

Ana Paula Fortunato Dametto

Expressão de ZAP 70 e relação com a expressão de CD 38, ploidia e índice de fase S em pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre

Orientador: Dr. Vergílio Antonio Rensi Colturato

Coorientadora: Dra. Maura Rosane Valério Ikoma

Botucatu

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Dametto, Ana Paula Fortunato.

Expressão de ZAP 70 e relação com a expressão de CD 38, ploidia e índice de fase S em pacientes com leucemia linfocítica crônica / Ana Paula Fortunato Dametto. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Vergílio Antonio Rensi Colturato

Coorientador: Maura Rosane Valério Ikoma

Capes: 40101053

1. Leucemia linfóide. 2. Citometria de fluxo. 3. Bioquímica. 4. Prognóstico.

Palavras-chave: CD38; Citometria de fluxo; Fase S; Leucemia linfocítica crônica; ZAP 70.

Ana Paula Fortunato Dametto

Expressão de ZAP 70 e relação com a expressão de CD 38, ploidia e índice de fase S em
pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento:
Biotecnologia Médica da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Vergílio Rensi Colturato

Comissão examinadora

Profª Dra. Mihoko Yamamoto

Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Profª Dra. Paula de Oliveira Montandon Hokama

Universidade Estadual Paulista – Botucatu

Dr. Vergílio Antonio Rensi Colturato

Serviço de Transplante de Medula Óssea
do Hospital Amaral Carvalho - Jaú

Botucatu, _____ de _____ de _____.

Dedicatória

À minha mãe Maria do Carmo por seu exemplo de força, dedicação e perseverança, os quais durante toda minha vida me fizeram seguir em frente e nunca desistir de meus objetivos e sonhos.

À meu pai Angelo por seu amor e cuidado.

Aos meus irmãos Rafael e André e minha cunhada Ariane, por tornarem meus dias mais alegres.

E ao Caio, que com seu amor e companheirismo está ao meu lado, em todos os momentos.

Agradecimentos especiais

À Dra. Maura Rosane Valério Ikoma, agradeço por sua disponibilidade em me orientar, ensinar e por seu exemplo de dedicação e competência profissional.

Ao Dr. Vergílio Antonio Rensi Colturato, por quem tenho grande admiração, agradeço por viabilizar a realização desse meu projeto profissional.

À Profa. Dra. Lígia Niéro-Melo agradeço pelos ensinamentos durante minha formação profissional.

Agradecimentos

Aos colegas Dr. Fabrício Pascolat, Dra. Luzia Beatriz Ribeiro Zago, Dra. Márcia Higashi e Dr. Ederson Roberto de Mattos pela aprendizagem gerada do convívio pessoal e profissional.

Aos membros do Laboratório de Citometria de Fluxo, Marcimara Penitente, Camila Marques e Joana Espricigo Conte pelo acolhimento e aprendizado.

Aos médicos do Departamento de Hematologia e Oncologia Clínica do Hospital Amaral Carvalho:

Dr. Alejandro Mauricio Arancibia

Dr. Alexandre Tobias

Dra. Ana Lúcia Coradazzi

Dra. Andiará Cantarelli Boneto Pires

Dra. Andrea Miranda Pedro

Dr. Carlos Augusto de Mendonça Beato

Dra. Cláudia Teresa de Oliveira

Dra. Eda Manzo

Dr. Ederson Roberto de Mattos

Dr. Fabrício Pascolat

Dr. Gustavo Fernando Veraldi Ismael

Dr. José Getúlio Martins Segalla

Dra. Juliana dos Santos Oliveira

Dra. Luzia Beatriz Ribeiro Zago

Dra. Márcia Higashi

Dr. Marcos Augusto Mauad

Dr. Mair Pedro de Souza

Dra. Marília de Freitas Segalla Brancaglioni

Dra. Maura Rosane Valério Ikoma

Dr. Vergílio Antonio Rensi Colturato

Agradeço por fazer parte dessa equipe.

Aos funcionários do Ambulatório de Hematologia, agradeço pela convivência e profissionalismo.

À Professora Patrícia Saggioro, por sua pronta contribuição no trabalho de tradução.

**“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas
o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.**
Madre Teresa de Calcutá

Resumo

DAMETTO, A.P.F. **Expressão de ZAP 70 e relação com a expressão de CD 38, ploidia e índice de fase S em pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica**. 2014. 53f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é uma neoplasia de linfócitos B maduros, de curso clínico heterogêneo, com alguns pacientes necessitando de tratamento imediato e outros vivendo sem tratamento por décadas. Por essa característica, se faz necessária a identificação de marcadores prognósticos acessíveis e de valor clínico. O objetivo principal foi avaliar retrospectivamente os indicativos prognósticos de progressão da doença (ZAP-70, CD38, ploidia de DNA e Fase S) em pacientes portadores de LLC, frente a sua evolução clínica. Como objetivos secundários, foram comparadas as metodologias de análise de ZAP-70 por citometria de fluxo(CF) ISO Método e Análise em Tubo Único, assim como as técnicas de análise de conteúdo de DNA pelo modelo matemático (ModFit LT™) e estratégia de *gating* booleano (Infinicyt™). Na caústica foram incluídos 27 pacientes que possuíam disponíveis os dados clínicos e laboratoriais em estudo e que concordaram e preencheram o termo de consentimento livre e esclarecido. A avaliação da situação clínica foi feita uma única vez, e assim como os resultados das expressões de CD 38 e ZAP 70, foi realizada através de revisão de prontuário médico. A análise do conteúdo de DNA por CF foi avaliada pelos dois métodos supracitados, a partir de arquivos do laboratório de citometria de fluxo da instituição. Como resultados, não se observou relação das expressões de ZAP-70 e CD38 com o estado clínico dos pacientes. Em relação à análise de índice de DNA e Fase S, não houve diferença estatística ($p=0,69$ e $p=0,08$ respectivamente utilizando-se os *softwares* ModFit LT™ e Infinicyt™). Também foi encontrado que os dados obtidos na análise de DNA indicam a possibilidade de utilização da Fase S na avaliação prognóstica dessa série de pacientes. Conclusão: todos os três fatores estudados são considerados prognósticos. Não houve relação dos marcadores estudados com a evolução clínica dos pacientes. Para relacionar esses dados com a evolução clínica se faz necessário o seguimento desses pacientes por maior período de tempo.

Palavras-chave: leucemia linfocítica crônica, citometria de fluxo, fatores prognósticos, ZAP-70, CD38, Fase S.

Abstract

DAMETTO, A.P.F. Expression of ZAP 70 and relation with the expression of CD 38, ploidy and S-phase index in patients under Chronic Lymphocytic Leukemia. 2014. 53f. Thesis (Master Degree) – Botucatu Medical School, UNESP, Botucatu, 2014.

The Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a mature B lymphocytes malignancy, on heterogeneous clinical course, where some patients require immediate treatment and others live for decades without treatment. For this peculiarity, it's required the identification of prognostic markers and clinical value. The main objective was to retrospectively, evaluate the prognostic indicator of the disease progression (ZAP- 70, CD38, DNA ploidy and S phase) in patients under CLL, facing the clinical evolution. As secondary purposes, methodologies were compared to ZAP- 70 analysis by flow cytometry (FC) ISO Method and Single-Tube Analysis, as well as technical analysis of DNA content by the mathematical model (ModFit LT TM) and boolean gating principle (Infinicyt TM). On the registration of the cases observed, there were included 27 patients under the clinical and laboratory data who had available and filled in the term consenting agreement. The evaluation of the clinical situation was made only once, and the results of expressions and CD38 and ZAP 70, were held by reviewing medical records. The analysis of DNA content by CF was evaluated by the above two methods files from a laboratorial flow cytometry institution. As a result, no relation of the expressions of CD38 and ZAP- 70 with the clinical status of the patients was observed. Concerning the analysis of DNA index and S phase, there wasn't any statistical difference ($p = 0.69$ and $p = 0.08$ respectively using the ModFit LT TM and Infinicyt TM software). It was also found that the data obtained in the analysis of DNA indicates the possibility of using the S phase in the prognostic evaluation of those patients. Conclusion: all the three factors studied are considered prognostic. There was no relation of the markers studied to the clinical course of patients. To correlate these data with clinical follow-up of those patients, it is necessary a longer period of time.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, flow cytometry, prognostic factors, ZAP- 70, CD38, Phase S.

Lista de siglas

AcMO	Anticorpos monoclonais
AHAI	Anemia hemolítica autoimune
BAFF	B cell activating fator
BCR	Receptor de células B
BR	Bendamustina e Rituximab
CALGB	Cancer and Leukemia Group B
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CF	Citometria de fluxo
CFM	Citometria de fluxo multiparamétrica
COP	Ciclofosfamida, oncovin e prednisona
DAPI	4',6 – diamidino – 2- phenylindole
DLPCB	Doença linfoproliferativa crônica B
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FC	Fludarabina e ciclofosfamida
FCR	Fludarabina, ciclofosfamida e rituximab
FISH	Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência
FR	Fludarabina e rituximab
IgVH	Região variável da cadeia pesada de imunoglobulina
IFM	Intensidade de fluorescência média
ITAM	Imunorreceptores de ativação de motivos tirosino-baseados
IWCLL	International workshop on chronic lymphocytic leukemia
LLC	Leucemia linfocítica crônica
MAPK	Mitógeno ativado da proteíno-kinase
NK	Natural killer
PTK	Tirosino-kinase
RC	Resposta completa
RP	Resposta parcial
SLL	Small lymphocytic lymphoma
SyK	Tirosino-kinase esplênica
TA	Temperatura ambiente
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR	Receptor de células T

TRL	Toll-like receptors
WHO	World Health Organization
ZAP 70	Proteína <i>zeta</i> -associada de 70kDa

Sumário

Resumo	
Abstract	
Lista de siglas	
1 Introdução	13
2 Objetivo principal	27
2.1 Objetivos secundários	27
3 Material e métodos	27
3.1 Casuística	27
3.2 Material	29
3.3 Métodos de citometria de fluxo	30
3.3.1 Técnica de ZAP – 70 (Fenotipagem intracitoplasmática)	30
3.3.2 Técnica de marcação de DNA e antígenos da membrana - KIT: Cycletest™ plus DNA Reagent kit (BD)	31
3.4 Análises das amostras	32
4 Resultados	37
4.1 Expressão de CD38	38
4.2 Expressão de ZAP-70	39
4.3 Análise do Índice de Fase S (Software Infinicyt)	39
4.4 Comparação das metodologias de análise de DNA ModFit™ e Infinicyt™	40
4.5 Comparação das metodologias ISO Método e Análise em tubo único	42
4.6 Perfil dos pacientes com doença de difícil controle e óbitos por causa relacionada à doença	42
5 Discussão	42
6 Conclusões	44
Referências Bibliográficas	45
Anexos	49

1. Introdução

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é uma neoplasia de linfócitos B maduros, pós-centro germinativo, composta por linfócitos monomórficos, redondos a ligeiramente irregulares no sangue periférico, medula óssea, baço e linfonodos, junto a prolinfócitos e paraimunoblastos, formando centros de proliferação nos tecidos infiltrados ¹. Os prolinfócitos podem estar presentes em pequeno número e o seu aumento (>10%) indica transformação prolinfocítica da LLC ². Ao diagnóstico, observa-se infiltração linfocitária da medula óssea, geralmente acima de 30% das células nucleadas e na biópsia de medula óssea, onde três padrões de infiltração podem ser vistos: nodular, intersticial e difuso ou combinação desses. Os tipos histológicos nodular e difuso são relacionados com prognóstico favorável ². As células da LLC usualmente coexpressam CD5 e CD23. Na ausência de envolvimento de tecido extramedular, deve haver uma contagem maior ou igual a $5 \times 10^9/L$ de linfócitos monoclonais no sangue periférico com o fenótipo de LLC por citometria de fluxo ¹. Segundo o The International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) é necessário que esta linfocitose esteja presente pelo menos por 3 meses, como parâmetro diagnóstico. Em pacientes com contagens linfocitárias menores, mas em presença de citopenias ou sintomas relacionados à doença, também pode ser considerado esse diagnóstico ¹. O termo Small lymphocytic lymphoma (SLL) é utilizado nos casos não leucêmicos com morfologia e imunofenótipo de LLC e a definição do IWCLL para diagnóstico de SLL implica na presença de linfadenomegalias, ausência de citopenias secundárias à infiltração da medula óssea e contagens linfocitárias menores que $5 \times 10^9/L$ no sangue periférico ¹. Na ausência de linfadenomegalias ou organomegalia (definidas pelo exame físico ou tomografia computadorizada), citopenias e sintomas relacionados à doença, a presença de uma contagem de linfócitos no sangue periférico menor que $5 \times 10^9/L$ é definida como Linfocitose B Monoclonal³. Não está claro se esta condição predispõe ou é um evento precursor de LLC ¹, porém a linfocitose B monoclonal parece progredir para LLC a uma taxa de 1-2% ao ano ³.

A clonalidade dos linfócitos B circulantes deve ser confirmada por CF sendo que as células da LLC expressam um imunofenótipo característico, com a co-expressão do antígenos de superfície de células T CD5 e de células B CD19, CD20 e CD23 ³. Os níveis de imunoglobulina de superfície (sIg), CD20 e de CD79b são baixos se comparados com os encontrados em células B normais ³. Cada clone de células leucêmicas tem a restrição de expressão ou da imunoglobulina de cadeia leve Kappa ou Lambda ³. O CD 200 é positivo, sendo o marcador de maior importância para distinguir essa entidade do Linfoma do Manto ². Alguns casos podem ter imunofenótipo atípico com negatividade para CD5 ou CD23, FMC7+

ou CD11c+, expressão forte de imunoglobulina de superfície e CD79b+¹. Para diferenciação dos casos de LLC de outras doenças linfoproliferativas B (DLPCB) Matutes et al.⁴ estabeleceu um escore baseado na expressão antigênica que tem se mostrado muito útil (Tabela 1), casos com escore 2 a 3 requerem cuidados e necessitam de avaliação com painel ampliado para confirmação diagnóstica².

Tabela 1: Sistema de escore para diagnóstico de LLC, no qual o comportamento de cada antígeno recebe pontuação de zero ou 1

Escore	0	1
CD5	Negativo	Positivo
CD23	Negativo	Positivo
CD79b	Positivo	Fraco/Negativo
FMC7	Positivo	Negativo
sIg	Forte	Fraco/Negativo

O escore total é obtido pela soma dos pontos e varia de zero a 5.

Diagnóstico: LLC= escore $\geq$ 3; DLPCB= 0-2

Matutes apud Yamamoto²

A LLC é uma neoplasia de curso clínico heterogêneo, com alguns pacientes necessitando de tratamento imediato e outros vivendo sem tratamento por décadas. A taxa de incidência da doença é de 2-6 casos por 100 000 indivíduos e aumenta com a idade, chegando a 12,8/100 000 com uma média de idade de 65 anos ao diagnóstico¹, porém o diagnóstico da LLC tem sido cada vez mais precoce no curso da doença, com a possibilidade de se oferecer aos pacientes uma observação clínica adequada e instituição de terapêutica no momento correto, podendo assim aumentar a sobrevida desses doentes (Molica & Levato apud Furman⁵). Como a taxa de incidência aumenta com a idade, a prevalência e mortalidade são susceptíveis a aumentar mais devido a mudanças demográficas na sociedade nas próximas décadas³. Atualmente, quase 70% dos pacientes morrem por causas relacionadas à LLC, principalmente idosos, sendo a sobrevida média de 69,9% de 40 a 59 anos versus 38,1% acima dos 80 anos⁵. Como marcadores prognósticos, inicialmente, foram desenvolvidos os sistemas de estadiamento Rai e Binet (Tabela 2)⁶. A classificação de Rai original foi modificada para reduzir o número de grupos prognósticos de cinco para três³. Os dois sistemas de estadiamento são simples, baratos e se baseiam no exame físico e exames laboratoriais padrão. Eles não necessitam de ultrassom, tomografia computadorizada ou ressonância magnética³. Além da avaliação prognóstica, eles também são utilizados para definir o momento do início da

terapêutica. Em geral, pacientes recém diagnosticados, assintomáticos e com doença em estadio precoce (Rai 0, Binet A), devem ser monitorados sem terapêutica até apresentarem evidências de progressão de doença.

Tabela 2: Classificação de Rai e Binet

Sistema	Achados clínicos	Sobrevida média(anos)
Rai (simplificado)		
0 (baixo risco)	Linfocitose sangue periférico e medula óssea	> 10
I e II (risco intermediário)	Linfadenomegalia esplenomegalia +/- hepatomegalia	7
III e IV (alto risco)	Anemia, trombocitopenia	0,75-4
Binet		
A	< 3 áreas de adenomegalias, sem anemia, sem trombocitemia	12
B	> 3 áreas de adenomegalias, sem anemia, sem trombocitemia	7
C	Hemoglobina < 10,0g/dL Plaquetas < 100 x 10 ⁹ g/dL	2-4

Extraído de Gribben⁶

Estudos do French Cooperative Group on CLL, do Cancer and Leukemia Group B (CALGB) e do Spanish Group Pethema mostraram que em pacientes com doença em estadio precoce mostraram que o uso de agentes alquilantes não prolongaram a sobrevida nesta situação específica³. No entanto, pacientes com risco intermediário (Rai I e Rai II) ou alto risco (Rai III e Rai IV) ou Binet B e C se beneficiam do início da terapêutica³. Alguns pacientes (risco intermediário de Rai ou Binet B), podem ser monitorados sem terapia até evidência de progressão de doença ou doença sintomática/ativa, que é definida pelo *guideline* da IWCLL:^{3,7}

- evidência de falência de medula óssea progressiva (anemia e/ou trombocitopenia);
- esplenomegalia ≥ 6 cm abaixo do rebordo costal esquerdo, esplenomegalia progressiva ou sintomática;
- linfonodos ≥ 10 cm no seu maior diâmetro ou linfonodomegalia progressiva ou sintomática;
- linfocitose progressiva com um aumento de 50% no período de 2 meses;
- tempo de duplicação dos linfócitos menor do que 6 meses;

- anemia hemolítica autoimune e/ou trombocitopenia pouco responsivas aos corticóides ou outra terapia padrão;

- sintomas relacionados à doença: perda de peso não intencional acima de 10% dentro de 6 meses, fadiga significativa, febre ($>38^{\circ}\text{C}$) por 2 ou mais semanas sem evidência de infecção ou sudorese noturna por mais de um mês sem evidência de infecção;

- transformação para tipo histológico mais agressivo, como exemplo Síndrome de Richter, que se possível dever ser confirmada por biópsia de linfonodo.

A contagem absoluta de linfócitos não deve ser usada como critério único para indicar o tratamento. Quanto às anormalidades cromossômicas, embora somem informações prognósticas aos sistemas de estadiamento, até agora não há consenso ou evidência que o uso de marcadores adicionais são necessários na prática clínica geral para definir uma indicação de tratamento ³.

Durante a terapêutica, as citopenias não podem ser utilizadas para definir progressão da doença pois podem estar relacionadas a efeitos colaterais do tratamento ⁷. Depois do tratamento, a progressão de qualquer citopenia (não relacionada à citopenia autoimune), documentada pela queda da hemoglobina (Hb) em mais de 2g/dL ou abaixo de 10g/dL, ou pela diminuição da contagem de plaquetas mais do que 50% ou menos que $100 \times 10^9/\text{L}$, ao menos 3 meses após o término do tratamento, define progressão da doença se a biópsia de medula óssea evidenciar infiltração pelas células clonais da LLC ⁷.

A doença é considerada estável, por sua vez, naqueles pacientes que após terapêutica não atingiram resposta completa (RC) ou resposta parcial (RP) e que não exibiram progressão da doença, o que equivale a não resposta. As respostas que devem ser consideradas clinicamente benéficas são as RC e RP, e todas as outras (doença estável, não resposta, doença progressiva ou morte) devem ser classificadas como falência ao tratamento ⁷. A doença refratária é definida como aquela que apresentou falha ao tratamento ou progrediu no prazo de 6 meses para última terapêutica anti-leucêmica. Já para definição de LLC de alto risco, que justifique a indicação do transplante alogênico de medula óssea, a doença deve ser refratária ao tratamento baseado em análogos de purina ou ao transplante autólogo de medula óssea ⁷.

A escolha do tratamento para o paciente de LLC é uma tarefa que requer experiência, um bom julgamento clínico e o uso de ferramentas diagnósticas adequadas. Deve-se considerar antes de se recomendar o tratamento: o estadio clínico, a condição física do paciente, o risco genético, a situação do tratamento (primeira linha *versus* segunda linha, resposta *versus* não resposta do último tratamento) ³. Para pacientes com boa condição clínica deveriam ser oferecidas terapias combinadas como Fludarabina mais Ciclofosfamida (FC), Fludarabina mais

Rituximab (FR) ou Fludarabina mais Ciclofosfamida mais Rituximab (FCR). Nos pacientes mais debilitados pode ser oferecido Clorambucil associado a um anti-CD20, ou um esquema de Fludarabina em dose reduzida com um anti-CD20. Nesse braço, o objetivo é o controle dos sintomas ³. Pacientes sintomáticos com deleção do 17p ou mutação TP53 podem receber FCR ou Bendamustina mais Rituximab (BR) ou um regime contendo Alentuzumab como primeira linha de tratamento. Esses regimes têm uma taxa de resposta de 50%, sendo que esses pacientes respondem de maneira pobre a regimes contendo Fludarabina e Ciclofosfamida, dessa forma o Transplante alogênico de medula óssea deve ser considerado ³. Quanto à segunda linha de tratamento, em geral, o primeiro esquema pode ser repetido desde que a duração da remissão exceda 12 meses (ou 24 meses com a associação do anticorpo monoclonal). A escolha se torna mais limitada nos pacientes refratários e com del17p ³. Novos agentes vêm sendo desenvolvidos e estudados tendo como alvo os receptores de células B (Fostamatinib, Idelalisib, Ibrutinib, Dasatinib), também se estudam os inibidores de Bcl-2 e drogas imunomodulatórias como a Lenalidomida ³.

Além dos sistemas de estadiamento de Rai e Binet, outros marcadores prognósticos têm sido estudados com a finalidade de uma melhor caracterização biológica da doença. Em 1992 um primeiro trabalho sugeriu que os casos de LLC poderiam possuir genes de imunoglobulina mutados ou não mutados (Cai apud Furman ⁵) e em 1999 foram publicados estudos que demonstraram o valor prognóstico do *status* mutacional da imunoglobulina, sendo que os casos não mutados apresentaram um curso mais agressivo e menor sobrevida média ⁵. Na década de 90 uma nova técnica para busca de anormalidades cromossômicas foi desenvolvida (hibridação *in situ* por fluorescência – FISH), a qual por não depender de metáfases cromossômicas, aumentou a taxa de detecção de anormalidades cromossômicas em LLC que é marcada por baixo índice mitótico. Em 1999 o CD 38 foi associado com o *status* mutacional da imunoglobulina e como preditor de sobrevida ⁸. Na tentativa de identificar genes que se correlacionavam com o *status* mutacional da imunoglobulina, em 2001 Rosenwald et al. ⁹ demonstraram a correlação da expressão do gene *zap-70* com o *status* não mutado.

Status mutacional IgVH

A ausência de mutações genéticas somáticas nas regiões variáveis de cadeia pesada de imunoglobulina (IgVH) nas LLC está relacionada a pior prognóstico, com doença rapidamente progressiva em relação aos pacientes que têm essa mutação ¹⁰. Cada cadeia de imunoglobulina é formada a partir de segmentos gênicos que se rearranjam em uma sequência específica para constituir a cadeia completa (figura 1).

A porção variável da cadeia pesada das imunoglobulinas é codificada pelos segmentos V_H , D_H , J_H . Há mais de 50 genes V_H , 25 genes D_H e 6 J_H dispostos sequencialmente no cromossomo, seguidos das regiões constantes $C\mu$, $C\delta$, $C\gamma3$, $C\gamma1$, $Ca1$, $C\gamma4$, $C\gamma2$, $C\epsilon1$ e $Ca2$. Nas cadeias leves os segmentos são: $\sim 35 V\kappa$, 5 $J\kappa$ e um só segmento $C\kappa$; $\sim 30 V\lambda$ e 4 conjuntos $J\lambda C\lambda$ ¹¹.

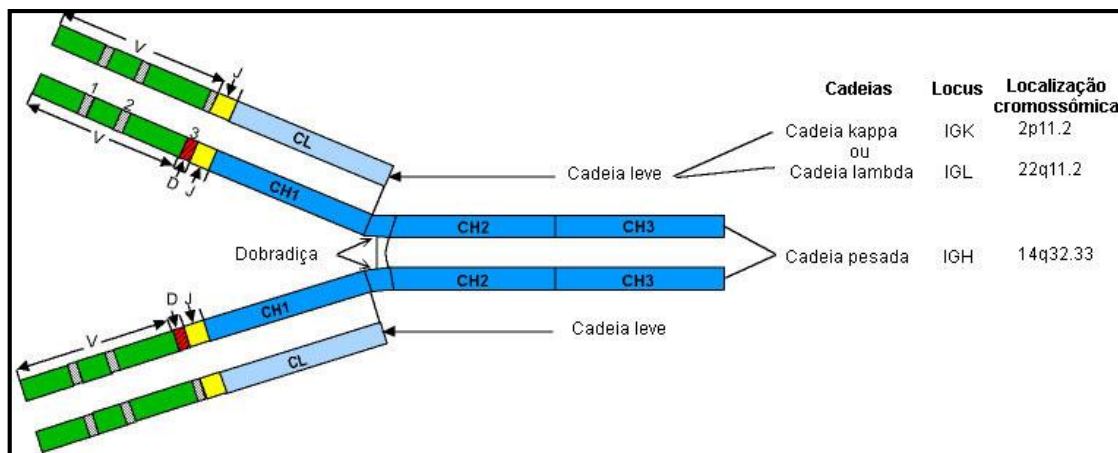


Figura 1 – Cadeia de imunoglobulina. Em verde: porção variável das cadeias leves e pesadas, em vermelho o segmento D da cadeia pesada, em amarelo o segmento J das cadeias leve e pesada, em azul claro o segmento C da cadeia leve e em azul escuro o segmento C da cadeia pesada. Extraída de Ginestoux et al. ¹²

<http://www.imgt.org/IMGTEducation/Tutorials/IGandBcells/PT/Genetica/fig1.jpg>

No início da maturação dos linfócitos B, na medula óssea, há expressão de 3 genes: TdT, RAG1 e RAG2 que comandam a recombinação gênica necessária para a produção de imunoglobulina ¹¹. O rearranjo dos genes dos receptores de antígenos é o evento chave no desenvolvimento dos linfócitos, responsável pela geração de um repertório diverso (figura 2). Esses eventos de rearranjo do DNA que levam à produção de receptores de antígeno (IgM/receptor de células B ou BCR), não dependem da presença ou influência do antígeno, ou seja, os receptores de antígenos diversos são gerados e expressos antes do encontro com antígenos. O processo combinatório dos diferentes segmentos que compõem as regiões variáveis das cadeias pesadas e leves, e as diferentes possibilidades de associação entre eles, resultam em cerca de 10^{11} especificidades diferentes de reconhecimento pelas imunoglobulinas ¹¹.

A fim de restringir esse repertório, mecanismos de seleção positiva e negativa atuam durante a maturação dos linfócitos B ¹¹. O repertório pré-imune garante que existirá um sítio de

ligação específico, no mínimo com baixa afinidade, para cada antígeno existente na natureza. Neste estágio o linfócito B é chamado de linfócito B *naive* imaturo e encontra-se em condições de deixar a medula óssea ¹³. Já na circulação, a célula começa a expressar IgD na superfície e é chamada de linfócito B *naive* maduro. Ao encontrar antígenos que se ligam com seus receptores de superfície, as células B *naive* se submetem à transformações, proliferam e por último amadurecem em plasmócitos e células B de memória ¹. As células B *naive* que encontram o antígeno podem amadurecer diretamente em plasmócitos de vida curta, processo mediado por células T e fora do centro germinativo ou migrar para o folículo primário ¹. No centro germinativo, a primeira etapa de diferenciação caracteriza-se por alterações significativas na morfologia do linfócito B e também pela troca da porção constante da cadeia pesada de IgM ou IgD para IgG, IgA ou IgE, processo conhecido como mudança de classe. Nesse processo as porções variáveis das cadeias pesadas e leves permanecem as mesmas e consequentemente a especificidade antigênica do anticorpo não é alterada, mas a resposta imune é mais diversificada, uma vez que as diferentes classes de imunoglobulina apresentam diferentes características funcionais ¹¹.

A seguir ocorre a maturação de afinidade que é o processo que leva ao aumento da afinidade dos anticorpos para um antígeno, à medida que a resposta humoral dependente de célula T progride, e é o resultado da mutação somática de genes Ig seguida pela sobrevivência seletiva das células B produtoras de anticorpos de maior afinidade ¹⁴.

A partir de um rearranjo V(D)J que possui alguma afinidade com o determinante antigênico, uma série de mutações podem ocorrer dentro desse segmento, tanto na cadeia leve quanto na pesada. A taxa de mutação é estimada em 1 a cada 10^3 pares de base do gene V, por divisão celular, o que é cerca de mil vezes maior que a taxa de mutação espontânea em outros genes de mamíferos (por esta razão, a mutação nos genes V das Ig também é chamada de hipermutação) ¹⁴. Várias características dessas mutações são dignas de notas: as mutações do gene V se concentram na região de determinação de complementariedade ao antígeno, existem muito mais mutações nos anticorpos IgG do que IgM e a presença de mutações se correlaciona com o aumento da afinidade dos anticorpos ao antígeno que induziu a resposta. Muitas mutações podem gerar declínio ou perda de função do antígeno, portanto o próximo e crucial passo no processo de maturação da afinidade é a seleção das células B de maior afinidade ¹⁴. Dada a extraordinária taxa de mutação nos centros germinativos, não é surpreendente que as neoplasias malignas de origem linfóide em humanos se desenvolvam mais frequentemente de células B desse local, porque a quebra de DNA associada à mutação e mudança de isotipo criam um cenário propício para translocações cromossômicas de vários oncogenes para os loci de

gene Ig, produzindo tumores de células B ¹⁴. Três tipos de genes *IgV* são especialmente super-expressos na LLC: Vh3-07 que é observado frequentemente em LLC com mutação somática Vh1-69 em LLC não mutada e Vh4-34 que é encontrada igualmente distribuída nas duas formas ¹³.

Em seu estudo Messmer et al. ¹⁵ obteve evidências de que as células que se acumulam e proliferam em LLC são linfócitos B maduros que apresentam exposição antigênica.

O estado atual de conhecimento da LLC indica que a célula precursora de LLC (célula que sofre o primeiro evento leucemogênico) consegue escapar dos *checkpoints* da medula óssea e evadir à apoptose, para poder se diferenciar em um linfócito B maduro que retém propriedades de células T, mas possui um receptor de células B (BCR) funcional ¹³.

A funcionalidade do BCR é observada indistintamente em casos mutados como não mutados, indicando que alguma forma de estimulação antigênica é provavelmente comum a todos casos de LLC. A natureza desse antígeno é desconhecida, mas, independentemente da mesma, seja viral, autólogo ou superantígeno, o papel desempenhado pela estimulação de BCR é incontestável e tem importância central na patogênese da LLC ¹³.

Por muito tempo acreditou-se que a LLC era uma doença caracterizada por perdas dos mecanismos normais de apoptose, no entanto tem sido observado que os telômeros das células leucêmicas são significativamente mais curtos que os observados em linfócitos B normais, sendo que as células que apresentam status não mutado do gene *V_H* da Ig têm telômeros menores do que aquelas com mutações somáticas ¹³. Dessa forma, pode-se concluir que as células não mutadas passam por um número maior de divisões celulares, possivelmente após múltiplas exposições antigênicas e com isso apresentam mais oportunidade de adquirir aberrações cromossômicas e, portanto, um comportamento mais agressivo. É possível que as células com mutações somáticas não interajam bem com os antígenos, o que as leva a uma menor capacidade de proliferação e um melhor prognóstico ¹³. Assim, na patogênese da LLC, observamos um balanço entre apoptose e proliferação.

Atualmente se reconhece o microambiente tecidual na sobrevivência e proliferação das células da LLC. As células nos linfonodos e na medula óssea mostram características de células B ativadas e aumento na proliferação. O termo microambiente descreve os componentes celulares, estruturais e solúveis no compartimento anatômico em que a célula de LLC reside ¹⁶. *In vitro*, diferentes tipos de células estromais e células derivadas de monócitos, designadas “*nurse-like cells*”, promovem a sobrevivência da célula ¹⁶. As células T também se mostraram necessárias para proliferação de células da LLC *in vivo*, utilizando modelos de xenotransplante em ratos. Estudos *in vitro* têm identificado muitos fatores que aumentam a sobrevivência das

células de LLC e promovem uma limitada proliferação, são eles: BCR, Toll-like receptors (TRL), citocinas, quimiocinas, CD40, BAFF, integrinas e componentes da matriz extracelular¹⁶.

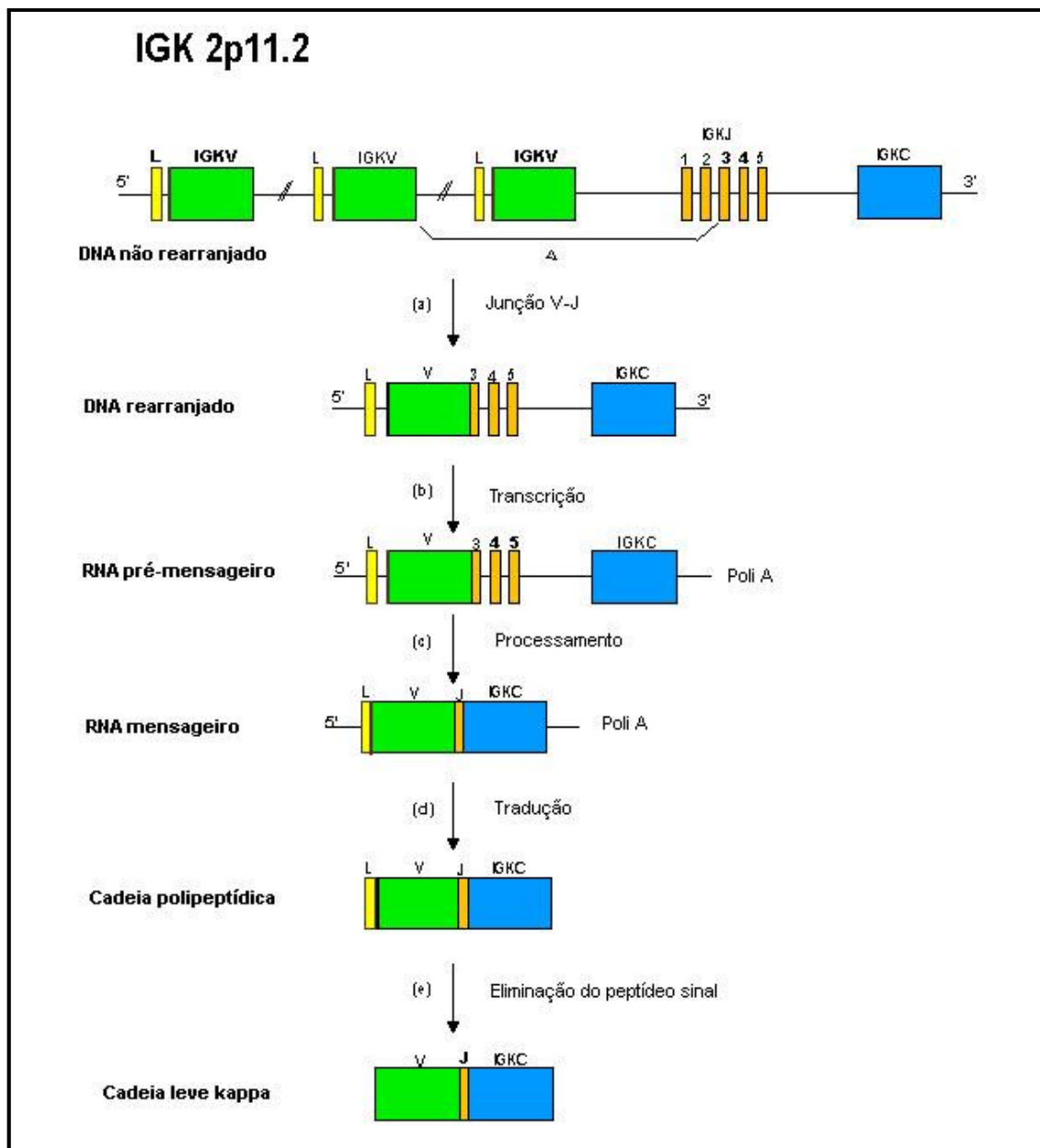


Figura 2 – Rearranjo de genes receptores de antígenos da cadeia leve Kappa. A partir do DNA rearranjado ocorre o processo de transcrição que gera o RNA mensageiro que será traduzido, gerando a proteína da cadeia leve Kappa. Extraído de Ginestoux et al.¹²

http://www.imgt.org/IMGTEducation/Tutorials/IGandBcells/_PT/Genetica/fig1.jpg

ZAP 70

Com a finalidade de se identificar genes que poderiam distinguir casos mutados e os não mutados em LLC, Rosenwald et al.⁹ demonstrou que todos os pacientes de LLC compartilham uma assinatura de expressão gênica comum, independentemente do *status* mutacional da IgVH. Entre os genes que são diferentemente expressados entre os casos mutados e não mutados, o *zap 70* foi o mais diferentemente expressado entre os dois subtipos, sendo expresso em casos não mutados. Porém há algumas exceções, havendo uma taxa de discrepância de 8 a 25%¹⁷. O ZAP – 70 pode ser um conveniente substituto clínico para o status de mutação do gene IgVH¹⁸.

A proteína zeta-associada de 70 kDa (ZAP-70), é uma tirosino-kinase (PTK) pertencente à família Src das proteíno-kinases. Ela atua na fosforilação em conjunto com a proteína *zeta* do complexo CD3, este associado aos receptores de células T (TCR), ou em receptores Fc para IgG (CD16) nas células NK, tendo assim papel precoce na ativação das células T e NK¹⁹. A proteína ZAP-70 funciona como ativador da família Tec das PTKs ativando as vias de sinalização da fosfolipase C γ /CA++ e da Ras/Mitógeno Ativado da Proteína – Kinase (MAPK), levando à fosforilação da tirosina contendo imunorreceptores de ativação de motivos tirosino – baseados (ITAMs)²⁰.

Normalmente as células B não têm a proteína ZAP-70, porém transitoriamente ela pode ser detectada durante certos estágios de desenvolvimento das células B. As células B utilizam a via Syk (tirosino-quinase esplênica) para fosforilação dos receptores de células B (BCR) durante a ativação celular. Similarmente ao ZAP-70, Syk é recrutado para fosforilação dos ITAM do complexo BCR, promovendo sua ativação. Há evidências que a proteína ZAP 70 possa funcionar nas LLC ligando-se ao complexo BCR como sinalizador e promovendo a fosforilação da tirosina de maneira aumentada²⁰. Dessa forma, sugere-se que o curso clínico mais agressivo possa estar relacionado à sinalização BCR, e sua superativação pela ZAP-70²¹.

Quiroga et al.²² demonstrou uma maior expressão de ZAP-70 na medula óssea e linfonodos, comparada ao sangue periférico e também que a maior expressão de ZAP-70 nas células LLC facilita a atividade migratória para locais com microambiente mais favorável para sua proliferação e sobrevivência.

Diante do valor tanto na fisiopatologia quanto prognóstico do ZAP-70 na LLC e sua correlação com o status mutacional da IgVH, é desejável que exista uma metodologia simples, reprodutível e confiável para sua determinação. A imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) tornou-se um método muito utilizado para avaliação do ZAP 70, pela facilidade de realização técnica e de avaliação das células leucêmicas, em separado às células T e NK da amostra, que também expressam o ZAP 70²³. Apesar de ser amplamente utilizado,

a desvantagem do método está na falta de padronização interlaboratorial (escolha dos melhores clones e fluorocromos, estratégia de *gate* (isolamento da população alvo) e determinação do ponto de corte de positividade) ²³. A partir da necessidade de um padrão, várias técnicas têm sido empregadas para definir a porcentagem de células ZAP-70 positivas ²⁴.

A técnica do ISO Método é baseada no sinal obtido quando é utilizado um anticorpo isotópico marcado como controle negativo. A partir dessa metodologia, uma amostra é considerada ZAP-70 positiva quando ao menos 20% das células de LLC demonstram um sinal que excede, comparativamente, àquele do controle ²⁵. Outro método utiliza um controle positivo interno baseado na expressão de ZAP-70 constitucional das células T/NK residuais da amostra. A amostra é considerada positiva quando ao menos 20% das células LLC expressam ZAP-70 comparado à expressão das células T/NK ²⁶. Uma desvantagem de utilizar as células T do paciente com LLC como controle positivo é que elas podem não ser normais e mostrar níveis variáveis de expressão de ZAP-70, dificultando sua análise acurada ²⁶. Comparando os dois métodos, Zucchetto et al. ²⁶ encontrou superioridade do ISO Método quanto a correlação com o *status* mutacional da IgVH.

Para reduzir a subjetividade na estratégia de *gate* e melhor distinção entre as células ZAP-70 positivas e negativas, foi proposta a avaliação da expressão de ZAP-70 com métodos que utilizam valores de intensidade de fluorescência média (IMF) ²⁷. Os resultados se mostraram menos subjetivos ao utilizar a relação da IMF de ZAP 70 das células LLC com células B ou T normais de amostras de sangue periférico ²⁷, tendo sido observado que os parâmetros são mais acurados e reprodutíveis quando se utiliza a relação entre a IMF de linfócitos T normais como controle positivo e células LLC ²⁴. A análise por CFM quantitativa também foi proposta por Kay et al. ²⁸, cujo método a quantidade de molécula da proteína por célula é avaliada através do cálculo da equivalência de fluorescência usando *beads* marcadas (*Quantum FITC molecules of equivalent soluble fluorochrome – MESF – Beads*).

Degheidy et al. ²³ desenvolveram uma técnica de análise de ZAP 70 em um único tubo, utilizando dois clones de anticorpos, amostra de doador normal e de células LLC. Há vantagem em avaliarem-se simultaneamente os níveis de ZAP-70 em células B clonais, tanto quanto para células T e NK residuais (controle positivo), além de células B normais remanescentes (controle negativo) e introduzir uma amostra de doador normal (controle externo). A determinação da expressão do ZAP-70 foi feita através de cinco metodologias de análise: método percentil, relação células T paciente/clone, relação células T doador/clone, relação clone/células B normais, índice Z modificado. Todas as análises empregadas mostraram resultados confiáveis quando associados ao *status* mutacional da IgVH, além ter sido demonstrado que um único

clone de anticorpo é suficiente, fazendo dessa técnica uma opção confiável na prática laboratorial diária.

Expressão de CD38

A expressão de CD38 vinha sendo apontada pela literatura ^{8,29,30,31} como indicativo de mau prognóstico e curso clínico agressivo em LLC, também estando relacionada ao *status* de mutação do gene IgVH. Há estudos que demonstram a associação da expressão do CD 38 com a do ZAP 70, mas essas expressões não são concomitantes em todos os casos ^{10,20}. Os níveis de CD 38 podem mudar ao longo da doença em alguns pacientes e seu aumento pode correlacionar-se com o aumento da agressividade da doença, sendo útil em determinar piora do curso clínico ¹⁸.

Também não parece haver uma relação pareada entre a expressão do CD 38 e a ausência de mutação da IgVH em séries estudadas ¹⁰.

Anormalidades citogenéticas

Aproximadamente de 50 a 80% das LLC carregam anormalidades cromossômicas. Diferentes aberrações cromossômicas determinam diferentes prognósticos ³². Muitos desses defeitos afetam genes responsáveis pela proliferação celular e sobrevida das células (P53, RB, CYCLIND2, CDK4 e MDM2). Dentre os achados clínicos, estas alterações podem se traduzir em um menor tempo de duplicação de linfócitos em sangue periférico, sendo importante ferramenta para classificação e estratificação prognóstica (Tabela 3).

As anormalidades genéticas envolvendo os cromossomos 11, 12, 13 e 17 são comuns em LLC e elas podem predizer o tempo para início de tratamento e a sobrevida. Os principais genes responsáveis pelo mau prognóstico estão associados com del 17p13 e del 11q22 (TP53 e ATM) ³³. A contribuição da trissomia do cromossomo 12 na patogênese da LLC é desconhecida, havendo dúvidas se essa anormalidade pode conferir evolução mais agressiva à doença. A deleção do 13q14 é o achado citogenético mais comum e que determina um curso mais favorável.

A LLC é o distúrbio hematológico mais difícil de ser analisado por citogenética devido ao baixo índice mitótico, pobre resposta a mitógenos e problemas na obtenção de metáfases em altas contagens leucocitárias ³⁴. A associação da citogenética convencional com a hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) tem sido a abordagem de escolha nesse grupo de pacientes. Novos mitógenos têm sido incorporados na técnica da citogenética para melhorar a detecção de anormalidades cromossômicas, principalmente em cariótipos complexos e na descoberta de novas anormalidades recorrentes.

Tabela 3: Anormalidades Cromossômicas em LLC e sua correlação com as características clínicas, sobrevida média e o prognóstico apresentados pelos pacientes.

Anormalidade	Características clínicas	Sobrevida média (meses)	Prognóstico
del13q14	Estágio Binet precoce, IgVh não mutado e baixa taxa de progressão da doença	79 a 133	Bom
12	Morfologia e imunofenótipos atípicos com elevada citomorfologia; diferenciação linfoplasmacitóide; expressão mais intensa de CD20; desvio imunofenotípico de CD5-, positividade de FMC7 e alta frequência de expressão de CD38	33 a 114	Intermediário
del6q	Contagem de células brancas no sangue relativamente elevada; imunofenótipo clássico e CD38+; morfologia atípica e incidência intermediária de hipermutação somática de IgVH	33 a 114	Intermediário
del11q22-23	Doença avançada, com rápido tempo de duplicação dos linfócitos; esplenomegalia e extensa linfadenomegalia abdominal, mediastinal e periférica (em especial na del11q); IgVH não mutado; níveis séricos elevados de desidrogenase láctica e baixos de albumina	13 a 79	Pobre
del17p13		9 a 32	Pobre

Modificado de Paskulin et al.³⁴

Análise do ciclo celular

A análise do ciclo celular, sobretudo o índice de Fase S em doenças linfoproliferativas crônicas, também constitui importante indicativo de progressão da doença.

O estudo do conteúdo do DNA (índice de proliferação, ploidia) pode ser realizado por CFM. São utilizados intercalantes que são incorporados ao DNA dentro do núcleo da célula tumoral (iodeto de propídeo, acridine Orange, DAPI, brometo de etídio, mitramicina) e a fluorescência destes é medida após ter sido excitada pelo laser do citômetro³⁵. A análise dos dados pode ser feita através de modelos matemáticos que utilizam histogramas para quantificar a distribuição das células dentro das diferentes fases do ciclo celular de uma população de interesse, demarcada por um *gate*. Há uma variedade de *softwares* com essa capacidade. Nem sempre é possível ter uma medida acurada da fase S com esses modelos, o que se deve à presença de *debris*, que se confundem muitas vezes às células normais, e à superposição do compartimento G2/M à fase S e também à dificuldade de isolar a célula tumoral do total da amostra, mesmo quando se utiliza marcadores específicos³⁵. Uma forma de se avaliar a qualidade do histograma é através do coeficiente de variação do pico G0-G1. Picos amplos com

altos coeficientes de variação podem dificultar a análise. É prudente considerar que histogramas de DNA com coeficientes de variação do pico G0-G1 maiores que 5,0 não são interpretáveis ³⁵.

Para definição da ploidia é calculado o índice do DNA, o qual se obtém pela relação entre o pico G0-G1 do tecido tumoral e o pico G0-G1 de uma população normal diploide conhecida. Denomina-se uma população diplóide se o índice de DNA é 1,0; hiperdiplóide se o índice de DNA é maior que 1,0; hipodiplóide se é menor que 1,0 e tetraplóide se igual a 2,0. Os valores diferentes desses são considerados aneuplóides ³⁵.

Considerando o grau de variabilidade dos modelos matemáticos, Quijano et al. ³⁶ utilizou a estratégia de *gate* para identificação de subpopulações de linfócitos e análise de distribuição no ciclo celular. Na medula óssea normal a taxa de proliferação de células B diminui com sua maturação. Quijano et al. ³⁶ observou em progenitores B uma fase S+G2/M de $7\% \pm 2,4\%$; nas precursoras B mais maduras fase S+G2/M de $3\% \pm 1,2\%$ e nas células B maduras uma fase S+G2/M de $0,5\% \pm 1,1\%$. Na LLC uma maior porcentagem de células em fase S+G2/M foi detectada na medula óssea versus sangue periférico ($0,7\% \pm 1\%$ versus $0,4\% \pm 0,5\%$) ³², cujo achado sugere que na LLC a medula óssea poderia propiciar um microambiente mais adequado para proliferação e expansão de células B neoplásicas, sendo esse microambiente influenciado por variações nas propriedades de moléculas de adesão das células tumorais na medula óssea e também no estroma do linfonodo.

Para as LLC, que habitualmente são de evolução lenta, uma Fase S acima de 0,5% indica doença mais agressiva ³². Também, na LLC, a aneuploidia do DNA foi associada com uma maior porcentagem de fase S+G2/M. Há também associação entre a maior taxa de proliferação das células B neoplásicas e outras características clínicas e biológicas: pior performance status, infiltração de dois ou mais sítios extranodais, trombocitopenia, aumento de DHL, estádios clínicos Binet B e C ³².

Apesar do valor reconhecido valor prognóstico da pesquisa do *status* mutacional da IgVH e do estudo do cariótipo e FISH, esses recursos laboratoriais não se encontram disponíveis nas instituições brasileiras para tratamento de neoplasias malignas, sobretudo às pertencentes à rede pública.

Frente à necessidade em se obter uma avaliação prognóstica que seja aplicável à prática clínica diária dos pacientes portadores de LLC, para que sejam reconhecidos os pacientes de maior risco de progressão de doença e consequentemente de maior necessidade de vigilância clínica frequente, consideramos que a CFM seja uma opção interessante, pela acessibilidade da sua utilização em nosso meio. A CFM, fundamental para definição diagnóstica, possibilita a

realização concomitante da pesquisa das expressões de CD38 e ZAP 70, que são fatores prognósticos amplamente reconhecidos e adicionalmente realizar a avaliação do ciclo celular, também de valor prognóstico, conforme exposto anteriormente. Nesse estudo retrospectivo, avaliamos a relação das expressões de CD38, ZAP 70, Fase S e índice de DNA entre si, realizadas por CFM, e as relacionamos à situação clínica dos pacientes portadores de LLC atendidos no Hospital Amaral Carvalho de Jaú.

2. Objetivo principal

Avaliação retrospectiva dos indicativos prognósticos de progressão de doença (ZAP 70, CD38, ploidia de DNA e Fase S) dos pacientes portadores de LLC atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hospital Amaral Carvalho (HAC) e verificar sua relação com o *status* clínico desses pacientes.

2.1 Objetivos secundários

Comparar entre si as técnicas de análise do conteúdo de DNA (baseada em modelo matemático – ModFit LT™ e estratégia de *gatings* booleanos).

Comparar entre si as metodologias de análise de ZAP-70 por citometria de fluxo (ISO Método e Análise em Tubo Único).

3. Material e métodos

3.1 Casuística

Foram avaliados retrospectivamente os prontuários de 47 pacientes portadores de LLC atendidos no HAC no período de 10/07/2007 a 30/06/2013, que tinham arquivos laboratoriais de CFM. Foram incluídos no estudo 27 pacientes, por terem todos os dados necessários disponíveis, clínicos e laboratoriais, e que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Exceção se fez àqueles que já haviam ido a óbito, conforme a Autorização de Dispensa do TCLE aprovada pelo CEP da Instituição. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HAC, cadastrado com o número CAAE 02321312.0.0000.5434.

Dos 27 pacientes incluídos no estudo, 14 eram do sexo feminino e 13 eram do sexo masculino. A mediana de idade da população ao diagnóstico foi de 61 anos (38-81 anos). Ao diagnóstico, 8 indivíduos (29,63%) se encontravam no estágio clínico Rai 0; 10 (37,04%) em

Rai I; 3 (11,11%) em Rai I e linfonodos volumosos (>10 cm); 3 (11,11%) em Rai II; 2 (7,41%) em Rai IV e 1 (3,7%) em Rai IV com linfonodos volumosos (>10 cm). (Tabela 4)

A avaliação da situação clínica dos pacientes foi feita uma única vez, através de revisão de prontuários, retrospectivamente, e 15 indivíduos foram considerados com doença estável, ou seja pacientes que não atingiram RC ou RP, porém sem progressão da doença⁷ e desses 15 pacientes estáveis, 7 mantinham-se em observação clínica e 7 em tratamento sem progressão da doença e 1 tinha doença controlada/estável, porém foi a óbito por causa não relacionada à doença. Os 12 pacientes que não preencheram critérios para doença estável foram classificados como pacientes com doença de difícil controle, sendo que 1 cursou com recidiva da doença de forma agressiva e foi submetido à Transplante alogênico de medula óssea (TMO); 5 apresentavam doença com pobre controle à quimioterapia (progressão da doença) ou eram politratados (mantendo doença em progressão) e 6 foram a óbito por causas relacionadas à doença. (Tabela 4)

Os esquemas terapêuticos utilizados nesse grupo de pacientes foram Clorambucil em monoterapia, COP, FC ou FCR.

Com o objetivo de otimizar a análise dos dados dividimos os pacientes quanto à situação clínica em dois grupos: estáveis (pacientes em observação clínica, doença bem controlada com o tratamento, óbito não relacionado à doença) e doença de difícil controle (doença em atividade, progressão, necessidade de transplante de medula óssea, óbito por causa relacionada à doença). Quanto ao estadiamento, foi utilizado Rai modificado.

No estudo 22 pacientes realizaram imunofenotipagem e análise de DNA ao diagnóstico e 5 pacientes quando houve progressão da doença, caracterizada por: duplicação do número de linfócitos em sangue periférico em período igual ou inferior a 6 meses do seguimento do paciente, escape de resposta terapêutica ou situações outras de mudança de comportamento clínico, que indicassem progressão da doença. Nenhum paciente realizou esses exames ao diagnóstico e no momento de progressão de doença.

O diagnóstico de LLC foi realizado por avaliação morfológica da medula óssea e sangue periférico, contagem linfocitária em sangue periférico e imunofenotipagem por citometria de fluxo de amostra da medula óssea, obedecendo aos critérios da Organização Mundial de Saúde¹.

Tabela 4: Estadio ao diagnóstico e situação clínica

SITUAÇÃO CLÍNICA	ESTADIO AO DIAGNÓSTICO					
	Rai O	Rai I	Rai I + Linf. Vol. (> 10 cm)	Rai II	Rai IV	Rai IV+ Linf. Vol. (>10 cm)
Doença atividade/progressão	1	0	0	2	2	0
Estável	6	7	0	1	0	0
Estável/ óbito outra causa	0	1	0	0	0	0
Estável pós-TMO	0	0	1	0	0	0
Óbito por causa relacionada à doença	1	2	2	0	0	1

3.2 Material

Amostras de Medula Óssea (MO): rotineiramente são colhidas amostras por punção esternal 5 mL de aspirado de medula óssea em EDTA Na₃ e processadas dentro de 24 horas da coleta. Paralelamente são realizadas avaliações morfológicas das amostras coletadas.

Sangue periférico de doador normal: para controles negativo e positivo do ZAP 70, são utilizados 200 µL de amostras de doadores de sangue, normais e anônimos, retiradas dos tubos colhidos para testes pré transfusionais, sabendo-se que linfócitos T normais expressam ZAP-70 e linfócitos B normais não. Também foram utilizadas células mononucleares de doadores normais, separadas por Ficoll-Paque[®] para controle diplóide da análise de DNA.

Painel de anticorpos monoclonais e utilizados como rotina na avaliação imunofenotípica das LLC (tabela 5):

Tabela 5: Paineis de anticorpos

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Marca
CD45	PerCP	2D1	BD
CD19	PE	SJ25C1	BD
CD19	PerCP Cy5.5	SJ25C1	BD
CD10	FITC	HI10a	BD
CD20	APC	L27	BD
CD5	FITC	L17F12	BD
CD38	FITC	HB7	BD
IgM	FITC	poliCLONAL	DAKO
KAPPA	PE	POLiClonal	DAKO
LAMBDA	FITC	POLICLONAL	DAKO
CD24	PE	ML5	BD PHARMINGEN
FMC7	FITC	FMC7	BD
ZAP 70	ALEXA FLUOR 388	1E7.2	INVITROGEM
CD23	PE	EBVCS-5	BD

Reagentes para Ploidia de DNA: DNA Cycletest plus® - BD

Citômetros de Fluxo (CF): FACSCalibur (BD)TM, provido de 2 lasers e 4 fluorescências.

Software para aquisição da análise dos dados do CF: CellQUEST (BD)TM para aquisição, PAINT-A-GATE Pro(BD)TM e Infinicyt (Cytognos)TM para análise de fenótipos e Infinicyt (Cytognos)TM e ModFit LTTM para análise de DNA.

3.3 Métodos de citometria de fluxo

3.3.1 Técnica de ZAP – 70 (Fenotipagem intracitoplasmática)

As concentrações celulares são ajustadas em 10^6 células, tanto da amostra de MO do paciente quanto do sangue periférico do doador, a partir de quantificação por contador automático (T890 – Coulter®). O volume de anticorpos monoclonais (AcMo) utilizado para cada tubo segue a especificação de cada fabricante ou pela titulação padronizada pelo laboratório. São preparados dois tubos com a amostra do paciente, um contendo o controle isotípico cyIgG1a AlexaFluor e uma combinação dos AcMo CD5 e CD19 em APC; e outro tubo teste com cyZAP-70 AlexaFluor e a mesma combinação de CD5 e CD19 APC. Primeiramente procede-se a incubação com os AcMo de superfície com CD 5 + CD 19APC por 15 minutos à temperatura ambiente (TA) e no escuro.

Para a técnica de tubo único utiliza-se como controles negativo e positivo uma amostra do doador, combinando-se em um tubo o CD19 PE para linfócitos B com CD3 PerCP. Para linfócitos T. Adiciona-se o volume suficiente da amostra do doador contendo 1×10^6 células por tubo, sendo o mínimo de 5 μ L e máximo de 300 μ L respectivamente. Procede-se a incubação com AcMO de superfície celular (CD19 e CD 3) por 15 minutos à TA e no escuro.

A seguir adiciona-se aos tubos a solução estabilizante A Fix & Perm (ADG)®, homogeniza-se e mantém-se a mistura à TA, no escuro por 15 minutos. Adiciona-se o tampão de lavagem PBS e centrifuga-se a 300 g por 5 minutos. Remove-se o sobrenadante e coloca-se a solução permeabilizante B Fix & Perm (ADG)®, homogeneiza-se e divide-se a amostra do tubo do doador em iguais volumes, que serão colocados nos dois tubos da amostra do paciente, previamente incubadas com o CD 19+CD 5 de membrana e também com a solução B.

Em seguida incuba-se a amostra os anticorpos intracelulares: um tubo com ZAP-70 e outro com isotipo IgG1a, por 10 a 15 minutos à TA e no escuro, adiciona-se de 2 a 3 mL do tampão de lavagem PBS, centrifuga-se a 300g por 5 minutos. Remove-se o sobrenadante e re-suspende-se em 300 μ L paraformaldeído 0,5%, para serem analisadas no citômetro de fluxo.

Para a técnica de ISO controle, procede-se da mesma maneira, estando a diferença na preparação do controle celular, ou seja, ao invés dos linfócitos do doador serem os controles positivos (T) e negativos (B), utiliza-se a marcação de superfície dos linfócitos T, NK e B do próprio paciente, incubando-se os respectivos marcadores de superfície: CD 56 + CD 3 PE, CD 19PerCP. Dessa forma, são preparados 2 tubos da amostra do paciente: um com cyIgG1a AlexaFluor (isotipo), CD 56 + CD 3 PE, CD 19PerCP e CD19+CD5 APC e outro com cyZAP 70 em Alexa Fluor e os mesmos marcadores citados.

3.3.2 Técnica de marcação de DNA e antígenos da membrana - KIT: Cycletest™ plus DNA Reagent kit (BD)®

Inicialmente prepara-se um tubo controle diplóide utilizando-se as células mononucleares de doador normal, separadas em FICOLL PAQUE®.

Ajusta-se a concentração das amostras, tanto do controle quanto do paciente, para uma suspensão de 5×10^5 células. No tubo da amostra do paciente adicionam-se inicialmente os AcMo de membrana CD19+CD5 FITC com volume padronizado pelo laboratório e incuba-se de 15 a 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Em seguida, adiciona-se 1 mL da solução de lise FACSLysing BD®, diluída 1 vez nos tubos controle e do paciente. Incuba-se por 10 minutos à TA e no escuro. Centrifuga-se a 300g por 5 minutos e descarta-se o sobrenadante. Lava-se 1 vez com o tampão DNA, centrifuga-se e retira-se o sobrenadante.

Adiciona-se a solução A (tampão de tripsina) a cada tubo, incuba-se por 10 minutos e adiciona-se a solução B (inibidor de tripsina e RNase), sem remover a solução A. Após 10 minutos, adiciona-se a solução C (iodeto de propídeo -IP) gelada (entre 2 a 8° C) e incuba-se a amostra no escuro e no refrigerador (entre 2 a 8°C) por mais 10 minutos.

As amostras devem ser estocadas no refrigerador até o momento da análise e devem ser adquiridas até 3 horas após a colocação do IP.

3.4 Análises das amostras

As amostras foram processadas pelo Laboratório de Citometria de Fluxo do Hospital Amaral Carvalho, Jaú – SP. Foram revistas todas as análises de ZAP – 70 e CD 38 utilizando o *software* Infinicyt (Cytognos)TM, já que as amostras mais antigas foram analisadas pelo *software* PAINT-A-GATE Pro (BD)TM, e o Infinicyt (Cytognos)TM é um *software* mais moderno e com um maior número de recursos para análise mais acurada. Também foram reanalisadas as amostras quanto ao conteúdo de DNA utilizando o *software* Infinicyt (Cytognos)TM com a estratégia de *gating* para análise de distribuição das células no ciclo celular, na qual se delimitam as populações de maneira sucessiva em cada gráfico, e com isso é possível uma melhor eliminação de *debris* (Figura 4).

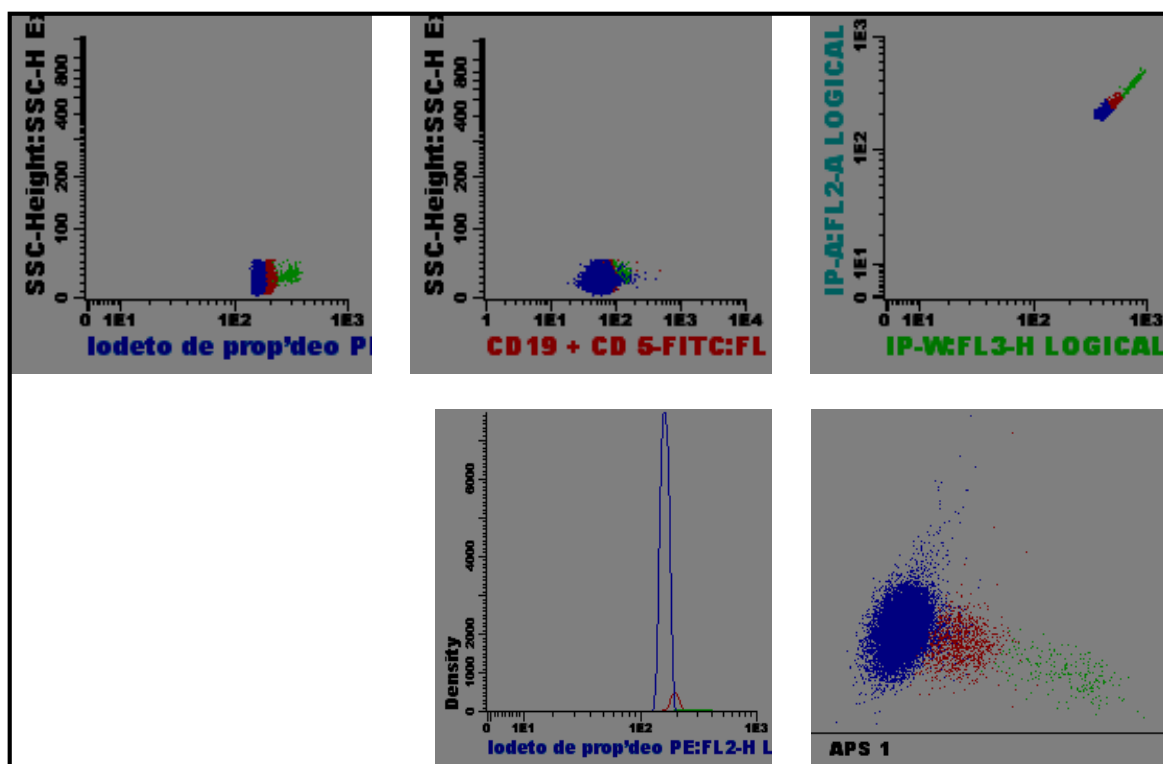


Figura 4 - Análise DNA Infinit cyt – através da estratégia de *gates* sucessivos em cada gráfico é possível isolar a população alvo e com isso eliminar os *debris* que poderiam prejudicar a quantificação de cada fase do ciclo celular. O pico/população G0-G1 está representado em azul, em vermelho a Fase S e em verde o pico G2M.

Utilizou-se também software ModFit™ que estima a distribuição das populações através de um modelo matemático (Figura 5 e 6), com a finalidade de posterior comparação dos resultados das técnicas. Nesse modelo há maior dificuldade em se eliminar os *debris* com os *gates* geométricos e dessa forma os resultados das porcentagens de Fase S são mais altos por contaminação

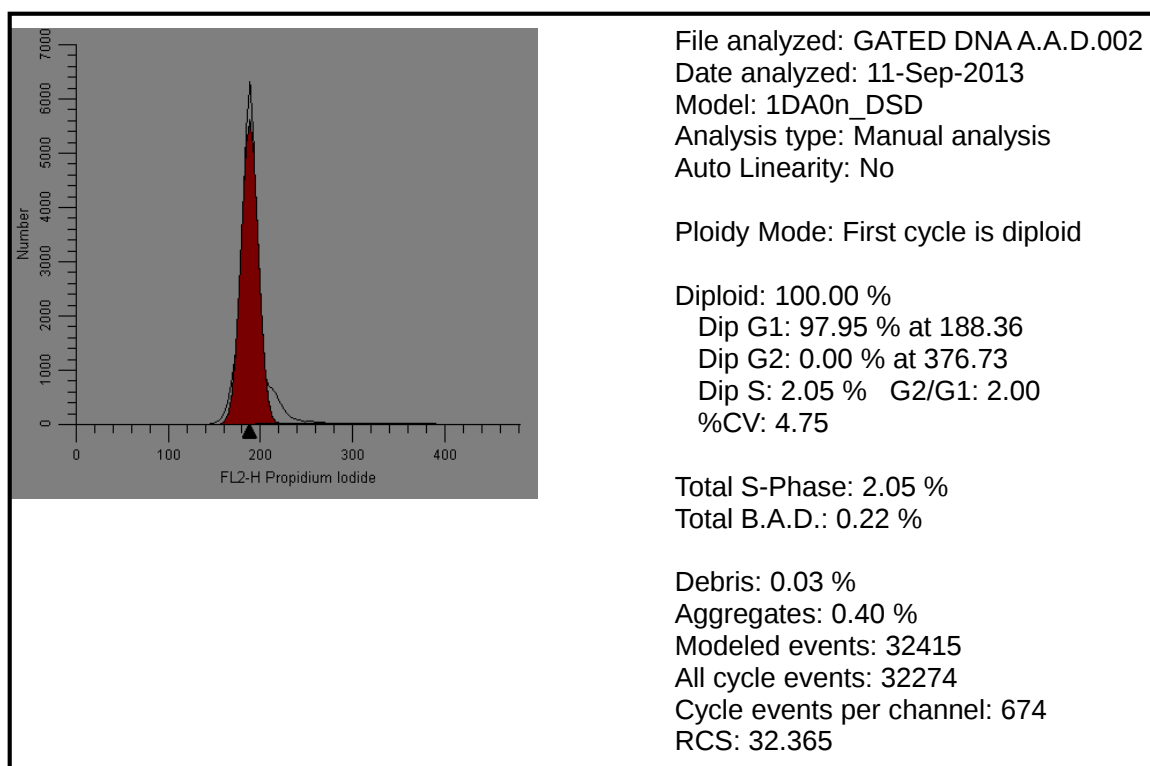


Figura 5 - Análise DNA software ModFit – observa-se em vermelho o pico G0-G1 e a sua direita o pico da Fase S. O cálculo da porcentagem de cada fase do ciclo celular é mostrado à direita

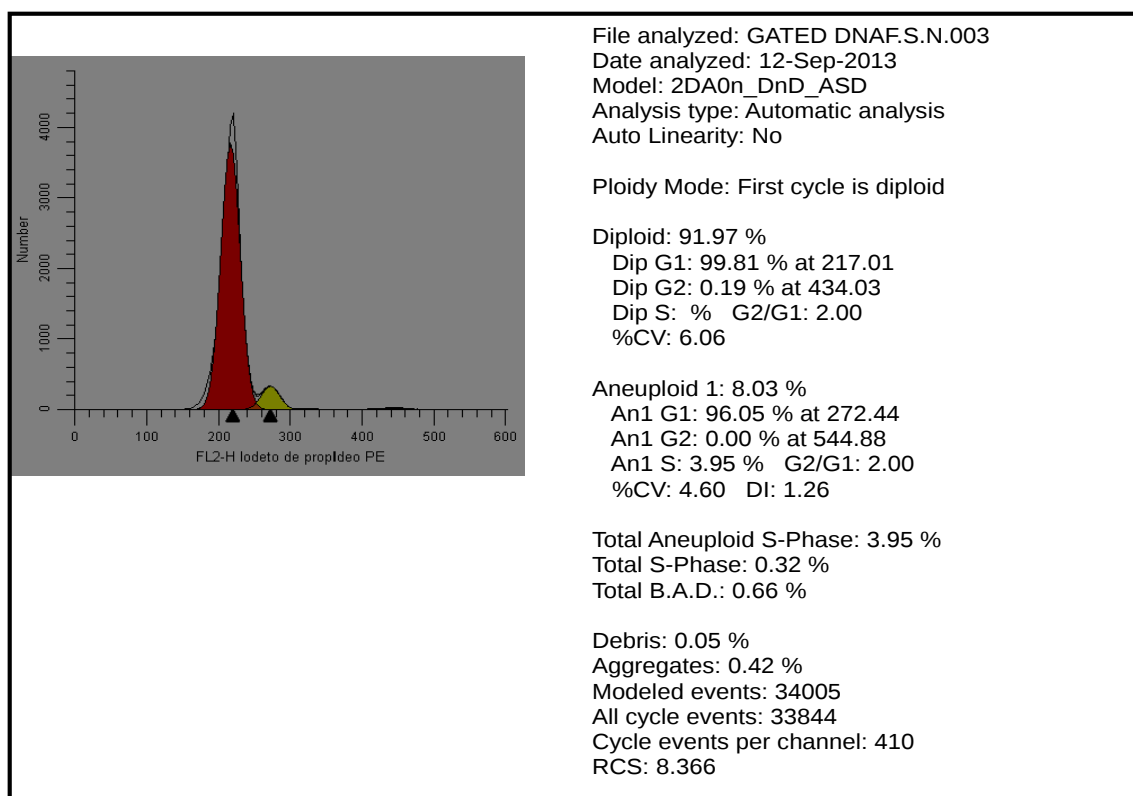


Figura 6 – ModFit: população aneuplóide – em amarelo, à direita do pico G0-G1, encontra-se o pico aneuplóide. A quantificação dos picos pode ser automática ou manual e está representada à direita da figura

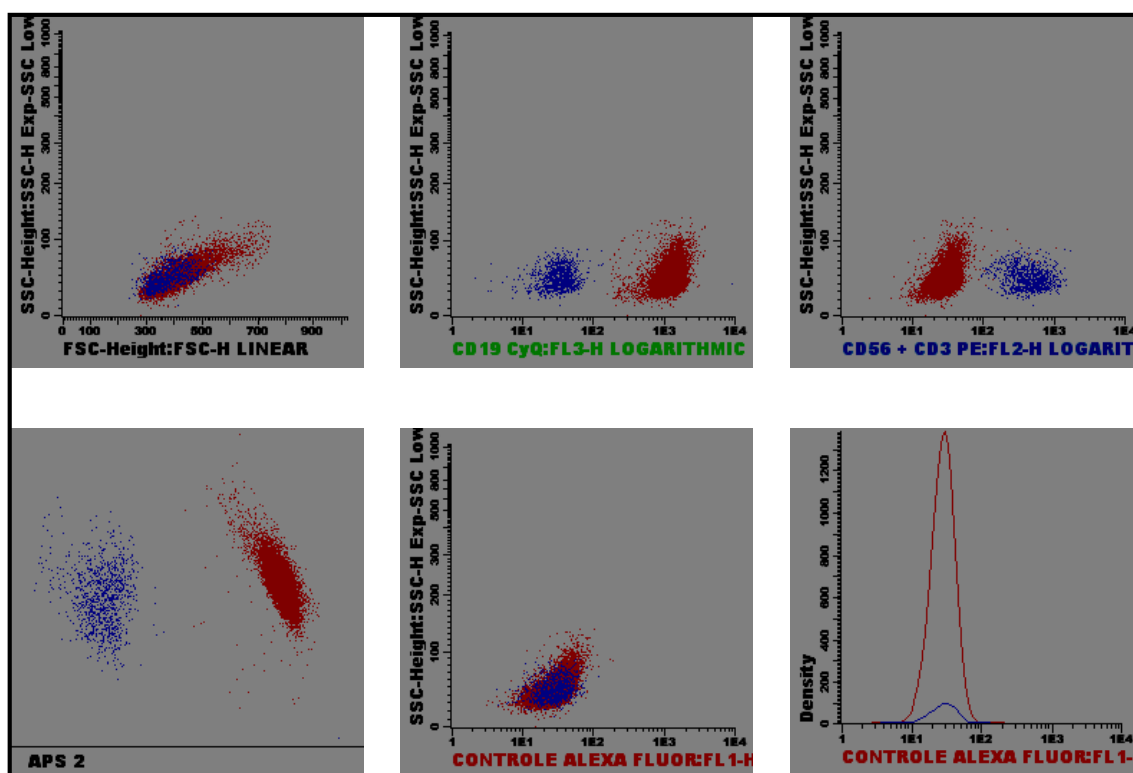


Figura 7 – ISO Método para avaliação de ZAP 70 – em azul a população de células T/NK, em vermelho a população de células de LLC. Nessa amostra é utilizado um controle isotípico negativo (Alexa Fluor)

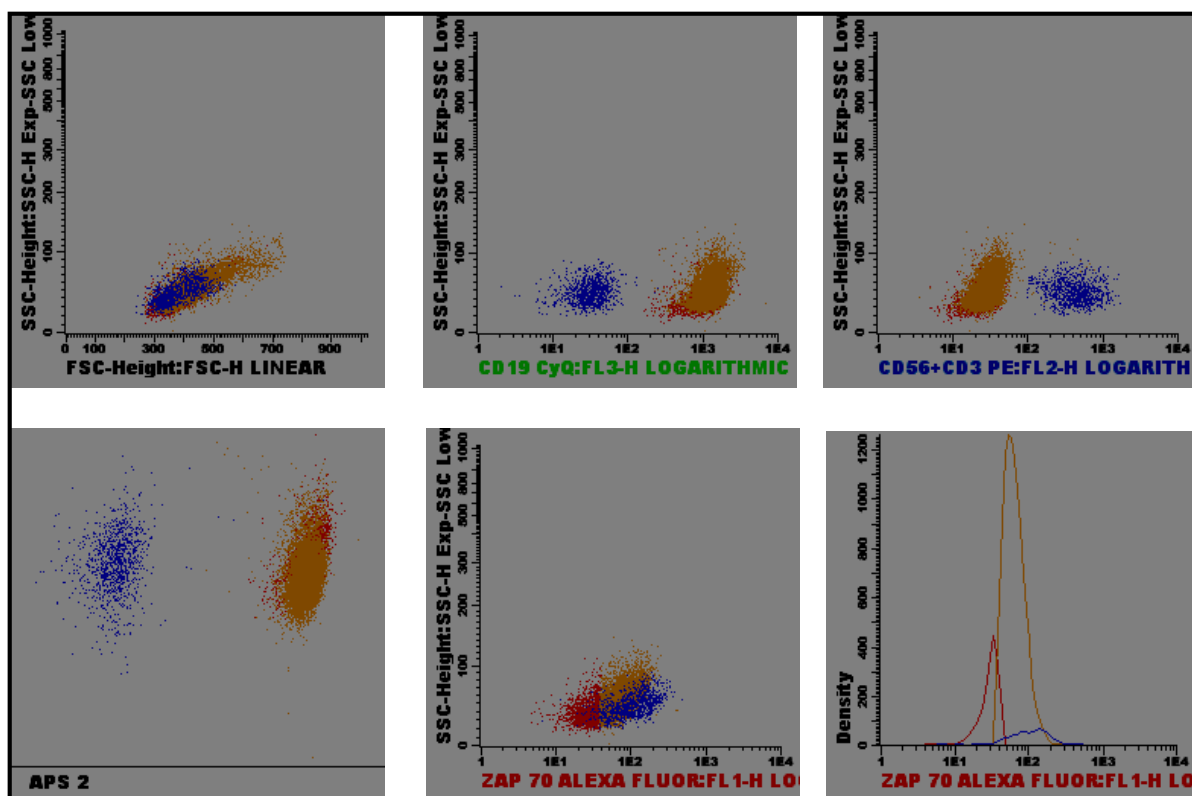


Figura 8 - ISO Método para avaliação de ZAP 70 – em azul está representada a população de células T/NK (controle interno), em vermelho a população de células B (Controle negativo) e em amarelo a população de células de LLC. Nota-se que o sinal da população LLC excede o da população controle negativo e se sobrepõe ao sinal da população controle positivo, dessa forma as células LLC são consideradas positivas para ZAP 70

As análises das amostras quanto ao ZAP-70 foram realizadas utilizando controle isotópico e controle interno (ISO Método) até o ano de 2011 (figura 7 e 8), a partir do ano de 2012 todas as análises de ZAP-70 utilizaram a metodologia de Análise em Tubo Único (figura 9).

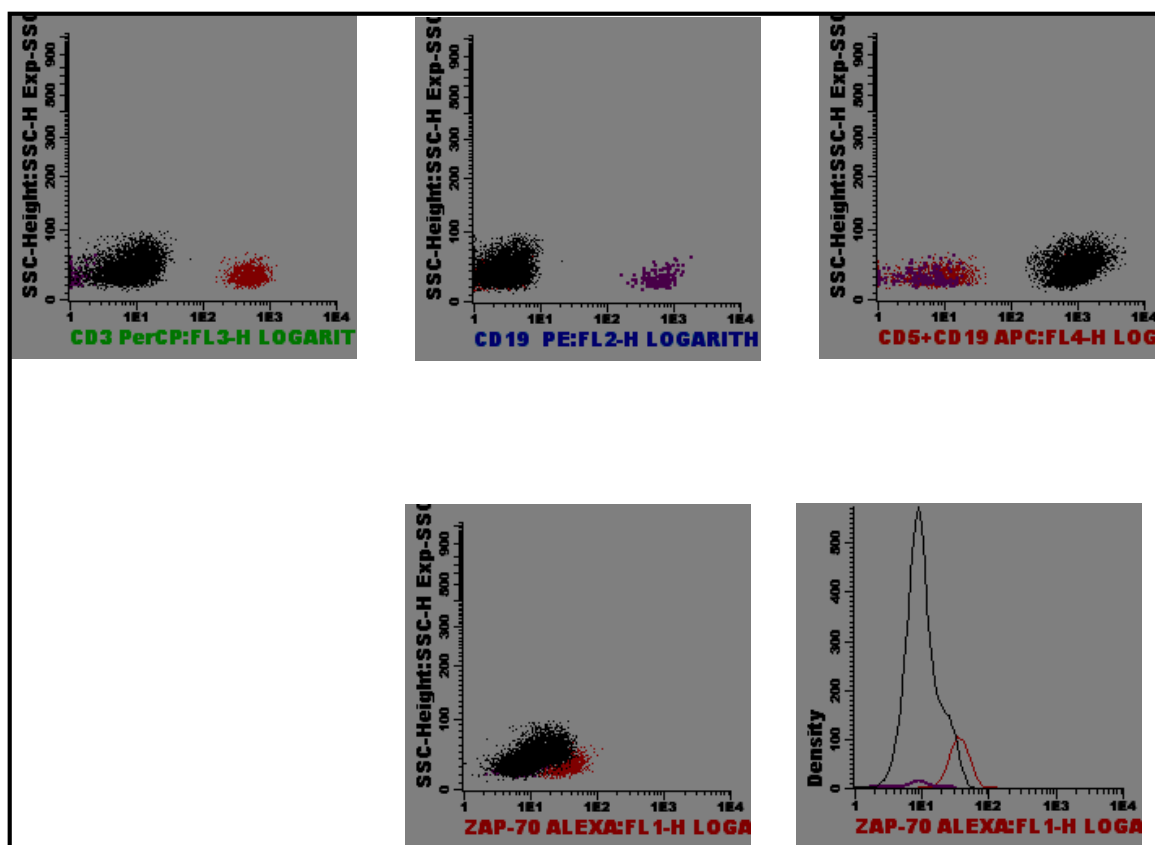


Figura 9 - ZAP 70 positivo parcial - tubo único: em preto a população de células de LLC, em vermelho controle externo positivo (células T de doador), em roxo controle externo negativo (células B de doador)

4. Resultados

A distribuição dos pacientes quanto a Classificação de Rai modificada no momento do exame de imunofenotipagem para determinação do CD38, ZAP 70 e Fase S, e seus respectivos resultados está representada na tabela 6. Somente 3 (11,11%) pacientes foram positivos para CD38, sendo que 1 estava em baixo risco ao diagnóstico e 2 em risco intermediário. Dos 24 pacientes negativos para CD 38 (88,89%), 10 estavam em baixo risco, 11 em risco intermediário e 3 em alto risco, segundo os critérios de Rai. Os resultados para CD38 foram considerados positivos quando a expressão desse marcador foi superior a 30%.

Em relação a determinação do ZAP 70, 8 pacientes foram avaliados pela Técnica em Tubo Único, em todos os demais foi utilizada a técnica do ISO Método. Onze pacientes foram positivos para ZAP 70 (40,74%) do total de 27 pacientes. Desses, 3 se encontravam em baixo risco, 7 em risco intermediário e 1 em alto risco. Dezesesseis pacientes foram ZAP 70 negativo (59,26%), desses 5 foram baixo risco e 9 risco intermediário e 2 alto risco. As amostras foram

consideradas positivas para ZAP 70 quando os valores obtidos excederam 20% o sinal de fluorescência do controle negativo.

Tabela 6: Características dos pacientes portadores de LLC quanto ao estadiamento, expressão de CD38, ZAP 70 e Fase S

		BAIXO RISCO (RAI 0)	RISCO INTERMEDIÁRIO (RAI I e RAI II)	ALTO RISCO (RAI III e RAI IV)
CD38	POSITIVO (>30%)	1	2	0
	NEGATIVO	10	11	3
ZAP 70	POSITIVO (>20%)	3	7	1
	NEGATIVO	5	9	2
FASE S	>0,5%	7	7	1
	<0,5%	1	8	1

A estratégia de análise do ciclo celular que apresentou melhores resultados foi a que utiliza o software Infinicyt™, por ter apresentado os resultados mais próximos aos encontrados na literatura. Foram excluídos 2 pacientes que apresentaram Fase S igual a 0, o que sugere contaminação da amostra com sangue periférico. Em 15 pacientes encontrou-se uma Fase S maior que 0,5% (60%), desses 7 estavam em baixo risco, 7 em risco intermediário e 1 em alto risco. Abaixo de 0,5% ficaram 10 pacientes (40%), 1 em baixo risco, 8 risco intermediário e 1 alto risco.

4.1 Expressão de CD 38

A distribuição dos pacientes quanto a expressão de CD38 e a situação clínica no momento da avaliação está representada na Tabela 7. Dos 24 pacientes que não expressavam CD38, 13 (54,16%) se encontravam com doença estável e 11 (45,84%) com doença de difícil controle. Considerando os três pacientes positivos para CD38, 2 (66,66%) estavam com doença estável e 1 (33,34%) com doença de difícil controle (óbito).

Tabela 7: Distribuição dos pacientes quanto à expressão de CD 38 e a situação clínica no momento do estudo

	Doença estável	Doença de difícil controle
CD38 negativo	13	11
CD38 positivo (>30%)	2	1

4.2 Expressão de ZAP-70

A distribuição dos pacientes quanto a expressão de ZAP 70 e a situação clínica no momento da avaliação está representada na tabela 8. Dos 27 pacientes avaliados para ZAP 70, 16 foram negativos e 11 foram positivos. Quanto aos negativos, 9 dos 16 pacientes (56,25%) estavam com doença estável e 7 (43,75%) apresentavam doença de difícil controle. Dentre os positivos 6 (54,55%) se encontravam com doença estável e os outros 5 (45,45%) com doença de difícil controle (sendo 3 óbitos desses 5 pacientes).

Tabela 8: Distribuição dos pacientes quanto à expressão de ZAP 70 e a situação clínica no momento da avaliação

	Doença estável	Doença de difícil controle
ZAP 70 negativo	9	7
ZAP 70 Positivo(>20%)	6	5

4.3 Análise do Índice de Fase S (Software Infinicyt)

Em dois pacientes, após eliminação de *debris*, a Fase S/G2M foi igual a zero, o que sugeriu contaminação com sangue periférico, e portanto foram excluídos da análise.

Os pacientes foram separados em dois grupos: Fase S/G2M abaixo de 0,5% e acima de 0,5%, a distribuição dos pacientes em relação à Fase S e a situação clínica no momento da avaliação está representada na Tabela 9.

Tabela 9: Distribuição dos pacientes quanto a Fase S e a situação clínica no momento da avaliação

	Doença estável	Doença de difícil controle
Fase S <0,5%	6	4
Fase S >0,5%	9	6

Dez pacientes possuíam Fase S < 05%, 6 (60%) apresentavam-se com doença estável e 4 (40%) com doença de difícil controle. Dos 15 pacientes com fase S >0,5%, 9 (60%) mantinham doença estável e 6 (40%) com doença de difícil controle. Dos 6 pacientes com Fase S>0,5% e doença de difícil controle, 4 foram a óbito.

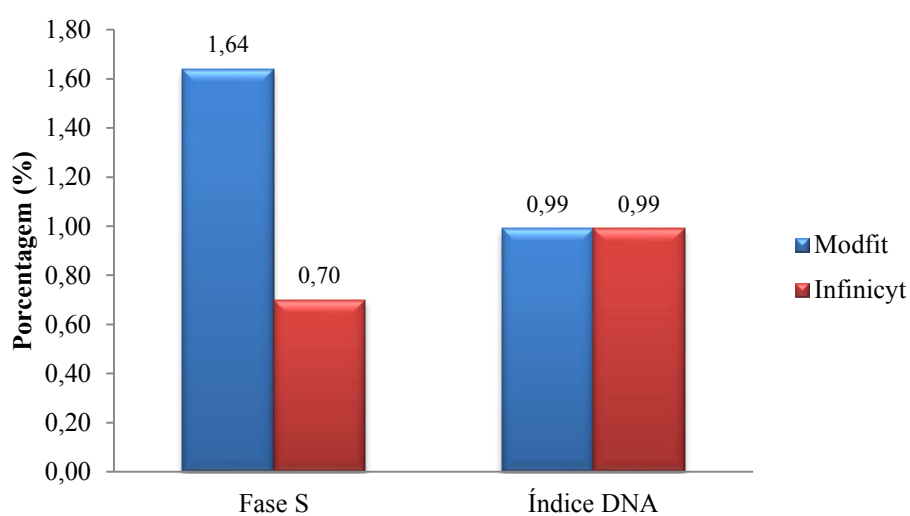
4.4 Comparação das metodologias de análise de DNA ModFit™ e Infinicyt™

A Tabela 10 mostra os resultados obtidos na avaliação do ciclo celular pelo *software* ModFit™ e o *software* Infinicyt™. Estão relacionados os dados da quantificação da Fase S, índice DNA e ploidia utilizando-se as duas metodologias.

Para comparação dos resultados da metodologias foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, não sendo observada diferença estatística entre os dois métodos ($p>0,05\%$). (Figura 10)

Tabela 10: Análise do ciclo celular utilizando o *software* ModFit™ e Infinicyt™

	ModFit				Infinicyt		
	FASE S	Índice DNA	CV	Aneuplóide	FASE S/G2M	Aneuplóide	Índice DNA
1	1,20%	1,09	3,23		0,70%		1,13
2	4,28%	0,99	3,47		4,69%		0,99
3	0,72%	0,96	4,03		2,16%		0,96
4	4,05%	1,03	4,35		0,28%		1,04
5	1,92%	1,01	8,40		0,45%		1,01
6	2,05%	0,99	4,75		7,76%		0,97
7	0,68%	1,07	4,71		0,33%		1,15
8	4,79%	0,92	5,57		2,16%		0,92
9	1,23%	0,89	3,74		0,48%		0,89
10	4,47%	0,90	3,96		0(contaminação)		0,89
11	0,73%	1,14	4,15		0,63%		1,08
12	1,84%	1,00	4,23		0,86%		1,00
13	0,80%	0,97	2,25		0,77%		0,97
14	3,14%	1,09	5,4		1,77%		1,08
15	0,23%	0,98	4		0,27%		0,98
16	0,66%	0,99	5,74		0,30%		0,98
17	2,51%	1,22	5,82	0,70%	0(contaminação)		1.22
18	6,95%	1,00	4,77	0,69%	7,97%		0,98
19	1,64%	1,07	5,52		0,07%		1,07
20	0,67%	0,89	4,44		0,74%		0,89
21	0,83%	0,91	3,48		0,34%		0,92
22	1,70%	1,19	4,46		0,27%		1,2
23	0,37%	0,90	3,04		0,66%		0,9
24	3,47%	1,02	5,43		2,89%		1,04
25	0,32%	1,25	4,60	8,03%	0,37%	6,63	0,99
26	2,11%	0,94	4,76		1,25%		0,94
27	2,08%	0,99	2,73		1,41%		0,99

**Figura 10** - Foi realizado o teste não paramérico de Mann-Whitney e não se observou diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os métodos de avaliação Modifit e Infinicyt para a Fase S e Índice de DNA

4.5 Comparação das metodologias ISO Método e Análise em tubo único

O ZAP 70 foi determinado pela metodologia de Análise em tubo único em 8 amostras (29,6%), após validação desse novo método pelo laboratório, a partir de 2012.

Pelo baixo número de amostras utilizando o tubo único, não foi possível realizar-se uma análise estatística comparativa entre os dois métodos, embora visualmente fosse observada a superioridade da metodologia com tubo único (controle celular com linfócitos de doador normal) em relação ao IsoMétodo. (Figura 7 e 8)

4.6 Perfil dos pacientes com doença de difícil controle e óbitos por causa relacionada à doença

Dos 6 pacientes que foram a óbito por causas relacionadas à doença, 3 possuíam linfonodos volumosos ao diagnóstico e 1 evolui com linfonodomegalia volumosa refratária durante o tratamento, 1 paciente possuía Fase S aumentada nas duas metodologias (ModFit e Infinicyt), 1 com Fase S aumentada somente no ModFit (contaminação pelo Infinicyt).

O paciente que necessitou ser submetido à TMO, durante a evolução cursou com linfonodomegalia volumosa, apresentava CD38 de 29,24%, ZAP 70 de 77,61% e apesar de Fase S menor que 0,5% nas duas metodologias, teve porcentagens altas de aneuploidia 8,03% (ModFit) e 6,63% (Infinicyt).

Outros dois pacientes em que foi constatada aneuploidia do DNA, tiveram progressão da doença, apesar de diferentes linhas de tratamento.

5. Discussão

Houve concordância de 81,5% entre a expressão de ZAP 70 e CD 38, ou seja, 16/27 pacientes eram duplo negativos e 3/27 eram duplo positivos para esses marcadores. Observamos ainda que nos pacientes com fenótipo CD 38+, todos expressavam ZAP 70. Dos três pacientes duplo positivos, dois apresentavam doença estável, e um foi a óbito por doença progressiva. Três dos 16 pacientes duplo negativos para CD 38 e ZAP 70 apresentaram doença progressiva e óbito relacionado à doença. Dos oito pacientes que apresentavam expressão de ZAP 70 sem apresentar expressão de CD 38, 2 evoluíram a óbito pela atividade de doença. A expressão de ambos os parâmetros segue um padrão de concordância e estão relacionados entre si, embora isso não seja obrigatório, o que já havia sido descrito por Wiestner et al.¹⁰ e Chen et al.²⁰. A relação desses parâmetros com a evolução clínica poderia ser melhor avaliada com seguimento dos pacientes por período maior, em especial a expressão de CD 38 que pode mudar

ao longo da doença e o aumento de sua expressão pode estar associado à maior agressividade da doença.^{18,31}

Em relação à análise de DNA por CF, houve discrepância de resultados entre os índices de Fase realizadas pelos software ModFit LT™ e Infinicyt™, não foi observada diferença estatisticamente significativa. Apenas três dos 27 pacientes avaliados pelo software ModFit LT™ para análise de DNA apresentaram índice de Fase S < 0,5%. Na análise feita pelo Infinicyt™ foi observado que 15 pacientes apresentaram Fase S > 0,5%, em 2 pacientes não foi possível determinação de fase S por ambos os softwares, e em 10 pacientes a Fase S foi <0,5%, que está relacionada a melhor prognóstico. O Modfit LT™ tem limitações para que com o *gate*, que é geométrico, se excluam os *debris* celulares, e embora o software ofereça a possibilidade de exclusão dos mesmos. Porém observamos que mesmo utilizando essa ferramenta do software, sempre há “contaminação” desses *debris* nas diversas populações celulares que compõem as fases do ciclo celular. Esse fato pode explicar a diferença de resultados entre as duas metodologias.

Em 6 dos 10 pacientes com Fase S < 0,5% pela análise do Infinicyt™ observamos doença estável com terapêutica de 1ª linha ou em acompanhamento sem necessidade de tratamento. Em 3 desses 10 pacientes não houve resposta terapêutica, com um óbito em progressão de doença.

Seis dos 16 pacientes que não apresentaram expressões de CD 38 e de ZAP 70 (duplo negativos) tinham índice de Fase S < 0,5%, não havendo relação entre esses parâmetros, porém 4 desses 6 apresentavam doença indolente, indicando potencial relação desses parâmetros com o prognóstico. Dois dos 3 pacientes duplo positivos para CD 38 e ZAP 70 apresentaram Fase S > 0,5%, sendo que um deles apresentou doença de difícil controle e óbito.

Foi verificado que 60% dos pacientes (9 / 15) com fase S > 0,5% estavam com doença estável no momento da avaliação, e 6/15 apresentaram doença progressiva ou mesmo óbito, independente da expressão de CD 38 e ZAP 70. Seis dos 10 pacientes com Fase S < 0,5% apresentavam doença indolente e 4 doença resistente à terapêutica. Os dados indicam a possibilidade da utilidade prognóstica do índice de Fase S para avaliação prognóstica dessa série de pacientes.

6. Conclusões

Todos os três fatores analisados são considerados prognósticos pela literatura. Nos casos estudados, em que os pacientes encontravam-se em momentos clínicos diversos, não pudemos observar um padrão uniforme de relação entre os fatores prognósticos e o estado clínico do paciente. Isso nos levou a concluir que o n pequeno e a avaliação realizada em apenas um ponto da evolução clínica dos pacientes dificultaram que, nesse estudo, sejam relacionados entre si, a clínica e os fatores prognósticos estudados. Por outro lado, observamos que há uma tendência a que os parâmetros prognósticos estudados se relacionem ao perfil de estadio / agressividade de doença, visto que a maioria dos pacientes cujas células leucêmicas não expressaram CD 38 e ZAP 70, e que apresentaram índice de Fase S $< 0,5\%$ foram os classificados em risco baixo ou intermediário.

Há controvérsias quanto à correlação da expressão do CD 38 e o status de mutação do gene V_H , assim como ao seu valor preditivo de mau prognóstico^{30, 31}. Nesse estudo também não observamos relação da expressão desse marcador com a presença de doença de difícil controle, embora tenha sido descrito que a expressão de CD38 pode aumentar durante a progressão da LLC para doença mais agressiva³¹. Dessa forma não se pôde estabelecer relação direta ou inversa da expressão de CD 38 com o prognóstico.

Quanto à expressão de ZAP 70, também não foi possível relacioná-lo à doença de difícil controle conforme esperado pelas informações de literatura²¹. Também foi atribuído ao número pequeno de pacientes avaliados essa dificuldade de relacionar o ZAP 70 como indicativo prognóstico. Outra razão que se pode relacionar à falta de correspondência prognóstica é técnica, já que o *cut-off* para positividade fica dificultado quando se utiliza o ISO Método. Considerando-se que a maioria dos pacientes foi avaliada por esse método, essa pode ser uma das razões para falta de correlação clínico-laboratorial. Por outro lado, em até 25% dos casos não existe correlação da expressão de ZAP 70 com o status de mutação do gene V_H e mau prognóstico e pode ser que também na nossa série de pacientes realmente eles não se relacionem. Não dispomos de avaliação de PCR para confirmar essa assertiva.

A análise do conteúdo de DNA, tanto pelo software Infinicyt™ quanto pelo Modifit™, mostrou não haver relação de ploidia e índice de fase S com o *status* clínico da doença na nossa série de pacientes, embora essa relação tenha sido demonstrada pela literatura.

Para que seja possível se relacionar a evolução clínica dos pacientes com os fatores considerados prognósticos, é importante que sejam feitas avaliações periódicas desses marcadores, em estudo prospectivo.

Quanto às questões técnicas dos objetivos secundários desse estudo, observamos que os dois métodos de análise do conteúdo de DNA são superponíveis em resultados. Quanto às metodologias de preparo de amostras para avaliação da expressão de ZAP 70, houve poucos pacientes com a metodologia em tubo único para que os resultados pudessem ser comparáveis ao de ISO Método, embora na prática diária a técnica de tubo único seja superior à outra para separação entre as populações positivas e negativas.

Finalmente, a evolução das metodologias em citometria de fluxo na última década tem permitido melhor avaliação diagnóstica e prognóstica das doenças onco-hematológicas, incluindo a LLC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. SWERDLOW, S.H; CAMPO, E.; HARRIS, N.L. et al. WHO Classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC: Lyon 2008.
2. YAMAMOTO, M.; KIMURA, E.Y.S.; GUIRAO, F.P. Leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico. In: SALES, M.M.; MORAES-VASCONCELOS, D.; DUARTE, A.J.S. *Citometria de fluxo: aplicações no laboratório clínico e de pesquisa*. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. P.183-189.
3. HALLEK, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am. J. Hematol.*, vol. 88, p. 803-816, 2013. doi: 10.1002/ajh.23491.
4. MATUTES, E.; OWUSU-ANKOMAH, K.; MORILLA, R. et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia.*, vol.8, p.1640-1645, 1994.
5. FURMAN, R.R. Prognostic Markers and Stratification of Chronic Lymphocytic Leukemia., vol.2010, p.77-81, Dez. 2010.
6. GRIBBEN, J.G. How I treat CLL upfront. *Blood.*, vol.115, n.2, p.187-197, Jan.2010.
7. HALLEK, M.; CHESON, B.D.; CATOVSKY, D. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: A report from the international Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood.*, vol.111, n.12, p.5446-5456, Jun.2008.
8. DAMLE, R.N.; WASIL, T.; FAIS F. et al. Ig V gene mutation status and CD 38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.*, vol.94, p.1840-1847, 1999.

9. ROSENWALD, A.; ALIZADEH, A.A.; WIDHOPF, G. et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.*, vol.194, p.1639-1647, 2001.
10. WIESTNER, A.; ROSENWALD, A.; BARRY, T.S. et al. ZAP 70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood.*, vol.101, p.4944-4951, 2003.
11. MESQUITA JUNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T. et al. Sistema Imunitário – Parte II. Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev. Bras. Reumatol.*, vol.50, n.5, p.552-580, 2010.
12. GINESTOUX, C.; PROTAT, C. editors. Génétique moléculaire des immunoglobulines. Tradução: Geraldo A. S. Passos. Montpellier: IMGT®, the international immunogenetics information system®, 2003. Available from: http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/IGandBcells/_PT/Genetica/fig1.jpg
13. GARICOCHEA, B. Patogênese da Leucemia Linfóide Crônica. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, vol.25, n.4, p.241-246, 2005.
14. ABBAS, A.K.; LITCHMAN, A.H.; PILLAI, S. et al. Ativação da célula B e produção de anticorpos. In: *Imunologia celular e molecular*. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 592p. Tradução de: Cellular and molecular immunology, 7th ed.
15. MESSMER, B.T.; ALBESIANO, E.; EFREMOV, D.G. et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.*, vol.200, p.519-525, 2004.
16. WIESTNER, A. Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.*, vol.120, p.4684-4691, 2012.
17. GRIBBEN, J.G. Molecular Profiling in CLL. *Hematology.*, vol.2008, p.444-449, Jan.2008.
18. KEATING, M.J.; CHIORAZZI, N.; MESSNER, B. et al. Biology and Treatment of Chronic Lymphocytic. *Leukemia.*, vol.2003, p.153-175, Jan. 2003.
19. VROBLOVA, V.; SMOLEJ, L.; KREJSEK, J. Pitfalls and limitations of ZAP-70 detection in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology.*, 2012; vol.17, n.5, p.268-274, 2012.
20. CHEN, L.; WIDHOPF, G.; HUYNH, L. et al. Expression of ZAP 70 is associated with increased B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.*, vol.100, p.4609-4614, 2002.

21. WANG, Y.H.; FAN, L.; XU, W. et al. Detection methods of ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Exp Med.*, vol.12, p.69-77, 2012.
22. QUIROGA, M.P.; BALAKRISHNAN, K.; KURTOVA, A.V. et al. B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood.*, vol.114, p.1209-1037, 2009.
23. DEGHEIDY, H.A.; VENZON, D.J.; FAROOQUI, M.Z.H. et al. Combined normal donor and CLL: single tube ZAP-70 analysis. *Clinical Cytometry.*, vol. 82B, p.67-77, 2012.
24. LETESTU, R.; RAWSTRON, A.; GHIA, P. et al. Evaluation of ZAP-70 expression by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: a multicentric international harmonization process. *Clinical Cytometry.*, vol.70B, p.309-314, 2006.
25. PREOBRAZHENSKY, S.N.; SZANKASI, P.; BAHLER, D.W. et al. Improved flow cytometric detection of ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia using experimentally optimized isotypic control antibodies. *Clinical Cytometry.*, vol.82B, p.78-84, 2012.
26. ZUCCHETTO, A.; BOMBEN, R.; DAL PO, M et al. ZAP-70 Expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: evaluation by external (isotypic) or internal (T/NK cells) controls and correlation with IgVH mutations. *Clinical Cytometry.*, vol.70B, p.284-292, 2006.
27. BAKKE, A.C.; PURTZER, Z.; LEIS, J. et al. A robust ratio metric method for analysis of zap-70 expression in chronic lymphocytic leucemia (LLC). *Clinical Cytometry.*, vol. 70B, p.227-234, 2006.
28. KAY, S.; HERISHAMU, Y.; PICKY, M. et al. Quantitative flow cytometry of ZAP-70 levels in chronic lymphocytic leukemia using molecules of equivalent soluble fluorochrome. *Clinical Cytometry.*, vol.70B, p.218-226, 2006.
29. HAMBLIN, T.J.; ORCHARD, J.A.; GARDINER, A. et al. Immunoglobulin V genes and CD 38 expression in CLL. *Blood.*, vol.95, p. 2455-2457, 2000.
30. HAMBLIN, T.J.; ORCHARD, J.A.; IBBOTSON, R.E. et al. CD 38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD 38 expression may vary during the course of the disease. *Blood.*, vol.99, p.1023-1029, 2002.
31. KROBER, A.; SEILER, T.; BENNER, A. et al. V (H) Mutation Status, CD 38 Expression Level, Genomic Aberrations, and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood.*, vol.100, p.1410-1416, 2002.
32. QUIJANO, S.; LÓPEZ, A.; RASILLO, A. et al. Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cytometry.*, vol.74B, p.139-149, 2008.

33. LANASA, M.C. Novel Insights into the Biology of CLL. *Hematology.*, vol.2010, p.70-76, Dez. 2010.
34. PASKULIN, G.A.; ROSA, R.F.M.; ZEN, P.R.G. Diagnóstico citogenético da leukemia linfocítica crônica. In: MALUF, S.W.; RIEGEL, M. *Citogenética humana*. Porto Alegre: Artmed, 2011. p.234-241.
35. MERKEL, D.E.; DRESSLER, L.G.; MCGUIRE, W.L. *Journal of Clinical Oncology.*, vol.5, p.1690-1703, 1987.
36. QUIJANO, S.; LÓPEZ, A.; RASILLO, A. et al. Association between the proliferative rate of neoplastic B cells, their maturation stage, and underlying cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphoproliferative disorders: analysis of a series of 432 patients. *Blood.*; 2008; vol.111, p.5130-5141, 2008.

Anexos

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FUNDAÇÃO HOSPITAL
AMARAL CARVALHO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: "Expressão de zap 70 e relação com a expressão de CD 38, ploidia e índice de fase S em pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica" **Pesquisador:** Ana Paula Fortunato Dametto **Área Temática:**

Versão: 2

CAAE: 02321312.0.0000.5434

Instituição Proponente: Fundação Hospital Amaral Carvalho

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 161.310

Data da Relatoria: 30/11/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa para avaliar a evolução clínica de pacientes portadores de leucemia linfóide crônica e expressão do gene ZAP70 e CD38. A pesquisa desses marcadores é realizado na rotina do serviço através da técnica de citometria de fluxo.

Objetivo da Pesquisa:

Correlação clínica entre a expressão do ZAP 70 e do CD 38 e a data diagnóstico até progressão clínica ou terapêutica como descrito.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A princípio não há riscos adicionais, uma vez que o serviço protocolou a pesquisa desses marcadores prognósticos nestas situações, portanto, o paciente não realizará uma coleta adicional, estando submetido a coleta deste exame na rotina.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa já tinha avaliado e como pendências faltava o currículo dos pesquisadores, que já foi adicionado em modo lattes, e também havia a solicitação de dispensa do TCLE no caso de pacientes que tenham ido a óbito, sendo aplicável o TCLE nos pacientes vivos. Nenhuma das alterações são nova tecnologia, já estando bem estabelecida na literatura, acredito que o termo de confidencialidade nestes pacientes sejam suficientes pois não há entraves éticos, como genes relacionados a alterações familiares ou que exponham esses pacientes a situações relacionados a hábitos pessoais ou sexuais.

Endereço: DOUTOR MIRANDA JUNIOR

Bairro: VILA ASSIS

CEP: 17.210-300

UF: SP

Município: JAU

Telefone: 1436-0211

Fax: 1436-0211

E-mail: cep_hac@amaralcarvalho.org.br

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

**FUNDAÇÃO HOSPITAL
AMARAL CARVALHO**

Os termos pendentes estão de acordo, sendo a metodologia já aplicada desde dois mil e sete, não como pesquisa, mas sim na rotina para definir terapia quimioterápica ou indicação de transplante.

Recomendações:

Atualizar a esse CEP o andamento da pesquisa após aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram atendidas, desta maneira não vejo entravés éticos a realização da pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

JAU, 03 de Dezembro de 2012

Assinador por:
ÉDERSON ROBERTO DE MATTOS
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR MIRANDA JUNIOR

Bairro: VILA ASSIS

CEP: 17.210-300

UF: SP

Município: JAU

Telefone: 1436-0211

Fax: 1436-0211

E-mail: cep_hac@amaralcarvalho.org.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar do estudo “Expressão de zap 70 e relação com a expressão de CD 38, ploidia e índice de fase S em pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica”, por ter esse diagnóstico.

A LLC (leucemia linfocítica crônica) é uma doença do linfócito B (um tipo de glóbulo branco do sangue), caracterizada pelo aumento do número desses linfócitos. A LLC pode permanecer por muito tempo sem causar sintomas em alguns pacientes, porém em outros pode evoluir de maneira mais agressiva – aumento rápido de gânglios (ínguas), anemia, plaquetas baixas (a plaqueta é uma célula do sangue que ajuda controlar sangramentos), aumento do risco de pegar infecções.

Hoje em dia muitos estudos têm sido feitos para tentar identificar os fatores que tornam a evolução da doença tão diferente entre as pessoas. Esses fatores são chamados de biomarcadores. São exemplos de biomarcadores: zap 70 (sua presença nas células da doença pode indicar evolução mais agressiva), CD 38 (também pode indicar uma doença mais agressiva) e o índice da fase S e ploidia do DNA (ambos podem estar relacionados ao grau de malignidade da doença).

Todos esses marcadores são determinados nas células da leucemia que se encontram na medula óssea, através da análise por um aparelho chamado Citômetro de Fluxo.

Em nosso Ambulatório de Hematologia do Hospital Amaral Carvalho esse exame já é realizado nos pacientes com suspeita de LLC, por ser uma ferramenta importante para o diagnóstico.

Se você aceitar participar desse estudo, faremos a análise da presença ou ausência desses biomarcadores nas células da doença presentes em sua medula óssea, com o objetivo de determinar se é possível prever um curso mais agressivo da LLC com essas informações. Nossa previsão é de incluir 25 pacientes para uma análise mais fidedigna.

Esses dados vão ser estudados na amostra de medula óssea que utilizamos para fazer seu diagnóstico ou na amostra de medula que venha a ser colhida na ocasião da progressão da doença, ou seja, quando ela apresentar sinais de estar se tornando mais agressiva ou de não estar respondendo bem ao tratamento.

O procedimento de coleta de medula óssea consiste em uma punção, após anestesia local, ou no osso chamado esterno (peito) ou no osso da crista ilíaca posterior (bacia), de onde serão retirados 5 mL de sangue da medula óssea para análise. Durante o procedimento você poderá sentir dor ou desconforto e em raros casos o exame pode resultar em mancha roxa ou infecção

no local da punção. Se isso acontecer, essas complicações serão tratadas como de rotina, com analgésicos e antibióticos.

As amostras de sangue da medula serão utilizadas somente para a finalidade desse estudo e serão destruídas após esse fim.

Será assegurada sua privacidade durante o estudo e análise dos dados. Você poderá ter acesso a esses dados a qualquer momento durante o estudo, se assim desejar.

Os resultados dessa pesquisa poderão ser divulgados em publicações científicas com a finalidade de enriquecer o conhecimento atual sobre a doença.

Ao aceitar participar desse estudo não haverá prejuízo em seu tratamento. Você não receberá qualquer pagamento pela sua participação.

Após assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, a qualquer momento você poderá se retirar do estudo, se assim decidir, sem nenhuma penalidade.

O objetivo desse estudo é o de compreender melhor o comportamento da Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) através da presença desses biomarcadores – zap 70, CD 38, ploidia e índice da fase S, para melhorar a assistência ao paciente portador desta enfermidade.

A pesquisadora responsável por esta pesquisa é a Dra. Ana Paula Fortunato Dametto, a qual poderá ser consultada no Ambulatório de Hematologia do Hospital Amaral Carvalho Jaú - SP e/ou pelo telefone (14) 36021200 – ramais 1177/1180.

No caso de dúvidas também poderá ser consultado o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Amaral Carvalho Jaú – SP pelo telefone (14) 36021200 – ramal 1194

Eu, _____, declaro que me sinto devidamente esclarecido a respeito da pesquisa “Expressão de zap 70 e relação com a expressão de CD 38, ploidia e índice de fase S em pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica”, concordo com os procedimentos aos quais vou ser submetido e com as publicações científicas que serão geradas dessa pesquisa.

Também estou ciente que, a qualquer momento posso solicitar a minha exclusão da pesquisa, o que não acarretará prejuízos para o meu tratamento pela equipe médica.

Jaú, _____.

Assinatura ou digital do paciente ou responsável.

Assinatura do responsável pela aplicação do TCLE.

ANEXO C – Justificativa para dispensa do TCLE

JUSTIFICATIVA PARA NÃO APLICAÇÃO DO TCLE

Estudo “Expressão de zap 70 e relação com a expressão de CD 38, ploidia e índice de fase S em pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica”

Mestranda: Ana Paula Fortunato Dametto

Orientador: Dr. Vergílio R. Colturato

Co-orientadora: Dra. Maura Rosane V. Ikoma

Solicito ao CEP autorização para não aplicação do TCLE nos casos em que o paciente tiver ido a óbito.

O estudo em questão consiste em análise dos marcadores do exame de imunofenotipagem que o paciente realizou na ocasião do diagnóstico, recidiva ou progressão da doença.

Os resultados dessa análise não trarão danos aos descendentes/familiares dos pacientes em questão. Serão respeitados todos os preceitos éticos de privacidade e sigilo.