

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PERFIL CLÍNICO-LABORATORIAL E ASSOCIAÇÃO
COM FATORES PROGNÓSTICOS DE PACIENTES
COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maria Catarina Silveira Chiarelli

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**PERFIL CLÍNICO-LABORATORIAL E ASSOCIAÇÃO COM
FATORES PROGNÓSTICOS DE PACIENTES COM
LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA**

Maria Catarina Silveira Chiarelli

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2012

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Chiarelli, Maria Catarina Silveira
PERFIL CLÍNICO-LABORATORIAL E ASSOCIAÇÃO COM FATORES
PROGNÓSTICOS DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA
/ Maria Catarina Silveira Chiarelli.-2012.
44 p.; 30cm

Orientador: José Edson Paz da Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas, RS, 2012

1. Leucemia Linfocítica Crônica 2. Prognóstico 3.
Antígeno CD38 4. Proteína-Tirosina Quinase Zap-70 I.
Silva, José Edson Paz da II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PERFIL CLÍNICO-LABORATORIAL E ASSOCIAÇÃO COM FATORES
PROGNÓSTICOS DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA
CRÔNICA**

elaborada por
Maria Catarina Silveira Chiarelli

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Edson Paz da Silva
(Presidente/Orientador)

Ariana Dornelles Carpes, Dra. (UNIFRA)

Ricardo Brandão, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 30 de janeiro de 2012.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

PERFIL CLÍNICO-LABORATORIAL E ASSOCIAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA

AUTORA: MARIA CATARINA SILVEIRA CHIARELLI
ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de janeiro de 2012

A Leucemia Linfocítica Crônica é a principal neoplasia linfóide em adultos e se manifesta principalmente em indivíduos idosos. Por ser uma doença heterogênea, desperta grande interesse quanto ao seu prognóstico. Rai e Binet desenvolveram sistemas de estadiamento capazes de prever a evolução da doença e atualmente, a análise da expressão de CD38 e Zap-70 tem sido investigada como fator prognóstico por indicar presença ou ausência da mutação no gene *IgV_H*, assim, o objetivo deste estudo foi analisar o perfil clínico-laboratorial dos pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica, tomando como referência os estadiamentos clínicos de Rai e Binet e a quantificação da expressão de CD38 e Zap-70 como fatores prognóstico. Foram pesquisados 64 prontuários médicos de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria e as variáveis consideradas foram aumento de linfonodos, presença ou ausência de hepatomegalia e/ou esplenomegalia, avaliação hematológica de sangue periférico e imunofenótipo. Os dados obtidos foram correlacionados com o estadiamento de Rai (1975) e Binet (1981), a expressão de CD38 e Zap-70 com o estágio clínico de Binet. Os resultados demonstraram que não há associação entre o estadiamento de Rai e Binet e a expressão de CD38, Zap-70 com o estadiamento clínico de Binet.

Palavras-chave: Leucemia Linfocítica Crônica. Prognóstico. Antígeno CD38. Proteína-Tirosina Quinase Zap-70.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post Graduate Course on Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

CLINICAL LABORATORY PROFILE AND ASSOCIATION OF PROGNOSTIC FACTORS FOR PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

AUTHOR: MARIA CATARINA SILVEIRA CHIARELLI

ADVISOR: PROF. DR. JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA

Date and place: FEBRUARY 30ST, 2012, SANTA MARIA

Chronic Lymphocytic Leukemia is the primary lymphoid neoplasm in adults and and it is especially manifested in the elderly. Because it is a heterogeneous disease it awakens great interest regarding its prognosis. Rai and Binet developed staging systems to predict the evolution of the disease and currently, the analysis of expression of CD38 and Zap-70 has been investigated as a prognostic factor for indicating presence or absence of the mutation in the gene IgVH, so, the objective of this study was to analyze the clinical and laboratory profiles of patients with Chronic Lymphocytic Leukemia taking as reference the clinical staging of Rai and Binet and quantification of CD38 and Zap-70 expression as prognosis factors. We searched the medical records of 64 patients treated at University Hospital of Santa Maria and the variables considered were swollen lymph nodes, presence or absence of hepatomegaly and / or splenomegaly, hematological evaluation of peripheral blood and immunophenotype. The data obtained were correlated with the staging of Rai (1975) and Binet (1981), the expression of CD38 and Zap-70 and clinical stage. The results showed no association between ataging Rai and Binet and the expression of CD38, Zap-70 and Binet clinical staging.

Keywords: Chronic Lymphocytic Leukemia B cells. Prognosis. Antigens CD38. Zap-70 Protein-tyrosine Kinase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esfregaço de SP de um paciente com LLC evidenciando linfócitos característicos da doença e manchas de Grumprecht	11
---	----

Manuscrito I

Figura 1 – Figura 1. Expressão de CD-38 por Estadiamentos EC-A, EC-B e EC-C. Dados apresentados como médias nas colunas. Barras representam o desvio padrão da média.....	35
---	----

Figura 2 – Figura 2: Gráfico de Correlação da expressão de CD38 e o Estadiamento de Binet.....	35
--	----

Figura 3 – Figura 3: Gráfico de Correlação da expressão de Zap-70 e o Estadiamento de Binet.....	36
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de neoplasias de Células B maduras – OMS	10
Tabela 2 – Sistema de Estadiamento proposto por Rai (1975) e Binet (1981)	13

Manuscrito I

Tabela 1 – Sistema de Estadiamento proposto por Rai (1975) e Binet (1981)	33
Tabela 2 – Resultados de Hemoglobina, Plaquetas e Áreas Acometidas referentes ao Estadiamento de Rai (1975)	33
Tabela 3 – Resultados de Hemoglobina, Plaquetas e Áreas Acometidas referentes Estadiamento de Binet (1981)	34
Tabela 4 – Classificação dos pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica através do Estadiamento de Rai e Binet (1981)	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
1.1 Leucemia Linfocítica Crônica	09
1.1.1 Neoplasia de Células B Maduras.....	09
1.1.2 Diagnóstico Leucemia Linfocítica Crônica	10
1.1.3 Imunofenótipo	11
1.2 Estadiamento de Rai e Binet.....	12
1.3 Gene IgV_H.....	13
1.4 Fatores Prognóstico: Expressão de CD38 e Zap-70	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 RESULTADOS	17
3.1 Manuscrito I	18
Resumo	18
Abstract	19
Introdução	20
Material e métodos	21
Resultados e discussão.....	25
Conclusão	29
Referências bibliográficas.....	29
4 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS	38
Anexo A – Carta de Aprovação Comitê de Ética – HUSM	41
Anexo B – Checklist usado na coleta de dados	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia Linfocítica Crônica

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é uma doença linfoproliferativa que se manifesta por expansão clonal de pequenos linfócitos B maduros presentes na medula óssea, fígado, baço, sangue periférico e órgãos linfóides. É a forma mais comum de neoplasia linfóide em adultos, sendo responsável por aproximadamente 11% de todas as neoplasias hematológicas e por 24% de todas as leucemias (JEMAL et al, 2008). Acomete principalmente indivíduos com mais de 65 anos de idade. A taxa de incidência ajustada por faixa etária, de 2004 a 2008, foi de 4,2 em 100.000 indivíduos e a taxa de mortalidade no período de 2003-2007 foi de 1,5 por 100.000 indivíduos (SEER, 2011). Nos Estados Unidos, em 2010, estima-se que aproximadamente 14.990 casos foram diagnosticados com LLC e aproximadamente 4.390 pessoas morreram como resultado da evolução da doença (ALTEKRUSE et al, 2010). No Brasil, a LLC representa aproximadamente 33% do total de leucemias em adultos. (www.inca.gov.br). A evolução da LLC para formas mais agressivas ocorre em 10% a 15% dos pacientes, sendo rara a evolução para a Síndrome de Richter, que ocorre em 2% a 6% dos casos. A Síndrome de Richter é caracterizada pela transformação da LLC em Linfoma não- Hodgkin de alto grau de malignidade, Leucemia Prolinfocítica, Doença de Hodgkin, Mieloma Múltiplo ou Leucemia Linfoblástica (DOBBIN, 2005).

1.1.1 Neoplasias de Células B Maduras

O conhecimento de processos biológicos de doenças linfoproliferativas permite um melhor entendimento sobre características clínicas e laboratoriais a respeito dessas doenças.

Segundo a classificação de neoplasias de células B maduras, proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS), essas doenças são classificadas de acordo com parâmetros morfológicos, imunofenotípicos e citogenéticos (JAFFE et al, 2001). (Tabela 1)

Tabela 1 – Classificação de neoplasias de Células B maduras - OMS

<i>Neoplasias de células B maduras</i>
Leucemias Crônicas
Leucemia Linfocítica Crônica
Leucemia pró-linfocítica B
Leucemia de células cabeludas (Tricoleucemia)
Linfomas Não Hodgkin
Linfoma Linfoplasmocítico
Linfoma de zona marginal esplênica
Linfoma de zona marginal extralinfonodal de tecido linfóide associado à mucosa (Linfoma Malt)
Linfoma da zona marginal linfonodal
Linfoma Folicular
Linfoma de células do manto
Linfoma difuso de grandes células B
Linfoma primário de efusões
Mieloma Múltiplo e Leucemia de células plasmáticas

1.1.2 Diagnóstico de Leucemia Linfocítica Crônica

As diretrizes mais adotadas no processo diagnóstico são os critérios estabelecidos e revisados pelo *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia* (1988) e pelo *National Cancer Institute Working Group* (1996), que definem que Leucemia Linfocítica Crônica deve apresentar uma contagem de linfócitos superior a 5.000/mm³ em sangue periférico. A clonalidade de linfócitos circulantes deve ser confirmada por citometria de fluxo (HALLEK et al, 2008). As células leucêmicas encontradas no esfregaço sanguíneo são caracteristicamente pequenas, linfócitos maduros com uma margem estreita de citoplasma e um núcleo denso sem nucléolos visíveis e cromatina parcialmente agregada (DAGKLIS et al, 2009). Estas células podem ser encontradas juntamente com outras células maiores ou atípicas, prolinfócitos, que poderão abranger até 55% dos linfócitos sanguíneos. Também são observadas as manchas de *Gumprecht*, que são células rompidas no sangue periférico da

maioria dos pacientes com LLC (figura 1). Porém, não se tem conhecimento de como essas estruturas são formadas (HALLEK et al, 2008).

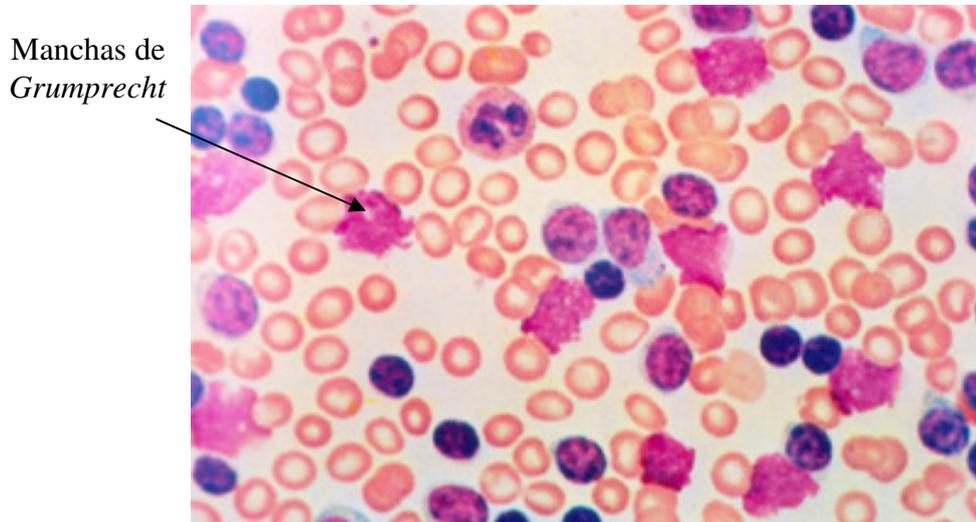


Figura 1 – Esfregaço de SP de um paciente com LLC evidenciando linfócitos característicos da doença e manchas de *Grumprecht*.

Fonte: Atlas Hematológico – Academia de Ciência e Hematologia

1.1.3 Imunofenótipo

É de grande importância distinguir a LLC das demais doenças malignas hematopoéticas e com a produção de anticorpos monoclonais (AcMo), houve um grande avanço na caracterização dessas células, permitindo a identificação de antígenos expressos na superfície celular. Com esse auxílio, pode-se descobrir que células leucêmicas de LLC apresentam a co-expressão de células T e B, CD5 e da imunoglobulina de cadeia pesada IgM e/ou IgD (JAFFEE et al, 2001). A expressão de imunoglobulinas de cadeia leve é restrita a uma única cadeia leve kappa (κ) ou lambda (λ). Também são expressos antígenos de superfície celular, CD19, CD20, CD23. A expressão de CD20 é caracteristicamente baixa, quando comparada com as encontradas em células B normais (BINET et al, 2006)

1.2 Estadiamento de Raí e Binet

A LLC é uma enfermidade que, em geral, evolui de maneira lenta com um aumento progressivo de prolinfócitos, de trombocitopenia e esplenomegalia. Dessa maneira, desperta grande interesse em estudos com relação ao seu prognóstico (DOBBIN, 2005).

Baseado nisso, Rai (1975) e Binet (1981), estabeleceram sistemas de estadiamento correlacionados com a sobrevida desses pacientes. Os estadiamentos ainda são utilizados na prática clínica para avaliar a extensão da doença nos pacientes com LLC, especialmente na América do Norte e Europa (VROBLOVÁL et al, 2009). Os estadiamentos são baseados nas características clínicas apresentadas, tais como aumento de linfonodos, presença ou ausência de esplenomegalia e/ou hepatomegalia e avaliação hematológica do sangue periférico. O estágio proposto por Raí et al (1975) considerava: 1) linfocitose absoluta maior que $15.000/\text{mm}^3$ em sangue periférico associada ou não a adenomegalias, esplenomegalias e/ou hepatomegalia; 2) anemia definida como taxa de hemoglobina menor que 11g/dl; 3) plaquetopenia definida como contagem de plaquetas menor que $100.000/\text{mm}^3$. Esse sistema classificava os pacientes em cinco categorias de 0 a IV.

O estágio proposto por Binet et al (1981) subdivide os pacientes em três categorias. Os pacientes em estágio clínico A são considerados de baixo risco e clinicamente sem evidências de anemia ou plaquetopenia e com até duas cadeias ganglionares afetadas. Os pacientes em estágio B são considerados em risco intermediário e apresentam três ou mais cadeias ganglionares comprometidas. Os pacientes classificados em estágio C apresentam anemia e plaquetopenia e são considerados de alto risco (tabela 2).

Tabela 2 – Sistema de Estadiamento proposto por Rai (1975) e Binet (1981).

RISCO	ESTÁDIO	LINFOCITOSE	LINFOADENOPATIAS (Áreas Acometidas)	HEPATOMEGALIA/ ESPLENOMEGALIA	HB (g/dL)	PLAQUETAS (x 10 ³ /dL)
	RAI					
Baixo	0	SIM	NÃO	NÃO	> 11	> 100
Intermediário	I	SIM	SIM	NÃO	> 11	>100
	II	SIM	SIM/NÃO	SIM	> 11	>100
Alto	III	SIM	SIM/NÃO	SIM/NÃO	< 11	>100
	IV	SIM	SIM/NÃO	SIM/NÃO	Qualquer	<100
	BINET					
Baixo	A	SIM	SIM/NÃO (< 3)	SIM/NÃO	>10	>100
Intermediário	B	SIM	SIM/NÃO (< 3)	SIM/NAO	<10	>100
Alto	C	SIM	SIM/NÃO	SIM/NÃO	<10	<100

1.3 Gene *IgV_H*

Nas células do centro germinativo, ocorrem diversas recombinações no DNA para formar o gene que codifica a molécula da imunoglobulina (Ig) (CRESPO et al, 2003). Durante esse percurso, ocorrem mutações na estrutura dos genes de cadeia pesada da Ig (KÜPPERS et al, 1999).

Um conjunto de genes, existentes em regiões variáveis de cadeias pesadas e leves, inicia o desenvolvimento de células B na medula óssea, em células progenitoras. Cada uma dessas cadeias é subdividida em região C (constante) e região V (variável). Tal processo ocorre por recombinação, sendo que a primeira ocorre no *locus* de cadeia pesada da Ig, ocorrendo o rearranjo do segmento D (região de diversidade) com o segmento J (região da junção), originando o segmento DJ. Após a recombinação DJ, um gene pertencente à região V se junta ao complexo, originando um gene VDJ rearranjado. Esse complexo formado permanece separado dos genes da região C (constante) (KÜPPERS et al, 1999).

Durante o processo de recombinação, o gene que codifica a cadeia de origem é excluído do cromossomo. Dessa maneira, algumas células B nos centros germinativos modificam sua expressão. Deixam de expressar IgM e IgD e passam a expressar cadeias

pesadas de outras classes de imunoglobulinas, sendo estas IGA, IgG ou IgE. Esse processo permite que a especificidade do anticorpo permaneça inalterada, porém ocorrem mudanças nas funções efetoras do anticorpo (CRESPO et al, 2003).

Em 1999, dois grupos de pesquisadores demonstraram que aproximadamente 50% dos pacientes apresentavam mutação somática nas regiões variáveis da cadeia pesada de imunoglobulina (*IgVH*) nas células leucêmicas (HAMBLIN et al, 1999, DAMLE et al, 1999). O *status* da mutação divide os pacientes em dois grupos distintos de evolução, a ausência da mutação do *IgVH* e a presença do *IgVH*. A ausência de mutação também está associada com uma morfologia atípica de linfócitos do sangue periférico e uma frequência maior de anomalias citogenéticas desfavoráveis e resistência à quimioterapia (VÉRONÈSE et al, 2008).

Os casos que possuem a mutação *IgVH* estão correlacionados com melhor prognóstico, porém os casos identificados que não a possuem estão correlacionados com pior prognóstico, tendo um curso clínico da doença mais agressivo e uma menor sobrevida quando comparados com os pacientes mutados (DAMLE et al, 1999; HAMBLIN et al, 1999).

1.4 Fatores Prognóstico: Expressão de CD38 e Zap-70

O comportamento clínico dos pacientes com LLC é heterogêneo. Considerando que alguns pacientes têm a doença indolente e ausência de complicações durante muitos anos, outros desenvolvem doença progressiva e/ou sintomática necessitando de terapia dentro de um prazo relativamente curto após o diagnóstico. O Tratamento precoce poderia colocar pacientes em risco devido a complicações decorrentes da quimioterapia, podendo comprometer a qualidade de vida e/ou sobrevida desses pacientes (DIGHIERO, 2005). Nos últimos anos tem sido investigada a expressão de CD38, juntamente com Zap-70, pois acredita-se que a expressão desses marcadores estão correlacionados com o *status* da mutação *IgVH*.

Alguns estudos têm demonstrado que as células B de pacientes com LLC que apresentam baixas ou nenhuma expressão de CD38 estão relacionadas com um melhor prognóstico, exibindo um curso clínico favorável da doença. Em contrapartida, as células B que apresentam alta expressão de CD38 estão relacionadas com um prognóstico mais agressivo, tendo uma evolução mais rápida da doença (RIVKINAL et al, 2011; DURIG et al,

2003). O valor de positividade para a expressão de CD38 ainda é discutido, mas considera-se expressão de CD38 >30% em células leucêmicas não mutadas (DAMLE, 2007).

Outro marcador importante para fins de prognóstico é Zap-70, pois trata-se de uma proteína pertencente à família tirosina quinase que desempenha uma função de ativação de Linfócitos T. As células B de indivíduos sadios normalmente não expressam essa proteína, pois elas utilizam outra proteína também da família tirosina quinase (Syk) para ativação de linfócitos B. Segundo Wistner et al (2003), há alta correlação entre níveis de Zap-70 e a mutação de *IgVH*. Sendo que indivíduos que apresentam a mutação *IgVH* não expressam Zap-70, e indivíduos que não apresentam a mutação expressam Zap-70 nas células leucêmicas. Estas expressões estão correlacionadas com melhor prognóstico e pior prognóstico, respectivamente (DEL PRINCIPE et al, 2006). Alguns estudos consideram como expressão positiva, valores de Zap-70 superiores a 20% (CRESPO, 2003).

Outro estudo relacionou a expressão de Zap-70, CD38 e o *status* da mutação somática *IgVH* como fatores combinados. Foi demonstrado que pacientes Zap-70 negativos/CD38 negativo, indicam presença da mutação somática *VHlg* e apresentam sobrevida média de 13 anos. Pacientes Zap-70 positivo/CD38 positivo, indicam ausência da mutação somática *VHlg*, apresentando sobrevida média de 5 anos e 5 meses (MORILLA, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o perfil clínico-laboratorial de pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica e associar a fatores prognósticos de evolução da doença;

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar o estadiamento clínico proposto por Raí (1975) e Binet (1981) nos pacientes diagnosticados com Leucemia Linfocítica Crônica;
- Identificar a relação entre a expressão de CD38 e o Estadiamento de Binet (1981) e a relação entre a expressão de Zap-70 e o Estadiamento de Binet (1981), associando a fatores prognósticos em pacientes diagnosticados com Leucemia Linfocítica Crônica.

3 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de Manuscrito I, apresentado a seguir. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados, Conclusão e Referências, encontram-se no próprio manuscrito. O Manuscrito I está disposto na versão a ser submetida.

3.1 Manuscrito I

Caracterização do estágio Clínico e Avaliação da expressão de CD38 como Fatores prognósticos em pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica

Maria Catarina S. Chiarelli^{1*}, Liliane Z. Oliveira², Juarez Chiesa³, José Edson Paz da Silva⁴

Resumo

A Leucemia Linfocítica Crônica é caracterizada por ser uma doença heterogênea com curso clínico bastante variável, sendo que alguns pacientes apresentam diversas complicações decorrentes da doença, enquanto outros apresentam um quadro clínico mais estável. Rai (1975) e Binet (1981) elaboraram um sistema de estadiamento clínico capaz de prever a evolução da doença. Outro fator prognóstico é a análise do status da mutação no gene *IgVH* por meio da expressão de CD38 e Zap-70. O presente estudo tem como objetivo traçar um perfil clínico-laboratorial dos pacientes, tomando como referência os estadiamentos clínicos propostos por Rai e Binet e a quantificação da expressão de CD38 e Zap-70 a fim de embasar a avaliação diagnóstica, inferir o prognóstico e propiciar estudos adicionais que permitam ações propositivas para o seguimento dos pacientes. Foram pesquisados 64 prontuários médicos de pacientes com LLC atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria e analisadas as variáveis: aumento de linfonodos, presença ou ausência de hepatomegalia e/ou esplenomegalia, avaliação hematológica de sangue periférico e imunofenótipo. As informações foram correlacionadas de acordo com o estadiamento proposto por Rai (1975) e Binet (1981), a expressão de CD38, Zap-70 e o estágio clínico da doença. Evidenciou-se que não há associação entre a expressão de CD38, Zap-70 e o sistema de estadiamento clínico de Binet.

Palavras-chave: Estadiamento de Neoplasias. Prognóstico. Leucemia Linfocítica Crônica de Células B. Antígenos CD38. Proteína-Tirosina Quinase Zap-70.

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

² Mestre em Engenharia de Produção. Farmacêutica-bioquímica. Serviço de Hematologia e Oncologia Hospital Universitário de Santa Maria, RS, Brasil.

³ Médico Oncologista, Serviço de Hematologia e Oncologia Hospital Universitário de Santa Maria, RS, Brasil.

⁴ Doutor em Farmácia Área de Análises Clínicas. Professor Orientador Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

*Endereço para Correspondência: Rua Senador Cassiano do Nascimento, 51, apto 301, CEP 97100-000, Santa Maria, RS, Brasil. Telefone: (54)9925-3435. E-mail: catarinachiarelli@yahoo.com.br

Characterization of the stadium and Clinical Evaluation of CD38 expression as prognostic factors in patients with chronic lymphocytic leukemia

Maria Catarina S. Chiarelli^{1*}, Liliane Z. Oliveira², Juarez Chiesa³, José Edson Paz da Silva⁴

Abstract

Chronic Lymphocytic Leukemia is characterized as a heterogeneous disease with highly variable clinical course where some patients have multiple complications of the disease, while others have a more stable clinical condition. Rai (1975) and Binet (1981) developed a clinical staging system for predicting progression of the disease. Another prognostic factor is the analysis of gene *IgVH* mutation status through the expression of CD38 and Zap-70. This study aims to draw a clinical-laboratorial profile of patients, taking as reference the clinical staging systems proposed by Rai and Binet and the quantification of the CD38 and Zap-70 expression in order to base the diagnostic evaluation, prognosis and infer the studies providing additional enabling actions purposes for the patient follow-up. We searched the medical records of 64 patients with CLL treated at University Hospital of Santa Maria and the variables analyzed had swollen lymph nodes, presense or absence of hepatomegaly and /or splenomegaly hematological evaluation of peripheral blood and immunophenotype. The data were correlated according to the staging proposed by Rai (1975) and Binet (1981), the expression of CD38, Zap-70 and disease stage. It was evident that there is no association between the expression of CD38, Zap-70 and Binet's clinical staging system.

Keywords: Neoplasm Staging. Prognosis. Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells. Antigens CD38. Zap-70 Protein-Tyrosine Kinase.

Introdução

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é uma neoplasia maligna caracterizada pelo acúmulo de pequenos linfócitos maduros na medula óssea, sangue periférico, linfonodos, baço, fígado e tecidos linfóides. A incidência da doença está relacionada a variáveis como origem étnica, idade, gênero e história familiar de neoplasias hematológicas¹. É a forma mais comum de leucemia em adultos, com uma prevalência duas vezes maior em homens do que em mulheres, afetando principalmente indivíduos idosos com idade ao diagnóstico de 70 a 72 anos²⁻⁴.

Uma das características mais intrigantes da doença é sua heterogeneidade clínica, tendo em vista que alguns pacientes evoluem rapidamente a óbito, enquanto outros pacientes permanecem com doença estável durante anos^{2,3}. Os estadiamentos propostos por Rai (1975)⁵ e Binet (1981)⁶ avaliam a extensão da doença nos pacientes com LLC, com base em características clínicas e laboratoriais como linfadenopatia, tecidos linfóides envolvidos, presença ou ausência de esplenomegalia e/ou hepatomegalia e avaliação hematológica do sangue periférico^{7,8}.

Para complementar o diagnóstico são utilizados critérios imunológicos e moleculares. De acordo com o *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia* (1988)⁹ e pelo National Cancer Institute Working Group (1996), as células da LLC caracterizam-se por apresentar acúmulo de células B monoclonais expressando antígenos de superfície celular, CD19, CD20, CD23, co-expressão de células T e B (CD5⁺), imunoglobulina de cadeia pesada IgM e/ou IgD e imunoglobulinas de cadeia leve kappa (κ) ou lambda (λ)¹⁰. Tais expressões podem auxiliar a prever o prognóstico desses pacientes^{9,11}.

Alguns estudos tem avaliado o estado da mutação somática no gene de região variável de cadeia pesada da imunoglobulina (*IgVH*), e demonstram que pacientes cujas células

leucêmicas expressam esta mutação apresentam um curso clínico da doença mais favorável, enquanto que a ausência da mutação somática nas células leucêmicas, está relacionado a casos mais agressivos de evolução da doença^{12,13,14}.

A análise da expressão de CD38 e Zap-70 são importantes indicadores prognóstico para avaliar a presença da mutação *IgVH*^{12,13}. A positividade de CD38 (>30%) e de Zap-70 (>20%) está correlacionada a um pior prognóstico e maior chance de progressão da doença. Estudos comprovam que a proteína Zap-70 apresenta-se abundante em células não mutadas e, raramente, em células leucêmicas mutadas^{15,16,17}.

Tendo em vista a importância clínica da LLC nos indivíduos adultos, o presente estudo tem como objetivo traçar um perfil clínico-laboratorial dos pacientes, tomando como referências os estadiamentos clínicos propostos por Rai e Binet e a quantificação da expressão de CD38 e Zap-70 a fim de embasar a avaliação diagnóstica e propiciar estudos adicionais que permitam ações propositivas para o seguimento dos pacientes.

Material e métodos

População Estudada:

O estudo incluiu 64 pacientes portadores de Leucemia Linfocítica Crônica do tipo B, tratados no Hospital Universitário de Santa Maria, Rio Grande do Sul, com tempo de acompanhamento desde o diagnóstico de cinco meses a dez anos e que realizaram imunofenotipagem de sangue periférico. Esta população foi classificada de acordo com os sistemas de estadiamento de Rai (1975) e Binet (1981). Para a avaliação da expressão de CD38, treze pacientes foram excluídos da amostra por não apresentarem tais resultados na imunofenotipagem, sendo avaliados 51 pacientes. Para a avaliação das expressões de Zap-70 e CD38 foram selecionados 20 pacientes, dentre os portadores de LLC que cumpriram os

critérios estabelecidos para o estudo: imunofenotipagem por ocasião do diagnóstico com fenótipo de células B (CD19+, CD20+, CD23+), co-expressão de CD5, expressão de imunoglobulina de superfície com baixa densidade, monoclonalidade para as cadeias leves da imunoglobulina κ ou λ e que, por ocasião da pesquisa, ainda não haviam recebido tratamento. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria sob o número 0294.0.243.000-09.

Dados Clínicos:

Os dados da pesquisa foram obtidos por meio da avaliação de prontuários médicos e análise do imunofenótipo realizado ao diagnóstico dos pacientes atendidos no Serviço de Hematologia e Oncologia. A coleta de dados desenvolveu-se no período de maio de 2010 a janeiro de 2012. As variáveis analisadas foram: aumento de linfonodos, presença ou ausência de hepatomegalia e/ou esplenomegalia e avaliação hematológica de sangue periférico.

Após a compilação dos dados, as informações foram correlacionadas de acordo com o estadiamento proposto por Rai (1975) e Binet (1981) (tabela 1), a expressão de CD38 e o estágio clínico da doença. Foram consideradas células leucêmicas não mutadas as que apresentavam expressão de CD38>30%.

Determinações de Zap-70 e CD38:

As amostras de sangue periférico foram colhidas e anticoaguladas com EDTA. Foi utilizado sangue total dos pacientes e três controles saudáveis usados como controles normais para a realização da imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os parâmetros foram avaliados em tubos com tripla marcação: CD38FITC/CD3PE/CD19PerCP e ZAP-70-Alexa-Fluor-488/CD3PE/ CD19PerCP. Controles isotípicos marcados com FITC/PE/PerCP foram utilizados como controle negativo. Os anticorpos utilizados na pesquisa foram da marca Invitrogen.

Para avaliação do ZAP-70 utilizou-se a técnica de permeabilização, conforme Crespo *et al* (2003). Para permeabilização utilizou-se o kit Fix & Perm (Invitrogen). Primeiramente, as células foram marcadas na superfície com CD3 e CD19 conforme recomendação do fabricante, fixadas, incubadas, lavadas com PBS pH7,4, centrifugadas e o sobrenadante desprezado. Às células remanescentes, acrescentou-se solução permeabilizante e o anticorpo monoclonal anti ZAP-70 e incubou-se, à temperatura ambiente (TA), ao abrigo da luz. Após este período, as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas em PBS pH 7,4.

Para avaliação de antígenos de superfície CD38FITC/CD3PE/CD19PerCP, utilizou-se a técnica de sangue total lisado e lavado. Após a marcação da amostra de sangue total conforme recomendação do fabricante, os tubos foram incubados, a TA, ao abrigo da luz. Após, lisados com solução Facs Lysing (BD Biosciences), incubados TA, ao abrigo da luz, lavados por duas vezes com solução de PBS Azida, centrifugados e ressuspensos em solução de PBS pH 7,4.

As amostras foram levadas para leitura imediata, sem fixação, no citômetro de fluxo FACS Calibur, com aquisição de, no mínimo, 15.000 eventos totais, utilizando o software Cell Quest PRO.

Para complementar o perfil imunofenotípico do diagnóstico e avaliar os fatores prognósticos, as amostras de sangue total foram avaliadas nos parâmetros CD38 e ZAP-70 utilizando como referência, marcadores de células T(CD3) e de células B(CD19). A análise das reações pelo Cell Quest PRO foi realizada a partir de um gate nos linfócitos (FSC x SSC) para delimitar a região de interesse. A população T(CD3+) foi utilizada como controle interno da expressão do ZAP-70. A partir do cruzamento de gráficos biparamétricos calculou-se o percentual de células de LLC positivas para ZAP-70. O valor de cut-off usado para distinguir células Zap-70 positivas de Zap-70 negativas foi 20%. O percentual de células CD38+ foi

obtido a partir de gráficos biparamétricos onde se avaliou a co-expressão com CD19. O valor de cut-off escolhido para positividade de CD38 foi 30%.

Análise Estatística:

Os dados coletados foram tabulados em uma planilha do programa *Microsoft Office Excel 2007* (Microsoft Corporation, EUA). Posteriormente foi utilizado o programa *GraphPad Prisma 4.0* para realização da análise estatística dos dados. As comparações das expressões de CD38 entre os estadiamentos de Binet foram realizadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis. A associação entre o estadiamento de Rai e Binet foi realizada pelo teste de Qui-Quadrado (χ^2). A correlação de Spearman foi utilizada para analisar as correlações das expressões de Zap-70 e CD38 com o estadiamento de Binet. Um nível de significância de 0,05 foi considerado em todas as análises estatísticas. Os valores são expressos pela média \pm desvio padrão.

Resultados e discussão

Dos 64 pacientes estudados, 45 eram virgens de tratamento e 19 submeteram-se a tratamento quimioterápico. A variação do gênero dos participantes do estudo mostrou que 43 (67%) eram do sexo masculino e 21 (33%) eram do sexo feminino. A faixa etária dos pacientes variou entre 44 e 89 anos (mediana de 66 anos). Do total de pacientes, quatro evoluíram a óbito durante o período de estudo. A expressão das variáveis: índice de hemoglobina, contagem de plaquetas e número de áreas acometidas referentes aos estadiamentos de Rai e Binet, encontram-se nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Os resultados observados demonstraram que os valores médios de Hemoglobina encontrados para Baixo Risco de Rai (0) foram 11,9g/dL e para Binet (A), 12,5g/dL. Os valores médios para o Risco Intermediário de Rai (I e II) foram 13,0g/dL e, para Binet (B), 11,4g/dL. Os valores médios para Alto Risco de Rai (III e IV) foram 9,1g/dL e, para Binet (C), 8,3g/dL.

Para ambos os estadiamentos, Rai e Binet, os valores médios de plaquetas para Baixo Risco e Risco Intermediário encontram-se dentro dos níveis de normalidade para indivíduos saudáveis, sendo estes, valores superiores a $150.0 \times 10^3/\text{dL}$. Na classificação de Alto Risco, em ambos os estadiamentos, a contagem de plaquetas apresentou valores aproximados, sendo que no estadiamento de Rai (III e IV), o valor médio encontrado foi próximo a $100.0 \times 10^3/\text{dL}$ ($139.3 \times 10^3/\text{dL}$) e no estadiamento de Binet (C), a contagem média de plaquetas foi inferior a $100.0 \times 10^3/\text{dL}$.

Os resultados referentes ao número de áreas acometidas para Baixo Risco de Binet (A) foi encontrado número médio de 1,1 áreas acometidas. Para Risco Intermediário, no estadiamento de Rai (I e II) foi observado número médio de 2,8 áreas acometidas e para Binet (B) a média encontrada foi de 5,0 áreas acometidas. Para a classificação de Alto Risco no

estadiamento de Raií (III e IV) foi observado número médio de 3,6 áreas acometidas e para Binet (C) foi encontrado número médio de 2,4 áreas acometidas.

A classificação de risco não deve ser entendida como variáveis isoladas, mas sim, dependente de um conjunto de valores que se complementam. Na amostra estudada, observou-se que, na classificação de Risco Intermediário, tanto para Rai quanto para Binet, os valores de hemoglobina e de plaquetas mostraram-se acima dos critérios estipulados, mas a escolha do grau de risco foi determinada pelo número de áreas acometidas.

Ao analisarem-se os resultados pelo método estatístico de qui-quadrado (tabela 4) observou-se que não é possível correlacionar os dados de Rai e Binet para a amostra estudada, ($X^2= 67,57$). Na classificação de Baixo Risco para o estadiamento de Rai evidenciou-se 29,7% dos pacientes e, para Binet, 67,2%. O Risco Intermediário para Rai foi 48,4% e para Binet, 20,3%. Os achados de Alto Risco para Rai foram 21,9% e para Binet, 12,5%.

A caracterização dos estadiamentos de Binet demonstrou que a frequência de pacientes no Estádio Clínico A foi inferior ao percentual encontrado na literatura. No presente estudo encontrou-se 66,7% e a literatura descreve valores superiores a 80% para Baixo Risco^{7,18}. Os resultados encontrados nos Estádio Clínico B e Estádio Clínico C também apresentaram valores divergentes de outros estudos, embora tenham representado uma frequência menor¹⁹.

Para análise dos casos quanto ao prognóstico, dos 51 pacientes estudados, 31 (60%) são do gênero masculino e 20 (40%) são do gênero feminino, com faixa etária média de 66 anos. Todos os pacientes foram classificados de acordo com o estágio clínico de Binet. Destes, 35 (69%) pertencem ao Estádio Clínico A, 10 (19%) ao Estádio Clínico B e 6 (12%) ao Estádio Clínico C. Dos pacientes avaliados, 13 (25%) apresentaram positividade para CD38, ou seja, $CD38 > 30\%$. Tendo em vista que a expressão de CD38 é capaz de indicar pior prognóstico de vida neste grupo de indivíduos, observa-se que dos 13 pacientes, a maioria foi classificada como Estádio Clínico A de Binet, sendo esta população representada por 9

pacientes. Em relação aos demais, 3 casos foram classificados como Estádio Clínico B e somente um paciente foi classificado como Estádio Clínico C.

Não houve diferenças significativas na expressão de CD38 entre os estadiamentos de Binet EC-A, EC-B e EC-C ($p=0,759$; Figura 1), embora considerando-se todos os valores e não apenas os resultados superiores a 30%. Nos casos de positividade para CD38, não foi possível análise estatística, devido ao $n = 13$. A análise de correlação de Spearman demonstrou que não existe associação entre o estadiamento de Binet e a expressão de CD38 ($r= 0,08$, $p=0,55$); Figura 2), demonstrando que são variáveis independentes.

Analisando individualmente os casos dos quatro pacientes que evoluíram a óbito, foi observado que todos os pacientes eram submetidos a tratamento quimioterápico e se apresentavam em estágios avançados da doença, demonstrando um acometimento importante dos órgãos envolvidos, além da diminuição de hemoglobina e plaquetas em sangue periférico. Dois pacientes foram classificados como Estádio Clínico B de Binet e os outros dois foram classificados como Estádio Clínico C de Binet. A expressão de CD38 foi positiva em dois casos, um Estádio Clínico B e outro Estádio Clínico C, apresentando expressões de CD38 bastante elevadas, sendo superiores a 80%.

Para a análise dos pacientes quanto à expressão de Zap-70, foi observado que dos 20 pacientes estudados, 14 (70%) são do gênero masculino e 6 (30%) são do gênero feminino. Os pacientes foram classificados de acordo com o sistema de Estadiamento de Binet e demonstraram que 15 pacientes foram classificados como Estádio Clínico A, sendo que esta população representa 75% do total de pacientes. No Estádio Clínico B, foi classificado somente um paciente, representando 5% da população e no Estádio Clínico C foram classificados 4 pacientes, representando 20%. Ao avaliar os pacientes quanto à positividade das expressões de Zap-70 e CD38, foram evidenciados que 11 pacientes, ou seja, 55% apresentaram expressão positiva de Zap-70 ou CD38 ou apresentaram expressão

concomitante dos dois marcadores.

Avaliando a expressão de Zap-70 nos pacientes estudados, foi evidenciado que 8 (40%) apresentaram positividade para Zap-70. Destes, 5 (33,3%) pertencem ao Estádio Clínico A, o único paciente pertencente a Estádio Clínico B apresentou positividade para Zap-70 e 2 (50%) pertencem ao Estádio Clínico C. A análise de Spearman demonstrou que não existe correlação entre a expressão de Zap-70 e o estadiamento de Binet ($r= 0,19$, $p= 0,40$); Figura 3), demonstrando que são variáveis independentes.

Até cerca de uma década atrás, o estágio clínico de Binet era o principal fator prognóstico disponível para pacientes com LLC. Entre as vantagens do sistema estão o baixo custo e aplicabilidade no momento do diagnóstico. Uma desvantagem importante era o não correlacionamento entre o estadiamento clínico e a agressividade da doença²².

Atualmente, a análise da mutação do gene de *IgVH* passou a ser considerada marcador independente de prognóstico de LLC e a análise da expressão de CD38 e Zap-70 foram identificadas marcadores substitutos dessa mutação. A população estudada apresentou positividade para CD38 em 13/51 pacientes, ou seja, 25% dos pacientes analisados estão associados à ausência da mutação somática do gene *IgVH* e assim, correlacionados com um pior prognóstico e uma rápida evolução da doença.

Alguns autores observaram que um grupo de genes, incluindo Zap-70 é capaz de discriminar os dois subgrupos de indivíduos com LLC, os que apresentam a mutação somática do gene *IgVH* e os que não a apresentam²⁰. Alguns estudos demonstraram que as maiorias dos pacientes que não apresentam a mutação somática apresentam alta expressão de Zap-70^{16,21}. Corroborando com esta informação, 8/20 pacientes estudados estão associados a ausência da mutação somática *IgVH*, sendo correlacionados com pior prognóstico de evolução da LLC.

Os resultados encontrados no presente estudo vão de encontro a outros estudos que mostram que o número de pacientes que não apresentam a mutação no gene de *IgVH* é

inferior quando comparado com pacientes que apresentam a mutação⁷ Os demais pacientes analisados, 38 (75%) apresentaram expressões de CD38<30% e para expressão de Zap-70, 12 (60%) apresentaram expressões de Zap-70<20%, ou seja, considerados negativos, estão correlacionados com melhor prognóstico da doença e maior tempo de sobrevida^{13,23,24}.

A LLC apresenta uma variabilidade substancial no curso da doença, essa variabilidade é observada entre os pacientes em cada fase de estadiamento. Estudos sugerem que a expressão de CD38 e Zap-70 são marcadores independentes de prognóstico^{25,26}.

Os estadiamentos clínicos não são capazes de prever a progressão da doença em estágios iniciais, bem como prever o curso clínico e a sobrevida dos pacientes individualmente. Portanto, torna-se relevante a pesquisa da presença ou ausência da mutação no gene *IgVH* o que auxiliaria o clínico na tomada de decisão quanto à real necessidade de tratamento quimioterápico^{14,26,27}.

Conclusão

Esta pesquisa demonstrou que não há associação entre a expressão de CD38 e Zap-70 com o estadiamento clínico de Binet. A análise das expressões de CD38 e Zap-70 pode ser um fator prognóstico mais preciso, visto que é capaz de analisar o *status* da mutação no gene *IgVH*.

Referências bibliográficas

1. Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O. Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, v. 94, n.5, 2009.

2. Molica S, Mirabelli R, Molica M, Levato L, Mauro, F. R, Foá R. Clinical relevance and treatment of nonautoimmune anemia in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Management and Research*, n. 3, p. 211-217, 2011.
3. Gribben JG. How I treat CLL up front. *Blood*, v. 115, n. 2, p. 187-197, 2009.
4. Kristinsson SY, Dickman PW, Wilson WH, Caporaso N, Björkholm M, Landgren O. Improved survival in chronic lymphocytic leukemia in the past decade: a population-based study including 11,179 patients diagnosed between 1973-2003 in Sweden. *Haematologica*, v.94, n. 9, p. 1259-1265, 2009.
5. Rai KRA, Sawistky A, Cronkite EP, Chanana AD, Lery RN. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v. 46, n.2, p. 219-34, 1975.
6. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, v. 48, p. 198-206, 1981.
7. Letestu R , Lévy V, Eclache V, Baran-Marszak F, Vaur D, Naguib D, et al. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. Published online before print August 25, 2010, doi: 10.1182/blood-2010-06-288274 *Blood*, November 25, v. 116, n. 22, p. 4588-4590, 2010.
8. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S , Ferrajoli A, Do Kim-Anh, et al. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* June 1, v. 109, n. 11, p. 4679-4685, 2007
9. Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, Cheson B, Davis T, Dighiero G, et al. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. For the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL)-initiated working group on prognostic and diagnostic parameters in CLL. *Blood*, vol. 107, n. 3, p. 859-861, 2006.
10. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S. National Cancer Institute-Sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*, v. 87, p. 4990-4997, 1996.
11. Jaffee ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press, 2001.
12. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; v. 94, p. 1840-1847, 1999.

13. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v. 94, p. 1848-1854, 1999.
14. Schroers R, Griesinger F, Trümper L, Haase D, Kulle B, Klein-Hitpass L, et al. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. v. 19, n. 5, p. 750-758, 2005.
15. Damle RN, Temburni S, Calissano C, Yancopoulos S, Banapour T, Sison C . CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood*, v. 110, n. 9, p. 3352-3359, 2007.
17. 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*, v. 348, n. 18, p. 1764-1775, 2003.
18. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai K, Weiss A, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v. 100, p. 4609-4614, 2002.
19. Bockstaele FV, Verhasselt B, Philippe J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev*. v. 23, n. 1, p. 25-47, 2009.
20. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V_H Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, v. 94, n. 6, p. 1848-1854, 1999.
21. Rosenwald A, Alizadeh A, Widhopf G et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*, v. 194, n. 11, p. 1.639-1.647, 2001.
22. WIESTNER, A. et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*, v. 101, n. 12, p. 4944-4951, 2003.
23. Hallek, M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Oncology* (Supplement 4): iv51–iv53, 2008.
24. Thorselius M, Krober A, Murray F, Thunberg U, Tobin G, Buhler A, et al. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood*, v. 107, p. 2889-2894, 2006.

25. Del Giudice I, Morilla A, Osuji N, Matutes E, Morilla R, Burford A, et al. ζ -Chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, v. 104, n. 10, p. 2124–32, 2005.
26. Rivkina A, Vitols G, Murovska M, Lejniece S. Identifying the stage of new CLL patients using tk, zap-70, cd38 levels. v. 33, n. 2. *Experimental Oncology*. 06 de abril de 2011.
27. Chevallier P, Penther D, Avet-Loiseau H, Robillard N, Ifrah N, Mahé B. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. v. 116, p. 142–150, 2002.
28. Vroblová V, Smolej L, Vrbacky F, Jankovičová K, Hrudková M, Mal J. Biological prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, v. 52, n. 1, p.3-8, 2009.

Tabela 1: Sistema de Estadiamento proposto por Rai (1975) e Binet (1981).

RISCO	ESTÁDIO	LINFOCITOSE	LINFOADENOPATIAS (Áreas Acometidas)	HEPATOMEGALIA/ ESPLENOMEGALIA	HB (g/dL)	PLAQUETAS (x 10 ³ /dL)
	RAI					
Baixo	0	SIM	NÃO	NÃO	> 11	> 100
Intermediário	I	SIM	SIM	NÃO	> 11	>100
	II	SIM	SIM/NÃO	SIM	> 11	>100
Alto	III	SIM	SIM/NÃO	SIM/NÃO	< 11	>100
	IV	SIM	SIM/NÃO	SIM/NÃO	Qualquer	<100
	BINET					
Baixo	A	SIM	SIM/NÃO (< 3)	SIM/NÃO	>10	>100
Intermediário	B	SIM	SIM/NÃO (< 3)	SIM/NAO	<10	>100
Alto	C	SIM	SIM/NÃO	SIM/NÃO	<10	<100

Tabela 2: Resultados de Hemoglobina, Plaquetas e Áreas Acometidas referentes ao Estadiamento de Rai (1975).

	Estádio	N	Média	Desvio Padrão
HB (g/dL)	0	19	11.9	±2.4
	I	16	12.4	±2.1
	II	15	13.6	±2.1
	III	6	9.0	±0.7
	IV	8	9.2	±2.5
PLAQUETAS (x10 ³ /dL)	0	19	190.7	±62.4
	I	16	190.0	±71.2
	II	15	172.5	±57.5
	III	6	203.6	±100.0
	IV	8	75.1	±24.7
ÁREAS ACOMETIDAS	0	19	0	0
	I	16	2.0	±1.3
	II	15	3.7	±1.6
	III	6	5.1	±1.7
	IV	8	2.2	±2.7
	Total	64		

Tabela 3: Resultados de Hemoglobina, Plaquetas e Áreas Acometidas referentes ao Estadiamento de Binet (1981).

	Estádio	N	Média	Desvio Padrão
HB (g/dL)	A	43	12.5	±2.1
	B	13	11.4	±2.9
	C	8	8.3	±2.2
PLAQUETAS (x10 ³ /dL)	A	43	190.3	±65.6
	B	13	169.4	±75.1
	C	8	74.2	±27.0
ÁREAS ACOMETIDAS	A	43	1.1	±1.3
	B	13	5.0	±1.2
	C	8	2.4	±3.0
	Total	64		

Tabela 4: Classificação dos pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica através do Estadiamento de Rai e Binet (1981)

Estadiamento Rai (1975)	Frequência	Estadiamento Binet (1981)	Frequência
0	19/64	A	43/64
I	16/64	B	13/64
II	15/64		
III	6/64	C	8/64
IV	8/64		

Expressão de CD-38

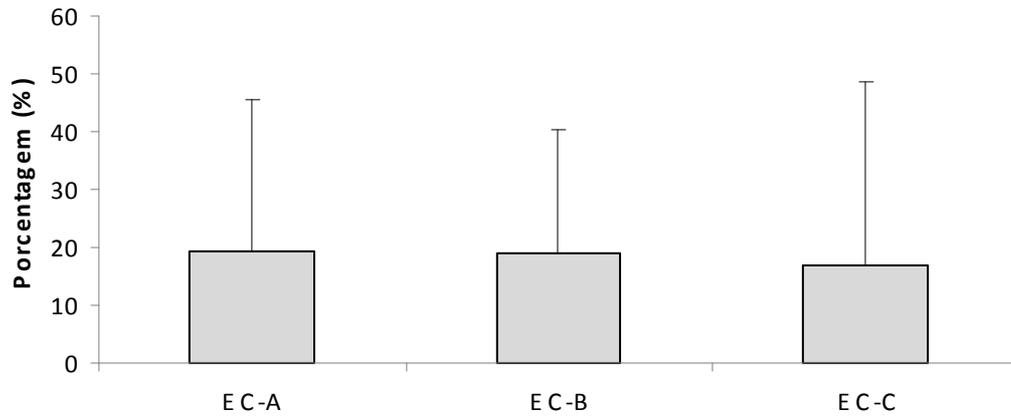


Figura 1. Expressão de CD-38 por Estadiamentos EC-A, EC-B e EC-C. Dados apresentados como médias nas colunas. Barras representam o desvio padrão da média.

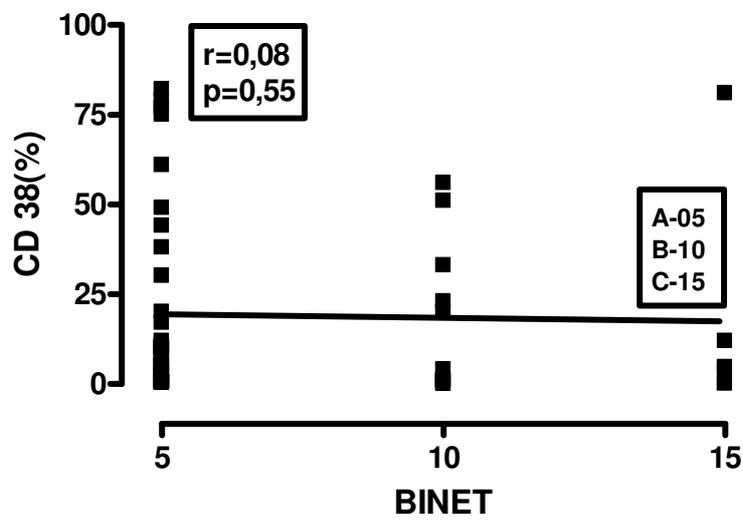


Figura 2: Gráfico de Correlação da expressão de CD38 e o Estadiamento de Binet.

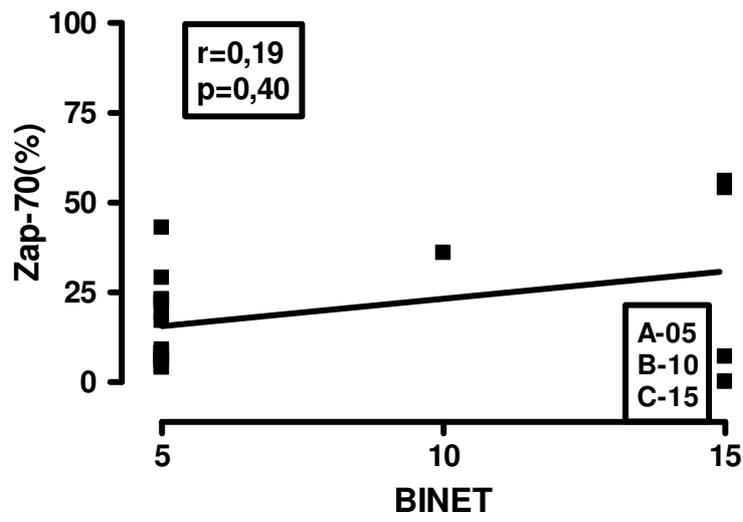


Figura 3: Gráfico de Correlação da expressão de Zap-70 e o Estadiamento de Binet.

4 CONCLUSÃO

- Não existe correlação entre os estadiamentos de Rai e Binet para a amostra estudada;
- Não houve diferenças significativas na expressão de CD38 entre os estadiamentos de Binet EC-A, EC-B e EC-C;
- Não há associação entre a expressão de CD38 e o estadiamento clínico de Binet;
- Não há associação entre a expressão de Zap-70 e o estadiamento clínico de Binet;

REFERÊNCIAS

ALTEKRUSE, S. F. et al. *SEER Cancer Statistics comentário, 1975-2007*. National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, EUA, 2010.

BINET, JL. et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. v. 48, n.1, p. 198-206, 1981.

BINET, JL. et al. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL)-initiated working group on prognostic and diagnostic parameters in CLL. October 13, doi: 10.1182/blood-2005-04-1677 *Blood* February 1, 2006 v. 107 n. 3, p. 859-861, 2005.

CRESPO, M. et al. ZAP-70 Expression as a Surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, v. 348, n. 18, p. 1764-75, 2003.

DAGKLIS, A. et al. Valeria. The immunoglobulin gene repertoire of low-count chronic lymphocytic leukemia (CLL)-like monoclonal B lymphocytosis is different from CLL: diagnostic implications for clinical monitoring. *Blood*, v. 114, p. 26-32, 2009.

DAMLE, R. N. et al. Imunoglobulina V estado de mutação do gene CD38 e expressão como novos indicadores de prognóstico na leucemia linfocítica crônica. *Blood*, v. 94, p. 1840-1847, 1999.

DAMLE, R. N. et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v. 94, n. 6, p. 1840-1847, 1999.

DAMLE, R. N. et al. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood*, v. 110, n. 9, p. 3352-3359, 2007.

DEL PRINCIPE, M. I. et al. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v. 108, n.3, 2006.

DIGHIERO, G. CLL biology and prognosis. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, p. 278-284, 2005.

DOBBIN, J. A. Transformação da LLC-B: síndrome de Richter. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 27, n. 4, 2005.

DÜRIG, J. et al. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, v. 16, n. 1, p. 30-35, 2002.

GENTILE, M. et al. Predictive value of β 2-microglobulin (β 2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica*, v. 94, n. 6, p. 887-888, 2009.

HALLEK, M. 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*, v. 111, p. 5446-5456, 2008.

HALLEK, M. et al. Serum β_2 -Microglobulin and Serum Thymidine Kinase are Independent Predictors of Progression-Free Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia and Immunocytoma. *Leuk Lymphoma*, v. 22, p. 439-47, 1996.

HAMBLIN, T. J. et al. Unmutated Ig V_H Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, v. 94, p. 1848-1854, 1999.

JAFFEE, E. S. Et al. *Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press, 2001

JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, v. 58, n. 2, p. 71-96, 2008.

KÜPPERS, R. et al. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*, v. 341, n. 20, p. 1520-1529, 1999.

MORILLA, A. et al. Combinations of ZAP-70, CD38 and IGHV mutational status as predictors of time to first treatment in CLL. *Leuk Lymphoma*, v. 49, n. 11, p. 2108-2115, 2008.

PARKER, T. Chronic Lymphocytic Leukemia: Prognostic Factors and Impact on Treatment. *Discovery Medicine*, v. 11, n. 57, p. 115-123, 2011.

RAI, K. R. et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v. 46, n. 2, p. 219-234, 1975.

RASSENTI, L. Z. et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v. 112, n. 5, p. 1923-1930, 2008.

RIVKINA, A. et al. Identifying the stage of new cll patients using tk, zap-70, cd38 levels. *Exp Oncol*, v. 33, n. 2, p. 99-103, 2011.

National Cancer Institute. SEER Stat Fact Sheets: Chronic Lymphocytic Leukemia. Disponível em: <[http:// seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html](http://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html)>. Acessado em 02 de julho de 2011.

VASCONCELOS, Y. Marcadores de prognóstico na leucemia linfocítica crônica. *Rev. bras. hematol. Hemoter*, v. 27, n. 4, p. 253-256, 2005.

VÉRONÈSE, L. et al. Pronostic de la leucémie lymphoïde chronique: mise au point sur les facteurs biologiques récents. *Annales de Biologie Clinique*, v. 66, n. 4, p. 371-377, 2008.

VROBLOVÁ, V. et al. Biological prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Medica*, v. 52, n. 1, p. 3-8, 2009.

WIESTNER, A. et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*, v. 101, n. 12, p. 4944-4951, 2003.

Anexo A – Carta de Aprovação Comitê de Ética – HUSM

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p> 
--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Análise da expressão de CD38 e Zap-70 em pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica do Hospital Universitário de Santa Maria

Número do processo: 23081.015580/2009-29

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0294.0.243.000-09

Pesquisador Responsável: José Edson Paz da Silva

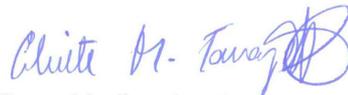
Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Janeiro / 2011- **Relatório final**

Os membros do CEP-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 03/03/2010

Santa Maria, 05 de março de 2010.



Elisete Medianeira Tomazetti
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-UFSM
Registro CONEP N. 243.

ANEXO B – Checklist usado na coleta de dados

LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA FICHA DE IDENTIFICAÇÃO

01. IDENTIFICAÇÃO:

Nome:.....Registro:.....
 Estado Civil:.....Data de Nascimento:...../...../.....Idade(diag):.....
 Local de nascimento:.....Raça:.....
 Procedência:.....
 Sexo: () M () F Profissão:.....Religião:.....
 Residência: Rural () Urbana ()
 Observações:.....

02. DIAGNÓSTICO:

Data:...../...../..... Tempo de diagnóstico:.....
 Evolução:.....

Hemograma (1º) Data/...../.....

Ht:.....%;	Hb:.....g/dl;	Leuc:.....mm ³ ;
Mielo:.....%;	Meta:.....%;	Bast:.....%;
Seg:.....%;	Linf:.....%;	Mono:.....%;
Eos:.....%;	Bas:.....%;	Blast:.....%;
Plaq:.....mm ³	Glicemia:.....mg/dl;	Uréia:.....mg/dl;
Creatinina:.....mg/dl;	Ác. Úrico:.....mg/dl;	DHL:.....UI;
TGO:.....UI;	TGP:.....UI;	F. Alcalina:.....UI;
Bil. Totais:.....mg/dl;	BD:.....mg/dl;	Sódio:.....meq/l;
Potássio:.....meq/l;	Cloretos:.....meq/l;	Calcio:.....mg/dl;
Magnésio:.....mg/dl;	Fósforo:.....mg/dl;	Anti HIV:.....;
Anti HCV:.....;	HbsAg:.....	VDRL:.....;
Monoteste:.....	CMV (IgM).....	CMV(IgG).....
Chagas:.....	Proteinograma:.....	TSH:.....
T4L:.....	Coombs Direto:.....	Reticulócitos:.....

Biópsia Medular
 Série Vermelha:.....

Série Branca.....

Série Plaquetária:.....

Citogenética:.....

