



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RICHEYLA KELLY DE ASSIS CUSTÓDIO

PERFIL CLÍNICO E LABORATORIAL DOS PACIENTES COM LEUCEMIA
LINFOIDE CRÔNICA ATENDIDOS NO SERVIÇO DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO HUWC-HEMOCE

FORTALEZA
2009

RICHEYLA KELLY DE ASSIS CUSTÓDIO

PERFIL CLÍNICO E LABORATORIAL DOS PACIENTES COM LEUCEMIA
LINFOIDE CRÔNICA ATENDIDOS NO SERVIÇO DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO HUWC-HEMOCE

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do Ceará para obtenção do
título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves

FORTALEZA
2009

C991p Custódio, Richeyla Kelly de Assis
Perfil clínico e laboratorial dos pacientes com leucemia linfóide crônica
atendidos no Serviço de Hematologia e Hemoterapia do HUWC-
HEMOCE / Richeyla Kelly de Assis Custódio. – Fortaleza, 2009.
77f. : il.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza-Ce, 2009.

1. Leucemia linfóide. 2. Doença crônica. 3. Proteína ZAP-70. 4.
Antígeno CD38. I. Gonçalves, Romélia Pinheiro (Orient.) II. Título.

CDD T616.99419

RICHEYLA KELLY DE ASSIS CUSTÓDIO

PERFIL CLÍNICO E LABORATORIAL DOS PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOIDE CRÔNICA ATENDIDOS NO SERVIÇO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO HUWC-HEMOCE

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____/____/2009.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Herivaldo Ferreira da Silva
Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE)

Profª. Dra. Ieda Pereira de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, pela força que me move na busca dos meus objetivos.

Aos meus amores, que me deram motivação para superar as dificuldades que enfrentei na caminhada até aqui.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves, que me orientou neste trabalho, com valiosos questionamentos e ensinamentos e, especialmente, com sua infinita paciência para acompanhar os obstáculos ultrapassados.

À Dra. Rosângela Pinheiro Gonçalves Machado, pelas palavras de incentivo e encorajamento para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Daniel Mazza Matos, pela sua brilhante capacidade solidária e humana e pelas suas valiosíssimas orientações para o enriquecimento desse trabalho.

Aos pacientes, que muito colaboraram com as informações prestadas, sem as quais me seria impossível continuar.

A técnica Andréa, pela sua presteza e valiosa ajuda na realização dos testes.

A todos do ambulatório de hematologia e hemoterapia do HEMOCE, pela colaboração na cansativa busca de dados nos prontuários.

A todos do laboratório de hematologia e hemoterapia do HEMOCE, pela captação de pacientes e coleta das amostras.

Aos colegas do mestrado, em especial a minha amiga Darcielle Bruna.

Ao colega Roberto do LACT, pela centrifugação e separação das amostras.

Ao colega Daniel Pinheiro Maia, pela ajuda na interpretação dos artigos.

À FUNCAP, pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

À secretária Raimundinha, pela sua dedicação e pelas mais variadas ajudas.

Ao meu esposo, Valdinar Custódio Filho, pelos mais incríveis incentivos e pelas inúmeras horas dedicadas aos nossos filhos para que eu pudesse me dedicar aos estudos.

Aos nossos filhos, Valdinar Neto, Danilo e o que ainda nem conheço (mas já o sinto), pelos mais incríveis momentos de alegria passados muitas vezes ao lado do computador.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram desse trabalho.

“Ide pois aos vossos campos e pomares,
e lá aprendereis que o prazer da abelha
é de sugar o mel da flor,
mas que o prazer da flor
é de entregar o mel à abelha.

Pois para a abelha,
uma flor é fonte de vida
e para a flor,
uma abelha é mensageira do amor.

E para ambas,
a abelha e a flor,
dar e receber é uma necessidade.”

Gibran Kalil Gibran

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leucemia linfocítica crônica (LLC) é a leucemia mais freqüente nos países ocidentais, ocorrendo em cerca de 30% de todas as leucemias do adulto, acometendo principalmente a população acima de 65 anos de idade. É caracterizada pela proliferação clonal de linfócitos tipo B CD5 positivos. Do ponto de vista epidemiológico, raramente é vista entre os orientais e a sua incidência não sofre influência de agentes ambientais como substâncias tóxicas ou radiações ionizantes. Os pacientes com LLC podem apresentar evolução clínica variável desde indolente a forma mais agressiva e rapidamente fatal. Na última década, houve um grande avanço no conhecimento da fisiopatologia desta doença e fatores de prognóstico de maior impacto foram estabelecidos e, do ponto de vista terapêutico, novos medicamentos com maior eficácia surgiram. Desta forma é interessante conhecer a real situação desta doença com características epidemiológicas, clínicas e de prognóstico muito peculiares. **OBJETIVOS:** Nesse trabalho traçamos o perfil (demográfico, clínico e laboratorial) dos pacientes com LLC atendidos no serviço de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) do HUWC, correlacionando a expressão dos marcadores de prognóstico (CD38 e ZAP-70) com algumas variáveis e com o tratamento farmacológico. **METODOLOGIA:** Foram utilizadas amostras de sangue de 55 pacientes com LLC confirmados através de imunofenotipagem, em tratamento ou não. Os marcadores CD38 e ZAP-70 foram analisados por citometria de fluxo e a dosagem de β 2-microglobulina obtida através de método imunoenzimático (ELISA). Os dados obtidos foram analisados através de programa estatístico. **RESULTADOS:** Observamos um leve predomínio de pacientes do sexo masculino (1,4:1), 78% acima de 65 anos de idade e 60% eram procedentes da capital. Quanto ao estadiamento, 50,9% pacientes foram classificados como de baixo risco, segundo classificação de Rai. Quanto a evolução clínica, mais de 30% dos pacientes não apresentavam sinais clínicos, nem no momento do diagnóstico nem no final do estudo. Em relação aos marcadores, 22,2% dos pacientes apresentavam expressão do ZAP-70 e 24,13% do CD38. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os marcadores ZAP-70 e CD38 e as variáveis hematológicas (Hb, Ht e Plaquetas). Houve correlação entre o estadiamento clínico de Rai e o tratamento farmacológico e com os marcadores de prognóstico (ZAP-70 e CD38). **CONCLUSÃO:** O perfil foi caracterizado por pacientes em estágios clínicos, segundo Rai, de baixo risco, com ausência da expressão dos marcadores de prognóstico (ZAP-70 e CD38) e com ausência de tratamento específico.

Palavras-chaves: Leucemia linfóide crônica. Proteína ZAP-70. Antígeno CD38.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is the most frequent leukemia on western countries, responding for 30% off all leukemia cases, reaching, specially, the under 65 years old population. It is characterized by accumulation of neoplastic mature B lymphocytes positives CD5. Concerning epidemiology, it is barely seen among eastern people, and its incidence is not influenced by environmental agents, such as toxic substances or ionizing radiation. CLL-B patients may present a variable clinical evolution, which goes from indolent to aggressive and rapidly fast cases. On last decade, there have been great advance on biology knowledge of this disease, and greater impact prognostic factors have been established. In relation to treatment, new medication, with better efficacy, appeared. Therefore, it is interesting to know the real situation of this disease, which has singular epidemiological, clinical and prognostic characteristics. **OBJECTIVES:** In this work we trace the demographical, clinical and laboratorial profile of patients with CLL-B, at a state hemocenter (HEMOCE). We correlate prognostic markers expression (CD38 e ZAP-70) with some variable and with pharmacological treatment. **METODOLOGY:** We used 55 blood samples from patients CLL-B confirmed by their immunophenotypes; these patients may or may not be in treatment. CD38 and ZAP-70 were analyzed by flow cytometry and β 2-microglobulin dosage, obtained through ELISA. Results were treated by statistic program. **RESULTS:** We see a discrete prevalence of male patients (1,4:1), 78% are under 65 years old and 60% live at Ceará's capital. In relation to Rai staging system, 50,9% were classified as low risk patients. Concerning clinical evolution, more than 30% of the patients did not show clinical signs, neither at diagnose moment nor at the end of this study. In relation to the markers, 22,2% of the patients show ZAP-70 expression, and 24,13% show CD38 expression. There was no significant statistic difference between ZAP-70 and CD38 markers and hematological variable (Hb, Ht and platelets). There was correlation between Rai's staging and pharmacological treatment and with prognostic markers. **CONCLUSION:** The profile was characterized by low risk patients, according Rai's staging, it lacks prognostic markers expression and it also lacks specific treatment.

Keywords: Chronic Lymphoid Leukemia. ZAP-70 Protein. CD38 Antigen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Características morfológicas de células LLC no sangue periférico -----	18
Figura 2. Características de células LLC na medula óssea -----	20
Figura 3. Distribuição dos pacientes com LLC em relação ao gênero -----	34
Figura 4. Distribuição dos pacientes com LLC segundo a faixa etária -----	35
Figura 5. Distribuição dos pacientes com LLC segundo a origem -----	36
Figura 6. Classificação dos pacientes com LLC segundo Rai <i>et al.</i> -----	37
Figura 7. Relação das organomegalias presentes nos pacientes com LLC ao diagnóstico e no acompanhamento -----	38
Figura 8. Perfil de imunofenotipagem dos pacientes com LLC quanto ao marcador CD38 ---	39
Figura 9. Perfil de imunofenotipagem dos pacientes com LLC quanto ao marcador ZAP70 --	40
Figura 10. Relação do tratamento dos pacientes com LLC ao diagnóstico e no acompanhamento -----	41
Figura 11. Boxplot's das variáveis Hb (g/dL), Ht (%), plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$) e LEU ($10^3/\text{mm}^3$) por níveis do marcador CD38 -----	47
Figura 12. Boxplot's das variáveis Hb (g/dL), Ht (%), plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$) e LEU ($10^3/\text{mm}^3$) por níveis do marcador ZAP- 70-----	48
Figura 13. Boxplot's das variáveis LDH (U/L) e Linf ($10^3/\text{mm}^3$) por níveis dos marcadores ZAP- 70 e CD38-----	49
Figura 14. Boxplot's das variáveis Hb (g/dL), Ht (%), plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$) e LEU ($10^3/\text{mm}^3$) para cada cruzamento dos marcadores ZAP-70 e CD38 -----	50
Figura 15. Boxplot's das variáveis LDH (U/L) e Linf ($10^3/\text{mm}^3$) para cada cruzamento dos marcadores ZAP- 70 e CD38 -----	51
Quadro 1. Classificação dos cinco estágios de estadiamento segundo Rai, 1975 -----	21
Quadro 2. Classificação dos três estágios de estadiamento, segundo Binet, 1977 -----	22
Quadro 3. II Encontro Brasileiro de Consenso em LLC-----	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Percentagem de pacientes ZAP -70 positivo versus ZAP-70 negativo e CD38 positivo versus CD38 negativo para pacientes tratados e não tratados	42
Tabela 2.	Relações dos tratamentos através da idade e do marcador ZAP 70 e CD38	42
Tabela 3.	Relação do tratamento nos grupos ZAP-70-/CD38- e ZAP-70+/CD38+	42
Tabela 4.	Relações dos tratamentos através da idade e do Estágio RAI	43
Tabela 5.	Comparação entre CD38 positivo e CD38 negativo através das variáveis	44
Tabela 6.	Comparação entre ZAP-70 positivo e ZAP-70 negativo através das variáveis	44
Tabela 7.	Teste-T pareado para estadiamento segundo RAI	45
Tabela 8.	Comparações entre os níveis do estágio RAI através das variáveis (diagnóstico), Teste Tukey	46
Tabela 9.	Comparações entre os níveis do estágio RAI através das variáveis (final do estudo), Teste Tukey	46
Tabela 10.	Resumo dos fatores avaliados	77
Tabela 11.	Relações dos tratamentos através da idade e do Estágio BINET	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LLC	Leucemia linfocítica crônica
β2-MG	β2-microglobulina
LDH	Enzima lactato desidrogenase
Ig	Imunoglobulina monotípica de superfície
IgVh	Região variante da cadeia pesada da imunoglobulina
Stk	Enzima timidina quinase
Hb	Hemoglobina
Ht	Hematócrito
Plaq	Plaqueta
TCR	Receptor para antígeno de células T
NK	Natural killer
MCH	Complexo principal de histocompatibilidade
ATP	Trifosfato de adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzima imuno ensaio
NCI	National Cancer Institute-sponsored
IWCLL	International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia
RNA-m	Ácido ribonucléico mensageiro
CVP	Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisona
CAP	Ciclofosfamida, Adriblastina, Prednisona
CHOP	Ciclofosfamida, Adriblastina, Vincristina, Prednisona
ADENO	Adenomegalia
ESPLENO	Esplenomegalia
HEPATO	Hepatomegalia
FLUDARA	Fludarabina
CICLO	Ciclofosfamida
LEUK	Leukeran
PRED	Prednisona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	Leucemias - aspectos gerais	14
2.2	Leucemia linfóide crônica	14
2.2.1	Classificação e prognóstico	15
2.2.2	Características clínico-laboratoriais	17
2.2.3	Estadiamento	21
2.2.4	Marcadores de prognóstico	22
2.2.5	Tratamento	26
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	Casuística	30
4.2	Metodologia	30
4.2.1	Coleta	30
4.2.2	Preparação das amostras	31
4.2.3	Considerações éticas	32
4.2.4	Análise estatística	32
4.2.5	Fluxograma	33
5	RESULTADOS	34
5.1	Resultados demográficos	34
5.2	Resultados clínicos	36
5.3	Resultados laboratoriais	38
5.4	Resultados terapêuticos	41
5.5	Resultados estatísticos	41
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58
	APÊNDICES	63
	ANEXOS	68

1 INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, a Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) foi considerada uma doença relativamente homogênea, desencadeada pelo acúmulo de linfócitos B monoclonais imuno-incompetentes e com graves distúrbios no processo normal de apoptose. No entanto, sabe-se hoje que a LLC é uma doença clinicamente heterogênea, na qual as células leucêmicas são provavelmente imuno-competentes, ou seja, previamente expostas a antígenos. Além disso, ao contrário do que se acreditava, o fenômeno de apoptose destas células parece estar intacto (GARICOCHEA, 2005).

Com o aumento da expectativa de vida e do tempo de vida médio de parte da população mundial, bem como com o grande avanço nas várias ciências, pôde ser observado um crescente interesse no estudo das leucemias linfocíticas nas duas últimas décadas, em particular da leucemia linfocítica crônica, havendo obviamente um aumento considerável nas publicações a respeito, grande parte em periódicos internacionais.

A busca de profissionais e pesquisadores por um diagnóstico laboratorial mais preciso, bem como por protocolos mais eficazes e uma maior segurança no tratamento em pacientes oncológicos como um todo tem direcionado os estudos para o descobrimento de novos marcadores. Movidos por esse interesse, decidimos, neste trabalho, realizar um estudo do perfil clínico e laboratorial nos pacientes com LLC e correlacionar os achados com os parâmetros ZAP-70, CD38, β 2-MG e LDH ditos atualmente como moduladores da atividade da doença.

Vale adiantar, como de fato é feito ao longo de todo este trabalho, o crescente consenso da comunidade internacional pelas conclusões, cada vez mais assertivas, quanto à superioridade dos marcadores sorológicos mais recentes em relação ao estadiamento tradicional para fins de prognóstico e acompanhamento da evolução da LLC na grande maioria dos pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leucemias - aspectos gerais

As leucemias constituem uma proliferação neoplásica generalizada de células hematopoéticas oriundas de um mesmo clone (monoclonalidades), com ou sem envolvimento do sangue periférico (OLIVEIRA; POLI NETO, 2004).

A transformação leucêmica pode ocorrer em qualquer precursor, podendo ser linfocítica, mieloide ou em uma célula progenitora que tenha capacidade pluripotente e potencial de diferenciação tanto para a linhagem mieloide quanto para a linfocítica. As doenças neoplásicas estão subdivididas em agudas e crônicas, com base na descrição do curso da doença e no grau de diferenciação e maturação celular (OLIVEIRA; POLI NETO, 2004).

As leucemias agudas apresentam uma progressão rápida, na sua maioria com sintomatologia, caracterizadas pela perda da capacidade de maturação ou diferenciação do clone leucêmico que tem grande poder de expansão, justificando assim o decurso clínico rápido e obscuro (OLIVEIRA; POLI NETO, 2004).

Já nas leucemias crônicas, o agravamento dos sinais e sintomas é gradual, tendo como denominador comum a proliferação anormal de uma célula neoplásica que mantém sua capacidade maturativa, resultando em um grande número de células neoplásicas maduras na circulação. São raras ou ausentes as formas blásticas na circulação periférica ou na medula óssea, e, nesses casos, a sobrevida é maior, mesmo sem tratamento, podendo chegar a alguns anos (OLIVEIRA; POLI NETO, 2004).

2.2 Leucemia Linfocítica Crônica

A LLC é uma doença neoplásica, caracterizada pelo acúmulo de linfócitos pequenos de aspecto maduro, no sangue periférico, nos tecidos linfocíticos e na medula óssea, com conseqüente organomegalia e insuficiência medular (FERRARINI; CHIORAZZI, 2004).

Mais de 90% dos casos apresentam imunofenótipo B, sendo a LLC uma doença predominantemente do idoso e, dentre as leucemias, a que apresenta maiores índices de

sobrevida. A idade mediana ao diagnóstico é de 64-70 anos, sendo rara a sua ocorrência em indivíduos com menos de 30 anos. Um aumento exponencial na incidência da LLC é observado com o avançar da idade, para ambos os sexos, sendo a incidência em indivíduos maiores que 65 anos de 20,6 casos/100.000/ano e de apenas 1,3 casos /100.000/ano em pacientes menores que 65 anos (YAMAMOTO, 2005; BROUET, 2003).

A origem étnica também parece influenciar o número de casos de LLC, com maiores índices em países como Austrália, EUA, Irlanda e Itália. Há ainda um predomínio no sexo masculino e na raça branca, apesar de haver variações de acordo com o país e com as regiões (YAMAMOTO, 2005). Porém, outros estudos discordam do que foi exposto anteriormente sobre a LLC ao afirmarem que nem idade, sexo ou raça possuem um papel relevante na avaliação de prognóstico na LLC, embora haja um leve predomínio no sexo masculino, e pacientes mais idosos tendam a evoluir menos favoravelmente devido a comorbidades (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Contrariamente a outras leucemias, não há ainda evidências que sugiram uma maior incidência de LLC em pacientes expostos a fatores ambientais ou ocupacionais. Parece haver uma forte influência de fatores genéticos, quando observado que 10% dos pacientes portadores de LLC apresentam histórico familiar da doença e que 13,5% dos parentes em primeiro grau de pacientes afetados apresentam linfócitos com imunofenotipagem semelhante à da LLC (podendo ou não manifestar a doença posteriormente). Observa-se ainda um aumento na frequência de outras doenças linfoproliferativas crônicas bem como de outros tumores sólidos em pacientes de primeiro e segundo graus (YAMAMOTO, 2005; GREER *et al.*, 2003).

2.2.1 Classificação e prognóstico

Antigamente, a LLC tinha sua classificação junto a outras desordens linfoproliferativas de origem em células B ou T, dentro da larga categoria denominada leucemias linfocíticas crônicas. Recentemente, houve uma divisão mais precisa deste grupo, sendo a LLC então definida pela expansão de células B com baixa expressão de imunoglobulina monotípica de superfície (Ig) e CD79b, bem como caracterizada fenotipicamente como CD19+, CD5+, CD23+ e CD22- (FERRARINI & CHIORAZZI, 2004).

Há muito tem sido descrito que alguns pacientes com LLC progridem rapidamente a estágios mais avançados da doença, indo ao óbito independentemente de tratamento, enquanto, em outros pacientes, a doença não evolui, determinando um longo período de sobrevida, podendo estes ser acompanhados sem tratamento. Apesar de antiga, esta dicotomia no curso clínico da doença é observada ainda hoje, mesmo em casos compatíveis com a definição mais moderna da LLC (FERRARINI; CHIORAZZI, 2004).

Alguns estudos demonstraram que a LLC pode ser dividida em dois subgrupos dependendo da presença ou ausência de mutações nos genes IgVH (região variante da cadeia pesada de imunoglobulina). Logo, um maior número de divisões celulares no grupo sem mutação do gene IgVH, em comparação com o grupo com mutação, explicaria porque o grupo não mutado está mais susceptível a adquirir aberrações cromossômicas e, conseqüentemente, apresentar um curso clínico mais agressivo da doença (GARICOCHEA, 2005).

Vem sendo também confirmado, em várias pesquisas, que a presença de genes IgVH não-mutados correlaciona-se com uma progressão mais rápida da doença e um período mais curto de sobrevida. Atualmente, o *status* de mutação no gene IgVH é o indicador mais preciso da evolução clínica da LLC (FERRARINI; CHIORAZZI, 2004).

Em virtude da heterogeneidade dos pacientes com LLC quanto à história natural e à evolução clínica, criaram-se sistemas de estadiamento da doença (RAI e Binet), baseados em características clínicas e hematológicas, sendo o estadiamento o principal critério para a avaliação da sobrevida dos pacientes com LLC, nos quais o tempo de sobrevida diminui à medida que os pacientes progridem para estágios mais avançados da doença (VASCONCELOS, 2005).

Contudo, em estágios iniciais da LLC, nenhum dos dois sistemas distingue com precisão os pacientes que podem desenvolver a forma mais agressiva da doença em relação aos que permanecerão com a forma mais indolente. Recentemente, novos marcadores de impacto prognóstico têm sido investigados e associados a um prognóstico mais grave, incluindo o *status* de não mutação de genes IgVH, alta expressão de CD38 na superfície de células B leucêmicas e de genes ZAP-70 (NASCIMENTO *et al*, 2006; VASCONCELOS, 2005).

Além disso, o modo de expansão e evolução de clones malignos e o conseqüente curso clínico da doença parecem, cada vez mais, estar associados à estimulação de antígenos ainda de origem indefinida, a qual, por sua vez, seria determinada por características intrínsecas de cada população de células (FERRARINI; CHIORAZZI, 2004).

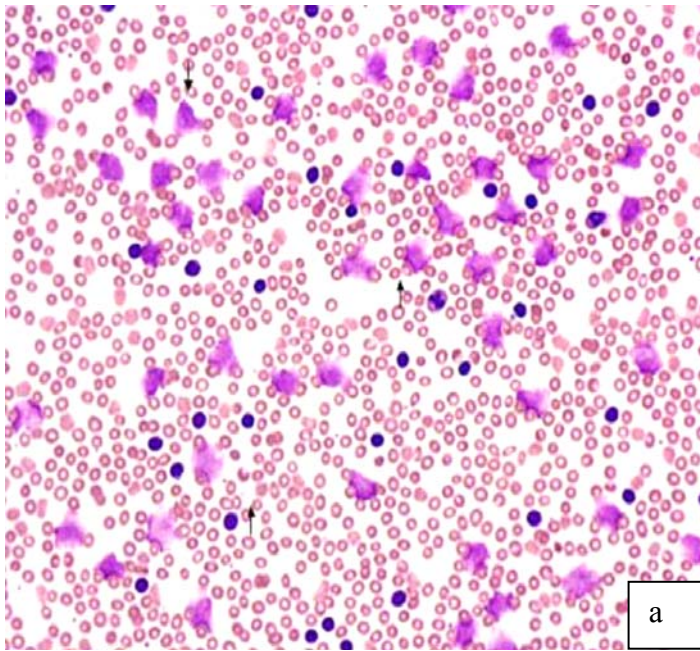
2.2.2 Características clínico-laboratoriais

Clinicamente, aproximadamente 50% dos pacientes com LLC são assintomáticos ao diagnóstico e apresentam linfocitose absoluta isolada no sangue periférico, sem causa determinada, sendo diagnosticados quase que por acaso, em um exame de rotina. Em aproximadamente 15% dos pacientes, ao diagnóstico, estão presentes sintomas constitucionais, tais como sudorese noturna, perda de peso e fadiga, mais frequentes que febre relacionável à doença. Os achados físicos mais comuns são linfadenopatia, seguida de esplenomegalia e hepatomegalia. O envolvimento extra-nodal de tonsilas e pele tem sido observado, enquanto o envolvimento do trato gastrointestinal, pulmão, pleura, sistema nervoso central, rins e ossos não é comum (YEE; O'BRIEN, 2006; VASCONCELOS; YAMAMOTO, 2005).

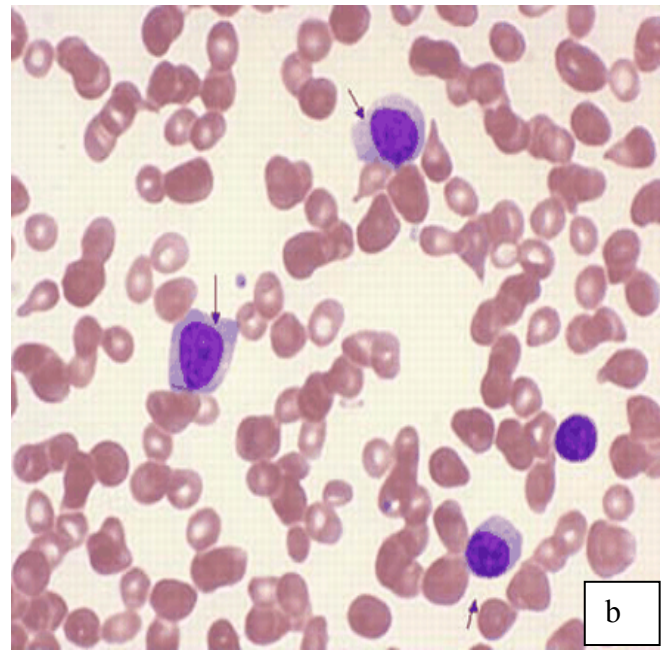
Quanto às características laboratoriais, os exames mais utilizados e úteis à tentativa de acerto diagnóstico laboratorial e prognóstico são: hemograma, tempo de duplicação linfocitária, padrão de infiltração histológica em biópsias ósseas, marcadores séricos, imunofenotipagem, análise citogenética para detecção de aberrações cromossômicas e avaliação do estado de mutação de genes da cadeia pesada da região variante de imunoglobulina IgVH, através de marcadores específicos (GREER *et al.*, 2003).

Apesar de inicialmente ser requerida uma linfocitose persistente e superior a $10.000_{/mm^3}$ para o diagnóstico de LLC, atualmente o preconizado é uma contagem superior a $5.000_{/mm^3}$ no hemograma. A média de contagem de linfócitos é de $30.000_{/mm^3}$ e em muitos pacientes há aumento contínuo desta taxa (GREER *et al.*, 2003).

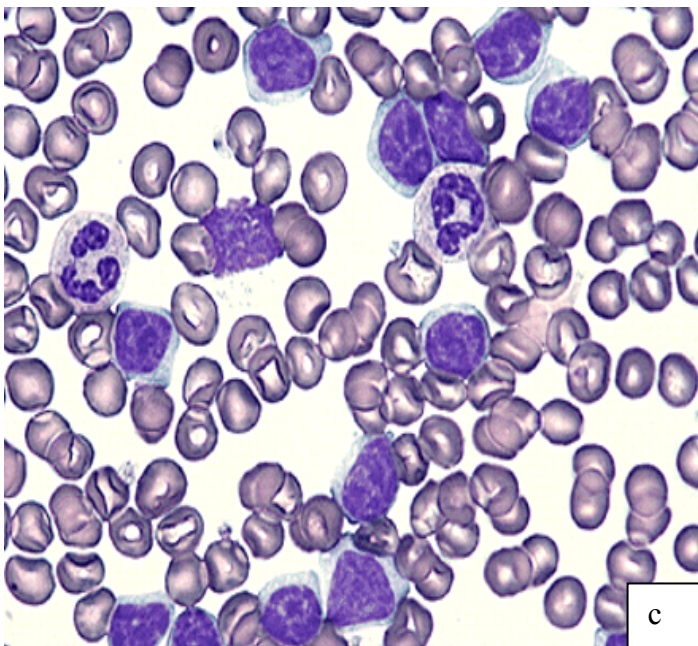
Em muitos pacientes, as células leucêmicas têm a aparência de linfócitos normais, de pequeno a médio porte, com cromatina condensada e uma fina camada citoplasmática (**figura 1-a**). Pode haver variações morfológicas, como algumas células assumindo morfologia de pró-linfócitos (**figura 1-b**), outras com citoplasma mais abundante (**figura 1-c**) e algumas com forma plasmocitóide ou clivada. Ruptura de linfócitos (“basket” ou “smudge cells” ou manchas de Gumprecht) pode estar presente (**figura 1-d**) e seu número aumenta com o número total de linfócitos (GREER *et al.*, 2003).



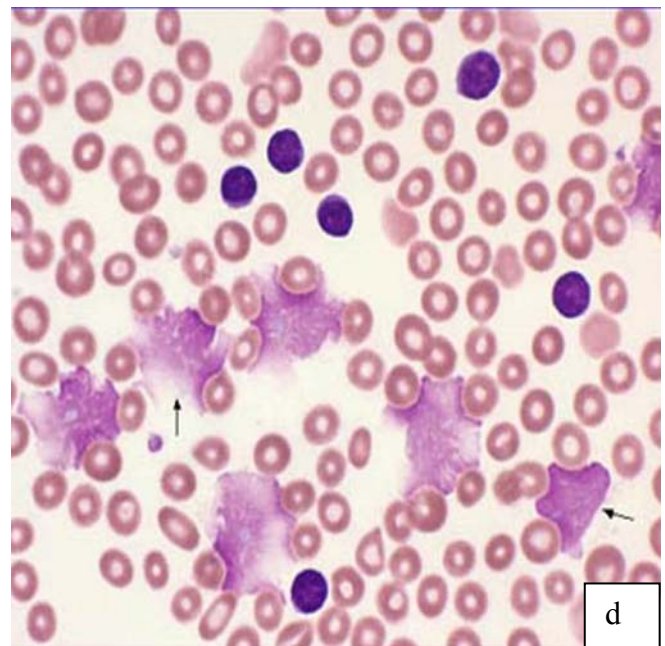
Aumento de 40x - MAY-GRUNWALD/GIEMSA



Aumento de 100x-MAY-GRUNWALD/GIEMSA



Aumento de 100x - MAY-GRUNWALD/GIEMSA



Aumento de 100x-MAY-GRUNWALD/GIEMSA

Figura 1. Características morfológicas de células LLC no sangue periférico: 1a – linfócitos maduros, com cromatina condensada e citoplasma escasso; 1b – pró-linfócitos e notável plaquetopenia; 1c – linfócitos com citoplasma mais abundante e formas atípicas; 1d – linfócitos maduros típicos e células de Gumprecht

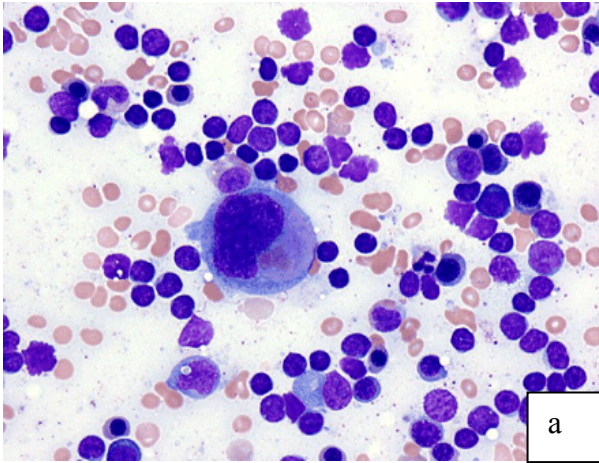
Fonte: LAZARCHICK, 2001; MASLAK, 2001.

Contrariamente, estudos recentes afirmam que a variabilidade entre pacientes do percentual de manchas de Gumprecht no sangue periférico é a muito conhecida e não está correlacionada com a contagem absoluta de linfócitos ou método de coloração (MASLAK, 2001).

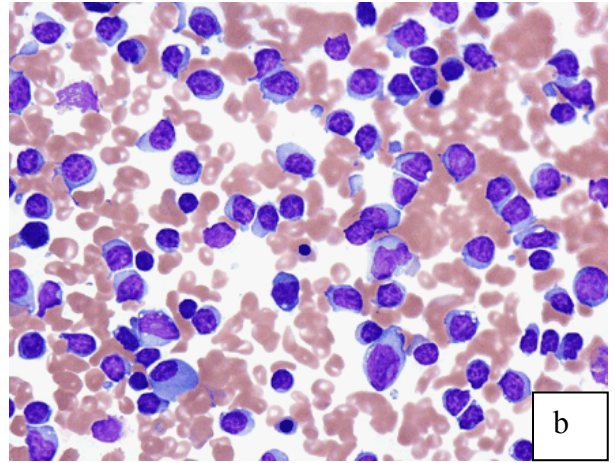
Usando um recurso proteômico, foi recentemente descoberto que a expressão da proteína vimentina, do citoesqueleto, é maior em células leucêmicas de pacientes com LLC, principalmente nas de pacientes com ausência de mutação do gene IgVH, de prognóstico ruim. Assim, a alta expressão de vimentina é associada à doença progressiva e de curto período entre diagnóstico e tratamento. Como a vimentina aumenta a rigidez linfocitária, isto explicaria o menor rompimento de células confirmado no grupo de pacientes de pior prognóstico, devido à maior presença desta proteína na constituição da estrutura celular (NOWAKOWSKI *et al.*, 2007).

Com relação ao tempo de duplicação linfocitária, um período menor que 12 meses está associado a um pior prognóstico e, se menor que 6 meses, influi na decisão terapêutica. Apesar de classicamente utilizado, o tempo de duplicação linfocitária vem perdendo importância na estimativa de prognóstico na LLC, tanto pela longa espera na sua definição quanto pelo poder preditivo superior de outros parâmetros mais recentes, como a imunofenotipagem e a citogenética (VASCONCELOS, 2005).

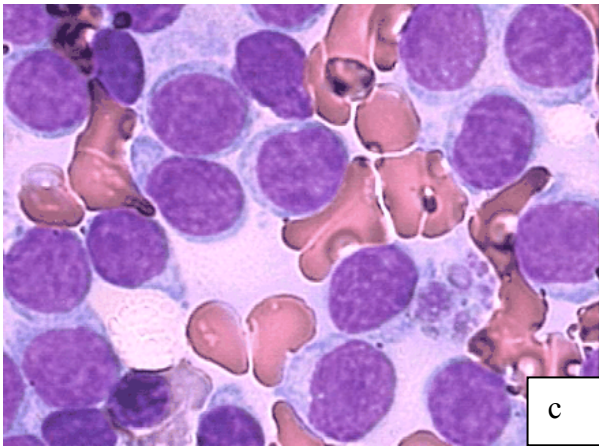
O padrão de infiltração na histologia da medula óssea (**figuras 2a-c**) é também tomado como marcador prognóstico em biópsias, na medida em que portadores de LLC contendo um padrão difuso de infiltração linfocitária possuem historicamente um perfil evolutivo mais agressivo (VASCONCELOS, 2005). Há quatro padrões possíveis de infiltração: difusa (**figura 2-d**), nodular (**figura 2-e**), intersticial (**figura 2-f**) ou mista (nodular e intersticial), sendo a mista a mais comum e a nodular, a menos frequente (GREER *et al.*, 2003).



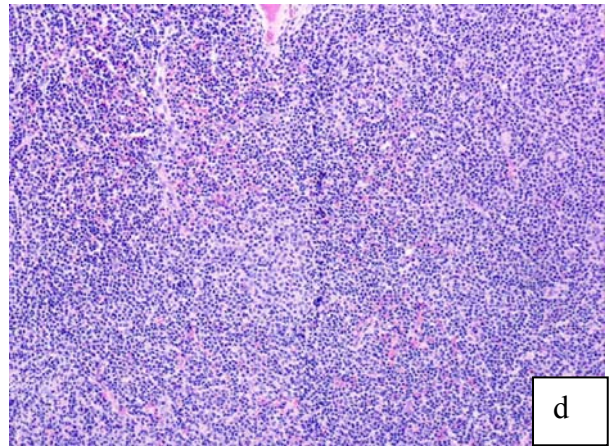
Aumento de 40- MAY-GRUNWALD/GIEMSA



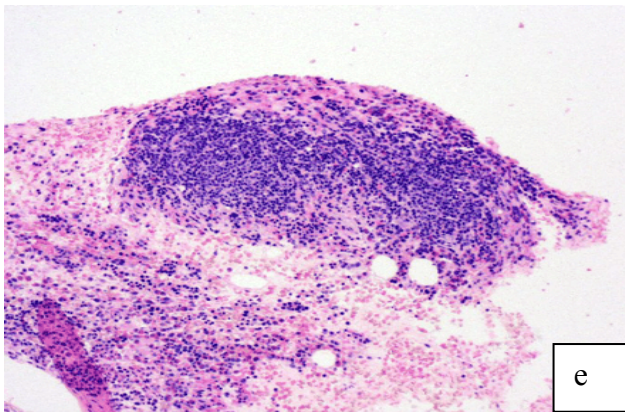
Aumento de 40 - MAY-GRUNWALD/GIEMSA



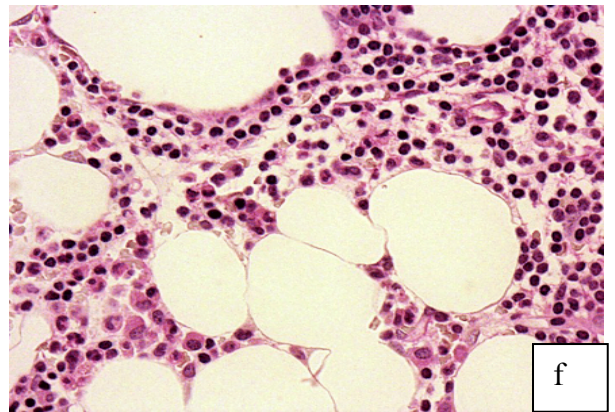
Aumento de 100x - MAY-GRUNWALD/GIEMSA



Aumento de 10x - MAY-GRUNWALD/GIEMSA



Aumento de 10x - MAY-GRUNWALD/GIEMSA



Aumento de 10x - MAY-GRUNWALD/GIEMSA

Figura 2. Características de células LLC na medula óssea: 2a – aspirado medular com megacariócito único, numerosos linfócitos pequenos e trombocitopenia; 2b – aspirado medular com grande quantidade de pró-lymfócitos (mau prognóstico); 2c – aspirado medular com substituição de componentes da medula por linfócitos maduros (cromatina condensada); 2d – biópsia de medula óssea com padrão de infiltração difuso; 2e – biópsia de medula óssea com padrão de infiltração nodular na região superior e padrão de infiltração intersticial na região inferior; 2f – biópsia de medula óssea com padrão de infiltração intersticial e presença dos elementos normais da medula óssea

Fonte: LAZARCHICK, 2001; MASLAK, 2001

2.2.3 Estadiamento

Pacientes com LLC são mundialmente alocados em três grandes grupos de risco (baixo, intermediário e alto), baseando-se em dois sistemas de estadiamento clínico, o de Rai (mais comum na América do Norte) e o de BINET (mais comum na Europa), às vezes em ambos, como em alguns centros brasileiros. Os estadiamentos, apesar da fácil aplicação, não identificam possíveis variações individuais que podem interferir no prognóstico da LLC (VASCONCELOS, 2005).

Esses sistemas definem estágios precoce (Rai 0, Binet A), intermediário (Rai I/II, Binet B) e avançado (Rai III/IV, Binet C), com tempos médios de sobrevida, respectivamente: > 10 anos, 5-7 anos e 1-3 anos. Surpreendentemente, esses sistemas são baseados somente no exame físico e no hemograma. Contudo, há heterogeneidade no curso da doença entre pacientes dentro de um mesmo estágio. Vale observar que os sistemas de estadiamento não permitem prever a taxa de progressão da doença em pacientes em estágios iniciais, nem a probabilidade de resposta ao tratamento em indivíduos de estágio mais avançado (SEILER; DÖHNER; STILGENBAUER, 2006). Além disso, em recentes análises, o estadiamento clínico não se manteve como um marcador independente de prognóstico quando foram introduzidos o *status* de mutação de genes IgVH e aberrações cromossômicas no modelo. Estes últimos, junto a marcadores sorológicos associados e independentes como ZAP-70, CD38 e outros como β_2 -M e TK, podem ter o poder de identificar subgrupos de pacientes com mau prognóstico entre pacientes de estágios iniciais e oferecerem informações prognósticas independente da clínica (SEILER; DÖHNER; STILGENBAUER, 2006).

Os quadros I e II apresentam as duas classificações, bem como os critérios de estadiamento, segundo os próprios autores.

Quadro1. Classificação dos cinco estágios de estadiamento segundo Rai, 1975.
Hb = hemoglobina.

RAI	Características clínicas dos estágios RAI
0	Linfocitose apenas ($\geq 15.000/\text{mm}^3$ no sangue ou $> 40\%$ na medula)
I	Linfocitose com aumento de linfonodos
II	Linfocitose com esplenomegalia e/ou hepatomegalia (com ou sem aumento de linfonodos)

III	Linfocitose com anemia (Hb < 11g/dL) (com ou sem aumento de linfonodos, fígado ou baço)
IV	Linfocitose com plaquetopenia (< 100.000/mm ³) (com ou sem aumento de linfonodos, fígado ou baço)

Fonte: Adaptado de GREER *et al.*, 2003

Quadro 2. Classificação dos três estágios de estadiamento, segundo Binet et al., 1977.
Hb = hemoglobina.

Binet	Características clínicas dos estágios BINET
A	Hb > 10 g/dL e plaquetas > 100.000/mm ³ ; < 3 áreas* envolvidas.
B	Hb > 10 g/dL e plaquetas > 100.000/mm ³ ; > 3 áreas* envolvidas.
C	Hb < 10 g/dL e/ou plaquetas < 100.000/mm ³ ; independente do número de áreas* envolvidas.

* As cinco áreas de envolvimento incluem cabeça e pescoço, axilas, virilha, baço e fígado.

Fonte: Adaptado de GREER *et al.*, 2003

2.2.4 Marcadores de prognóstico

• CD38

CD38 é um marcador de superfície detectado em uma proporção de casos de LLC. Sua expressão foi correlacionada com algumas propriedades funcionais destas células, como apoptose *in vitro*, tanto espontaneamente como depois de ligação cruzada com IgM de superfície. A expressão de CD38 é um indicador de mau prognóstico, em alguns casos relacionado também à não-mutação nos genes IgVH. Embora esta última relação nem sempre tenha sido confirmada nos vários estudos, a expressão de CD38 constitui um importante e independente fator prognóstico na grande maioria dos casos de LLC (FERRARINI, 2004). No entanto, a expressão de CD38 nas células leucêmicas pode mudar durante o curso clínico da doença (DEAGLIO *et al.*, 2006; CHEVALLIER *et al.*, 2002).

Em relação à positividade de CD38, não se tem um consenso, tendo sido propostos os seguintes pontos de corte: 5%, 7%, 20% e 30%, este último de melhor aceite (MONTERRAT, 2006; FERRARINI; CHIORAZZI, 2004).

- **ZAP-70**

ZAP-70 é uma proteína associada com a cadeia ζ do receptor para antígenos de células T (TCR), expresso de modo seletivo por células T e células *natural killer* (NK). Esta proteína está envolvida na via de transdução de sinal mediante encontro entre o TCR e seus epítomos antigênicos específicos. As células B normais e neoplásicas não expressam ZAP-70 em quantidades significativas, entretanto altos níveis de RNA-m e de proteína ZAP-70 foram encontrados em casos de LLC não-mutados. Assim, clinicamente, casos ZAP-70 positivos têm um pior prognóstico e, em geral, possuem genes IgVH não-mutados e são CD38 positivos (FERRARINI; CHIORAZZI, 2004).

A identificação imuno-histoquímica de ZAP-70 em biópsias de medula óssea, ao diagnóstico, também provou ser uma abordagem metodológica útil na identificação de pacientes com LLC com mau prognóstico, chegando-se a resultados semelhantes aos obtidos com sua identificação por citometria de fluxo (ZANOTTI *et al.*, 2007). Alguns grupos também confirmaram a concordância de técnicas de citometria de fluxo com as de imunocitoquímica e *Western blot* (“cut-off” de 25% de células positivas) (SLACK, 2007). Outros chegaram igualmente à mesma conclusão, porém tomando como 20% o “cut-off” ideal, bem como na maioria dos demais estudos (MONTSERRAT, 2006).

Recentemente foi reportado o papel do ZAP-70 como um marcador substituto para o *status* de mutação do IgVH com o intuito de ajudar na identificação dos pacientes com um curso clínico da doença mais agressivo. Foi sugerido que a expressão de ZAP-70 pode, além de predizer o *status* de mutação de gene IgVH, servir como um fator de prognóstico na LLC, e a sua expressão pode ser estável durante o curso da doença (YAMAMOTO, 2005; HUS *et al.*, 2006).

Ainda, a análise combinada de ZAP-70 e CD38, ou ZAP-70 e o *status* de mutação do IgVH, permitiu a identificação de subgrupos discordantes de pacientes, nos quais a presença de ZAP-70, por si só, seria suficiente para definição de mal prognóstico. Esses resultados sugerem um papel prognóstico superior de ZAP-70 em relação ao CD38 e ao *status* mutacional IgVH (DEL PRINCIPE *et al.*, 2006; IBRAHIM *et al.*, 2001).

Do ponto de vista clínico e molecular, faz-se, portanto, a divisão da LLC em basicamente dois grupos extremos e distintos: um com ausência de mutações na região IgVH e expressão de CD38 e ZAP-70, correspondente ao grupo de pior prognóstico, e outro, com presença de mutação nessa região da imunoglobulina e a não expressão destes dois

marcadores, correspondentes ao grupo de melhor prognóstico, maior sobrevida e resposta mais favorável ao tratamento (FERRARINI; CHIORIZZI, 2004).

Embora os resultados quanto à positividade desses marcadores sejam talvez superestimados por pesquisas em centros secundários e terciários, onde são tidas como em torno de 50% dos casos, estudos realizados em centros primários levam a uma incidência um pouco mais baixa, em torno de 30-40% para este grupo de pior prognóstico (FERRARINI; CHIORIZZI, 2004).

Há, entretanto, uma discordância relativa em alguns casos de LLC quanto à associação dos marcadores acima e a evolução de determinados pacientes, o que leva à necessidade atual de pesquisas sobre novos marcadores e estudo de suas prováveis relações na definição de um sistema de escore prognóstico mais preciso (FERRARINI; CHIORIZZI, 2004).

- **β_2 -microglobulina (β_2 -M)**

A β_2 -microglobulina é uma proteína extracelular não covalentemente associada à cadeia α do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe I, detectável no soro. Apesar das críticas de alguns pesquisadores (VASCONCELOS, 2005; VINCENT *et al.*, 1985), a medição da concentração de β_2 -M parece manter um valor prognóstico independente e é associada a eventos adversos observados em pacientes com baixa sobrevida (FILIPPIN; SOUZA, 2005; MAVRIDIS *et al.*, 1998).

Outros trabalhos mostram que a β_2 -M apresenta uma correlação positiva com os estágios clínicos e tem sido considerada um forte marcador prognóstico em pacientes com LLC (MONTERRAT, 2006; MOLICA, 2005).

- **Lactato desidrogenase (LDH)**

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima constituída de cinco diferentes isoenzimas que catalisam a interconversão de L-lactato a piruvato. A LDH está presente no citoplasma de todos os tecidos humanos e em altas concentrações no coração e músculo

esquelético e em baixas concentrações nos eritrócitos, pâncreas e estômago. A elevação da atividade da LDH é encontrada em várias condições patológicas, como no infarto do miocárdio, câncer e doenças do fígado, sangue ou músculos (MONTILLO *et al.*, 2005).

Pouco se tem publicado acerca da utilização da dosagem da enzima LDH como parâmetro de prognóstico na LLC. Alguns autores demonstraram que o total de atividade da LDH na LLC não foi significativamente diferente do de células B normais (OSCIER *et al.*, 2004), enquanto outros autores propuseram a associação da LDH com β_2 -MG para maior valor prognóstico (MONTILLO *et al.*, 2005).

• Timidina quinase (s-TK)

A timidina quinase é uma enzima que catalisa a conversão de ATP e timidina a ADP e timidina 5'-fosfato. A atividade aumentada da timidina quinase (s-TK) em pacientes com LLC ocorre provavelmente devido ao grande número de células em divisão (MONTILLO *et al.*, 2005). Seus níveis séricos correlacionam-se com a massa tumoral e a atividade proliferativa de células LLC, e podem prever a progressão da doença até mesmo em pacientes em estágio inicial (MONTSERRAT, 2006).

Em estudo recente, foi observado que a s-TK estaria entre os quatro principais parâmetros indicadores de prognóstico (MONTILLO *et al.*, 2005). Atualmente, os estudos têm mostrado que altos níveis de s-TK são associados com estágio clínico avançado, baixa sobrevida independente da progressão e genes IgVH não-mutados em pacientes com LLC. Portanto, foi demonstrada a importância da avaliação da concentração de s-TK, no fornecimento de informações prognósticas valiosas, incluindo resposta à terapia e a condutas clínicas (MATHEWS *et al.*, 2006).

A utilização de alguns marcadores sorológicos está atualmente limitada pela falta de padronização de métodos, por diferentes pontos de corte usados em vários estudos ou pela falta de validação em estudos prospectivos. Uma alternativa atraente é incluir diferentes marcadores sorológicos, que possam contribuir para a avaliação do prognóstico na LLC (MONTILLO *et al.*, 2005; VASCONCELOS, 2005).

Alguns marcadores sorológicos, como β_2 -microglobulina (β_2 -MG), lactato desidrogenase (LDH) e timidina quinase (s-TK), têm sido acessíveis à maioria dos serviços de

onco-hematologia, embora não possam contribuir significativamente para a avaliação de prognóstico na LLC (VASCONCELOS, 2005).

2.2.5 Tratamento

Pelo fato de a LLC continuar sendo uma doença incurável, o tratamento tem por objetivo aliviar os sintomas da doença bem como prolongar a sobrevida dos pacientes. Os cuidados vão desde a observação psicológica dos pacientes, sem medicação específica, até uma variedade de opções terapêuticas: agentes alquilantes orais (clorambucil, ciclofosfamida), análogos de purina (fludarabina, cladribina, pentostatina), poliquimioterapia: CVP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona), CAP (ciclofosfamida, adriplastina, prednisona) ou CHOP (ciclofosfamida, adriplastina, vincristina, prednisona), anticorpos monoclonais (Rituximabe) e até mesmo o transplante de células tronco hematopoéticas (CHIATTONE, 2005).

Alguns estudos mostraram que o tratamento específico não é indicado para pacientes que se encontram nos estágios iniciais da doença, bem como assintomáticos, não ocasionando aumento na sobrevida dos pacientes e, sim, uma toxicidade desnecessária (SCHEINBERG; GOLDE, 1994). Portanto, os pacientes em estágios iniciais são apenas observados periodicamente, sendo o tratamento somente indicado quando houver presença de sintomas relacionados com a doença (sintomas B, redução da *performance status*, complicações de organomegalia, hemólise) ou sinais de alta atividade da LLC (tempo de duplicação de linfócitos menor que seis meses ou rápido crescimento de linfonodos). De modo contrário, os pacientes com doença mais avançada ou, ainda, doença menos avançada porém progressiva, nas quais a expectativa de vida não seja superior a sete anos, devem ser tratados precocemente (YEE; O'BRIEN, 2006).

Quanto à reavaliação periódica dos pacientes sem grandes acometimentos, geralmente é sugerido um período de três a seis meses. Para os pacientes bem orientados quanto ao surgimento de sinais de progressão da doença, o intervalo para acompanhamento pode ser maior que seis meses, e para os pacientes de alto risco, é indicado um intervalo inferior a três meses (SCHEINBERG; GOLDE, 1994).

Quanto ao tratamento farmacológico, o clorambucil pode ser considerado a primeira opção para pacientes com idade muito avançada, devido a sua fácil utilização, baixo custo e menor taxa de complicação. Já para os mais jovens, apresentando sintomas que demandam indução de remissão mais efetiva, há uma maior tendência para o uso de

fludarabina. O tratamento com clorambucil é indicado até que se obtenha o efeito máximo desejável e o intervalo livre de progressão após o seu uso não for superior a seis e doze meses, podendo a mesma droga ser usada para o retratamento. Porém, se a progressão ocorrer durante ou logo após o uso da droga, deve-se mudar o tratamento para outra droga quimioterápica, como a fludarabina (MONTILLO *et al.*, 2005; CHIATTONE, 2005).

A taxa de indução de resposta com o uso do clorambucil fica em torno de 25% a 35%, porém a taxa de resposta completa é observada somente em cerca de 3%, com uma duração de remissão curta (cerca de quatorze meses). O tratamento é bem tolerado, apresentando mielotoxicidade moderada, e a sua associação com a prednisona só é vantajosa quando a LLC vem acompanhada de manifestação auto-imune (CHIATTONE, 2005).

Nos últimos anos, a introdução de análogos de purina levou a um avanço no tratamento de LLC, usados de forma isolada ou combinada com outros agentes. Dentre essa classe de drogas, a que tem sido mais extensivamente utilizada é a fludarabina, que, quando utilizada de forma isolada, em pacientes previamente não tratados, determinou taxa de resposta entre 60% e 70%, resposta completa entre 20% e 30% e uma maior taxa de indução da resposta global e resposta completa que qualquer outro esquema quimioterápico convencional, como clorambucil, CAP ou CHOP, além de uma evidente vantagem quanto à sobrevida livre de progressão (DEAGLIO *et al.*, 2008). Antes de iniciar o tratamento com a fludarabina, preconiza-se fazer o teste de Coombs direto, para descartar a possibilidade de agravamento de hemólise auto-imune, devendo-se antes alcançar a negatificação do teste com o uso de corticóides (CHIATTONE, 2005).

O tratamento com poliquimioterapia não se mostrou vantajoso em relação ao uso de clorambucil isolado. Estudos comparando CVP com clorambucil mostraram taxas de resposta semelhantes. Já quando a quimioterapia contém antraciclina, a taxa de resposta se mostrou maior, porém com aumento também dos efeitos colaterais, sem vantagem na sobrevida dos pacientes (CHIATTONE, 2005).

Recentemente, o uso de anticorpo monoclonal (rituximabe) tem despertado interesse nos pesquisadores de LLC, sendo determinado por dados *in vitro*, indicando um importante sinergismo entre rituximabe e fludarabina (DEAGLIO *et al.*, 2008).

Outra alternativa quanto ao tratamento da LLC são os transplantes de célula progenitora hematopoética (somente indicados em casos muito bem selecionados), tanto em nível de medula como de sangue periférico. A rigor, tanto o transplante autólogo como o alogênico são possíveis, mas em circunstâncias diferentes (SOUZA, 2005).

Em resumo, os critérios de início, bem como os de interrupção e os de reintrodução do tratamento são, de certa forma, vagos, devendo sempre ser individualizados de acordo com o perfil de cada paciente, sendo guiados pelo estágio clínico e pela presença de sintomatologia e de sinais de atividade da doença (HALLEK, 2005).

A seguir, apresentamos um quadro que traz as principais conclusões em relação ao tratamento na LLC - B, segundo CHIATTONE (2005).

Quadro 3 - 2º Encontro Brasileiro de Consenso em LLC

TRATAMENTO DA DOENÇA INICIAL	TRATAMENTO DA DOENÇA AVANÇADA	
Binet (A ou B) sem sintomas RAI (O, I ou II) sem sintomas	Binet (A ou B) com sintomas RAI (O, I ou II) com sintomas	Binet (C) RAI (III-IV)
Idade: qualquer idade	Idade: pacientes < 65 anos, fisicamente ativos, sem comorbidade maior.	Idade: pacientes > 65 anos, com comorbidade maior.
Tratamento inicial: observação	Tratamento inicial: análogo de purina - maior taxa de resposta completa e mais longa sobrevida livre de progressão e livre de tratamento, comparada a agentes alquilantes.	Tratamento inicial: agente alquilante, devido à menor mielotoxicidade e menor efeito imunossupressor comparado aos análogos de purina.
Reavaliação: três a seis meses	Reavaliação: três meses	Reavaliação: menos que três meses

Fonte: Adaptado de CHIATTONE, 2005.

A LLC, no passado, era tida como uma patologia homogênea; no entanto, estudos recentes demonstram que a doença tem comportamento heterogêneo e que apresenta fatores moduladores de grau variado, que são responsáveis pelo prognóstico. Portanto, decidimos, neste trabalho, traçar o perfil clínico e laboratorial dos pacientes com LLC, realizando o estadiamento segundo RAI, correlacionando as variáveis inclusas no estadiamento entre si e entre os marcadores: ZAP-70, CD38, β 2-MG e LDH, ditos atualmente como moduladores da atividade da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Traçar o perfil clínico e laboratorial dos pacientes com LLC atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) - HEMOCE.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil demográfico dos pacientes com LLC;
- Correlacionar o estadiamento dos pacientes com LLC, segundo classificação de RAI, com os marcadores de prognóstico CD38, ZAP-70, β 2-microglobulina e LDH;
- Avaliar a expressão dos marcadores CD38 e ZAP-70 com o tratamento;
- Correlacionar a idade, o estadiamento clínico e o tratamento terapêutico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

Realizamos um estudo transversal prospectivo com 55 pacientes com LLC diagnosticados clinicamente e confirmado por imunofenotipagem, mielograma e/ou biópsia óssea, no período de fevereiro de 2008 a junho de 2009. Participaram do estudo pacientes de ambos os sexos, atendidos regularmente no Ambulatório de Hematologia do HUWC - HEMOCE, aqueles que concordaram com a pesquisa assinando o termo de consentimento e que, no momento, participavam ou não de um algum esquema terapêutico.

4.2 Metodologia

4.2.1 Coleta

Após o esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa e a assinatura do termo de consentimento, os pacientes foram encaminhados ao Laboratório de Hematologia, onde foram colhidas três amostras de sangue venoso (5 mL cada) em tubo contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético). Utilizamos como fonte de dados os prontuários médicos dos pacientes para obtenção de informações sobre identificação, história clínica, avaliação laboratorial e tratamento.

4.2.2 Preparação das amostras

A primeira amostra foi destinada à realização do hemograma, sendo processada no aparelho Cell-Dyn 3.500 do Laboratório de Hematologia do HUWC - HEMOCE, todos com revisão de lâminas fornecendo dados como: contagem de leucócitos, linfócitos totais, hemoglobina, hematócrito e plaquetas.

A segunda amostra teve como propósito a obtenção da expressão dos marcadores CD38 e ZAP-70, sendo analisados no citômetro de fluxo Coulter-Epics XL-MCL equipado com laser de argônio de 488 nm de comprimento de onda do Laboratório de citometria de fluxo do Hemoce.

O painel de anticorpos monoclonais utilizado, com especificidade para leucemia linfocítica crônica foi: CD3, CD5, CD7, CD8, CD10, CD16, CD19, CD20, CD22, CD23, CD56, CD103, Kappa, lambda, FMC7, IGM, ZAP-70 e CD38 (DIEHL; KARNELL; MENCK, 1999).

Para a obtenção das células malignas do sangue periférico fresco, células mononucleares foram separadas mediante centrifugação em gradiente de densidade, utilizando-se a solução de Fycoll Hypaque com densidade específica de 1.077. Em um tubo falcon foram colocados 5,0 mL da solução de Fycoll Hypaque, sobre a qual foram pipetados, vagarosamente, aproximadamente 5,0 mL de sangue total. Após centrifugação por 30 minutos, a 1.500 rpm em temperatura ambiente, as células mononucleares que se localizavam na interface plasma-solução foram retiradas com o uso de pipeta Pasteur e lavadas com aproximadamente 50,0 mL de solução salina tamponada a 1% (PBS 1%) por três vezes. A concentração final foi ajustada para 1×10^6 células /100 μ l de solução (NASCIMENTO *et al.*, 2006; YAMAMOTO, 2005).

Com o objetivo de assegurar que somente as células malignas fossem estudadas, com exclusão dos monócitos e linfócitos contaminantes, o anticorpo monoclonal da linhagem B CD19 foi utilizado em todos os tubos durante o procedimento de incubação das amostras. Aproximadamente 1×10^6 células em suspensão de 100 μ l de RPMI1640 (Gibco) foram incubadas a 4 °C, em ambiente escuro, por 3 minutos, com 5 μ l de cada anticorpo monoclonal em cada tubo. Após o término da incubação, as células foram centrifugadas por 5 minutos, a 5.000 rpm em temperatura ambiente com 2,0 mL de PBS contendo azida 0,1% e ressuspensas em 0,5 mL de PBS 1%. O material foi mantido a 4 °C em ambiente escuro até a leitura no citômetro de fluxo.

A terceira amostra foi utilizada para a dosagem bioquímica de β_2 -microglobulina, sendo processada no Laboratório de Apoio Roberto Picanço (LARP), situado em Fortaleza - Ceará. As amostras colhidas foram congeladas a $-25\text{ }^\circ\text{C}$ até o momento da realização do teste. Foram utilizados $100\ \mu\text{l}$ da amostra, tendo o teste durado cerca de 40 min. O método utilizado foi o imunoenzimático (ELISA) feito em duas etapas no aparelho Minividas, com uma detecção final em fluorescência. A primeira leitura correspondeu ao branco da cuvete antes de o substrato entrar em contato com o cone; a segunda foi efetuada após incubação do substrato com a enzima presente no cone. O cálculo obtido é o resultado da diferença das duas medidas. O valor de referência utilizado para a concentração de β_2 -microglobulina no soro ou plasma foi de 0,8 a 2,2 mg/L.

A dosagem da enzima LDH (lactato desidrogenase) foi obtida dos prontuários dos pacientes participantes do estudo, sendo o valor de referência menor que 200UI (LOPES, 1998).

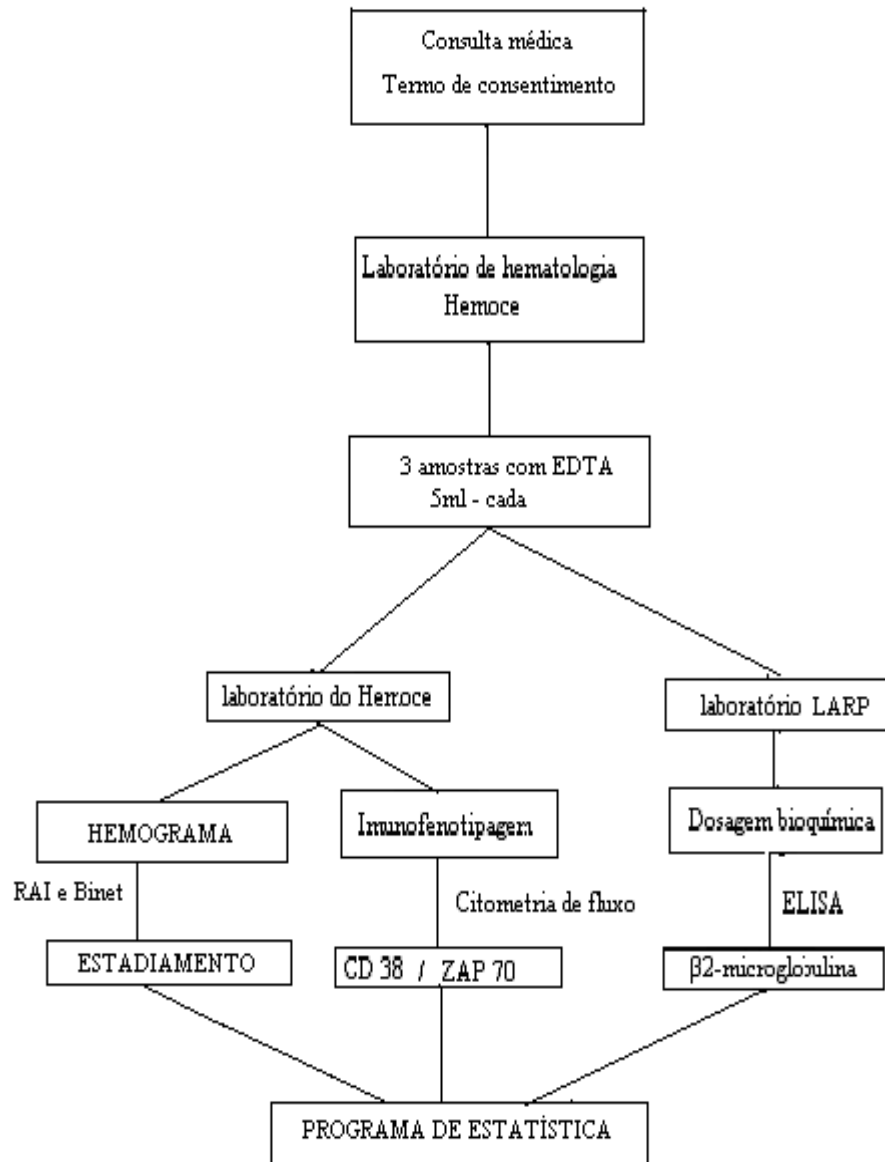
4.2.3 Considerações éticas

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, e aprovado sob o número 010.03.08.

4.2.4 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita mediante a utilização do programa estatístico RGui (2008). O *software* usado para a construção dos gráficos foi o SPSS 15.0. Os testes estatísticos utilizados na análise da associação de variáveis foi o teste da ANOVA. Alternativamente, utilizou-se um teste sob métodos não-paramétricos de Mann-Whitney U. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.2.5 Fluxograma



5 RESULTADOS

Um total de 55 pacientes com diagnóstico de LLC foram selecionados aleatoriamente no Ambulatório de Hematologia do HUWC - HEMOCE, sendo que desse total, 34,5% (14) estavam em tratamento e 74,5% (41) sem tratamento, ao final do estudo.

5.1 Resultados demográficos

Na figura 3, observamos um predomínio do gênero masculino, sendo 58,2% (n = 32) dos pacientes pertencentes ao sexo masculino e 41,8% (n = 23) ao sexo feminino.

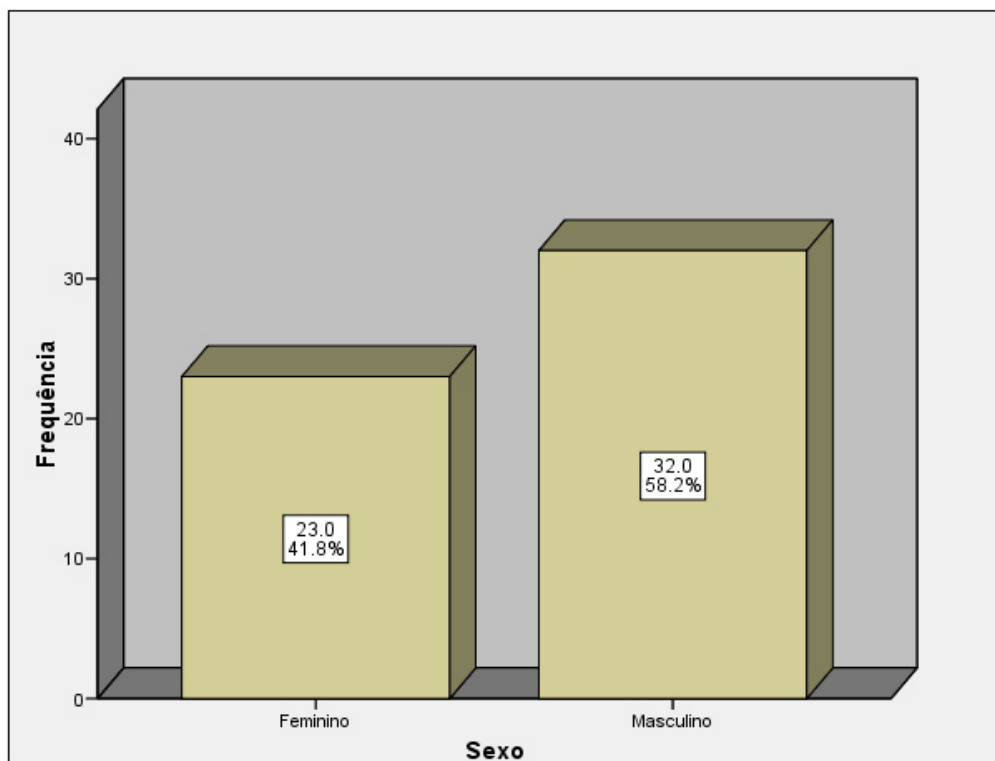


Figura 3 – Distribuição dos pacientes com LLC em relação ao gênero

Na figura 4, podemos verificar uma maior frequência de pacientes com idade acima de 65 anos, ficando os pacientes assim distribuídos segundo a faixa-etária: 40-55 anos -

4% (n = 2), entre 55-65 anos - 11% (n = 10), entre 65-75 anos - 36% (n = 25), entre 75-85 - 34% (n = 15), entre 85-90 anos - 11% (n = 3). A média calculada para a idade foi de 70,96 (\pm 9,345) anos.

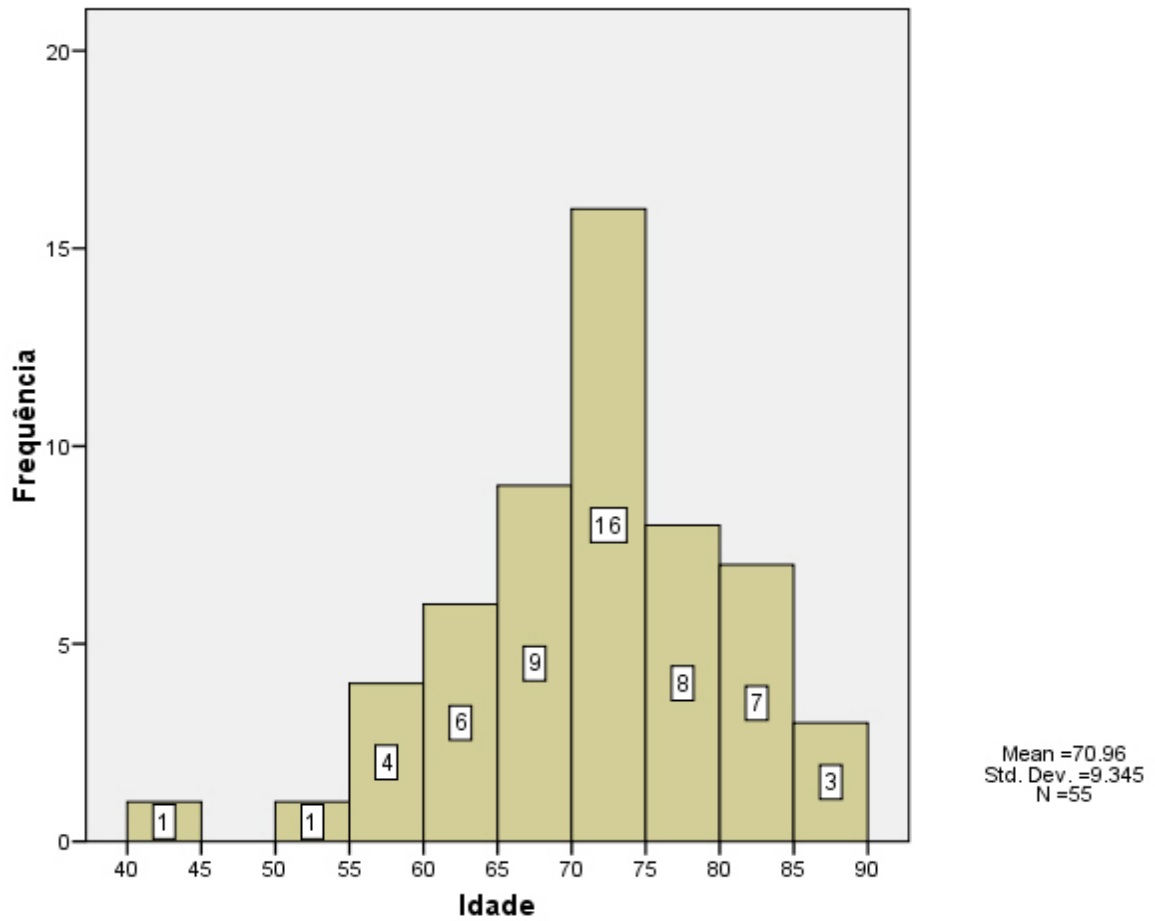


Figura 4 – Distribuição dos pacientes com LLC segundo a faixa etária

A figura 5 mostra a distribuição dos pacientes segundo a procedência, sendo 60% (n = 33) da capital e 40% (n = 22) do interior.

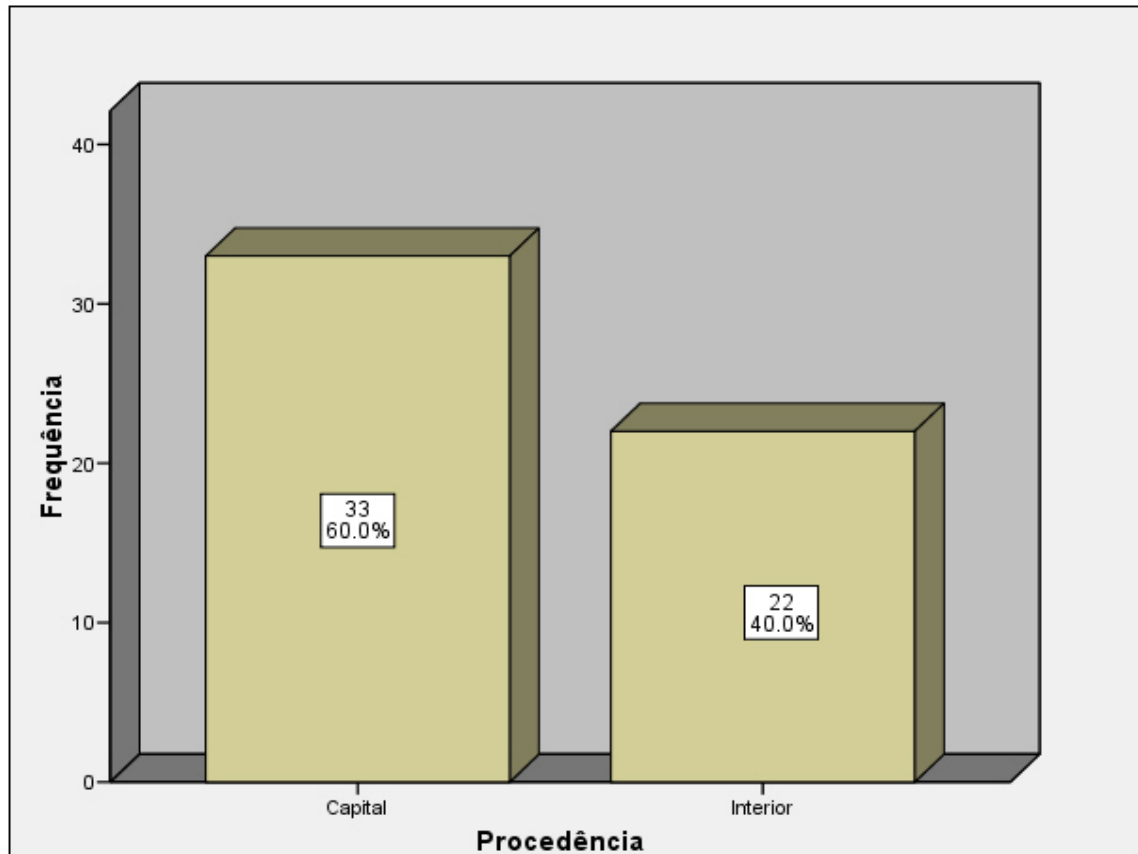


Figura 5 – Distribuição dos pacientes com LLC segundo a origem

5.2 Resultados clínicos

Tomando-se como base os dados clínico-laboratoriais, pôde-se definir o estadiamento para os 55 pacientes deste estudo, seguindo-se os critérios já mencionados para a classificação da LLC, segundo Rai *et al.*, 1975 (Quadro 1).

Podemos observar que a maior parte dos pacientes são classificados como de baixo risco (Rai 0). A figura 6 apresenta os seguintes índices percentuais: Rai 0 - 50,9% (n = 28), Rai I - 18,2% (n = 10), Rai II - 23,6% (n = 13), Rai III - 5,5% (n = 3) e Rai IV - 1,8% (n = 1).

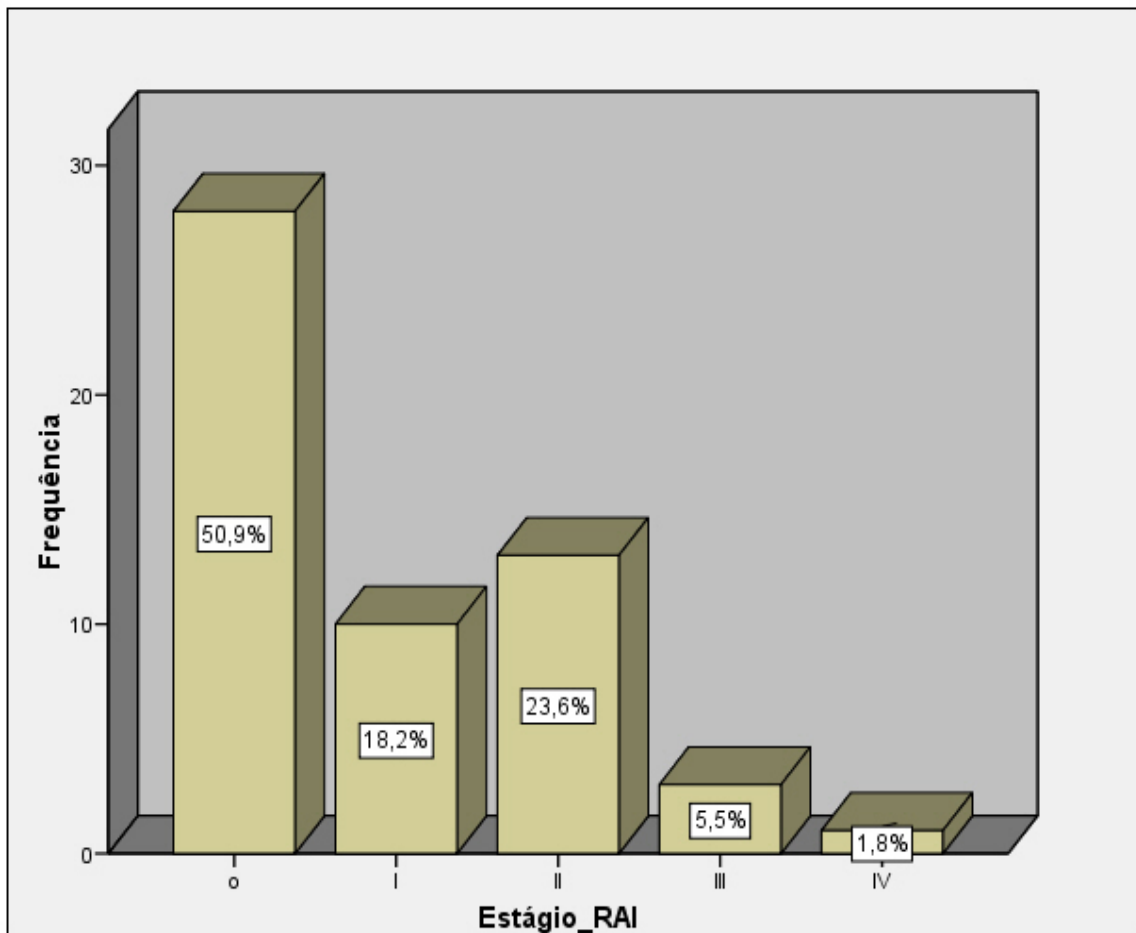


Figura 6 – Classificação dos pacientes com LLC segundo Rai *et al*

Observamos, na figura 7, que mais de 30% dos pacientes não apresentavam sintomatologia, nem no momento do diagnóstico nem ao final do estudo.

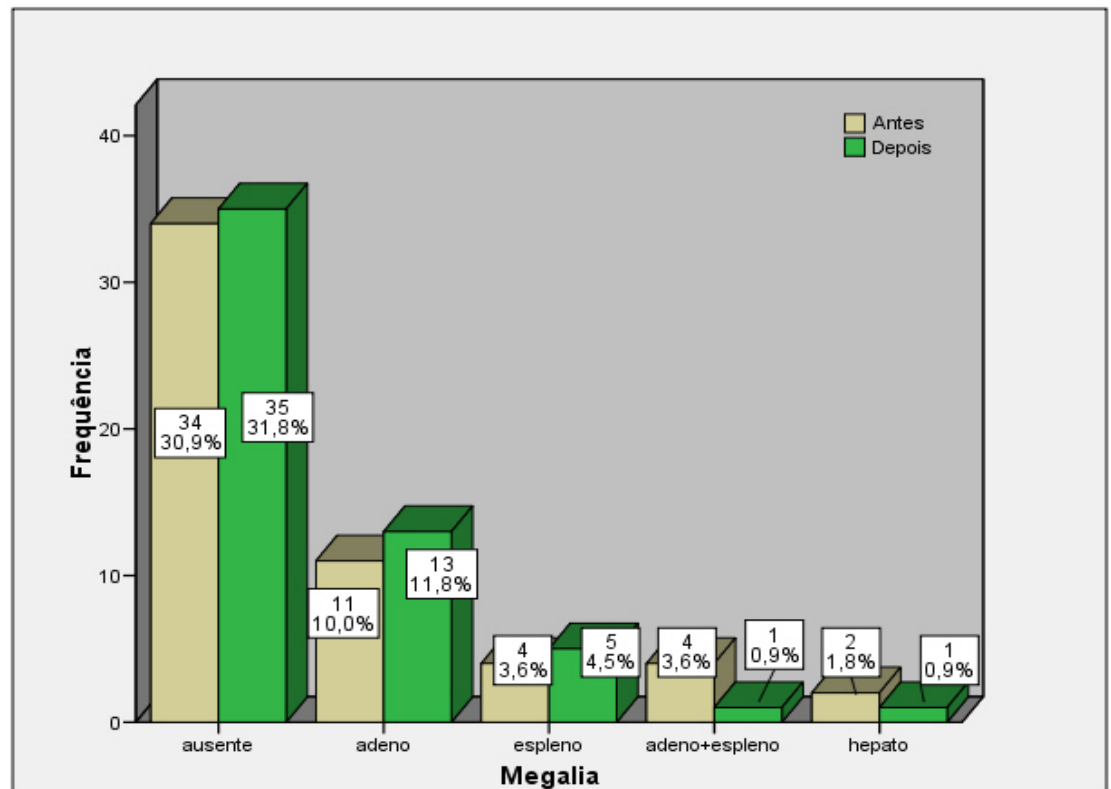


Figura 7 - Relação das organomegalias presentes nos pacientes com LLC ao diagnóstico e ao final do estudo

5.3 Resultados laboratoriais

Como podemos observar na figura 8, um pequeno percentual de pacientes apresentou a expressão do marcador de prognóstico CD38. Os dados foram obtidos de 53 dos 55 pacientes com LLC, sendo 16,4% (n = 9) CD38 positivo e 80,0% (n = 44) CD38 negativo.

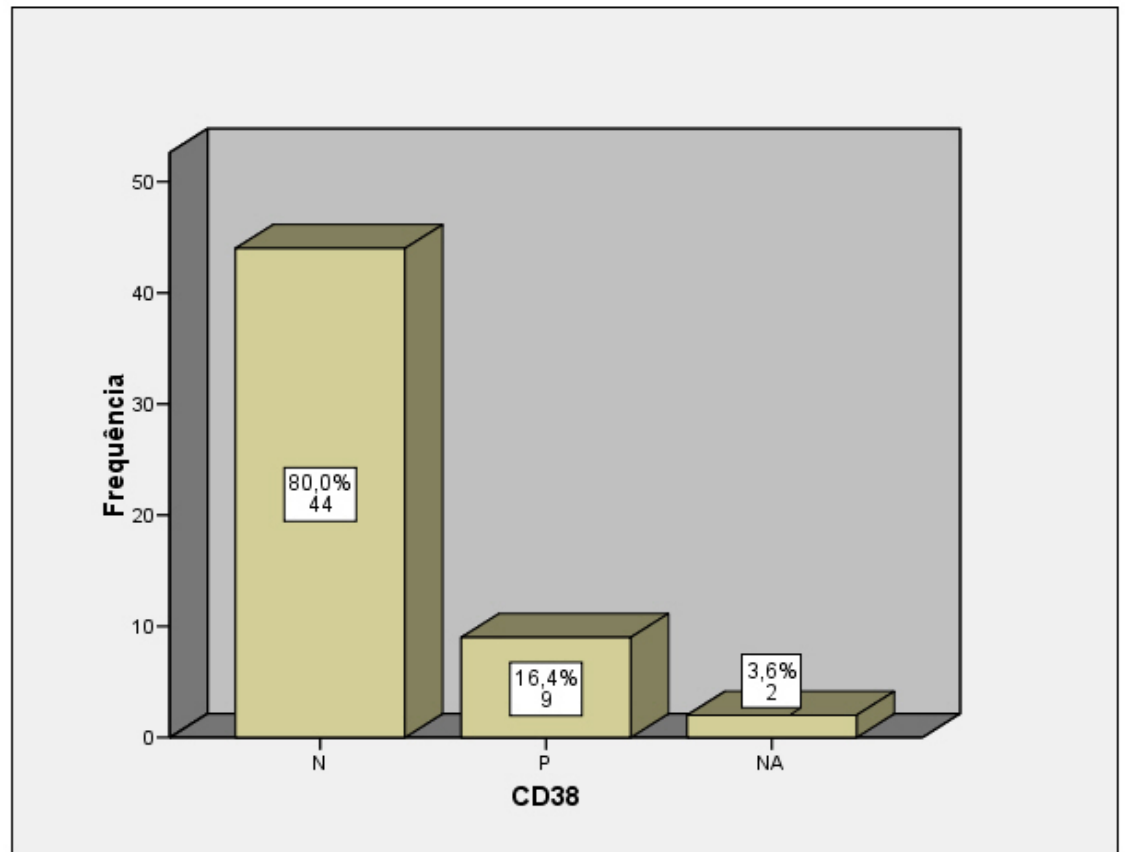


Figura 8 – Perfil de imunofenotipagem dos pacientes com LLC quanto ao marcador CD38

Nota: N= pacientes CD38 negativo, P= pacientes CD38 positivo, Na= pacientes não analisados.

A figura 9 mostra que a positividade para o marcador ZAP-70, realizado em 49 dos 55 pacientes com LLC, foi expressa em um pequeno número de pacientes, com 16,4% (n = 9) de pacientes ZAP-70 positivo e 72,2% (n = 40) ZAP-70 negativo.

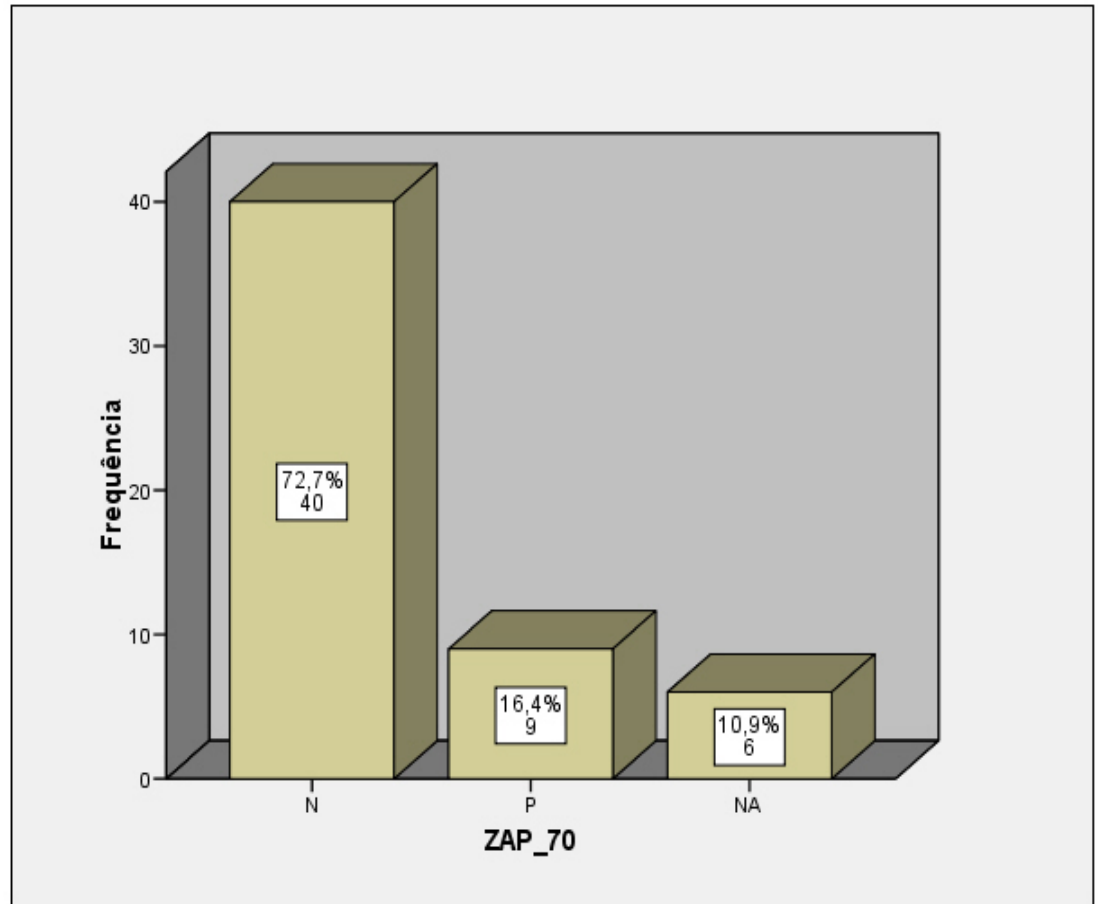


Figura 9 – Perfil de imunofenotipagem dos pacientes com LLC quanto ao marcador ZAP-70

Nota: N= pacientes ZAP-70 negativo, P= pacientes ZAP-70 positivo, Na= pacientes não analisados.

5.4 Resultados terapêuticos

Na figura 10 verificamos a relação dos tratamentos dos pacientes com LLC em dois momentos, ao diagnóstico e ao final do estudo.

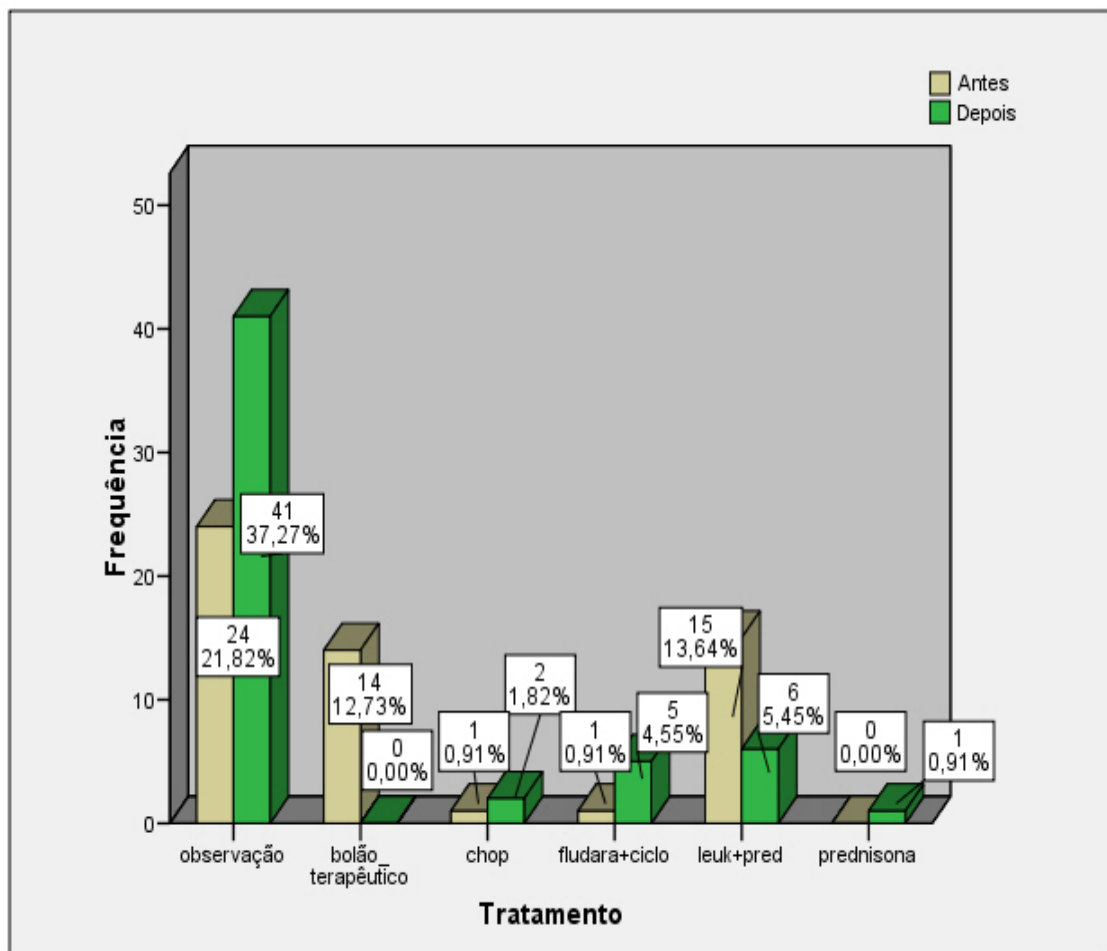


Figura 10 – Relação do tratamento dos pacientes com LLC ao diagnóstico e no acompanhamento

5.5 Resultados estatísticos

A tabela 1 mostra as comparações entre os marcadores (CD38 e ZAP-70) em que um grande percentual de pacientes, nos grupos tratados e não tratados, não expressava os marcadores em suas células.

Tabela 1 - Percentagem de pacientes ZAP 70 positivo versus ZAP70 negativo e CD38 positivo versus CD38 negativo para pacientes tratados e não tratados

Grupo de Pacientes	ZAP 70		CD38	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
<i>Com Tratamento</i>	2 (22,2%)	13 (77,7%)	4 (24,1%)	12 (75,8%)
<i>Sem Tratamento</i>	7 (13,63)	27 (86,3%)	5 (8,3%)	32 (91,6%)
Total	9 (18,3%)	40 (81,6%)	9 (16,9%)	44 (83,0%)

Na tabela 2 podemos observar que a expressão do ZAP-70 e do CD38 foi mais freqüente em pacientes com idade ≥ 65 anos e em tratamento.

Tabela 2 - Relação dos tratamentos através da idade e do marcador ZAP- 70 e CD38

Tratamento	Idade							
	< 65 anos		≥ 65 anos		< 65 anos		≥ 65 anos	
	ZAP 70		ZAP 70		CD38		CD38	
	N	P	N	P	N	P	N	P
<i>Bolão terapêutico</i>	2	0	6	4	2	0	8	3
<i>CHOP</i>	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>Fludara+ciclo</i>	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Leuk+pred</i>	2	1	10	1	2	1	8	3
<i>Observação</i>	3	0	16	3	3	1	19	1
Total	8	1	32	8	8	2	36	7

Dos três pacientes com co-expressão de ZAP-70 e do CD38, somente um estava em tratamento, sendo 2 do estadio II e um do estadio Rai 0 (Tabela 3).

Tabela 3 - Relação do tratamento nos grupos ZAP-70-/CD38- e ZAP-70+/CD38+

Tratamento	ZAP-70 vs CD38	
	ZAP-70-/CD38-	ZAP-70+/CD38+
<i>Bolão terapêutico</i>	7	2 (0 e II)*
<i>CHOP</i>	1	0
<i>Fludara+ciclo</i>	0	0
<i>Leuk+pred</i>	9	1 (II)*
<i>Observação</i>	17	0
Total	34	3

Nota: * Estadiamento segundo RAI.

Na tabela 4 podemos observar a relação dos tratamentos com a idade e com o estágio de RAI, onde verificamos que a maioria dos pacientes em estudo apresenta idade ≥ 65 anos, estadio 0 de Rai e sem tratamento.

Tabela 4 - Relações dos tratamentos através da idade e do Estágio RAI

Tratamento	Estágio RAI					
	0		I ou II		III ou IV	
	Idade		Idade		Idade	
	< 65 anos	≥ 65 anos	< 65 anos	≥ 65 anos	< 65 anos	≥ 65 anos
<i>Bolão terapêutico</i>	0	6	3	5	0	0
<i>Cop</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Fludara+ciclo</i>	0	1	0	0	0	0
<i>Leuk+pred</i>	2	4	2	6	0	1
<i>Observação</i>	2	15	1	4	1	1
Total	4	26	6	15	2	2

As tabelas 5 e 6 mostram a comparação feita entre os marcadores (CD38 e ZAP-70) com algumas variáveis hematológicas. Foi utilizado o teste da ANOVA para verificar se houve diferença média nos níveis com respeito ao resultado de cada marcador, feita a transformação de variável quando necessário para satisfazer as suposições do teste. Alternativamente, utilizou-se também um procedimento sob métodos não-paramétricos, o teste de Mann-Whitney U. Esses procedimentos não-paramétricos não são tão eficientes quando o tamanho da amostra é razoavelmente pequeno, podendo-se notar que o método da ANOVA se mostrou mais sensível. Um valor p abaixo de 0,05 indica que a média da variável para CD38 positivo é estatisticamente diferente para CD38 negativo para qualquer nível de significância superior ao valor p obtido. O mesmo acontece para o marcador ZAP-70 (positivo e negativo).

Na comparação do marcador CD38 (tabela 5), se adotarmos um nível de significância de 0,10, teríamos os níveis médios de Hb e Ht estatisticamente diferentes com respeito aos valores do marcador CD38.

Tabela 5 - Comparação entre CD38 positivo e CD38 negativo através das variáveis

Variável	CD38								Comparação			
	Positivo				Negativo				Valor p (ANOVA)		Valor p (Mann-WhitneyU)	
	Diagnóstico		Acompanhamento		Diagnóstico		Acompanhamento					
	Média	Desv.Pad.	Média	Desv.Pad.	Média	Desv.Pad.	Média	Desv.Pad.	Antes	Depois	Antes	Depois
Ht (%)	35,46	4,71	32	7,84	37,27	5,7	36,53	7,66	0,378	0,097	0,316	0,148
Hb(g/dL)	11,84	1,91	10,51	2,83	12,33	2,02	12,12	2,59	0,505	0,099	0,563	0,145
LEU(10 ³ /mm ³)	48,30	31,76	69,88	88,61	78,46	90,08	54,25	41,9	0,304	0,546	0,37	0,647
Pla(10 ³ /mm ³)	210,9	98,31	159,96	106,89	220,66	131,36	169,18	73,56	0,802	0,627	0,571	0,579
LDH (U/L)	483,00	265,18	-	-	441,75	189,67	-	-	0,950	-	0,662	-
Linf(10 ³ /mm ³)	84,88	9,27	-	-	81,29	14,36	-	-	0,639	-	0,722	-
B2micro(U/L)	-	-	3,06	1,37	-	-	3,17	0,95	*	-	-	0,821

Nota: Pla=plaqueta, LEU=leucócitos, Linf=linfócitos, B2 micro= B2 microglobulina

Nota: * Não foi possível obter valor p, violação da suposição de normalidade.

Na tabela 6, apenas o nível de Ht apresenta diferença média significativa para ZAP-70 positivo e ZAP-70 negativo ao nível de 0,061. Para as demais variáveis, não rejeitamos a hipótese de que exista diferença média, pois para pequenas diferenças médias o teste não tem tanto poder, e neste caso seria necessário aumentar o tamanho amostral para diminuir o erro do tipo II, e conseqüentemente aumentar a probabilidade de se detectar uma diferença de pelo menos entre as duas médias. No caso em estudo, temos apenas 9 repetições para valores positivos para ambos os marcadores, o que é considerado razoavelmente baixo, devido a uma considerável dispersão e a uma ligeira diferença entre as médias.

Tabela 6 - Comparação entre ZAP-70 positivo e ZAP-70 negativo através das variáveis

Variável	ZAP 70								Comparação			
	Positivo				Negativo				Valor p (ANOVA)		Valor p (Mann-WhitneyU)	
	Diagnóstico		Acompanhamento		Diagnóstico		Acompanhamento					
	Média	Desv.Pad.	Média	Desv.Pad.	Média	Desv.Pad.	Média	Desv.Pad.	Antes	Depois	Antes	Depois
Ht (%)	35,46	3,65	30,76	10,41	37,27	6,07	36,56	7,10	0,545	0,061	0,554	0,137
Hb(g/dL)	11,79	1,35	11,25	2,19	12,27	2,18	11,89	2,89	0,53	0,537	0,606	0,456
LEU (10 ³ /mm ³)	56,68	30,54	78,51	79,78	78,91	94,42	50,48	41,74	0,922	0,491	0,833	0,299
Plaqueta(10 ³ /mm ³)	207,55	99,85	175,53	96,4	210,5	132,14	161,73	74,28	0,939	0,695	0,834	0,914
LDH (U/L)	515,88	246,47	-	-	433,37	200,45	-	-	0,233	-	0,263	-
Linf (10 ³ /mm ³)	87,11	6,90	-	-	80,55	14,96	-	-	0,293	-	0,361	-
B2 micro (U/L)	-	-	2,96	1,41	-	-	3,12	0,95	*	-	-	0,878

Nota: Pla=plaqueta, LEU=leucócitos, Linf=linfócitos, B2 micro= B2 microglobulina

Nota: * Não foi possível obter valor p, violação da suposição de normalidade.

Nas tabelas 7, 8 e 9 podemos observar os valores de algumas variáveis segundo o teste-T pareado para cada nível do estágio de RAI, com o objetivo de verificar o aumento ou a diminuição do valor médio das variáveis no momento do diagnóstico e ao final do estudo. Esse teste junto com o teste da ANOVA pode concluir que para algumas variáveis (no diagnóstico e ao final do estudo) os valores têm uma tendência a se tornarem em média iguais a quem tinha o estágio RAI 0, exceto para as plaquetas.

Como pode ser visto na variável Ht, quem era classificado no nível III ou IV tinha estatisticamente valor do Ht médio diferente do nível I ou II, já no final do estudo (depois) tinha seu nível médio de Ht estatisticamente igual a quem era classificado como estágio RAI 0 Ht médio de 29,7 aumentou para 35,55.

Para o leucócito, que tinha valor médio no estágio RAI III ou IV diferente estatisticamente do estágio I ou II, passou a ter o mesmo valor médio de quem era classificado no estágio RAI 0. Isso é, antes, seu valor médio era de 230,72 ($10^3/\text{mm}^3$), estatisticamente diferente de quem era do estágio RAI I ou II com o valor de 56,34 ($10^3/\text{mm}^3$), ao final do estudo (depois), seu valor médio passou a ser 48,77 ($10^3/\text{mm}^3$), estatisticamente igual a quem era do estágio RAI 0. Já para as plaquetas, houve uma redução significativa de quem era do nível I ou II e também para quem era do nível 0, mas apenas os que eram do I ou II com valor de 185,91 ($10^3/\text{mm}^3$), passaram a ter o mesmo valor médio dos eram do III ou IV com valor de 110,00 ($10^3/\text{mm}^3$).

Tabela 7 - Teste-T pareado para estadiamento segundo RAI

Variável Antes x Depois		Estágio RAI		
		Nível 0	Nível I ou II	Nível III ou IV
Ht (%)	<i>Variação média</i>	-0,54	-3,09	5,85
	<i>Valor p</i>	0.707	0.067	0.045*
Hb (g/dL)	<i>Variação média</i>	0,12	-0,97	-0,85
	<i>Valor p</i>	0.722	0.093	0.703
LEU ($10^3/\text{mm}^3$)	<i>Variação média</i>	-14,40	16,05	-181,95
	<i>Valor p</i>	0.255	0.256	0.224
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	<i>Variação média</i>	-42,75	-49,91	-18,57
	<i>Valor p</i>	0.044*	0*	0.465

Nota: * Valor p significante (< 0,05).

Tabela 8 - Comparações entre os níveis do estágio RAI através das variáveis (diagnóstico), Teste Tukey

Variável (Antes)		Estágio RAI		
		Nível 0	Nível I ou II	Nível III ou IV
Ht (%)	<i>Comparação</i>	B	B	A
	<i>Média</i>	37,51	36,93	29,70
	<i>Desv. Padrão</i>	6,33	3,49	4,71
Hb (g/dL)	<i>Comparação</i>	B	B	A
	<i>Média</i>	12,43	12,17	10,15
	<i>Desv. Padrão</i>	2,30	1,40	1,45
LEU ($10^3/\text{mm}^3$)	<i>Comparação</i>	A	A	B
	<i>Média</i>	62,34	56,33	230,72
	<i>Desv. Padrão</i>	64,79	35,43	191,37
Plaqueta ($10^3/\text{mm}^3$)	<i>Comparação</i>	B	B	A
	<i>Média</i>	237,20	185,91	129,20
	<i>Desv. Padrão</i>	147,01	84,31	37,55

Nota: Letras diferentes indicam que as médias são estatisticamente diferentes ao nível de 0,05, em que A<B<C.

Tabela 9 - Comparações entre os níveis do estágio RAI através das variáveis (final do estudo), Teste Tukey

Variável (Depois)		Estágio RAI		
		Nível 0	Nível I ou II	Nível III ou IV
Ht (%)	<i>Comparação</i>	A	A	A
	<i>Média</i>	36,97	33,83	35,55
	<i>Desv. Padrão</i>	8,54	6,70	4,56
Hb (g/dL)	<i>Comparação</i>	B	B	A
	<i>Média</i>	12,55	11,20	9,30
	<i>Desv. Padrão</i>	2,35	2,39	4,19
LEU ($10^3/\text{mm}^3$)	<i>Comparação</i>	A	B	A
	<i>Média</i>	47,93	72,38	48,77
	<i>Desv. Padrão</i>	35,17	65,95	66,03
Plaqueta ($10^3/\text{mm}^3$)	<i>Comparação</i>	B	A	A
	<i>Média</i>	194,45	136,00	110,62
	<i>Desv. Padrão</i>	76,35	71,01	39,70

Nota: Letras diferentes indicam que as médias são estatisticamente diferentes ao nível de 0,05, em que A<B<C.

Os Boxplot's das figuras 11 e 12 mostram que os níveis de Hb, em relação aos dois marcadores (CD38 e ZAP-70), são bem parecidos quanto ao parâmetro de localização (média), tanto para o grupo positivo quanto para o negativo. Para o parâmetro Ht, quanto ao grupo dos marcadores positivos, observa-se uma razoável redução nos níveis de dosagens no

momento do diagnóstico bem como no acompanhamento dos pacientes, o que não ocorre para o grupo dos marcadores negativos. Para as contagens de plaquetas, nota-se uma redução nos níveis durante os dois momentos; além disso, os níveis de plaquetas parecem possuir um mesmo parâmetro de localização e de dispersão tanto para o grupo negativo quanto para o positivo. Para a contagem global dos leucócitos, pode-se observar uma grande presença de pontos discrepantes, para valores de CD38 negativo e ZAP-70 negativo.

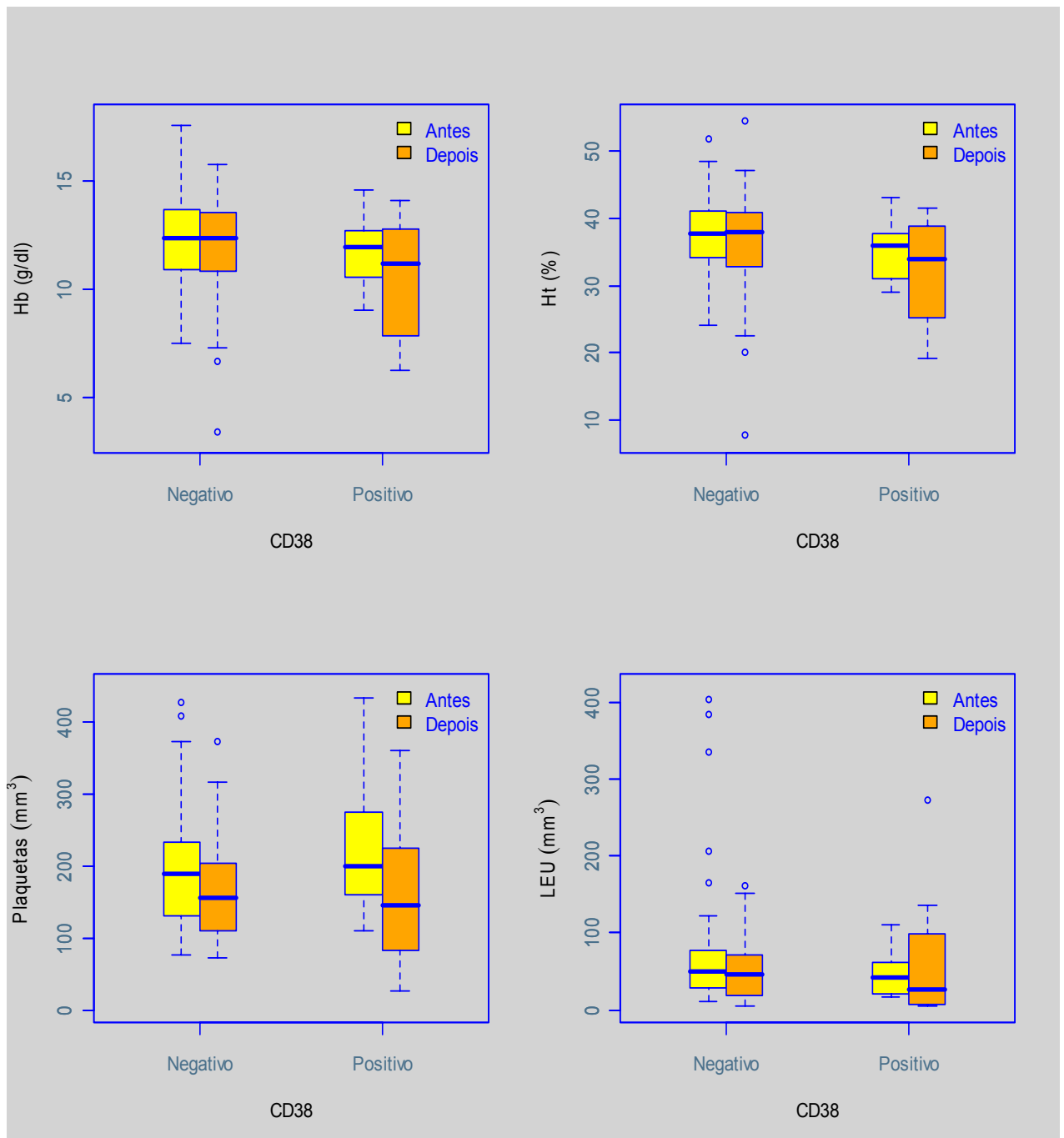


Figura 11 - Boxplot's das variáveis Hb (g/dL), Ht (%), plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$) e LEU ($10^3/\text{mm}^3$) por níveis do marcador CD38.

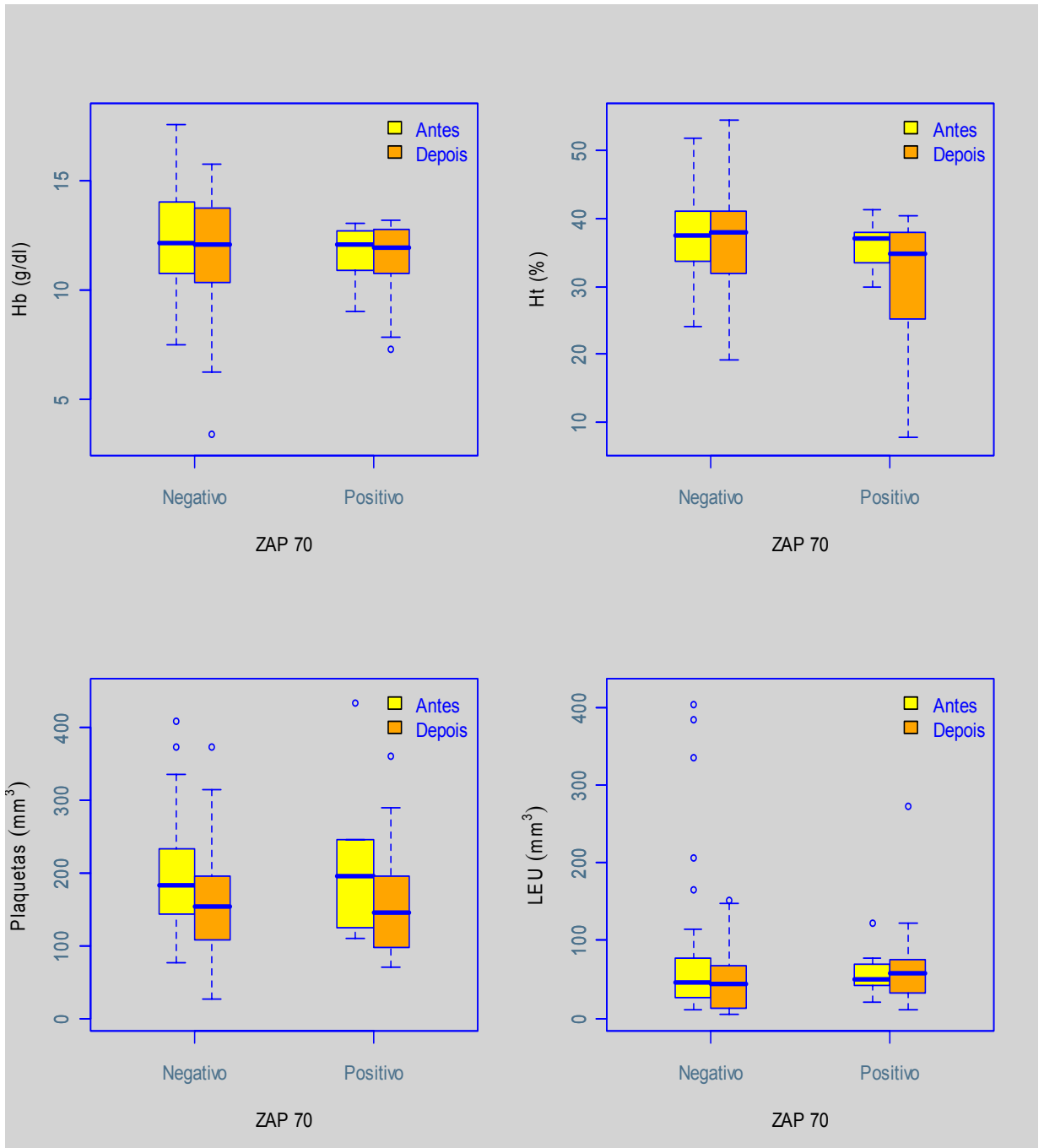


Figura 12 - Boxplot's das variáveis Hb (g/dL), Ht (%), plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$) e LEU ($10^3/\text{mm}^3$) por níveis do marcador ZAP- 70.

No Boxplot's 13 podemos observar, em relação aos valores da LDH com respeito ao ZAP-70 positivo e negativo, que eles são parecidos tanto em relação à medida de posição quanto a de dispersão. O mesmo não ocorre em relação aos valores dos linfócitos, pois nota-se valores bem homogêneos para os pacientes que tiveram o marcador positivo. Observa-se que o comportamento para o marcador CD38 é bem semelhante ao do ZAP-70, em relação aos valores de LDH e linfócitos.

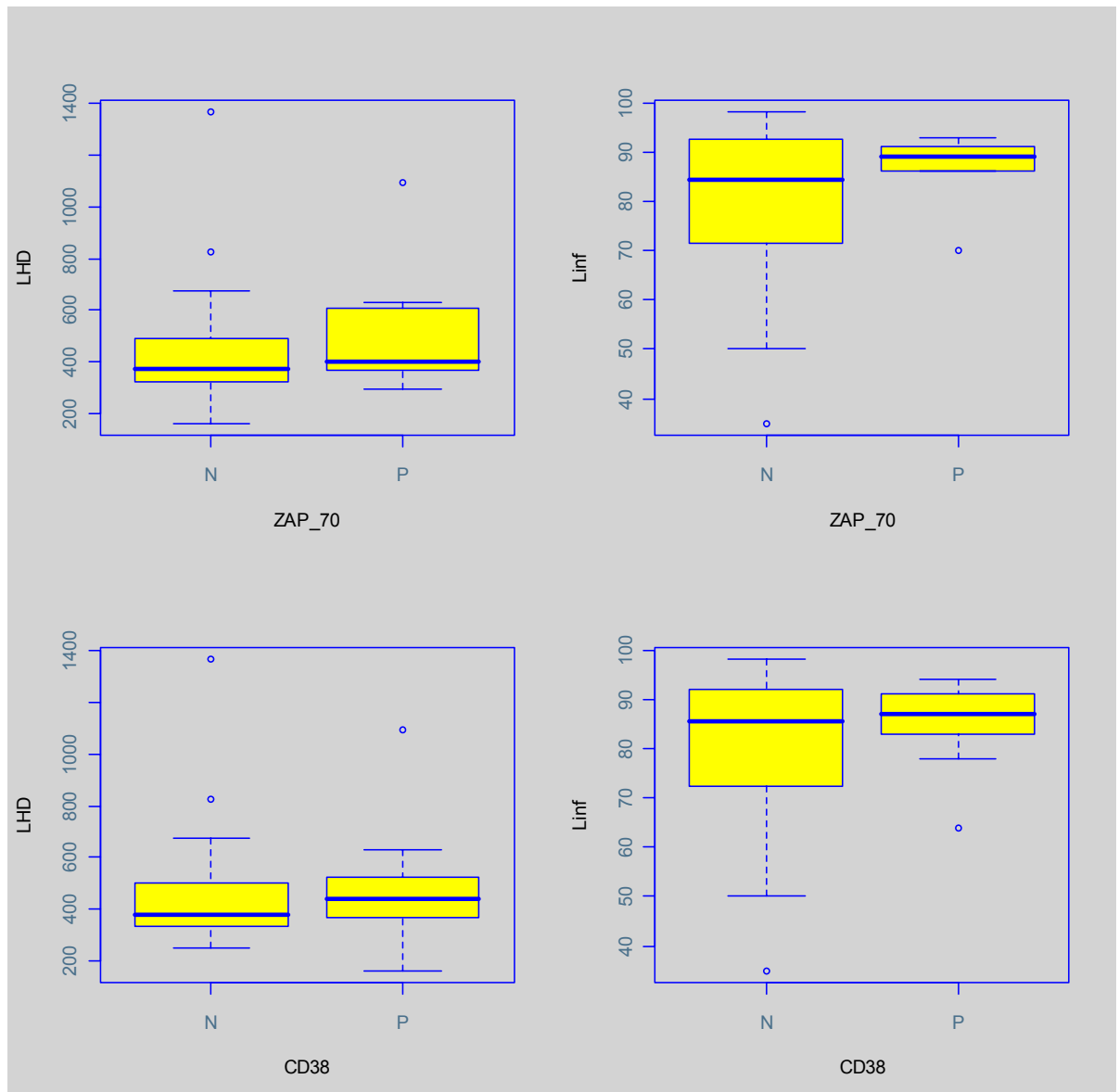


Figura 13 - Boxplot's das variáveis LDH (U/L) e Linf ($10^3/\text{mm}^3$) por níveis dos marcadores ZAP- 70 e CD38.

No boxplot's 14, verifica-se uma tendência de decaimento nos valores da Hb, tanto ao diagnóstico quanto ao final do estudo, para o grupo que apresentou positividade para os dois marcadores (ZAP-70+/CD38+), o que não se observa no grupo sem expressão para os marcadores (ZAP-70-/CD38), além disso, os valores da Hb para o grupo positivo são inferiores em relação ao grupo negativo. Para as plaquetas, nota-se que para todos os cruzamentos ocorrem uma redução de seus valores (em relação aos dois momentos), principalmente no caso em que ambos os marcadores são positivos. Observa-se que esse comportamento é bem parecido para os níveis de Ht, sendo que para o cruzamento dos

marcadores negativos não se percebe esse decaimento. Já em relação aos leucócitos, o grupo com positividade para os dois marcadores mostrou um expressivo aumento no nível de leucócitos, ao final do estudo.

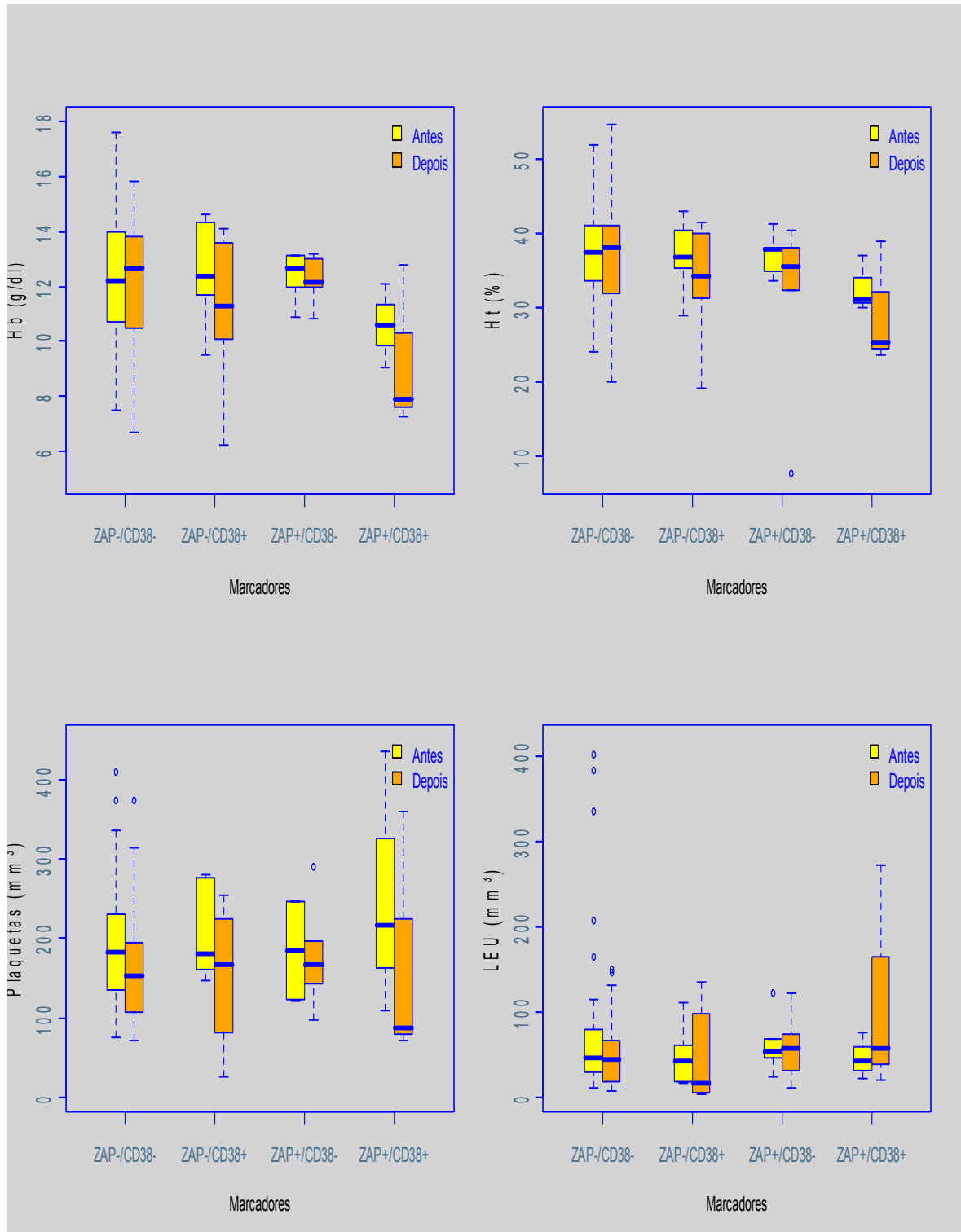


Figura 14 - Boxplot's das variáveis Hb (g/dL), Ht (%), plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$) e LEU ($10^3/\text{mm}^3$) para cada cruzamento dos marcadores ZAP-70 e CD38.

No boxplot's 15, observa-se que os níveis de LDH para o grupo que apresentou positividade para os dois marcadores, são razoavelmente superiores em relação ao grupo com negatividade para os marcadores. E para os grupos em que os marcadores se alternam em positivo e negativo não se percebe uma diferença média. Já para os linfócitos, não se nota claramente nenhuma diferença da medida de posição para os cruzamentos dos marcadores, apenas que para o grupo de marcadores positivos, os valores tendem a se tornar mais homogêneos, ou seja, não apresentam a grande variabilidade que ocorre no grupo de marcadores negativos.

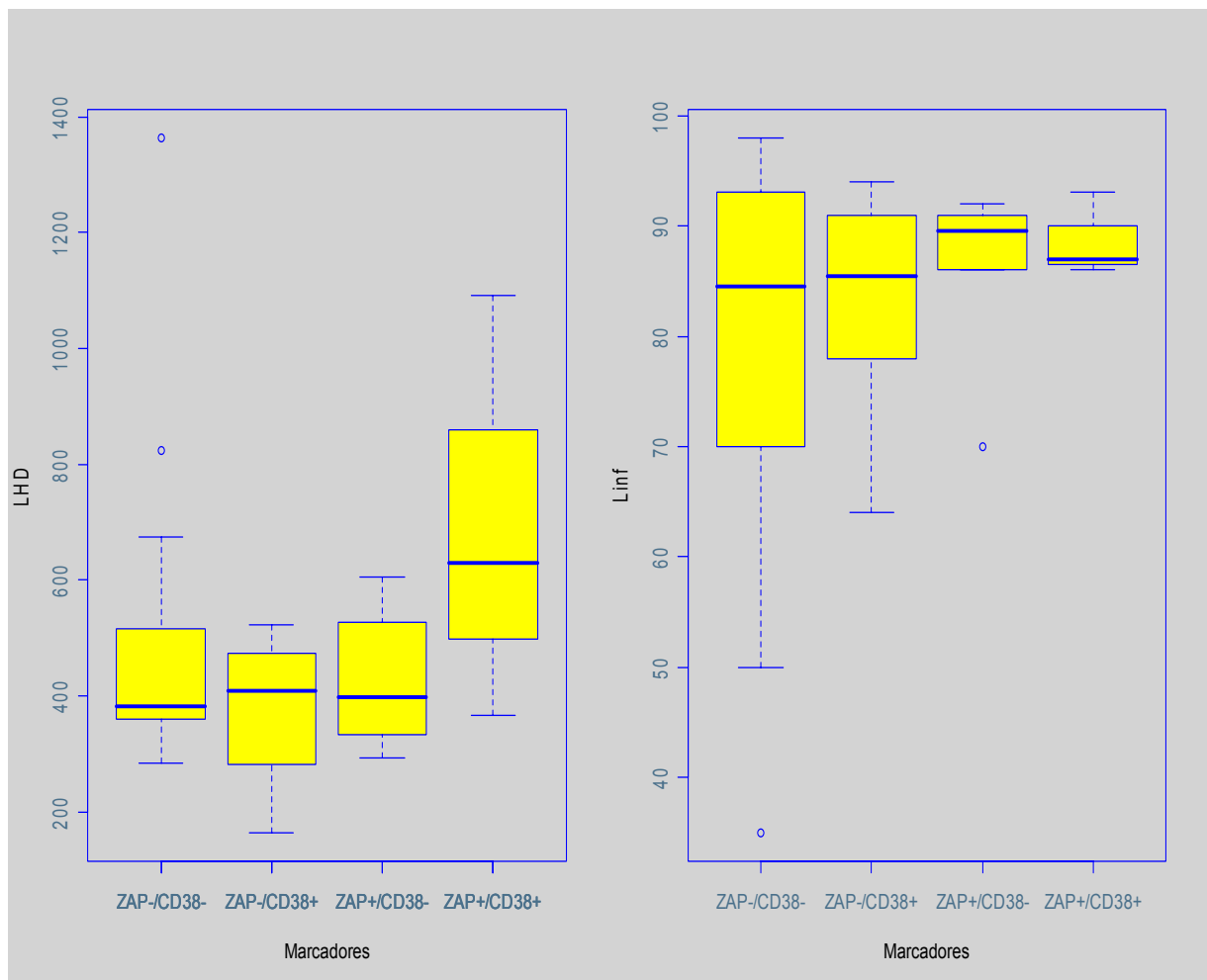


Figura 15 - Boxplot's das variáveis LDH (IU/L) e Linf ($10^3/\text{mm}^3$) para cada cruzamento dos marcadores ZAP- 70 e CD38

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, evidenciamos um predomínio maior do sexo masculino, com 58,2% (n = 32) e 41,8% (n = 23) do sexo feminino, com uma relação de (1,4:1). Os dados encontrados revelaram-se de acordo com a literatura, embora alguns pesquisadores desconsiderem uma diferença significativa na incidência de LLC dentre os sexos, o que varia de região para região, outros relatam um predomínio significativo no sexo masculino (REDAELLI *et al.*, 2004).

Quanto à idade, a grande maioria dos pacientes 78% (n = 43) mostrou-se acima dos 65 anos de idade e a distribuição por faixa etária foi de: 3,6% (n = 2) no intervalo de 40-55 anos, 18,1% (n=10) entre 55 e 65 anos, 36% (n = 25) entre 65-75 anos, 34% (n = 15) entre 75-85 anos e 11% (n = 3) entre 85-90 anos. Os resultados estão de acordo com a literatura (YAMAMOTO, 2005) a qual afirma um aumento de até 20 vezes na incidência para pacientes acima dos 65 anos em comparação à faixa-etária inferior. Quanto à procedência dos pacientes com LLC participantes do estudo, 60% (n = 35) eram provenientes da capital, enquanto 40% (n=15) eram do interior.

Para critério de diagnóstico da LLC não há uma contagem mínima para os linfócitos. No entanto, houve a adição de novos critérios, tais como a avaliação da morfologia dos linfócitos neoplásicos e a presença de células de Gumprecht.. A morfologia típica dos linfócitos na LLC é caracterizada por células de pequeno porte, de aspecto maduro, sem evidência de nucléolo e faixa citoplasmática estreita. Atualmente, a avaliação da medula óssea é considerada um exame complementar dispensável no diagnóstico da LLC e a imunofenotipagem como um exame que define o diagnóstico (YEE; O'BRIEN, 2006).

Os critérios como ao menos um dos marcadores de células B (CD19, CD20 ou CD23), positividade quanto ao CD5 (na ausência de células T), a negatividade para FMC7, CD22 (ou baixa expressão) e CD79b, com baixa densidade de Ig de superfície, expressão monoclonal de cadeia κ ou λ , < 55% ou < 15.000/ μ L de células atípicas (pró-lymphócitos), são necessários para definir o diagnóstico de LLC (YEE; O'BRIEN, 2006; FERRARINI; CHIORAZZI, 2004).

Baseados nos critérios originais propostos por Rai *et al.* (1975), realizou-se o perfil dos pacientes com LLC, quanto ao estadiamento, ao diagnóstico, obtendo-se as seguintes proporções para cada estágio: Rai 0 – 50,9% (n = 28), Rai I – 18,2% (n = 10), Rai II – 23,6% (n = 13), Rai III – 5,5% (n = 3) e Rai IV – 1,8% (n = 1). Segundo Rai *et al.* (1975) o

grupo de pacientes de baixo risco (Rai 0) na LLC corresponde a 31% e a média de sobrevida é maior que 10 anos. Apesar disto, metade desses evolui para um estágio que necessita de tratamento em algum período e 25% vai a óbito por conta da doença. Os pacientes de risco intermediário (Rai I e II) são em torno de 61% e o tempo de sobrevida é de 7-9 anos. Os pacientes de alto risco (Rai III e IV) correspondem a 8% com tempo médio de sobrevida de 5 anos.

Comparando-se com as proporções encontradas por Rai *et al.*, (1975), observa-se, na população do presente estudo, um aumento no percentual de pacientes no grupo de baixo risco (50,9% versus 31%) e uma diminuição na proporção dos grupos de risco intermediário (41,8% versus 61%) e alto risco (7,3% versus 8%). Portanto podemos observar que houve uma diferença a favor dos pacientes de baixo risco no presente estudo, quando comparados aos encontrados por RAI *et al.*, 1975. O aumento no número de pacientes diagnosticados em estágio Rai 0 pode significar, para alguns, medidas e estruturas suficientes para um diagnóstico precoce, enquanto a diminuição no grupo de pacientes de alto risco em relação a outros estudos pode significar realização de exames preventivos, indicando que uma parcela da população esteja procurando atenção médica sem esperar o aparecimento de sintomas, no caso da LLC, presentes geralmente nos estágios intermediários ou avançados.

Quanto à presença de linfonomegalias e organomegalias, 26,3% (29) dos pacientes apresentaram linfadenopatia, enquanto 10,8% (12) apresentaram hepato e/ou esplenomegalia e 4,5% (5) apresentaram esplenomegalia e linfadenopatia, ao diagnóstico. Esses achados estão de acordo com a literatura que relata ao diagnóstico, um quadro clínico caracterizado principalmente por linfonomegalia, seguida de esplenomegalia e hepatomegalia (PANGALIS, 2002).

Em relação à contagem absoluta dos linfócitos ao diagnóstico, podemos observar no presente estudo, as seguintes proporções: 28% (15) entre 10 - 25.000/mm³, 38% (21) entre 25 - 50.000/mm³, 20% (11) entre 50 - 100.000/mm³ e 14% (8) entre 100-300.000/mm³. Segundo DOHNER, 2000, o aumento na contagem de linfócitos está associado a maior atividade da doença. Estudos de HUS *et al.* (2006), demonstraram em 57 pacientes com LLC, não tratados e com expressão de ZAP-70, um valor médio de linfócitos de $80.63 \pm 73.76 \times 10^3/\text{mm}^3$ e em 99 pacientes ZAP-70 negativo, uma contagem de linfócitos de $50.94 + 42.10 \times 10^3/\text{mm}^3$. Portanto, nossos resultados estão semelhantes aos encontrados pelo grupo acima citado, uma vez que a grande maioria dos pacientes em estudo não expressa o marcador ZAP-70. Elevadas contagens de linfócitos são consideradas como fator de mau prognóstico, correlacionando com a sobrevida, sendo de 8,6 anos para contagens de linfócitos em torno de

20.000/mm³ e de 3,7 anos para contagens em torno de 40.000/mm³ (GREER *et al.*, 2003).

Contagens diminuídas de hemoglobina e de plaquetas são consideradas, há décadas, como sinônimo de estágio avançado na LLC, correspondendo aos estágios Rai III e IV, respectivamente, independentemente da presença ou ausência de linfonodomegalia ou hepatoesplenomegalia. O diagnóstico, nos estágios III e IV de Rai, levaria a uma expectativa média de vida de apenas 19 meses, em comparação com o estágio II que é de 71 meses e os estágios 0 e I que apresentam 150 e 101 meses de vida, respectivamente (RAI *et al.*, 1975). Nos estágios mais avançados da doença, os pacientes podem desenvolver trombocitopenia devido à substituição de componentes normais da medula e ao hiperesplenismo, podendo isto ocorrer, entretanto, em qualquer estágio pela produção de anticorpos antiplaquetários (BEUTLER *et al.*, 2000).

No presente estudo, um total de 25,45% (n = 14) dos pacientes se apresentavam anêmicos, com hemoglobina menor que 11,0 g/dL e 3,6% (n = 2) com trombocitopenia, e plaqueta menor que 100.000 /mm³, ao diagnóstico. Segundo dados da literatura, em torno de 15% dos pacientes com LLC apresentam anemia normocítica e normocrômica ao diagnóstico (BEUTLER *et al.*, 2000).

Foram observados em nosso estudo casos discordantes, sendo que nem sempre pacientes com as maiores taxas de linfócitos correspondiam a níveis menores de hemoglobina e vice-versa, embora, na maioria dos casos de leucocitose acima de 100.000/mm³, tenha sido observada anemia com hemoglobina abaixo de 11g/dL, coerente com o esperado segundo o estadiamento clínico (RAI *et al.*, 1975).

Foi realizada a imunofenotipagem nos pacientes com LLC para os marcadores CD38 e ZAP-70, os quais são associados à não-mutação do gene IgVH, de mau prognóstico, mostrando que de 53 pacientes, 17% (n = 9) apresentavam CD38 positivo (mau prognóstico), enquanto 83% (n = 44) apresentavam CD38 negativo (bom prognóstico). Em contrapartida, para o marcador ZAP-70 realizado em 49 pacientes, 18% (n = 9) eram ZAP-70 positivo e 82% (n = 40) eram ZAP-70 negativo.

Embora em vários estudos (DEAGLIO *et al.*, 2007; HUS *et al.*, 2006; MONTILLO *et al.*, 2005) os valores positivos quanto aos marcadores (CD38 e ZAP-70) estejam associados a um perfil de pior prognóstico, o qual incluiria também estágios clínicos mais avançados da LLC, curiosamente, dos 9 pacientes CD38 positivos, um foi classificado como Rai- III, 4 como Rai-II, 2 como Rai-I e 2 como Rai-0, observando-se, portanto, positividade de CD38 tanto no grupo clínico de baixo risco, como no intermediário, como no nível avançado. Ainda, dentre os 53 pacientes, 44 reconhecidos como CD38 negativo os

quais, 56,8% (n = 25) eram de baixo risco clínico, 34,0% (n = 15) de risco intermediário e 9,09% (n = 4) de alto risco, e dentre os 49 pacientes com imunofenotipagem realizada para ZAP-70, dos 9 pacientes ZAP-70 positivos, 55,5% (n = 5) foram classificados dentro do grupo de baixo risco, enquanto 44,4 (n = 4) como de risco intermediário. Para os 40 pacientes ZAP-70 negativos, 57,5% (n = 23) eram do grupo de baixo risco, 32,5% (n = 13) do grupo de risco intermediário e 10% (n = 4) do grupo de alto risco, o que demonstra valores preditivos positivos bastante baixos quando tomados os marcadores CD38 e ZAP-70 ou a classificação clínica de Rai como padrão mais confiável quanto ao melhor prognóstico. Segundo HUS *et al.* (2006), de 156 pacientes, 33,3% (52) expressavam CD38 e 44,2% (23) eram do estágio III e IV, enquanto 66,7% (104) não expressavam CD38 e somente 17,3% (18) eram do estágio III e IV, enquanto 36,5% (57) expressavam ZAP-70 e 49% (28) eram do estágio III e IV e 63,5% (99) não expressavam ZAP-70 e somente 13% (13) eram do estágio III e IV. Resultados esses discordantes com o encontrado em nosso estudo. A maioria dos trabalhos demonstrou que a expressão dos marcadores CD38 e ZAP-70 se correlacionam significativamente com o estágio da doença. A não correlação entre os marcadores de prognóstico (CD38 e ZAP-70) com o estadiamento clínico no presente estudo provavelmente se deva a vários fatores, tais como a pequena amostragem, a metodologia empregada bem como ao tipo de tratamento.

Nesse estudo foi dosada a proteína β 2-microglobulina de 55 pacientes, não havendo significância estatística quando correlacionada aos marcadores CD38 (positivo e negativo) e ZAP-70 (positivo e negativo), nem em relação à enzima LDH. Resultados semelhantes foram obtidos pelos estudos de HUS *et al.* (2006), que observaram a não correlação entre β 2-microglobulina e a expressão de ZAP-70 e do CD38. Porém foi encontrada correlação entre a β 2-microglobulina e a dosagem de hemoglobina, no citado estudo, para os grupos de pacientes (CD38+/ZAP-70+), bem como no grupo (CD38-/ZAP-70-).

Segundo alguns autores (MOLICA, 2005; FILIPPIN; SOUZA, 2005) a dosagem da β 2-microglobulina parece manter valor prognóstico independente sendo associada a eventos adversos. Outros afirmam que há uma correlação positiva com o estadiamento clínico sendo considerada um forte marcador prognóstico em pacientes com LLC (MONTSERRAT, 2006).

Foram coletados dados dos prontuários de 55 pacientes com LLC quanto ao nível da enzima LDH. Não houve diferença estatisticamente significativa em suas médias ou medianas quanto aos diferentes estágios de Rai. Além disso, não houve diferença também entre as médias de LDH e as duas categorias (positivo e negativo) dos marcadores CD38 e

ZAP-70. A enzima lactato-desidrogenase (LDH), embora atualmente de utilidade controversa, quando considerada isoladamente (MONTILLO *et al.*, 2005), tem sido associada a mau prognóstico, quando associada a outros marcadores sorológicos, como a β 2-microglobulina, embora faltem estudos a respeito, inclusive sobre os pontos de corte e metodologias empregadas (OSCIER *et al.*, 2004). Resultados discordantes foram encontrados por HUS *et al.* (2006) que obtiveram correlação entre a LDH e os grupos de pacientes que expressavam os marcadores (CD38+/ZAP-70+), bem como nos pacientes que não expressavam esses marcadores (CD38-/ZAP-70-).

A maioria dos pacientes com expressão para os marcadores (CD38 e ZAP-70) não estavam em tratamento com quimioterápicos. Esse achado está em conformidade com o estudo da correlação do estadiamento com esses marcadores sendo que esse resultado reflete que o estadiamento segundo Rai, na população em estudo, não detectou precocemente os grupos de pacientes de mau prognóstico. No entanto, é importante relatar que a maioria dos estudos refere que com o tratamento a positividade desses marcadores (CD38 e ZAP-70) tende a desaparecer (CHEVALLIER *et al.*, 2002).

Estes resultados, portanto, convergem para a necessidade de estudos em populações mais amplas, nos quais sejam incluídos o estudo citogenético e o estado mutacional de IgVH. Esses novos parâmetros devem ser cuidadosamente avaliados, e o conjunto deve ser tomado como referência no julgamento dos valores prognósticos de cada marcador separadamente ou mesmo da ainda validade das classificações clínicas quanto à maior especificidade dos marcadores tumorais mais recentes.

7 CONCLUSÕES

- Quanto a classificação de Rai, a maior parte dos pacientes foi classificada como sendo de baixo risco (RAI 0).
- Não houve diferença estatisticamente significativa para os marcadores (CD38 e ZAP-70) em relação a dosagem de β 2-microglobulina e a LDH.
- Quanto a avaliação da expressão dos marcadores, a grande maioria dos pacientes, tanto no grupo dos tratados quanto no grupo dos não tratados, não expressava os marcadores (CD38 e ZAP-70).
- Dos pacientes que expressavam os marcadores (CD38 e ZAP-70), somente um estava em tratamento.
- Correlacionando as variáveis: idade, estadiamento clínico e tratamento, concluímos que a maioria dos pacientes eram maiores de 65 anos, foram classificados como sendo do grupo de baixo risco (RAI 0) e eram expectantes, ou seja, estavam em observação.
- Quanto aos pacientes que eram tratados e os que não estavam em tratamento, pode-se notar claramente que no momento do diagnóstico haviam menos pacientes em observação quando comparados ao final do estudo.
- Em relação ao tipo de tratamento farmacológico, houve um aumento no uso de fludarabina+ciclofosfamida e CHOP, em relação ao momento do diagnóstico, enquanto foi observada uma diminuição no uso de leukeran+prednisona, ao final do estudo.

REFERÊNCIAS

BEUTLER, E. *et al.* (Eds.). **Williams Hematology**. 6th. ed. New York: McGraw-Hill Professional, 2000.

BINET, J. L.; LEPORRIER, M.; DIGHIRO, G.; CHARRON, D.; VAUGIER, G.; BERAL, H. M.; NATALI, J. C.; RAPHAEL, M.; NIZET, B.; FOLLEZOU, J. Y. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia. **Cancer**, v. 40, p. 855-864, 1977.

BROUET, J. C. Diagnostic, évolution et complications de la leucémie lymphoïde chronique. In: BROUET, J. C.; LEPORRIER, M. (Org.). **Leucémie lymphoïde chronique**. Paris: John Libbey, 2003. p. 46-53.

CHIATTONE, C. S. Indicações para início de tratamento na leucemia linfocítica crônica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, n. 4, p. 272-275, 2006.

CHIATTONE, C. S. Tratamento de primeira linha da leucemia linfocítica crônica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, n. 4, p. 276-279, 2005.

CHIATTONE, C. S.; FALCÃO, R. P. Leucemia linfocítica crônica : nova visão de uma velha doença (II Encontro Brasileiro de Consenso em LLC). **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, n. 4, p. 227-228, 2005.

DEAGLIO, S.; VAISITTI, T.; AYDIN, S.; FERRERO, E.; MALAVASI, F. In-tandem insight from basic science combined with clinical research: CD38 as both marker and key component of the pathogenetic network underlying chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 108, n. 4, p. 1135-1144, 2006.

DEAGLIO, S.; VAISITTI, T.; AYDIN, S.; BERGUI, L.; D'ARENA, G.; BONELLO, L.; OMEDÉ, P.; SCATOLINI, M.; JAKSIC, O.; CHIORINO, G.; EFREMOV, D.; MALAVASI, F. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. **Blood**, v. 110, n. 12, p. 4012-4021, 2007.

DEAGLIO, S.; AYDIN, S.; VAISITTI, T.; BERGUI, L.; MALAVASI, F. CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target. **Trends Mol. Med.**, v. 14, n. 5, p. 210-218, 2008.

DEL PRINCIPE, M. I.; DEL POETA, G.; BUCCISANO, F.; MAURILLO, L.; VENDITTI, A.; ZUCCHETTO, A.; MARINI, R.; NISCOLA, P.; CONSALVO, M. A. I.; MAZZONE, C.;

OTTAVIANI, L.; PANETTA, P.; BRUNO, A.; BOMBEN, R.; SUPPO, G.; DEGAN, M.; GATTEI, V.; FABRITIIS, P.; CANTONETTI, M.; LO COCO, F.; DEL PRINCIPE, D.; AMADORI, S. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 108, n. 3, p. 853-861, 2006.

DIEHL, L. F.; KARNELL, L. H., MENCK, H. R. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia. **Câncer**, v. 86, n. 2, p. 684-692, 1999.

FERRARINI, M.; CHIORAZZI, N. Recent advances in the molecular biology and immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. **Semin. Hematol.**, v. 41, n. 3, p. 207-223, 2004.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Serum beta-2 microglobulin values among healthy Brazilians using a DPC IMMULITE assay. **Clinics**, v. 60, n. 1, p. 47-50, 2005.

GARICOCHEA, B. Patogênese da leucemia linfocítica crônica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, n. 4, p. 241-246, 2005.

GREER, J. P.; Foerster, J.; Lukens, J. N.; Rodgers, G. M.; Paraskevas, F.; Glader, B. (Eds.). **Wintrobe clinical hematology**. 11. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003.

HALLEK, M. **Chronic lymphocytic leukemia (CLL):** first-line treatment. Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program. 2005. p. 285-291.

HUS, I.; PODHORECKA, M.; BOJARSKA-JUNAK, A.; ROLINSKI, J.; SCHMITT, M.; SIEKLUCKA, M.; WASIK-SZCZEPANEK, E.; DMOSZYNSKA, A. The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Ann. Oncol.**, v. 17, n. 4, p. 683-690, 2006.

IBRAHIM, S.; KEATING, M.; DO, K. A.; O'BRIEN, S.; HUH, Y. O.; JILANI, I.; LERNER, S.; KANTARJIAN, H. M.; ALBITAR, M. CD 38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leucemia. **Blood**, v. 98, n. 1, p. 181-186, 2001.

LAZARCHICK, J. **Chronic lymphocytic leukemia:** thrombocytopenia. Washington: American Society of Hematology Image Bank, 2001.

LOPES, H. J. J. **Enzimas no laboratório clínico** - aplicações diagnósticas. Belo Horizonte: Gold Analisa Diagnóstica, 1998.

MASLAK, P. Chronic lymphocytic leukemia. Washington: American Society of Hematology Image Bank, 2001.

MATHEWS, C.; CATHERWOOD, M. A.; MORRIS, T. C. M.; KETTLE, P. J.; DRAKE, M. B.; GILMORE, W. S.; ALEXANDER, H. D. Serum TK levels in CLL identify binet stage a patients within biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression. **Eur. J. Haematol.**, v. 77, n. 4, p. 309-317, 2006.

MAVRIDIS, A. K. ; TSIARA, S.; MAKIS, A.; CHAIDOS, A.; CHRISTOU, L.; SEFERIADIS, K.; BOURANTAS, K. L. Interleukins, TNF-alpha and beta- 2 M in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 17, n. 4, p. 445-448, 1998.

MOLICA, S.; LEVATO, D.; CASCAVILLA, N.; LEVATO, L.; MUSTO, P. Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and beta2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Eur. J. Haematol.**, v. 62, n. 2, p. 117-122, 1999.

MONTILLO, M.; HAMBLIN, T.; HALLEK, M.; MONTSERRAT, E.; MORRA, E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. **Haematologica**, v. 90, n. 3, p. 391-399, 2005.

MONTSERRAT, E. **New prognostic markers in CLL**. Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program. 2006. p. 289-274.

NASCIMENTO, M. C.; YAMAMOTO, M.; RODRIGUES, M. M.; FRANCO, L. F.; KIMURA, E. Y. S.; VASCONCELOS, Y.; OLIVEIRA, J. S. R.; FIGUEIREDO, V. L. P.; CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Chromosomal Abnormalities (FISH) and their Relation with Clinical Stage, CD38 and ZAP-70. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 1, p. 5-10, 2006.

NOWAKOWSKI, G. S.; HOYER, J. D.; SHANAFELT, T. D.; GEYER, S. M.; LAPLANT, B. R.; CALL, T. G.; JELINEK, D. F.; ZENT, C. S.; KAY, N. E. Using smudge cells on routine blood smears to predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: a universally available prognostic test. **Mayo Clin. Proc.**, v. 82, n. 4, p. 449-453, 2007.

OLIVEIRA, R. A. G.; POLI NETO, A. **Anemias e leucemias: conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais**. São Paulo: Roca, 2004.

OSCIER, D.; FEGAN, C.; HILLMEN, P.; ILLIDGE, T.; JOHNSON, S.; MAGUIRE, P.; MATUTES, E.; MILLIGAN, D.; GUIDELINES WORKING GROUP OF THE UK CLL FORUM. BRITISH COMMITTEE FOR STANDARDS IN HAEMATOLOGY. Guidelines

on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukemia. **Br. J. Haematol.**, v. 125, n. 3, p. 294-317, 2004.

RAI, K. R.; SAWITSKY, A.; CRONKITE, E. P.; CHANANA, A. D.; LEVY, R. N.; PASTERNAK, B. S. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 46, n. 2, p. 219-234, 1975.

REDAELLI, A.; LASKIN, B. L.; STEPHENS, J. M.; BOTTEMAN, M. F.; PASHOS, C. L. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. **Eur. J. Cancer Care**, v. 13, n. 3, p. 279-287, 2004.

SCHEINBERG, D. A.; GOLDE, D. W. As leucemias. In: ISSELBACHER, K. J. *et al.* (Org.). **Harrison Medicina interna**. São Paulo: McGraw-Hill / Interamericana, 1994.

SEILER, T.; DÖHNER, H.; STILGENBAUER, S. Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. **Semin. Oncol.**, v. 33, n. 2, p. 186-194, 2006.

SOUZA, C. A. Estratégias de tratamento da leucemia linfocítica crônica recidivada ou resistente incluindo o transplante de célula progenitora hematopoiética. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, n. 4, p. 283-286, 2005.

VASCONCELOS, Y. Marcadores de prognóstico na Leucemia Linfocítica Crônica. **Rev. Brasil. Hematol. Hemoter.**, v. 27, n. 4, p. 253-256, 2005.

VINCENT, C.; ESTEVE, J.; COOPER, E. H.; DECONNINCK, I.; FORBES, M.; POULIK, M. D.; SABLIN, G.; VOKAK, B. A collaborative study of a preparation of normal human serum for use as a reference in the assay of β_2 microglobulina. **Journal of biological standardization**, v. 13, n. 3, p. 185-197, 1985.

YAMAMOTO, M. ZAP 70: aspectos práticos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, n. 4, p. 236-240, 2005.

YAMAMOTO, M.; FIGUEIREDO, V. L. P. Epidemiologia da leucemia linfocítica crônica e leucemia linfocítica crônica familiar. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, n. 4, p. 229-232, 2005.

YEE, K. W. L.; O'BRIEN, S. M. Chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. Symposium on Oncology Practice: Hematological Malignancies. **Mayo Clin. Proc.**, v. 81, n. 8, p. 1105-1129, 2006.

ZANOTTI, R.; AMBROSETTI, A.; LESTANI, M.; GHIA, P.; PATTARO, C.; REMO, A.; ZANETTI, F.; STELLA, S.; PERBELLINI, O.; PRATO, G.; GUIDA, G.; CALIGARIS-CAPPIO, F.; MENESTRINA, F.; PIZZOLO, G.; CHILOSI, M. ZAP-70 expression, as detected by immunohistochemistry on bone marrow biopsies from early-phase cll patients, is a strong adverse prognostic factor. **Leukemia**, v. 21, n. 1, p. 102-109, 2007.

APÊNDICE A

Protocolo de Preenchimento - Diagnóstico

**Perfil Clínico e Laboratorial dos Pacientes Portadores de Leucemia Linfocítica Crônica
atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio -
HEMOCE**

Identificação

Iniciais: _____
 Prontuário: _____ Contato: _____
 Sexo: _____ Idade: _____ CPF: _____
 Profissão: _____ Estado civil: _____
 Cor: _____ Procedência (capital/interior): _____
 Endereço: _____

História Clínica

Data da Triagem: _____ Data do diagnóstico: _____
 Sintomas: _____

Estadiamento da doença

Estadiamento/início: RAI: O(), I(), II(), III(), IV(). BINET: A(), B(), C()

Avaliação laboratorial

Mielograma

Celularidade: _____
 Série eritróide: _____
 Série mielóide: _____
 Relação miel/erit: _____
 Linfócitos: _____, plasmócitos: _____,
 blastos: _____
 Megacariócitos: _____
 Elementos extra-
 hematopoéticos: _____

Conclusão: _____

Biópsia: _____

Imunofenotipagem

Painéis ou anticorpos monoclonais primários utilizados:

Positivos: _____
 Negativos: _____

Conclusão: _____

Imunologia:

Coombs direto: _____; Coombs indireto: _____; pesquisa de Auto-Anticorpo: _____

Hemograma:

Eritrograma	Leucograma	Plaquetograma
He: ___/ mm ³ ;	Leucócitos: _____/mm ³	Plaquetas: _____/mm ³
Hb: _____/g/dL	MB: _____; PRO: _____; MIE : _____; MET: _____	
Ht: _____ %	BAST: _____; SEG: _____; EO: _____;	
	BAS: _____; LINF : _____ : MON : _____	

Tratamento/protocolos:

Observação <input type="checkbox"/>	Ciclofosfamida 250mg/m ² /dia (D1 a D3) <input type="checkbox"/> Fludarabina 25mg/m ² /dia (D1 a D3) <input type="checkbox"/>
Bolão terapêutico (albendazol 400mg/3 dias + secnidazol 50mg 4cp uma vez/dia no 4° dia <input type="checkbox"/>	CHOP (1° dia-ciclofosfamida 750mg/m ² + adriplastina 50mg/m ² + oncovin 1,5mg/m ² + prednisona 100mg) +(2° ao 5° dia - prednisona 100mg) +(6° ao 21° dia - repouso terapêutico) + (21° dia - hemograma + plaquetas) + 22° dia - recomeçar o ciclo <input type="checkbox"/>
leukeran(8mg/7dias) + prednisona (60mg/7dias) <input type="checkbox"/>	

Protocolo de Preenchimento- Acompanhamento
Perfil Clínico e Laboratorial dos Pacientes Portadores de Leucemia Linfocítica Crônica
atendidos no serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio -
HEMOCE

Identificação

Iniciais: _____ Prontuário: _____ 2ª consulta: ____/____/____

História Clínica

Sinais: _____

Sintomas: _____

Evolução da doença

Estadiamento/atual : RAI : O(), I(), II(), III(), IV(). BINET: A(), B(), C()

Avaliação laboratorial

Perfil bioquímico: β_2 microglobulina: _____ LDH: _____

Imunofenotipagem: ZAP70: _____ CD38: _____

Hemograma:

Eritrograma	Leucograma	Plaquetograma
He: ____/ mm ³	Leucócitos: _____/mm ³	Plaquetas: _____/mm ³
Hb: ____/g/dL	MB: ____; PRO: ____; MIE : ____ ; MET: ____	
Ht: _____%	BAST: ____ ; SEG: ____; EO: ____;	
	BAS: _____;	
	LINF : ____ : MON : ____ : Outras : _____	

Tratamento/protocolos:

Observação <input type="checkbox"/>	Ciclofosfamida 250mg/m²/dia (D1 a D3) <input type="checkbox"/> Fludarabina 25mg/m²/dia (D1 a D3) <input type="checkbox"/>
Bolão terapêutico (albendazol 400mg/3 dias + secnidazol 50mg 4cp uma vez/dia no 4º dia) <input type="checkbox"/>	CHOP (1º dia-ciclofosfamida 750mg/m² + adriblastina 50mg/m² + oncovin 1,5mg/m² + prednisona 100mg) +(2º ao 5º dia - prednisona 100mg) +(6º ao 21º dia - repouso terapêutico) + (21º dia - hemograma + plaquetas) + 22º dia - recomeçar o ciclo <input type="checkbox"/>
leukeran(8mg/7dias) + prednisona (60mg/7dias) <input type="checkbox"/>	

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado: “Perfil clínico e laboratorial dos pacientes portadores de Leucemia Linfóide Crônica atendidos no serviço de Hematologia do HUWC- HEMOCE”, que tem por objetivo: avaliar o perfil dos pacientes com leucemia linfóide crônica quanto aos fatores de prognóstico.

Você, que já é cadastrado (a) no setor de hematologia do HEMOCE, com LLC -B confirmada, passará pela consulta médica de rotina, posteriormente, será entrevistado(a) por mim, sendo devidamente informado (a) sobre os objetivos da pesquisa, e terá que assinar um termo de consentimento caso aceite participar da pesquisa.

Na próxima consulta marcada pelo médico, você irá ao laboratório de hematologia do HEMOCE, onde serão colhidas três amostras de sangue. A primeira amostra (5mL), será obtida por sangue venoso em tubo com anticoagulante para a realização do hemograma a ser processado no aparelho de hematologia do próprio HEMOCE. As outras duas amostras (5mL) cada, serão obtidas por sangue venoso sem anticoagulante para dosagem bioquímica e imunofenotipagem.

Afirmo que ao participar da pesquisa, você não ficará exposto a nenhum risco, a não ser um pequeno desconforto devido à retirada de sangue.

Por tratar de um estudo experimental, não haverá nenhum benefício direto para você.

Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízo para seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não haverá despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Comprometo a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Sendo o principal investigador: Richeyla Kelly de Assis Custódio, a qual pode ser encontrada no endereço: av. Gov. Parsifal Barroso, 400, ap. 203, bairro Alagadiço, Fortaleza, CE, no telefone: (0xx85)-91172058 ou caso tenha alguma dúvida sobre a ética da pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em pesquisa (CEP) do HUWC - R: Capitão Francisco Pedro, nº1290, Rodolfo Teófilo; fone: 33668589 ou E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br.

Caso você se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se você concorda em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

Assinatura do

paciente/representante legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

Fortaleza, ____ de _____ de _____.

Local para digital

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura da testemunha

Assinatura de quem obteve o termo

ANEXO A

**PROTOCOLO PARA TRATAMENTO TERAPÊUTICO
BOLÃO TERAPÊUTICO**

Uso oral

1. Albendazol 400mg – 3 caixas

Mastigar 1 comprimido durante o jantar, por 3 dias seguidos.

2. Secnidazol 500 mg – 4 comprimidos

Tomar 4 comprimidos de uma só vez após o jantar, no 4º dia.

ANEXO B**PROTOCOLO PARA TRATAMENTO TERAPÊUTICO
LEUKERAN + PREDNISONA**

Uso oral

1. Leukeran 0,2 mg/Kg/dia
dose diária: 10mg a 15mg/dia
2. Prednisona 20mg-1mg/Kg/dia
dose diária: 60mg/dia

Usar a dosagem recomendada por 7 dias seguidos, repetir a cada 3 semanas.

ANEXO C

**PROTOCOLO PARA TRATAMENTO TERAPÊUTICO
CHOP**

Dia do ciclo	DROGAS	DOSE PREVISTA	DOSE ADMINISTRADA
1	Ciclofosfamida 750 mg/m ² (EV)		
	Adriplastina 50 mg/ m ² (EV)		
	Oncovin 1,5 mg/ m ² (EV)		
	Prednisona 100 mg (VO)		
2 a 5	Prednisona 100 mg (VO)		
6 a 21	Repouso terapêutico		
21	Hemograma + plaquetas		
22	Recomeçar o ciclo		

Ciclo N° 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Data: ___ ___ ___ ___ ___ ___ ___ ___ ___

ANEXO D

**PROTOCOLO PARA TRATAMENTO TERAPÊUTICO
CICLOFOSFAMIDA + FLUDARABINA**

Nome: _____
 Prontuário: _____
 Tipo Histológico: _____
 Estadiamento: _____
 Peso: _____
 Altura: _____ Área: _____

Dia	Medicação	Dose
D1 a D3	Ciclofosfamida	250 mg/m ² /dia
D1 a D3	Fludarabina	25 mg/m ² /dia

Total de ciclos: 06

Ciclo N° 1 2 3 4 5 6

Data: ___ ___ ___ ___ ___ ___

ANEXO E**LLC- PESQUISA - IMUNOFENOTIPAGEM**

NOME:
PRONTUÁRIO:
DATA DA COLETA:
MATERIAL:
SUSPEITA CLÍNICA:

LYMPHOGRAM

---/---/CD19

CD38/CD5/CD19

FMC7/CD23/CD19

CD20/CD10/CD19

IGM/CD22/CD19

Kappa/lambda/CD19

CD16/CD56/CD3

CD7/---/CD3

cGZAP-70/CD8/CD19

CZAP-70/CD8/CD19

CD103/---/CD19

ANEXO F
DADOS DOS PACIENTES

	Idade	sexo	Proc	RAI	Binet	Hb(g/dL)	Ht(%)	Linf(%)	Leuc(mm ³)	Plaq(mm ³)	CD38	Beta(IU/L)	ZAP70	LDH(U/L)
1	70	F	C	0	A	14,6	44	83	55	374	N	3,98	N	305
2	73	F	I	II	A	12,1	37	87	77,1	216	P	0,03	P	1092
3	74	F	C	O	A	14,6	43	64	16,4	163	P	>4,00	N	164
4	42	F	C	II	A	12,7	37,6	88	28,8	161	P	2,51	N	282
5	62	M	C	III	C	9,5	29	83	111	147	P	2	N	475
6	77	M	C	I	A	13,7	41,7	72	28,7	234	N	>4,00		531
7	90	M	C	I	A	11,9	37	86	26,1	216	N	>4,00		352
8	68	M	I	II	A	13,1	41,3	91	56	246	N	>4,00	P	401
9	72	M	I	O	A	14,2	43	94	24	160	N	2,15	N	337
10	57	M	C	I	A	10,6	34	76	165	136	N	>4,00	N	342
11	70	F	C	O	A	10,9	33,5	64	67	108	N	2	N	301
12	76	M	I	O	A	12,3	37,7	68	335	176	N	>4,00	N	479
13	76	F	I	O	A	13,5	41,2	91	43,5	142	N	>4,00	N	285
14	69	F	C	II	A	10,7	33	93	31,9	222	N	>4,00	N	465
15	52	M	C	O	A	15,2	45	50	96	231	N	2	N	337
16	71	F	I	I	A	12,0	36	78	18	280	P	2	N	522
17	69	M	I	II	A	13,8/	41,7	56	24	160	N	>4,00	N	301
18	70	F	I	I	A	12,6	39,1	87	94	194	N	2	N	373
19	79	F	I	O	A	11,8	37,7	82	207	225	N	2,95	N	564
20	68	M	I	I	A	14,3	40,3	94	60,8	200	P	>4,00	N	439
21	83	F	C	II	A	10,5	34,1	92	67,4	193	N	2	N	674
22	59	M	I	I	A	14,1	41	65	79,3	103	N	>4,00	N	379
23	60	F	C	O	A	10,1	31,4	84	41,8	169		>4,00		341
24	80	M	I	II	A	12,4	37,2	85	40,6	286	N	2	N	517
25	83	M	C	IV	C	12,1	36,2	53	24,9	87,8	N	>4,00	N	361

	Idade	SEXO	Proc	RAI	Binet	Hb(g/dL)	Ht(%)	Linf(%)	Leuc(mm ³)	Plaq(mm ³)	CD38	Beta(IU/L)	ZAP70	LDH(U/L)
26	82	M	I	O	C	14,1	41	73	51	162	N	>4,00	N	425
27	70	M	I	O	A	8,7	27	63	36	884	N	2	N	498
28	62	M	I	II	C	9,8	29	66	47/28	102		>4,00		201
29	81	M	C	O	A	16	48,5	83	49,5	190	N	2,42	N	416
30	77	M	C	O	A	7,5	24	91	115	281	N	2	N	289
31	72	F	I	O	A	10,9	33,5	86	50,6	124	N	2	P	606
32	61	M	C	O	A	10,9	34,7	98	30,3	189	N	>4,00	N	387
33	89	M	C	O	A	10	30	95	29,1	234	N	>4,00	N	653
34	64	F	C	III	B	8,7	24,9	35	403	110	N	2	N	1364
35	77	F	C	O	A	11,1	35,8	97	40,3	409	N	>4,00	N	346
36	69	M	C	O	A	12,7	38,1	92	46,9	247	N	1,93	P	334
37	73	M	C	O	A	17,6	51,8	83	20	190	N	2	N	360
38	69	M	I	III	B	10,3	28,7	96	384	172	N	>4,00	N	299
39	75	F	C	O	A	8,8	29	95	17,8	335	N	>4,00	N	349
40	73	M	C	O	A	11,7	34,9	88	62,5	119	N	>4,00	N	375
41	55	M	C	II	A	12,6	37,7	70	69,3	121	N	>4,00	P	293
42	60	F	C	O	A	13,7	41	73	36	197	N	2	N	674
43	75	F	C	II	A	11,7	35,2	91	58,3	276	P	>4,00	N	378
44	70	F	C	II	A	9,06	30	93	42,6	109	P	>4,00	P	629
45	71	M	I	O	A	12	34,9	90	122	196	N	2,68	P	527
46	73	F	I	O	A	10,6	31,1	86	21,7	434	P	>4,00	P	366
47	86	F	C	O	A	13,1	37,9	89	24	175	N	>4,00	P	395
48	67	F	I	II	A	11,6	38	88	10,6	126	N	>4,00	N	825
49	71	M	C	O	A	15	43,9	93	43,6	124	N	2	N	375
50	68	M	C	II	A	13,3	38,4	84	21,7	76,2	N	>4,00	N	508
51	84	M	C	O	A	14	40	85	48	173	N	2	N	372
52	82	M	I	O	A	11,6	33	70	131	255	N	2	N	250
53	56	F	C	I	A	12,8	37,4	85	92,5	427	N	3,39		498
54	69	M	C	I	A	12,4	36,4	95	7,69	169	N	>4,00	N	290
55	72	M	I	I	A	13,5	41,2	92	161	101	N	>4,00		425

	COOMBS D	COOMBS I	Tratamento diagnóstico	Tratamento Final do estudo	Organomegalias diagnóstico	Organomegalias Final do estudo
1	N	N	observação	observação	ausente	Ausente
2	P	N	leuk + pred	observação	hepato	Espleno
3	N	N	leuk + pred	ciclo+fludara	ausente	Ausente
4	N	N	leuk + pred	observação	adeno+espleno	Adeno
5	P	N	observação	observação	ausente	Ausente
6	N	N	ciclo+fludara	ciclo+fludara	adeno	Ausente
7	N	N	bolão terapêutico	observação	ausente	Adeno
8	N	N	bolão terapêutico	leuk + pred	adeno+espleno	Adeno
9	N	N	observação	observação	ausente	Ausente
10	N	N	bolão terapêutico	observação	adeno	Adeno
11	N	N	observação	observação	ausente	Ausente
12	P	P	bolão terapêutico	observação	ausente	Ausente
13	N	N	observação	observação	ausente	Ausente
14	N	N	leuk + pred	observação	adeno+espleno	Adeno
15	N	N	observação	observação	ausente	Ausente
16	N	N	leuk + pred	observação	adeno	Ausente
17	N	N	leuk + pred	ciclo+fludara	espleno	Espleno
18	P	N	leuk + pred	observação	ausente	Adeno
19	N	N	leuk + pred	observação	ausente	Ausente
20	N	N	observação	leuk + pred	adeno	Adeno
21	N	N	bolão terapêutico	leuk + pred	adeno	Espleno
22	N	N	bolão terapêutico	observação	adeno	Ausente
23	P	N	leuk + pred	observação	ausente	Ausente
24	N	N	observação	leuk + pred	hepato	Adeno
25	N	N	observação	observação	adeno	Ausente

26	N	N	observação	observação	ausente	ausente
27	N	N	observação	observação	ausente	ausente
28	N	N	bolão terapêutico	leuk + pred	espleno	espleno
29	N	N	bolão terapêutico	observação	ausente	ausente
30	N	N	leuk + pred	leuk + pred	ausente	ausente
31	N	N	bolão terapêutico	observação	ausente	ausente
32	P	N	leuk + pred	observação	ausente	adeno
33	P	N	observação	observação	ausente	ausente
34	P	N	CHOP	CHOP	adeno	adeno
35	N	N	observação	observação	ausente	ausente
36	N	N	observação	observação	ausente	ausente
37	N	N	observação	observação	ausente	ausente
38	N	N	leuk + pred	observação	adeno	adeno
39	N	N	leuk + pred	observação	ausente	ausente
40	P	N	observação	prednisona	ausente	ausente
41	N	N	leuk + pred	observação	adeno+espleno	ausente
42	N	N	observação	observação	ausente	ausente
43	P	N	bolão terapêutico	ciclo+fludara	ausente	hepato
44	N	N	bolão terapêutico	observação	espleno	espleno
45	N	N	observação	observação	ausente	ausente
46	N	N	bolão terapêutico	observação	ausente	ausente
47	N	N	observação	observação	ausente	ausente
48	N	N	leuk + pred	observação	espleno	ausente
49	N	N	observação	observação	ausente	ausente
50	N	N	bolão terapêutico	observação	ausente	adeno+espleno
51	N	N	bolão terapêutico	observação	ausente	ausente
52	N	N	observação	observação	ausente	ausente
53	N	N	observação	observação	ausente	adeno
54	N	N	observação	CHOP	adeno	adeno
55	N	N	observação	ciclo+fludara	adeno	ausente

Tabela 10 - Resumo dos fatores avaliados

Fatores Avaliados		Quantidade	Porcentagem (%)
Gênero	<i>Feminino</i>	23	41.8
	<i>Masculino</i>	32	58.2
Procedência	<i>Interior</i>	22	40.0
	<i>Centro</i>	33	60.0
Estágio BINET	<i>A</i>	45	81.8
	<i>B</i>	3	5.5
	<i>C</i>	7	12.7
Estágio RAI	<i>0</i>	28	50.9
	<i>I</i>	10	18.2
	<i>II</i>	13	23.6
	<i>III</i>	3	5.5
	<i>IV</i>	1	1.8
Organomegalias	<i>Ausente</i>	34	61.8
	<i>Espleno</i>	4	7.3
	<i>Adeno</i>	11	20.0
	<i>Hepato</i>	2	3.6
	<i>Adeno e Espleno</i>	4	7.3
Tratamento	<i>Observação</i>	24	43.6
	<i>Bolão terapêutico</i>	14	25.5
	<i>CHOP</i>	1	1.8
	<i>Fludara e Ciclo</i>	1	1.8
	<i>Leuk e Pred</i>	15	27.3
*ZAP 70	<i>Negativo</i>	40	81.6
	<i>Positivo</i>	9	18.4
**CD38	<i>Negativo</i>	44	83.0
	<i>Positivo</i>	9	17.0

Nota: * Foram desconsiderados 6 pacientes.

** Foram desconsiderados 2 pacientes.

Tabela 11 - Relações dos tratamentos através da idade e do Estágio BINET

Tratamento	Estágio BINET					
	<i>A</i>		<i>B</i>		<i>C</i>	
	Idade		Idade		Idade	
	< 65 anos	≥ 65 anos	< 65 anos	≥ 65 anos	< 65 anos	≥ 65 anos
<i>Bolão terapêutico</i>	2	10	0	1	1	0
<i>CHOP</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Fludara+ciclo</i>	0	1	0	0	0	0
<i>Leuk+pred</i>	3	9	0	2	1	0
<i>Observação</i>	2	17	0	0	2	3
Total	8	37	0	3	4	3

