração; A, B (letras maiúsculas): compara padrões de infiltração, dentro de um mesmo grau de retículo.

Tabela 11. Distribuição do ZAP-70 segundo celularidade da BMO ($p < 0,05$)

Celularidade	ZAP-70 positivo	ZAP-70 negativo	Total
Hipocelular	1 (12,50%) ^{a,A}	7 (87,50%) ^{a,B}	8
Normo ou Hiper celular	15 (12,00%) ^{a,A}	110 (88,00%) ^{a,B}	125

a,b (letras minúsculas): compara grupos quanto à celularidade (normal ou alterada para a idade) em uma mesma apresentação quanto ao ZAP-70; A,B (letras maiúsculas): compara grupos quanto à positividade ou não de ZAP-70, dentro de um mesmo padrão de celularidade.

Resultados

Tabela 12. Distribuição do ZAP-70 segundo padrão de infiltração à BMO ($p < 0,05$)

Padrão de Infiltração	ZAP-70 positivo	ZAP-70 negativo	Total
Intersticial/Nodular	11 (11,30%) ^{a,A}	86 (88,70%) ^{b,B}	97
Difuso maciço	15 (32,60%) ^{b,A}	31 (67,40%) ^{a,B}	46

a,b (letras minúsculas): compara tipos de padrão de infiltração à BMO em uma mesma apresentação quanto ao ZAP-70; A,B (letras maiúsculas): compara grupos quanto à positividade ou não de ZAP-70, dentro de um mesmo padrão de infiltração.

Tabela 13. Distribuição do ZAP-70 segundo formação de pseudofolículos e prolinfócitos à BMO ($p < 0,05$)

Pseudofolículos e Prolinfócitos	ZAP-70 positivo	ZAP-70 negativo	Total
Presença	12 (29,30%) ^{b,A}	29 (70,70%) ^{a,B}	41
Ausência	14 (13,70%) ^{a,A}	88 (86,30%) ^{b,B}	102

a,b (letras minúsculas): compara padrão de apresentação da BMO quanto à formação de pseudofolículos e prolinfócitos em uma mesma apresentação quanto ao ZAP-70; A,B (letras maiúsculas): compara grupos quanto à positividade ou não de ZAP-70, dentro de um mesmo perfil de formação de pseudofolículos e prolinfócitos.

Tabela 14. Distribuição do ZAP-70 segundo grau de retículo à BMO ($p < 0,05$)

Retículo BMO	ZAP-70 positivo	ZAP-70 negativo	Total
Grau I	5 (8,90%) ^{a,A}	51 (91,10%) ^{b,B}	56
Grau II ou III	21 (25,60%) ^{b,A}	61 (74,40%) ^{a,B}	82

a,b (letras minúsculas): compara graus de retículo à BMO em uma mesma apresentação quanto ao ZAP-70; A,B (letras maiúsculas): compara grupos quanto à positividade ou não de ZAP-70, dentro de um mesmo padrão de retículo.

Tabela 15. Distribuição do ZAP-70 segundo grau de retículo à AMO ($p < 0,05$)

Retículo BMO	ZAP-70 positivo	ZAP-70 negativo	Total
Grau I	6 (17,70%) ^{a,A}	28 (82,30%) ^{a,B}	34
Grau II	6 (25,00%) ^{a,A}	18 (75,00%) ^{a,B}	24
Grau III	7 (25,90%) ^{a,A}	20 (74,10%) ^{a,B}	27

a,b (letras minúsculas): compara graus de retículo à AMO em uma mesma apresentação quanto ao ZAP-70; A,B (letras maiúsculas): compara grupos quanto à positividade ou não de ZAP-70, dentro de um mesmo padrão de retículo.

DISCUSSÃO

A mediana de idade desta amostra é concordante com a literatura corrente, em que LLC/LL concentra-se em pacientes de idade mais avançada, em torno de 65 anos^{1,3,4}. A relação entre os gêneros mostra-se de 1,26:1, com discreto predomínio entre homens; entretanto, bem menor que o descrito em estudo epidemiológico americano⁵ e casuística da Universidade Federal Paulista³, que relatam uma incidência em torno de 1,9:1. Talvez a característica deste Serviço de atendimento de população de menor nível sócio-econômico, onde a emigração em busca de trabalho na capital pode fazer diferença na distribuição da população geral entre homens e mulheres ou, ainda, as taxas de vida média entre os gêneros nos dois países entre as décadas de 70 a 90, poderiam explicar esta diferença. A relação entre brancos e negros foi de 3,7:2,5, concordante com os autores^{1,3,4} e normal para a população assistida por este Serviço. Dados epidemiológicos de razoável casuística, sobre pacientes com diagnóstico de LLC, não foram encontrados na literatura pertinente³.

O fato de 40,5% dos pacientes terem sido admitidos com achado ocasional de LLC/LL poderia dever-se a múltiplos eventos associados. Primeiro, pelo caráter acumulativo da doença, cuja cinética é lenta, dando-lhe a possibilidade de ser descoberta sem sintomas clínicos que tenham levado o doente à procura de assistência médica; entretanto, é possível que haja interferência do nível sócio-cultural da maioria dos pacientes deste estudo, que poderiam postergar a busca de

Discussão

avaliação médica. Este fato poderia ser constatado nos quase três quartos dos pacientes que apresentavam massa tumoral perceptível ao exame físico, à admissão, ao que se soma o fato de que quase 70% dos pacientes, apesar de terem sido diagnosticados a partir de achado incidental, já se encontravam em estádios clínicos de riscos intermediário e alto, conforme já descrito por outros autores¹³. O achado laboratorial motivando diagnóstico inicial poderia ser atribuído, ainda ao envelhecimento mundial da população, com aumento das taxas de sobrevivência, também poderia ter contribuído para estas estatísticas, talvez pela maior exposição a patógenos que aumentariam suscetibilidade ao câncer. Assim também, os reflexos da implantação do Sistema Único de Saúde (SUS) no fim da década de 80, com a universalização da assistência médica nos anos subsequentes, poderiam ter contribuído no maior acesso aos laboratórios clínicos e em sua postura de busca ativa de doentes (à medida que são observados achados anormais na rotina diagnóstica em Hematologia), bem como no aumento do percentual de diagnóstico de LLC/LL através das décadas, com 17% na década de 80, 25% na década seguinte e mais de 50% diagnosticados entre os anos de 2000 e 2008.

Embora 225 pacientes tenham sido identificados com diagnóstico de LLC/LL, 162 foram passíveis de análise laboratorial, uma vez que 63 foram excluídos por falta de material para estudo, o que se deveu, possivelmente, a: 1) introdução de rotina do procedimento de BMO aconteceu a partir do final da década de 80, porque até então o Serviço não dispunha de agulhas próprias para sua realização; 2) foi nesta época em que se instituiu e consolidou, pelas Sociedades Médicas especialistas, a BMO como arma diagnóstica; 3) a formação de patologistas

Discussão

e, nestas Instituições também de hematologistas, com capacitação para avaliação adequada de morfologia de medula óssea; 4) por tratar-se de um Serviço de Ensino, muitos casos tiveram sua avaliação, à admissão, prejudicada pelas coletas inadequadas por aprendizes ainda em aperfeiçoamento (especialmente daqueles pacientes de mais difícil acesso à medula óssea por: obesidade, restrição postural ou fibrose reticulínica), avaliações estas que não puderam ser refeitas antes da introdução de terapêutica ao diagnóstico, nos pacientes com tal indicação clínica.

Observando-se a quantidade de dados clínicos não acessáveis por ausência dos prontuários no arquivo médico, atribui-se à falta de educação da escola médica quanto a registros de dados clínicos, em parte pelo próprio pensamento da época de não controlar a saída de prontuários; ou de que bastava ao médico assistente o conhecimento do raciocínio diagnóstico, não atribuindo importância ao registro destes dados para estudos futuros. Os dados clínicos de pacientes avaliados mais recentemente (última década) revelam, contudo, um maior respeito dispensado pela Instituição à importância destes registros, não só porque se tornou lei, quanto pela formação de “nova” mentalidade, que vislumbra a necessidade de estudos epidemiológicos em bases populacionais, para dados de evolução natural e sob interferência médica das doenças, bem como de substratos para estudos com técnicas emergentes.

Diante da postura adotada de LLC/LL como doença acumulativa e que não era responsabilizada pela morte de idosos, Rai e Binet foram importantes marcos ao proporem estratificação de riscos de progressão de doença baseados em dados clínico-laboratoriais, que eram a arma diagnóstica disponível à época. Nosso

Discussão

estudo revela-se em acordo com o atualmente descrito^{3,6,7,12,30}, quanto à apresentação e estratificação de risco segundo Classificação modificada de Rai e Binet, com menos de um quinto da casuística em estágio inicial. Até o momento, os sistemas de estadiamento clínico ainda possuem singular papel de valor prognóstico independente, pela fácil utilização e reprodutibilidade, além de mostrarem-se adequados na determinação de início de terapêutica.

Como apresentados nas figuras 1 e 2, os resultados obtidos validam o conceito de que, em sendo doença acumulativa (e menos proliferativa), os pacientes que se apresentaram com risco baixo (Rai 0/Binet A) também foram aqueles com remissão prolongada, como seria o esperado. Em oposição, os de estádios avançados (Rai III/IV e Binet C) estão incluídos entre aqueles com refratariedade à quimioterapia. Quanto ao grau intermediário (Rai II/Binet B), era de se esperar que parte dos doentes manifestasse polos entre o baixo e alto risco; entretanto, neste particular, observou-se que para quase 13% dos pacientes, embora em estágio clínico intermediário, a refratariedade à quimioterapia foi uma constante. Isto poderia ser justificado por: 1) carga tumoral à admissão ter caráter proliferativo preponderante (padrão de infiltração maciço/difuso, presença de pseudofolículos e prolinfócitos, como vistos nas tabelas 5b e 6, respectivamente); 2) idade dos doentes, com comorbidades e possível apresentação citogenética influenciada por múltiplos agressores, com prejuízo de *status performance*, motivo para uso de quimioterapias adaptadas. Tal raciocínio será retomado a seguir, em análise estatística multivariada, de resultados exibidos na tabela 6. Talvez, parte destes 12,8% seja de pacientes com LLC/LL não mutada e/ou com alterações tipo del11,

Discussão

mutações do p53, entre outras e, por isso, geneticamente programados para caráter mais agressivo da doença. Possivelmente, marcadores moleculares atuais poderão responder a essas questões.

Com relação à ocorrência de infecções ao diagnóstico, sabe-se que pacientes portadores de LLC/LL têm graus de imunossupressão relativos (dificuldades de opsonização para *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, produção defeituosa de linfócitos B e imunoglobulinas, graus de invasão esplênica prejudicando ativação do sistema monocítico-macrofágico, estado hipercatabólico pela neoplasia e, obviamente, a idade)^{13,44}. É sabido que a progressão de doença aumenta a frequência de infecção nestes doentes, inclusive com estimativas de que até metade dos pacientes com LLC/LL padecem de infecção de repetição, possivelmente pela estreita relação entre queda dos níveis de imunoglobulina de superfície com estádios mais avançados de doença. Outro contribuinte para a prevalência de infecções nesta população seria o tratamento quimioterápico, com reconhecido efeito imunossupressor, especialmente da atividade dos linfócitos T e de aplasias prolongadas, com neutropenias mais graves e prejuízo de imunidade celular. Quanto ao sítio de manifestação, a literatura referencia o trato respiratório como o principal, muito de longe seguido pelo geniturinário e pele^{45,46}. É possível que tal ocorrência se deva à deficiência, especialmente de IgA, além de disfunção associada do Sistema de Complemento, com resposta inadequada à antibioticoterapia usualmente instituída⁴⁷. Este estudo mostrou pacientes seguindo o mesmo perfil, com aproximadamente 23% sendo admitidos com infecção, todas de vias aéreas superiores e/ou inferiores.

Discussão

A ocorrência de pico monoclonal em perfil eletroforético no soro, nas regiões beta e gama, em mais da metade dos pacientes deste estudo, reforça as hipóteses acima descritas, uma vez que a produção errônea de imunoglobulinas clonais desvia a produção daquelas normais^{13,20}.

Ao se discutir conduta terapêutica em LLC/LL, pelo caráter de doença indolente, pouco relacionada a óbito em pacientes idosos; com estágio clínico precoce (Rai 0/I, Binet A); é possível conduta expectante, com prática consagrada tipo “*watch and wait*” (permitida pela característica de que a introdução de quimioterapia nessa fase não se relacionaria com aumento de sobrevida¹³), o que pode ser observado em um quinto dos pacientes deste estudo, dos quais foi possível avaliar dados clínico-laboratoriais iniciais e de evolução. Para garantir que o momento de intervenção com quimioterapia não fosse retardado, tais pacientes permaneceram sob observação clínico-laboratorial, em busca de aumento de massa tumoral ao exame clínico ou surgimento de infecções de repetição; sinais de comprometimento funcional de medula óssea, como anemia e plaquetopenia, às quais se associam importantes comorbidades nessa faixa etária; tempo de duplicação de linfometria (menor ou maior que seis meses); e características citológicas das células tumorais (persistência de forma usual ou aumento do número de prolinfócitos ou transformação blástica – síndrome de Richter, determinando possível aumento da capacidade replicativa). Apesar de uma corrente literária não propor a realização de mielograma e biópsia de medula óssea naqueles pacientes em que se opta por observação clínica como primeira conduta¹⁰, outros acreditam que sua observação ao diagnóstico possa trazer subsídios para a necessidade de

Discussão

introdução precoce de quimioterapia, uma vez que permite avaliação de fatores de mau prognóstico, como padrão de infiltração difuso/maciço pelas células tumorais, presença de pseudofolículos e prolinfócitos, além de ser útil para diagnóstico diferencial com outras doenças linfoproliferativas de baixo grau com invasão medular^{12,38}. Este estudo reafirmou a prática adotada no Serviço de avaliação da medula óssea à admissão, o que permitiu as múltiplas observações que serão discutidas a seguir.

Quanto à escolha da terapêutica, é possível que a composição do quadro clínico e laboratorial, junto à avaliação de comorbidades para cada doente, tenha delineado a escolha de esquemas quimioterápicos menos agressivos (CVP, clorambucil e corticóide como monoterapia) como primeira linha nestes pacientes, por terem sido considerados mais apropriados para essa faixa etária, uma vez que o objetivo do tratamento teve como alvo o doente, em sua totalidade, e não exclusivamente a doença. A figura 2 revela respostas diferentes aos esquemas quimioterápicos, com pacientes permanecendo em remissão prolongada após primeira terapêutica, outros com progressão de doença ou refratariedade ao tratamento, necessitando de múltiplos protocolos adaptados^{37,48}, refratariedade esta que poderia ter contribuído para piora de qualidade e encurtamento de sobrevida. Resultados variantes são encontrados na literatura^{13,48,49}, onde: remissão completa após terapêutica inicial pode acontecer entre zero até 63% dos pacientes; refratariedade, identificada como perda de resposta aos análogos das purinas ou por doença em progressão, dentro de seis meses, de uma resposta parcial ou completa ao tratamento, dados estes concordantes com os resultados do nosso estudo, que

Discussão

variou entre 40-60%. Uma crítica feita por Montserrat et al⁴⁸ é a não separação, pela maioria dos estudos publicados, desse grupo refratário desde o início, em relação àqueles de doentes que têm progressão de doença e que teriam melhor prognóstico, o que dificultaria a interpretação dos resultados obtidos com regimes de salvamento.

Assim, quanto à evolução desses pacientes após o diagnóstico clínico-laboratorial de LLC/LL, a casuística foi separada em grupos de pacientes que tiveram remissão prolongada (dois anos ou mais sem progressão de doença), aqueles que apresentaram progressão de doença para malignidade de alto grau, e outros que se mostraram refratários à introdução de quimioterapia, com necessidade de múltiplos esquemas seriados. Aproximadamente 15% dos pacientes pertence ao primeiro grupo, os quais corresponderam àqueles com uma combinação de fatores de bom prognóstico conhecidos, tais como estágio clínico de baixo risco, velocidade de duplicação de linfometria menor que seis meses, padrão de infiltração intersticial e/ou nodular, ausência de pseudofolículos e prolinfócitos, já denominados por Montserrat et al¹² como pacientes com *smoldering* LLC, bem como fenótipo mutado de expressão do gene que codifica porção variável de cadeia pesada de imunoglobulina^{14,17,28}. Quase 37% dos pacientes mostraram-se em progressão de doença, apesar de apresentarem-se com risco intermediário, com fatores de bom e mau prognóstico. Entretanto, como observamos ao sobrepôr as figuras 1 e 2, neste grupo de risco, houve pacientes com comportamento já de risco alto, com refratariedade à terapêutica inicial, possivelmente por trazerem consigo marcadores independentes de prognóstico ruim (padrão de infiltração difuso, expressão da proteína ZAP-70) e outros fatores de alta associação com doença agressiva

Discussão

(presença de pseudofolículos e prolinfócitos, velocidade de duplicação de linfometria, níveis de beta2microglobulina e desidrogenase láctica). Assim também, é possível observar nesta subpopulação, de risco intermediário mas com refratariedade à terapêutica, graus aumentados de reticulina e hiper celularidade para faixa etária, em 11 e 15 pacientes, respectivamente. Apesar de 30,8% dos pacientes serem de alto risco ao diagnóstico, aproximadamente metade da casuística total mostrou-se com comportamento agressivo, o que reforça a idéia de imposição da carga tumoral sobre o hospedeiro, com complicações associadas, como importante fator de mau prognóstico.

Conforme a literatura, a maioria dos pacientes com diagnóstico de LLC/LL morre de outras causas que não a própria doença^{1,5,13}, apesar do número de óbitos relacionados à progressão de doença, inclusive síndrome de Richter; refratariedade terapêutica; acentuado grau de anemia com aumento de necessidade transfusional e consequências de politransfusão. Entretanto, pela fragilidade orgânica atribuível à faixa etária e constante associação de comorbidades outras, pudemos observar que um décimo desta casuística teve óbito relacionado à LLC, cuja principal causa, consoante com o já descrito⁴⁴⁻⁴⁷, foi o comprometimento infeccioso, secundário à doença ou inerente à quimioterapia, e que ocorreu principalmente em pacientes do grupo de baixo risco. A fim de minimizar complicações infecciosas e melhorar qualidade de sobrevivência, há propostas de introduzir, na rotina terapêutica, calendários de vacinação, correção precoce de estados de anemia, acompanhamento sistemático para identificação de segunda neoplasia, além de adequado manuseio de quadros infecciosos⁴⁴. É possível que o número da amostra

Discussão

tenha contribuído para viés de observação quanto à prevalência de óbito junto aos grupos de risco, uma vez que se espera 70% de sobrevida em 12 anos nos estádios precoces¹³. Contudo, sobrepondo-se dados destes pacientes de baixo risco que evoluíram a óbito, quanto à celularidade da medula óssea, padrão e percentual de infiltração, além de graus de reticulina, houve preponderância daqueles que identificam maior e mais agressivo comportamento de carga tumoral nestes pacientes.

Ainda na correlação clínico-laboratorial, a respeito do comportamento clínico de pacientes com diagnóstico em idade mais jovem (menores de 50 anos), pudemos observar que 6/79 pacientes desta casuística compunham este subgrupo. Embora LLC seja uma doença de idosos, estudos relatam sua ocorrência cada vez mais freqüente em faixas etárias mais jovens^{3,9,30,49,50}; contudo, não se tem encontrado importante diferença nas taxas de resposta à terapêutica, forma de apresentação ou tempo de remissão entre pacientes mais jovens e mais velhos. Pode-se perceber, ao observar estes seis pacientes, que: três tinham padrão de infiltração medular tipo difuso/maciço, cinco com celularidade aumentada (mesmo corrigida para a idade); três apresentaram formação de pseudofolículos e prolinfócitos; e cinco, reticulina grau III, e dentre estes últimos, quatro foram refratários ao tratamento e um apresentou remissão prolongada. A única paciente que apresentou reticulina grau I, neste grupo, era ZAP-70 negativo e teve evolução com remissão prolongada. Apesar de a literatura não estabelecer maior gravidade neste subgrupo, talvez porque suportem esquemas plenos e mais agressivos de

Discussão

quimioterapia, a prática clínica, nesta casuística, revelou LLC como doença mais agressiva nesta população.

Apesar do nível sócio-cultural, houve apenas 5% de abandono de tratamento entre os pacientes observados clinicamente nesse estudo, o que poderia mostrar um perfil de pessoas comprometidas com a equipe de Saúde, mesmo aqueles com maiores dificuldades de locomoção e/ou acesso, além de ressaltar a importância da conduta de busca ativa secundária, com (re)convocação de pacientes ausentes e solicitações de auxílio social para esses doentes.

Quanto aos achados histológicos, no que pode ser observado na literatura, não há descrições de pacientes com LLC/LL quanto à celularidade da medula óssea à admissão, talvez pela conduta menos invasiva¹⁰ de postergar coleta de BMO nestes pacientes. No presente estudo, observou-se que 95% dos pacientes apresentaram celularidade medular superior à esperada para idade, resultante de maiores graus de infiltração por células neoplásicas. Assim também, esta hipercelularidade muitas vezes esteve associada a alterações histológicas como a hipoplasia de linhagens hematopoéticas normais, neovascularização e aumento do arcabouço reticulínico. Talvez este último, usando raciocínio fisiopatológico em LLC/LL, possa se tratar de mais um fator adverso, apresentando-se em conjunto com fatores de mau prognóstico já conhecidos.

A tabela 3, referente às medidas descritivas dos pacientes segundo: idade, tempo de evolução até a admissão, leucometria e linfometria, níveis de DHL, beta2microglobulina, ácido úrico e percentual de infiltração da medula óssea (marcadores de carga tumoral), creatininemia e glicemia (marcadores de

Discussão

comorbidades dos pacientes nessa faixa etária), revela que: 1) apesar de a mediana de idade estar em concordância com a literatura, as variações entre valor mínimo e máximo puderam estabelecer a diversidade da amostra, com pacientes muito jovens (terceira década) até aqueles nonagenários; 2) o tempo de história clínica progressa em meses, informado pelos pacientes à admissão, apresentou variabilidade importante, reforçando o caráter de doença acumulativa e indolente, além de retomar a discussão de tratar-se de pessoas com dificuldades sócio-cultural-cognitivas, cujas informações, pouco precisas, poderiam sofrer inferências e resultar em prejuízo de avaliação desta variável; 3) as significativas variabilidades da leucometria e linfometria, com desvio padrão maior que a média, nesses doentes, reforça o caráter de diversidade da LLC ou, ainda, podem revelar um viés de número da casuística; entretanto, retomam o conceito tão bem arraigado na literatura de que a cinética é preponderante sobre a quantidade de células neoplásicas nesses doentes; 4) os dados observados para análise de repercussão de carga tumoral, como níveis de DHL, beta2microglobulinemia e uricemia, reforçam a cinética acumulativa lenta, sem retenção de excretas comumente identificados na síndrome de lise tumoral em outras neoplasias hematopoéticas, apesar de a média dos pacientes mostrar alto percentual de infiltração por linfócitos neoplásicos; 5) houve baixa prevalência de disfunção renal, tomando como parâmetro a creatininemia, cujo valor máximo encontrado era o dobro do limite superior de normalidade, porém a média e mediana, revelando valores normais para a faixa etária. Tais achados mostraram que estes pacientes, para esta variável, tiveram menor necessidade de restrição terapêutica de doses plenas; 6) diabetes melito não foi uma comorbidade

Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- 1) A mediana de idade desta amostra é concordante com a literatura corrente, em torno de 65 anos;
- 2) A relação entre os gêneros teve discreto predomínio entre homens; entretanto, menor que o já descrito;
- 3) A relação entre brancos e negros foi de 3,7:2,5, concordante com a literatura;
- 4) Apesar de 40,5% dos pacientes terem sido admitidos com achado ocasional de LLC/LL, quase 70% dos pacientes já se encontravam em estádios clínicos de riscos intermediário e alto;
- 5) Houve aumento progressivo de diagnóstico de LLC/LL através das décadas, com 17% na década de 80, 25% na década seguinte e mais de 50% diagnosticados entre os anos de 2000 e 2008;
- 6) Dos 225 pacientes identificados com diagnóstico de LLC/LL, 162 foram passíveis de análise laboratorial e em 79 foi possível avaliação de dados clínicos;
- 7) Este estudo corroborou a ainda atual importância dos sistemas de estadiamento clínicos de Rai e Binet na prática clínica, apesar dos novos marcadores moleculares e imunofenotípicos prognósticos independentes em LLC/LL;
- 8) Nosso estudo revela-se em acordo com o atualmente descrito, quanto à apresentação e estratificação de risco segundo Classificação modificada de Rai e Binet, com menos de um quinto da casuística em estágio inicial;

Considerações Finais

- 9) Os resultados obtidos validam o conceito de melhor evolução clínica em pacientes de baixo risco clínico, mas também observam comportamento, em subgrupo de pacientes de grau intermediário, refratários à quimioterapia, semelhante ao dos pacientes de alto risco;
- 10) Com relação à ocorrência de infecções ao diagnóstico, esta casuística foi concordante com a literatura, com aproximadamente 23% sendo admitidos com infecção, todas de vias aéreas superiores e/ou inferiores, inclusive com evidência de pico monoclonal em perfil eletroforético no soro, em mais de 50% dos pacientes;
- 11) A prática de conduta expectante tipo “*watch and wait*”, observada em um quinto dos pacientes deste estudo, foi concordante com a literatura;
- 12) Os esquemas quimioterápicos usados (COP, clorambucil e corticóide como monoterapia), consideraram como alvo o doente, em sua totalidade, e não exclusivamente a doença;
- 13) A distribuição de pacientes segundo evolução clínica foi concordante com a literatura, entretanto, dentre os pacientes de risco clínico intermediário, houve alguns com comportamento já de risco alto, possivelmente por trazerem consigo marcadores independentes e/ou associados a prognóstico ruim, reforçando a imposição da carga tumoral sobre o hospedeiro, com complicações associadas, como importante fator de mau prognóstico;
- 14) Óbitos relacionados a LLC/LL, neste estudo tiveram como principal causa o comprometimento infeccioso, secundário à doença ou inerente à quimioterapia, e ocorreram principalmente em pacientes do grupo de baixo risco.

Considerações Finais

- 15) Apesar de não se ter encontrado diferença nas taxas de resposta à terapêutica, forma de apresentação ou tempo de remissão entre pacientes mais jovens e mais velhos, na literatura, nossos pacientes mais jovens tinham prevalência de marcadores histológicos de mau prognóstico;
- 16) Apenas 5% dos pacientes abandonaram o tratamento, ressaltando a importância da conduta de busca ativa secundária, com (re)convocação de pacientes ausentes e solicitações de auxílio social para esses doentes;
- 17) A BMO ao diagnóstico pode trazer informações importantes para auxílio de definição de conduta terapêutica mais apropriada;
- 18) Para os grupos de risco, celularidade aumentada, padrão de infiltração difuso/maciço, presença de pseudofolículos e graus de retículo aumentados foram importantes fatores relacionados a estádios mais avançados;
- 19) Padrão de infiltração difuso/maciço tem estreita correlação com outros fatores de mau prognóstico, evidenciando o impacto de maior carga tumoral sobre o hospedeiro;
- 20) AMO valida BMO e vice-versa;
- 21) A celularidade não interfere na amostra para avaliação de reticulina, entretanto a combinação retículo *versus* celularidade diverge entre os subgrupos de retículo;
- 22) O padrão de infiltração não interfere na amostra para avaliação de reticulina, entretanto a combinação de retículo grau I com padrão de infiltração nodular e/ou intersticial diverge de todos os outros grupos;
- 23) ZAP-70 não pode ser feito em todos os pacientes, mas foi, também nesta amostra, discriminador de mau prognóstico;

Considerações Finais

- 24) A celularidade e o padrão de infiltração não interferem na expressão imuno-histoquímica de ZAP-70, em AMO ou BMO;
- 25) Os pacientes ZAP-70 positivos apresentaram mais reticulina graus II e III;
- 26) A metodologia de citoinclusão de coágulo de AMO é confiável, relativamente não onerosa e altamente reprodutível, tanto em termos de amostragem, quanto para as colorações específicas de imuno-histoquímica.

Bibliografia

1. Kokhaei P, Palma M, Mellstedt H, Choudhury A. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol.* 2005;16:113-23.
2. Nguyen D, Diamond LW, Braylan RC. Flow cytometry in hematopathology: a visual approach to data analysis and interpretation. New Jersey: Humana Press; 2003.
3. Yamamoto M, Figueiredo VLP. Epidemiologia da leucemia linfocítica crônica e leucemia linfocítica crônica familiar. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2005;27:229-32.
4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2008.
5. Xie Y, Davies SM, Xiang Y, Robison LL, Ross JA. Trends in leukemia incidence and survival in the United States (1973-1998). *Cancer.* 2003;97: 229-35.
6. Jaffe ES, Pittaluga S. The pathology basis for the classification of non-Hodgkin's lymphoma. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, et al. *Hematology: basic principles and practice.* 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005. p. 1379-96.
7. Silla LMR. Leucemia linfóide crônica e linfoma linfocítico de pequenas células: a mesma doença? *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2005;27:263-6.
8. Yee KWL, O'Brien SM. Chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2006;81:1105-29.
9. Mauro RF, Foa R, Giannarelli D, Cordone I, Crescenzi S, Pescarmona E, et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood.* 1999;94:448-54.

Bibliografia

10. Lorand-Metze I. LLC: critérios diagnósticos, imunofenotipagem e diagnóstico diferencial. Rev Bras Hematol Hemoter. 2005;27:233-5.
11. Ravandi F, O'Brien S. Chronic Lymphoid leukemias other than chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. Mayo Clin Proc. 2006;80:1660-74.
12. Montserrat E, Rozman C. Chronic lymphocytic leukemia: present status. Ann Oncol. 1995;6:219-35.
13. De Vita-Jr VT, Hellman S, Rosenberg AS. Câncer: principles & practice of oncology. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
14. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. Blood. 2003;49:44-51.
15. Asaad NY, ABD EI-Wahed MM, Da Woud MM. Diagnosis and prognosis of B-cell Chronic Lymphocyt Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma (B-CLL/SLL) and Mantle Cell Lymphoma (MCL). J Egypt Nat Cancer Inst. 2005;17:279-90.
16. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2003;348:1764-75.
17. Del Giudice I, Morilla A, Osuji N, Matutes E, Morilla R, Burford A, et al. Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leucemia. Cancer. 2005;104:2124-32.

Bibliografia

18. Bosch F, Muntanola A, Gine E, Carrio A, Villamor N, Moreno C, et al. Clinical implications of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006;70:214-7.
19. Schade U, Bock O, Vornhusen S, Jager A, Busche G, Lehmann U, et al. Bone marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is related to immunoglobulin heavy-chain variable region mutations status and expression of 70-kd zeta-associated protein (ZAP-70). *Hum Pathol.* 2006;37:1153-61.
20. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular.* Rio de Janeiro: Ed. Revinter; 1995.
21. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2005;352:804-15.
22. Amin S, Parker A, Mann J. ZAP70 in chronic lymphocytic leukaemia. *Int Biochem Cell Biol.* 2008;40:1654-8.
23. Catherwood MA, Matthews C, Niblock R, Dobbin E, Morris TCM, Alexander HD. ZAP-70 mRNA quantification in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol.* 2006;76:294-8.
24. Vener C, Gianelli U, Cortelezzi A, Fracchiolla NS, Somalvico F, Savi F, et al. ZAP-70 immunoreactivity is a prognostic marker of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Lymphoma.* 2006;47:245-51.
25. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood.* 2003;101:4944-51.

Bibliografia

26. Admirand JH, Rassidakis GZ, Abruzzo LV, Valbuena JR, Jones D, Medeiros LJ. Immunohistochemical detection of ZAP-70 in 341 cases of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Modern Pathol.* 2004;17:954-61.
27. Schweighoffer E, Vanes L, Mathiot A, Nakamura T, Tybulewicz VLJ. Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion. *Immunity.* 2003;18:523-33.
28. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002;100:4609-14.
29. Carreras J, Villamor N, Colomo L, Moreno C, Ramon y Cajal S, Crespo S, et al. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. *J Pathol.* 2005;205:507-13.
30. Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT. *Williams Hematology.* 7th ed. New York: Mc Graw-Hill; 2006. p. 1353.
31. Ru Y, Zhao S, Liu E, Yang Q, Liu J, Pang T, et al. Ultrastructural characteristics of bone marrow in patients with hematological disease: a study of 13 cases. *Ultrastruct Pathol.* 2007;31:327-32.
32. Molica S, Montillo M, Ribatti D, Mirabelli R, Tedeschi A, Ricci F, et al. Intense reversal of bone marrow angiogenesis after sequential fludarabine-induction and alemtuzumab-consolidation therapy in advanced chronic lymphocytic leukemia. *Haematol Hematol.* 2007;92:1367-74.
33. Sanerkin NG. Stromal changes in leukaemic and related bone marrow proliferations. *J Clin Pathol.* 1964;17:541-7.

Bibliografia

34. Kuter DJ, Bain B, Mufti G, Bagg A, Hasserjian RP. Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *Br J Haematol.* 2007;139:351-62.
35. Shanafelt TD, Kay NE. The clinical and biologic importance of neovascularization and angiogenic signaling pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol.* 2006;33:174-85.
36. Kini AR, Kay NE, Peterson LC. Increased bone marrow angiogenesis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2000;8:1414-8.
37. Molica S, Vacca A, Ribatti D, Cuneo A, Cavazzini F, Levato D, et al. Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002;100:3344-51.
38. Bain BJ, Clarck DM, Lampert IA, Wilkins BS. *Bone Marrow Pathology.* Oxford: Blackwell Science; 2001.
39. Tam CS, Keating MJ. Chemoimmunotherapy of chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20:479-98.
40. Resende LSR. *Mielopatia Infiltrativa por Paracoccidioidomicose [Tese].* Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2000.
41. Perkins SL. Normal blood and bone marrow values in humans. In: Lee GM, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. *Wintrobe's Clinical Hematology.* 10^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999. v. 2, p.2738-48.
42. Goodman LA. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Ann Math Stat.* 1964;35:716-25.
43. Goodman LA. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics.* 1965;7:247-54.

Bibliografia

44. Garnica M, Nucci M. Epidemiologia, tratamento e profilaxia das infecções na leucemia linfóide crônica. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2005;27:290-300.
45. Morrison VA. The infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol.* 1998;25:98-106.
46. Ahmed S, Siddiqui AK, Rossoff L, Sison CP, Rai KR. Pulmonary complications in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2003;98:1912-7.
47. Heath ME, Cheson BD. Defective complement activity in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol.* 1985;19:63-73.
48. Montserrat E, Moreno C, Esteve J, Urbano-Ispizua A, Gine E, Bosch F. How we treat refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2005;2:1-21.
49. Vasconcelos Y. Marcadores de prognóstico em leucemia linfocítica crônica. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2005;27:253-6.
50. Montserrat E. Leucemia Linfóide Crônica. In: Degos L, Linch DC, Löwenberg B. *Text book of malignant Hematology.* London: Ed Taylor & Francis; 2005. p. 521-42.
51. Malerbi DA, Franco LJ, and the Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. *Diabetes Care.* 1992;15:509-16.
52. Foucar K. *Bone marrow pathology.* Chicago: ASCP Press; 2001.
53. Zanotti R, Ambrosetti A, Lestani M, Ghia P, Pattaro C, Remo A, et al. ZAP-70 expression, as detected by immunohistochemistry on bone marrow biopsies from early-phase CLL patients, is a strong adverse prognostic factor. *Leukemia.* 2007; 21:102-9.

Bibliografia

54. Letestu R, Rawstron A, Ghia P, Villamor N, Boeckx LN, Boettcher S, et al. Evaluation of ZAP-70 Expression by Flow Cytometry in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Multicentric International Harmonization Process. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006;70:309-14.
55. Sheikholeslami MR, Jilani I, Keating M, Uyeji J, Chen K, Kantarjian H, et al. Variations in the Detection of ZAP-70 in Chronic Lymphocytic Leukemia: Comparision with *IgV_H* Mutation Analysis. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006;70:270-5.
56. Rouillet M, Sargent R, Pasha T, Cajiao I, Elstrom R, Smith T, et al. ZAP70 expression assessed by immunohistochemistry on peripheral blood: a simple prognostic assay for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007;154:471-6.
57. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use de avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparision between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;29:577-80.

APÊNDICE 1 – Planilha para revisão de prontuário de pacientes com LLC/LL

Nome _____ Sexo: () Masculino () Feminino
 Registro UNESP _____ Estado Civil: () Solteiro (a); () Casado(a);
 Data de Admissão _____ () Viúvo(a); () Divorciado(a)
 Data de Nascimento _____ Etnia: () Branca () Parda () Negra () Indígena
 () Oriental () Mestiça

Tempo de início dos sintomas à ADMISSÃO _____

Hipótese Diagnóstica proposta por: () achado laboratorial () achado clínico

SINTOMAS INICIAIS/ EXAME FÍSICO

() Febre () Sudorese Noturna () Prurido
 () Astenia/ Prostração/ Hiporexia
 () Perda ponderal () <10% em 6 meses () >10% em 6 meses
 () Adenomegalias () Hepatomegalia () Esplenomegalia
 () Infecções (Qual? _____)
 () Outros _____

EXAMES COMPLEMENTARES INICIAIS

Hb _____g/dl PQT _____/mm³ Glicemia _____mg/dl IgM _____
 Ht _____% DHL _____UI/dl Ác. Úrico _____mg/dl IgG _____
 GB _____/mm³ Beta2mic __ mg/dl Cdireto ()+ ()neg ()NA IgE _____
 Li _____/mm³ Creat _____mg/dl IgD _____ IgA _____

EPS () Pico monoclonal () alfa () beta1 () beta2 () gama

Imagens (Rx tórax/ USG abdome/ TCs):

AMO/BMO (nº dos exames) – anexar cópias dos laudos

CONDUTA INICIAL: () Observar (“*watch and wait*”) () Iniciar QT
 Esquema de quimioterapia (QT) utilizado e doses (mg/m² ou em mg) 1º tratamento:
 () CVP; () Fludarabina; () Clorambucil; () outros _____

POSOLOGIA: () dose diária; () altas doses em ciclos/cada 15 ou 21d; () Outros _____

EVOLUÇÃO:

Tratamentos realizados (Siglas de esquemas de QT e doses (mg/m² ou em mg); N° de ciclos realizados; Intercorrências; Justificativas se troca de esquemas; Tempo fora de tratamento (FT); Data de reinício de tratamento; Causas de interrupção _____

Infecções durante o tratamento () Sim () Não Sistemas acometidos _____

Causas de óbito _____

Abandono de tratamento () Sim () Não

COMORBIDADES

() HAS () DM () DPOC () ICC
 () Baixo nível sócio-econômico () Etilismo () Tabagismo

Anexos

Anexo 1. Perfil imunofenotípico de Doenças Linfoproliferativas de Pequenas Células B^{4,11,52}

DLPC	slg	CD19	CD20	CD22	CD79	CD23	CD25	CD5	FMC7	CD11c	CD10	bcl6	bcl2	Ki67	DBA44	cic D1	CD38
LLC/LL	W	+	W	W	W	+	V	+	V	W	-	-	V	<10%	-	V	V
Leucemia Prolinfocítica	+	+	+	+	+	V	-	V	+	-	-	-	V	20-40%	-	V	V
Tricoleucemia	+	+	+	+	W	V	+	-	+	+	V	-	?	5-10%	+	W	-
Linfoma de Zona Esplênica com linfócitos vilosos	+	+	+	+	+	-	-	-	+	V	-	-	+	5-10%	+	-	-
Linfoma do Manto	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	30-40%	-	+	-
Linfoma Folicular	+	+	+	+	+	V	-	-	+	-	+	+	+	V	-	-	-
Linfoma Linfoplasmacítico	+	+	+	+	+	V	V	-	-	-	-	-	+	<5%	-	V	+

LLC: Leucemia Linfocítica Crônica; LL: Linfoma Linfocítico; slg: Imunoglobulina de superfície; cic D1: ciclina D1; W: expressão fraca, algumas vezes negativa; V: expressão variável; Ki67: índice de proliferação mitótico.

ANEXO 2 – Técnica de Preparo de Amostras Histológicas para Impregnação Argêntica de Gomori

Após a desparafinização e hidratação das lâminas contendo cortes histológicos, estas foram lavadas em água destilada e submersas em permanganato de potássio 0,3% por 2 minutos. Após banho com água destilada, as amostras foram mergulhadas em ácido oxálico 5% por 1 minuto e, então, submetidas a banho por sulfato férrico amoniacal 3% por 2 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água de torneira por 5 minutos e, posteriormente, banhadas na prata amoniacal por 2 minutos e lavadas em água destilada em três banhos. Foram, então, submersas em formol neutro 5% por 5 minutos e, após banho com água destilada, os cortes foram colocados em contato com cloreto de ouro 0,1% por 15 segundos e tiosulfato de sódio 3% por 3 minutos. As lâminas, então, foram lavadas em água de torneira por 1 minuto e contracoradas por Van Gienson por 5 minutos. Daí, as lâminas foram desidratadas e montadas com entelan ou resina.

ANEXO 3 – Técnica de Preparo de Amostras Histológicas para Coloração Imuno-histoquímica(ZAP-70)

Preparação das amostras:

Foram feitos cortes histológicos de 3 micra e colocados sobre lâmina previamente tratadas com poly-d-lysine. Em seguida, as lâminas foram riscadas com ponta de diamante, delimitando a área do corte para que o anticorpo se concentre no ponto desejado. As lâminas, desparafinadas por meio de três banhos de Xilol (DINAMICA PA), e incubadas por cerca de 5 minutos cada banho, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram incubadas em 4 banhos de Etanol absoluto (DINAMICA PA), para sua hidratação. O excesso de líquido foi eliminado por lavagem em água corrente por 3 minutos.

Reação de imuno-histoquímica:

A reação de imunoistoquímica foi realizada pelo método de Avidina-Biotina-Peroxidase⁵⁷ utilizando-se anticorpos anti-ZAP-70, em lâminas separadas e devidamente marcadas, nas concentrações padrão, diluídos em tampão específico para diluição de anticorpo primário (DAKO-S 3022).

Após a desparafinização, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por meio da incubação das lâminas com solução de peróxido de hidrogênio 3% (DINAMICA), diluída em água destilada por 10 minutos, à temperatura ambiente, protegido da luz. Em seguida, foi realizada a reativação antigênica pelo calor, utilizando-se forno de microondas (SHARP 900 W) e tampão Citrato pH 6.0/0,01mM (MERCK) por 15 minutos. Este procedimento foi realizado com a finalidade de recuperar sítios antigênicos mascarados pela fixação em formol e inclusão em parafina.

As amostras foram lavadas em tampão fosfato (PBS) pH 7.2-7.4 (MERCK) por 10 minutos, à temperatura ambiente. O excesso de líquido foi retirado e os cortes receberam os anticorpos primários diluídos previamente, e então incubados por 18 horas, em câmara úmida, a 8°C. Os anticorpos foram retirados por meio de aspiração negativa e as lâminas, lavadas em dois banhos de PBS, à temperatura ambiente, por 5 minutos cada banho. Por fim, os cortes foram recobertos pelo anticorpo secundário,

utilizando-se o KIT-EnVision (DAKO K4003 e 4001) e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Foram novamente lavados em dois banhos de PBS, à temperatura ambiente, por 5 minutos cada banho. A reação foi revelada pelo cromógeno e pelo substrato 3,3-diaminobenzidina (KIT DAKO-K3468). As lâminas, então, foram lavadas em água corrente por 30 segundos e contracoradas com Hematoxilina de Mayer (MERCK 1.09249). Os cortes foram desidratados por 4 banhos de álcool etílico PA, em concentrações crescentes de 60%, 65%, 95% 100%, e diafanizados por 3 banhos de Xilol. As lâminas foram montadas com Permont (FISHER-SP 15-500) e lamínulas 24x32 (KNITTEL), e lidas em microscópio óptico biocular (NIKON) no aumento de 400x.

Anexo 4 – Tabelas de análise de variância não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis

Tabela 16. Medidas descritivas da idade segundo os graus de retículo ($p>0,05$)

Medida descritiva	Grau I	Grau II	Grau III
Valor mínimo	39	51	28
1º Quartil	55,75	59	56,50
Mediana	64,50	62,50	65,50
3º Quartil	73,25	66	73
Valor máximo	85	74	82
Média	63,79	62,35	63,36
Desvio padrão	12,94	5,57	14,27

Tabela 17. Medidas descritivas de DHL segundo os graus de retículo ($p>0,05$)

Medida descritiva	Grau I	Grau II	Grau III
Valor mínimo	126	136	125
1º Quartil	154,25	215,75	191,50
Mediana	196,50	436,50	286,50
3º Quartil	556,25	617,75	536
Valor máximo	739	865	1522
Média	334,79	444,88	414,80
Desvio padrão	240,05	232,99	349,62

Tabela 18. Medidas descritivas de β 2microglobulina segundo os graus de retículo ($p>0,05$)

Medida descritiva	Grau I	Grau II	Grau III
Valor mínimo	0,32	0,17	0,80
1º Quartil	1,39	1,27	1,41
Mediana	1,98	2,25	1,77
3º Quartil	2,60	3,43	2,63
Valor máximo	4,55	14,50	7,60
Média	2,19	3,31	2,35
Desvio padrão	1,30	3,77	1,72

Tabela 19. Medidas descritivas de linfocitose segundo evolução clínica ($p>0,05$)

Medida descritiva	Remissão Prolongada	Progressão alto grau	Refratariedade QT
Valor mínimo	620	600	180
1º Quartil	3300	9050	3600
Mediana	10300	34549	14000
3º Quartil	33443	93000	54000
Valor máximo	66500	210000	170000
Média	19082,83	54037,26	33884,94
Desvio padrão	21303,34	59672,74	41684,63

Tabela 20. Medidas descritivas de creatinina sérica segundo evolução clínica ($p>0,05$)

Medida descritiva	Remissão Prolongada	Progressão alto grau	Refratariedade QT
Valor mínimo	0,57	0,70	0,10
1º Quartil	0,84	0,83	0,79
Mediana	0,91	1,00	1,10
3º Quartil	1,35	1,20	1,36
Valor máximo	1,90	2,20	2,77
Média	1,06	1,08	1,13
Desvio padrão	0,37	0,36	0,51

Tabela 21. Mediana e valores mínimo e máximo das variáveis (Grau de retículo e Risco) segundo óbitos ($p>0,05$)

Variável	Óbito relacionado LLC	Óbito outras causas	Sobreviventes
Retículo	3,0 (1,0-3,0)	2,0 (1,0-3,0)	2,0 (1,0-3,0)
Risco	1,0 (1,0-2,0)	1,5 (1,0-2,0)	1,0 (0,0-2,0)

Estudo de associação entre grupos pelo teste de Goodman

Tabela 22. Distribuição do grau de retículo segundo gênero ($p>0,05$)

Gênero	Grau I	Grau II	Grau III	Total
Masculino	8 (25,81) aA	9 (29,03) aA	14 (45,16) aA	31
Feminino	6 (23,08) aA	11 (42,31) aA	9 (34,62) aA	26

a (letra minúscula): compara linhas na categoria de resposta em consideração; *A* (letra maiúscula): compara categorias de resposta, dentro da linha em consideração.

Tabela 23. Distribuição do grau de retículo segundo sintomas B ($p>0,05$)

Sintomas B	Grau I	Grau II	Grau III	Total
Presentes	7 (25,93) aA	7 (25,93) aA	13 (48,15) aA	31
Ausentes	7 (25,92) aA	11 (42,31) aA	8 (30,77) aA	26

a (letra minúscula): compara linhas na categoria de resposta em consideração; A (letra maiúscula): compara categorias de resposta, dentro da linha em consideração.

Tabela 24. Distribuição do grau de retículo segundo comprometimento de órgãos linfóides secundários ($p>0,05$)

Acomentimento OL2 ^{ário}	Grau I	Grau II	Grau III	Total
Presente	10 (25,64) aA	12 (30,77) aA	17 (43,59) aA	39
Ausente	4 (22,22) aA	8 (44,44) aA	6 (33,33) aA	18

a (letra minúscula): compara linhas na categoria de resposta em consideração; A (letra maiúscula): compara categorias de resposta, dentro da linha em consideração.

Tabela 25. Distribuição de presença de infecção ao diagnóstico segundo grau de retículo ($p>0,05$)

Graus de Retículo	Presença de infecção	Ausência de infecção	Total
I	5 (35,71) aA	9 (64,29) aA	14
II	7 (35) aA	8 (44,44) aA	20
III	2 (9,09) aA	20 (90,91) aB*	22

*a (letra minúscula): compara linhas na categoria de resposta em consideração; A (letra maiúscula): compara categorias de resposta, dentro da linha em consideração; * interferência do n de pacientes, sem significado biológico.*

Tabela 26. Distribuição do grau de retículo segundo estratificação de risco de Rai e Binet, modificados ($p>0,05$)

Estratificação de Risco	Grau I	Grau II	Grau III	Total
Baixo	3 (25) aA	6 (50) aA	3 (25) aA	12
Intermediário	7 (25,93) aA	7 (25,93) aA	13 (48,15) aA	27
Alto	4 (23,53) aA	4 (41,18) aA	6 (35,29) aA	17

a (letra minúscula): compara linhas na categoria de resposta em consideração; A (letra maiúscula): compara categorias de resposta, dentro da linha em consideração.

Tabela 27. Distribuição de pico monoclonal, na eletroforese de proteínas séricas, segundo grau de retículo ($p>0,05$)

Graus de Reticulo	Ausência	α ou β	γ	Total
I	4 (28,57) aA	4 (28,57) aA	6 (42,86) aA	14
II	5 (25) aA	6 (30) aA	9 (45) aA	20
III	9 (39,13) aA	5 (21,74) aA	9 (39,13) aA	23

α : região de alfa globulina; β : região de beta globulina; γ : região de gama globulina; a (letra minúscula): compara linhas na categoria de resposta em consideração; A (letra maiúscula): compara categorias de resposta, dentro da linha em consideração.

Tabela 28. Distribuição da estratificação de risco segundo padrão de infiltração grau de retículo segundo celularidade da medula óssea ($p>0,05$)

Estratificação de Risco	Grau I	Grau II	Grau III	Total
Baixo	3 (25) aA	6 (50) aA	3 (25) aA	12
Intermediário	7 (25,93) aA	7 (25,93) aA	13 (48,15) aA	27
Alto	4 (23,53) aA	4 (41,18) aA	6 (35,29) aA	17

a (letra minúscula): compara linhas na categoria de resposta em consideração; A (letra maiúscula): compara categorias de resposta, dentro da linha em consideração.