



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**ESTUDO DE CITOCINAS, IMUNOFENOTIPAGEM,
ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS E DA VITAMINA D EM
PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFÓIDE
CRÔNICA ATÍPICA**

Salvador – Bahia – Brasil
2016

MARCOS DA COSTA SILVA

**ESTUDO DE CITOCINAS, IMUNOFENOTIPAGEM,
ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS E DA VITAMINA D EM
PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFÓIDE
CRÔNICA ATÍPICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento

Salvador – Bahia – Brasil
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Departamento de Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde
Sistema de Bibliotecas da UFBA

S586 Silva, Marcos da Costa

Estudo de Citocinas, Imunofenotipagem, Aberrações Cromossômicas e da Vitamina D em Pacientes com Diagnóstico de Leucemia Linfóide Crônica Atípica / Marcos da Costa Silva. -- Salvador, 2016.

118 f. : il

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Imunologia) --
Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, 2016.

1. Leucemia Linfóide Crônica Clássica e Atípica. 2. Aberrações Cromossômicas. 3. Citocinas. 4. Vitamina D. 5. Família NTRK. I. Meyer Nascimento, Prof. Dr. Roberto José . II. Título

CDU: 616.155.392

Marcos da Costa Silva

ESTUDO DE CITOCINAS, IMUNOFENOTIPAGEM, ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS E DA VITAMINA D EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFÓIDE CRÔNICA ATÍPICA

Tese defendida e aprovada para obtenção do Título de Doutor em Imunologia.

Salvador, 03 de Junho de 2016.

Prof. Dr. Marco Aurelio Salvino de Araujo

Profa. Dra. Maria Betânia Pereira Toralles

Profa. Dra. Silvia Lima Costa

Profa. Dra. Valdirene Leão Carneiro

Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento
Instituto de Ciências da Saúde – UFBA
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus por me dar forças e coragem para vencer as batalhas diárias.
- ✓ Aos meus pais, irmão, meu sobrinho e minha cunhada pela atenção, apoio e encorajamento preocupação.
- ✓ A todos meus familiares pelo incentivo e pela torcida.
- ✓ As Universidades do Estado da Bahia e Federal da Bahia pela formação
- ✓ Ao Prof. Roberto Meyer pela orientação e atenção.
- ✓ A Prof^a Maura Romeo pela orientação
- ✓ A Prof^a Vera Vale por ter me dado a primeira oportunidade no mundo da pesquisa.
- ✓ A uma Benzetacil que me fez chegar até o ICS.
- ✓ A Prof^a Teresita Benditcho pela grande ajuda.
- ✓ A todos os membros da banca
- ✓ Aos Profs. Ivana Nascimento, Songelí Freire, Denise Lemaire, Robert Schaer, Lília Ferreira de Moura Costa, Kiyoko Abe-Sandes pela colaboração.
- ✓ A equipe da imunofenotipagem do anexo 3 Prof. Hebert, Geraldo Pedral, Allan, Mariane e Lorena pelo apoio e ajuda no desenvolvimento do trabalho.
- ✓ Ao Laboratório de citogénica Prof^a Esmeralda Santos, Maílla Rebouças, Paula Brito, Daniel da Silva, Socrates Bezerra. Pelo apoio
- ✓ Aos professores e técnicos da Universidade do estado da Bahia do Campus II e do DCV I Campus I Roginaldo Chagas, Cláudia Regina, Lisovaldo Paixão, Joselita Sacramento, Atson Fernandes, Marco Silvany, Nadja Gomes, Artur Gomes, Karla Vila, Lidia, Fábio Rodrigo, Marcelo Peixoto, Edson Rodrigues, Bruno Azevedo, Isabel Cristina, Fátima Brazil, Juliana Cortes, Polynna Carôzo Adelaide, Cristiane, Luciane, Rose, Mônica, Naiana, Jessica, Risomar, Fabíola, Cristiane Ferreira..... pela ajuda, companheirismo e amizade
- ✓ A Universidade do Colorada. Prof^a Marileila Garcia, Severine Kako, Evelyn Muschalan, Sakshi Prabhu, Jane, Hala Nijmeh, Anna Kinsella, Aline Murakami, Gina Kin e Kin pelo apoio.
- ✓ Aos ex-mestrandos e hoje mestres, doutorandos e /ou doutores Soraya Trindade, Milene Salomão, Renato Carminati, Robson Bahia, Lívia Pugliese, Renata, Zoraida Oliveira, Bruno Paule, Adriano Alcântara, Alexandre Pinheiro, Cláudia Valle, Paula Moreira pela ajuda.
- ✓ A todos meus amigos “planctônicos” Andréia Pacheco, Ana Paula Gomes, Daniele Lima, Luis Miguel Barreto, Mabel Proence, Camila Azevedo, Georgetes Falcão, Marília Marques, Miriam Flores, Gabriele Rodrigues, Inara Barbosa, Ítala Felbergh, Rejane Souza, Igor Tavares, Rosalina Guedes, Heidiane Alves José Tadeu Raynal, Ramon Santos, Ana Tereza Dantas, Aretha Silva, Milton Galdino, Paulo Cirino, Tatiane Sales, Thais Brito, Ceica Aquino, Ioná Brito, Victória, Mariana, Tiago Ribeiro, Brysa Silveira, Mércia, Thiago Sousa Eula Amorim, Samantha, Zumaia, Marcos Bernardo, Thiago Barral, Rogério Reis, Danilo Alves, Danilo Jobim, Thais Bomfim, Taisa Manuela, que ajudaram a tornar a caminhada mais leve.
- ✓ A todos das comunidades planctônicas, pititinguenses, caçoniônicas e tubaronesca que por lapso de memória não estejam citados.
- ✓ A todos da equipe Labimuno pela torcida e pela ajuda. D. Chica, Mário, Manoel, Zé, Rui, Regis, Danilo, Diego Lima, Luiza, Michelle, Augusto Lyra,

Isaac Costa, Júlia, Marcos Leôncio, Juvenal, Rebeca, Cleidiane, Juçara, Ricardo, Osmundo, Luciane Arlindo, Marcelo pela ajuda.

- ✓ A todos os professores do PPGIM pelo ensino.
- ✓ A Dilcéia Oliveira, Luciane, Líliã, Daniela, Sônia e Naiana pela ajuda e incentivo.
- ✓ A todos da turma de mestrado e doutorado PPGIm 2011/2012
- ✓ A todos os pesquisadores do ICS pelo intercambio de conhecimento e materiais.
- ✓ A todos que de uma forma direta ou indireta ajudaram na realização desse trabalho.

*"Não importa o cargo que você ocupa, quanto ganha no fim do mês,
se suas roupas são da moda ou não... importa o quanto você é feliz de
verdade
e os amigos "leais e verdadeiros" que guarda em seu coração.
Pois essa felicidade que traz paz de espírito,
essas amizades que vão além da eternidade, dinheiro nenhum compra...
Não tem preço.
Pois são tão fortes quanto o vento quando sopra
Tronco forte que não quebra e não entorta."*

- Composição e releitura de *Vencendo a Leucemia* de Lílian Tassara
e *Podes crer* de Da Gama/Toni Garrido

COSTA-SILVA, Marcos. Estudo de citocinas, imunofenotipagem, aberrações cromossômicas e da vitamina D em pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide crônica atípica. 118 f. Il. 2016. Tese Doutorado – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

RESUMO

A Leucemia Linfóide Crônica (LLC) tem origem nos linfócitos B, derivada de uma única célula transformada devido a alterações genômicas, aumentando a resistência à apoptose. Essas células acumulam-se no sangue, medula óssea e órgãos linfoides secundários muitas vezes passando de 10.000 células/mm³ de sangue resultando em anormalidades imunológicas. Mais de 99% dessas células circulantes estão na fase G0 do ciclo celular. É uma doença de maior prevalência no idoso, com médias de idade entre 64-70 anos. Células LLC geralmente co-expressam antígenos de células T e B em sua superfície e esses marcadores são úteis para o diagnóstico da LLC através da imunofenotipagem. É frequente, na prática clínico-laboratorial, resultados inconclusivos para LLC, chamadas de LLC atípicas isso ocorre, principalmente devido a resultados limítrofes na imunofenotipagem. Outra técnica utilizada no diagnóstico e prognóstico da LLC é a análise de alterações cromossômicas através da Hibridação *In Situ* por Fluorescência (FISH). É uma alternativa para elucidação dos casos inconclusivos. Pacientes com aberrações têm sobrevida menor que aqueles com cariótipo normal. Devido a isso objetivou-se estudar a ocorrência da LLC no Estado da Bahia e as características dos indivíduos com laudo de LLC atípica, quanto ao perfil imunofenotípico, a presença de aberrações cromossômicas incluindo os genes da família NTRK, produção de citocinas e vitamina D. Entendimento que poderá auxiliar no desenvolvimento de políticas públicas para a terceira idade no Estado. Foi observado nas amostras analisadas no estudo a ocorrência de 22% de LLC, sendo que, 8% corresponde a LLC atípica. O gênero feminino foi o menos acometido, possivelmente associado aos hormônios sexuais. O trabalho mostrou a importância do uso do FISH, pois solucionou 87% dos casos atípicos sendo que a aberração mais frequente foi a translocação 11:14 associada ao linfoma do manto. A IL-17 A mostrou-se um possível marcador de evolução clínica da doença. TNF e IFN- γ mostraram-se marcadores de pior prognóstico. Além disso, a diminuição dos níveis de vitamina D como um sinal de pior prognóstico. Foi observado no trabalho a presença de alterações cromossômicas nos genes da família NTRK, NTRK1 e NTRK3 correspondendo a 24%. O conjunto desses resultados amplia os conhecimentos sobre a LLC além de possibilitar para os pacientes, quando possível, mudanças na conduta terapêutica.

Palavras chave: Leucemia Linfóide Crônica, Leucemia Linfóide Crônica Atípica, FISH, Aberrações Cromossômicas, Citocinas, Vitamina D e Família NTRK

COSTA-SILVA, Marcos. Study of cytokines, immunophenotyping, chromosomal aberrations and vitamin D in patients diagnosed with atypical chronic lymphocytic leukemia. 118 pp. ill. 2016. Doctoral Thesis - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2016.

ABSTRACT

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) originates from B lymphocytes, derived from a single cell transformed due to genomic changes, increasing resistance to apoptosis. These cells accumulate in the blood, bone marrow and secondary lymphoid organs often passing from 10,000 cells / mm³ of blood resulting in immunological abnormalities. More than 99% of these circulating cells are in the G0 phase of the cell cycle. It is a disease of higher prevalence in the elderly, with a mean age of 64-70 years. CLL cells generally co-express T-cell and B-cell antigens on their surface and such markers are useful for the diagnosis of CLL by immunophenotyping. In clinical-laboratory practice, inconclusive results for CLL, often called atypical CLLs, are common, mainly due to borderline immunophenotyping results. Another technique used in the diagnosis and prognosis of CLL is the analysis of chromosomal changes through Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH). It is an alternative for the elucidation of inconclusive cases. Patients with aberrations have a lower survival rate than those with normal karyotype. Due to this, we aimed to study the occurrence of CLL in the State of Bahia and the characteristics of individuals with atypical CLL, regarding the immunophenotypic profile, the presence of chromosomal aberrations including the NTRK family genes, cytokine and vitamin D production. Understanding that may assist in the development of public policies for the elderly in the State. The occurrence of 22% of CLL was observed in the samples analyzed in the study, and 8% corresponded to atypical CLL. The female gender was the least affected, possibly associated with sex hormones. The work showed the importance of using FISH, since it solved 87% of atypical cases and the most frequent aberration was the 11:14 translocation associated with mantle lymphoma. IL-17A was shown to be a possible marker of clinical evolution of the disease. TNF and IFN- γ were shown to be worse prognostic markers. In addition, the decrease in vitamin D levels as a sign of worse prognosis. The presence of chromosomal alterations in the NTRK, NTRK1 and NTRK3 family genes, corresponding to 24%, was observed in the study. Together, these findings broaden the understanding of CLL and make it possible for patients, when possible, to change their therapeutic behavior.

Keywords: Chronic Lymphocytic Leukemia, Atypical Chronic Lymphocytic Leukemia, FISH, Chromosome Aberration, Cytokine, vitamin D and NTRK Family

LISTA DE ABREVIATURAS

APRIL	Ligante Indutor de Proliferação
ATM	Gene da Ataxia-telangiectasia
AKT	Serina-Treonina quinase
BAFF	Fator Ativador de Células B
BCL-2	Célula B de Linfoma 2
BCMA	Antígeno De Maturação De Células B
BCR	Receptor de Células B
BMSC	Células do Estroma da Medula Óssea
BTK	Tirosina Cinase de Bruton's
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro
CALLA	Antígeno Comum da Leucemia Linfoblástica Aguda
CBA	Cytometric Bead Array
CCDN1	Ciclina D1
CD5	Cluster of Differentiation 5
CD10	Cluster of Differentiation 10
CD19	Cluster of Differentiation 19
CD20	Cluster of Differentiation 20
CD22	Cluster of Differentiation 22
CD23	Cluster of Differentiation 23
CD79b	Cluster of Differentiation 79b
CGH	Hibridação Genômica Comparativa
CXCL12	Quimiocina ligante 12
CXCL13	Quimiocina ligante 13
CXCR4	Receptor de Quimiocina Tipo 4
CXCR5	Receptor de Quimiocina Tipo 5
FISH	Hibridação <i>In Situ</i> por Fluorescência
IFN- γ	Interferon gama
IGH	Cadeia pesada da imunoglobulina
IgVH	Região Variável da Cadeia Pesada da Imunoglobulina
IL- 1	Interleucina 1
IL- 2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL- 6	Interleucina 6
IL- 10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
LCM	Linfoma de Células do Manto
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LNHs	Linfoma não-Hodgkin
MCL-1	Célula Mielóide Leucêmica-1
MPRIP	Proteína Rho de Interação com a Miosina Fosfatase
MYB	Oncogene da Mieloblastose Aviaria
NGF	Fator de Crescimento de Nervos

NLCs	Células Semelhantes a Nutrizes
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4	Neurotrofina 4
NTRK	Receptor Tirosina Cinase Neurotrófico
P53	Proteína Tumoral de 53 kDa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Cinase
PTH	Paratormônio
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
RPM	Rotação por Minuto
SERM	Moduladores Seletivos do Receptor de Estrogênio
SKY	Cariotipagem Espectral
SOX11	Fator de Transcrição Neural 11
Syk	Tirosina Cinase Esplênica
TACI	Interativo do Ligante De Ciclofilina
T CD4	Linfócito ou Célula T CD4 ⁺
T CD8	Linfócito ou Célula T CD8 ⁺
<i>TFG</i>	Gene Fundido ao TRK
TH1	Linfócito de Perfil Auxiliar de Tipo 1
TH2	Linfócito de Perfil Auxiliar de Tipo 2
TH1 7	Linfócito de Perfil Auxiliar de Tipo 17
<i>TPM3</i>	Tropomiosina 3
<i>TPR</i>	Proteína Nuclear Inserida em Região Promotora Translocada
Treg	População de Linfocitos T Auxiliares Regulatório
TNF	Fator de Necrose Tumoral
SIgM	Imunoglobulina M de Superfície
ZAP70	Proteína Zeta-Associada de 70 kD

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

MANUSCRITO 1

- Figura 1:** Análise da media anual de ocorrências de Leucemia Linfóide Crônica (LLC) no Estado da Bahia. 43
- Figura 2:** Análise da ocorrência anual de LLC comum e LLC atípica no período de 2012 – 2015 no Laboratório de imunologia e Biologia Molecular. 44
- Figura 3:** Painel dos marcadores da imunofenotipagem utilizados para a determinação da LLC 45
- Figura 4:** Imagens dos resultados da imunofenotipagem para controle negativo sem LLC, LLC clássica e LLC atípica. 47
- Figura 5:** Representação da ocorrência de LLC por gênero e a subdivisão em LLC típica e atípica dentro de cada gênero 48
- Figura 6:** Representação da população estudada em relação ao gênero e a idade com distribuição da média, mediana, moda a maior idade de ocorrência de LLC e a menor idade 49
- Figura 7:** Distribuição da frequência estratificada em 10 em 10 anos. Gráfico superior frequência geral, gráfico inferior frequência analisada por gênero 51

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

MANUSCRITO 2

- Quadro 1:** Painel dos marcadores da imunofenotipagem utilizados para a determinação da LLC. Mostrando o perfil atípico e as suspeitas diagnóstica.. 63
- Figura 1:** Distribuição das aberrações cromossômicas encontradas após o teste FISH 67
- Figura 2:** Imagens representando resultados positivos para o FISH: Trissomia do cromossomo 12, Translocação cromossômica 11:14 e Deleção do p53. 68
- Quadro 2:** Painel dos marcadores da imunofenotipagem utilizados para a determinação da LLC Após a realização do FISH. Verifica-se as aberrações cromossômicas encontradas. 70
- Figura 3:** Análise da produção da citocina IL-17A em indivíduos com diagnóstico de LLC atípica após análise da presença de aberrações cromossômicas. 72
- Figura 4:** Análise da produção da citocina TNF em indivíduos com diagnóstico de LLC atípica após análise da presença de aberrações cromossômicas. 75
- Figura 5:** Análise da produção da citocina IFN- γ em indivíduos com diagnóstico de LLC atípica após análise da presença de aberrações cromossômicas. 76
- Figura 6:** Análise da produção da citocina IL-10 em indivíduos com diagnóstico de LLC atípica após análise da presença de aberrações cromossômicas. 78
- Figura 7:** Análise da produção da citocina IL-4 em indivíduos com diagnóstico de LLC atípica após análise da presença de aberrações cromossômicas. 79
- Figura 8:** Análise da produção da citocina IL-6 em indivíduos com diagnóstico de LLC atípica após análise da presença de aberrações cromossômicas. 81
- Figura 9:** Análise da produção da citocina IL-2 em indivíduos com diagnóstico de LLC atípica após análise da presença de aberrações cromossômicas. 82
- Figura 10:** Análise da produção da vitamina D em indivíduos com diagnóstico de LLC atípica após análise da presença de aberrações cromossômicas. 84

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

MANUSCRITO 3

Figura 1: Desenho esquemático da sonda NTRK2 com as possíveis regiões de quebra.	99
Figura 2: Desenho esquemático da sonda NTRK3 com a possível região de quebra .	100
Figura 3: Imagem da validação para NTRK 2.	101
Figura 4: Imagem da validação para NTRK 3.	101
Figura 5: Imagem do resultado do controle negativo para o FISH em NTRK1 em núcleos de indivíduos controles.	102
Figura 6: Imagem do resultado positivo para o FISH em NTRK1 em núcleos de paciente com LLC atípica.	103
Figura 7: Imagem do resultado do controle negativo para o FISH em NTRK2 em núcleos de paciente com LLC atípica.	103
Figura 8: Imagem do resultado do controle negativo para o FISH em NTRK3 em núcleos de indivíduos controle.	104
Figura 9: Imagem do resultado positivo para o FISH em NTRK3 em núcleos de paciente com LLC atípica.	105

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1.	NEOPLASIAS LEUCOCITÁRIAS	20
2.2	LEUCEMIA LINFÓIDE CRÔNICA	20
2.2.1	Prevalência	21
2.2.2	Características Morfológicas e Imunofenotípicas	21
2.2.3	Citocinas	22
2.2.4	Comprometimento Imunológico	23
2.2.5	Sobrevida e Alteração no Gene IgVH	24
2.2.6	Ontogênese da Células LLC	25
2.2.7	Aberrações Cromossômicas e Análises Citogênicas	27
2.3	LINFOMA FOLICULAR	30
2.4	LINFOMA DE CÉLULAS DO MANTO	31
2.5	TRATAMENTO PARA AS NEOPLASIAS HEMATOPOIÉTICAS	32
2.6	FAMÍLIA NTRK	33
2.7	VITAMINA D	35
3.	JUSTIFICATIVA	37
4.	OBJETIVOS	38
4.1	OBJETIVO GERAL	38
4.1.1	Objetivos Específicos	38
5.	MANUSCRITO 1 - LEVANTAMENTO DOS CASOS DE LLC CLÁSSICA E ATÍPICA DETERMINADA ATRAVÉS DA IMUNOFENOTIPAGEM EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA NO ESTADO DA BAHIA	39
5.1.	INTRODUÇÃO	39
5.2.	MATERIAIS MÉTODOS	42
5.2.1.	Análise Imunofenotípica por Citometria de Fluxo.	42
5.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.3.1	Dados Do Laboratório	43
5.4.	CONCLUSÃO	52
5.5.	REFERÊNCIAS	53

6.	MANUSCRITO 2 - ESTUDO DE PACIENTES	
	CARACTERIZADOS COMO PORTADORES DE LLC ATÍPICA	57
6.1.	INTRODUÇÃO	57
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS	60
6.2.1.	Análise Imunofenotípica por Citometria De Fluxo	60
6.2.2.	Identificação de oito Aberrações Cromossômicas em Células de Indivíduos com LLC Atípica - Análise por Hibridação In Situ por Fluorescência (FISH) para as Sondas, MYB, Trissomia do 12, Deleção da ATM, Translocação (14;18), Quebra do 14, Deleção do P53, Translocação (11;14), Deleção do 13	60
6.2.3.	Dosagem de Citocinas	60
6.2.4.	Dosagem de Vitamina D	61
6.2.5.	Análise Estatística	61
6.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
6.3.1	Característica dos pacientes	62
6.3.2.	Imunofenotipagem	62
6.3.3.	Análises Cromossômicas	64
6.3.4.	Produção de citocinas	72
6.3.4.1.	Produção de Interleucina17 A (IL-17)	72
6.3.4.2.	Fator de Necrose Tumoral (TNF)	74
6.3.4.3.	Produção de Interferon-gamma (IFN-γ)	76
6.3.4.4.	Produção de Interleucina10 (IL-10)	77
6.3.4.5.	Produção de Interleucina4 (IL-4)	79
6.3.4.6.	Produção de Interleucina 6 (IL-6)	81
6.3.4.7.	Produção de Interleucina2 (IL-2)	82
6.3.5.	Produção de vitamina D	83
6.4.	CONCLUSÃO	86
6.5.	REFERÊNCIAS	87
7.	MANUSCRITO 3 - ESTUDO DOS GENES DA FAMÍLIA NTRK EM CÉLULAS DE PACIENTES COM LLC ATÍPICAS	94
7.1.	INTRODUÇÃO	94
7.2	MATERIAIS E MÉTODOS	96
7.2.1.	Desenho e Confecção das Sondas	96

7.2.2. Validação	96
7.2.3. FISH com Sondas da Família NTRK em Pacientes com LLC Atípica	97
7.2.3.1. Preparação para a Realização do FISH	97
7.2.3.2. Fixação dos Núcleos na Lâmina	98
7.2.3.3. Hibridação	98
7.2.3.4. Pós hibridização	98
7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
7.3.1. Desenho das Sondas NTRK	99
7.3.2. FISH para Família NTRK	102
7.4. CONCLUSÃO	106
7.5. REFERÊNCIAS	107
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
9. REFERÊNCIAS GERAIS	110

1. INTRODUÇÃO GERAL

A leucemia linfóide crônica (LLC) é a neoplasia linfóide mais frequente nos países ocidentais, correspondendo a cerca de 30% das leucemias do adulto.

A LLC é uma doença de maior prevalência no idoso, com médias de idade entre 64-70, caracterizada pelo acúmulo de linfócitos B no sangue periférico, medula óssea, órgãos linfóides e fígado. Pacientes idosos costumam evoluir menos favoravelmente em função de suas co-morbidades, sendo que, ocorre uma incidência ligeiramente maior de pessoas do sexo masculino. Para o diagnóstico as técnicas mais utilizadas são imunofenotipagem e a citogenética. Apesar de todo esse arsenal para o diagnóstico da LLC, é freqüente na prática clínico-laboratorial a saída de laudos inconclusivos, as chamadas LLC atípicas, onde as dúvidas mais comuns são entre o linfoma de células do manto, onde ocorre uma translocação $t(11;14)(q13;q32)$ com o rearranjo dos genes BCL1 ou ciclina D1 (CCDN1) e cadeia pesada da imunoglobulina (IGH), e linfoma folicular onde ocorre a translocação $t(14;18)$, que também acomete o cromossomo 14 (14q32), sendo que, essas doenças possuem progressão e tratamentos diferentes. Essa inconclusividade ocorre, principalmente devido a resultados limítrofes na imunofenotipagem, logo tornando necessária a investigação citogenética molecular por FISH (Hibridação In Situ por Fluorescência).

Essa técnica fundamenta-se no uso de uma sequência de bases nitrogenadas (sonda) complementar ao alvo (DNA) que se pretende estudar. Na LLC a utilização do FISH é mais vantajosa, pelo fato da análise cromossômica convencional ser pouco eficaz face à dificuldade em se obter metáfase da célula maligna pelo seu precário crescimento *in vitro*, tendo-se, muitas vezes, mitoses não representativas do clone anormal. Anormalidades cromossômicas têm sido observadas em 40%-50% das LLC pelo cariótipo convencional, enquanto por FISH em cerca de 80%. A razão para isto é que a FISH permite a detecção de anormalidades específicas, ou seja, no alvo predeterminado e suplantando o empecilho maior da citogenética clássica, que é o fato dos linfócitos B malignos permanecerem fora da fase de divisão (G0/G1).

A utilização do FISH e o desenvolvimento de novas sondas irá ampliar a capacidade de detecção de aberrações cromossômicas, o que poderá reduzir a emissão de laudos de LLC atípicas e caso haja alterações cromossômicas auxiliar

no direcionamento para um tratamento mais preciso. Além disso, permitirá determinar a prevalência de LLC clássica e atípica no Estado da Bahia e o perfil imunofenotípico e imunológico associado aos níveis de vitamina D dos pacientes com diagnóstico de LLC atípica, analisando também nesses indivíduos a presença de alterações cromossômicas na família do gene NTRK. O conhecimento do perfil populacional e a possibilidade de um diagnóstico mais precoce poderá igualmente contribuir para elaboração de políticas públicas voltadas para indivíduos da terceira idade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. NEOPLASIAS LEUCOCITÁRIAS

As neoplasias leucocitárias dividem-se basicamente em linfóides e mielóide. Das neoplasias linfóides, 80 a 85% tem origem nos linfócitos B, que são classificados com base nas manifestações clínicas, morfologia, imunofenótipo e genótipo, segundo a classificação REAL (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms) (COTRAN et. al., 2000) derivando de uma única célula transformada (monoclonais). Como são células do sistema imune, tendem a desorganizar os mecanismos reguladores normais, resultando em anormalidades imunológicas. Muitas dessas neoplasias linfóides estão associadas a mutações no cromossoma 14 que é uma das regiões propensa a sofrer translocações acidentais, devido à instabilidade genômica, necessária para os rearranjos da cadeia pesada das imunoglobulinas, cujo gene aí se encontra (KUPPERS, 2001).

Dentre as neoplasias linfóides a leucemia linfóide crônica (LLC) é a mais frequente nos países ocidentais, correspondendo a cerca de 30% das leucemias do adulto e 25% dos linfomas não-Hodgkin (LNH) (HALLEK et. al, 2010). Dados dos Estados Unidos mostram uma incidência de 4.1/100.000 com 15.000 novos casos por ano com aproximadamente 4500 mortes (HALLEK, 2015; JEMAL, 2007).

2.2 LEUCEMIA LINFÓIDE CRÔNICA

A LLC caracteriza-se pela proliferação e acúmulo de pequenas células B maduras, com *Cluster of Differentiation 5* (CD5) positivo, no sangue, medula óssea, linfonodos e baço, que se rompem facilmente (ROZMAN, 1995). Mais de 99% das células LLC circulantes estão na fase G0 do ciclo celular (ANDREEFF, 1980). Estudos recentes mostram que eventos leucogênicos primários ocorrem na célula tronco hematopoiética, levando a alterações genômicas específicas causando deleções em genes de micro-RNA e aumentando a resistência das células B a

apoptose (CALIN, 2002; CHIORAZZI, 2005; HALLEK, 2015). Essa doença não está associada à radiação da bomba atômica e nem a exposição a substâncias tóxicas (CALIGARIS-CAPPIO, 1999; HAMBLIN, 1998).

No estroma e na matriz da medula óssea e dos tecidos linfóides secundários ocorre uma complexa interação celular e molecular com as células LLC ainda não entendida (BURGER *et. al* 2009; BURGER, 2011). Esta interação afeta a sobrevivência, proliferação e resistência às drogas nas células LLC, e essa interação pode ser a responsável pela doença residual depois da terapia convencional. Acredita-se que as principais células envolvidas são: os linfócitos T, células mesenquimais estromais e células derivadas de monócitos semelhantes a nutridoras.

2.2.1 Prevalência

A LLC é uma doença de maior prevalência no idoso, com médias de idade entre 64-70, caracterizada pelo acúmulo de linfócitos B no sangue periférico, medula óssea, órgãos linfóides e fígado (COTRAN *et. al.*, 2000 GREER *et al.*, 2003; YAMAMOTO *et. al*, 2005; NASCIMENTO *et. al*, 2006). Pacientes idosos costumam evoluir menos favoravelmente em função de suas co-morbidades (MAURO *et. al*, 1999), sendo que ocorre uma incidência ligeiramente maior de pessoas do sexo masculino (1,7: 1) (VASCONCELOS, 2005; MOLICA, 2006; WATSON,2008; HALLEK, 2015). Na LLC o número de linfócitos é geralmente maior ou igual a $5.000/\text{mm}^3$ ou acima de $10.000/\text{mm}^3$ e acima de 40% no mielograma quando o paciente apresenta linfocitose persistente, independente da presença ou não de linfonodomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia e/ou plaquetopenia (LORAND-METZE, 2005).

2.2.2 Características Morfológicas e Imunofenotípicas

A morfologia das células neoplásicas é semelhante à de linfócitos normais. Porém, geralmente se encontra até 2% de pró-linfócitos ou blastos (células maiores com nucléolos e citoplasma mais amplos), na forma atípica, os pró-linfócitos podem representar 10-55%, sendo que, é comum a ocorrência de restos celulares (manchas de Gumprecht). A presença de células linfóides clivadas sugere o

diagnóstico de linfoma folicular (GONZALEZ *et. al*, 2002). Por outro lado, células com morfologia de células linfoplasmocitárias indicam tratar-se de um linfoma linfoplasmocítico (KONOPLEV *et al*, 2005; OWEN *et. al* 2001). Por esta razão, o diagnóstico de LLC depende da determinação do imunofenótipo dos linfócitos circulantes através da citometria de fluxo.

Os linfócitos da LLC co-expressam antígenos de células T (CD5) e de células B (CD19, CD20 e CD23) em sua superfície (HALLEK, 2008). Quando comparado com as células normais as células LLC expressam baixos níveis de CD20 e de imunoglobulina de superfície, com caráter clonal (só cadeia kappa ou só lambda) e não expressam CD10 (GINALDI, 1998; MOREAU, 1997; MÜLLER-HERMELINK *et. al*, 2001). São geralmente negativas para FMC7, CD79b e CD22 (DIGIUSEPPE *et. al* 1998; DIGHIERO *et. al*, 1996; GARAND *et. al*, 1996; GENERAL, 1994; MATUTES *et. al*, 1994).

CD79b e CD22 são considerados marcadores B muito específicos. Estes achados permitem fazer o diagnóstico diferencial com outros linfomas B leucemizados (LORAND-METZE *et. al*, 2000 e 2005). O CD79 está normalmente presente na superfície das células B malignas de linfomas, mas ausentes em células de LLC. Acredita-se que decorra de mutação, deleção ou truncamento. A alteração no CD79 pode estar associada à redução na expressão do BCR na superfície das células com LLC podendo ocorrer defeitos na transdução de sinal via BCR, reduzindo a indução da ativação das proteínas tirosinas cinases, similar ao que é observado em células B anérgicas (COOK, 1994).

2.2.3 Citocinas

Células LLC através do RNAm virtualmente produzem interleucina (IL) - 1, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, interferon gama, TNF, TGF- β 1. Essa produção ainda não está clara. Em soro de pacientes são frequentemente encontrados TGF- β e IFN- γ em altos níveis. Acredita-se que o TGF- β atue inibindo a proliferação de linfócitos e isso provavelmente é a causa da lenta progressão da LLC. O TGF- β pode também induzir apoptose em diversas células inclusive células B, entretanto, testes *in vitro* mostraram que as células LLC são resistentes a apoptose mediada por TGF- β

(CHAOUCHI, 1995; DOUGLAS, 1997). O IFN- γ promove a sobrevivência de células leucêmicas, prevenindo a apoptose (BUSCHLE, 1993; CALIGARIS-CAPPIO, 1999) .

A IL-4 inibe a proliferação e a liberação de citocinas pelas células LLC, tendo também atividade anti-apoptótica (DANCESEU, 1992; CALIGARIS CAPPIO, 1999; REITTIE, 1994). As células LLC não expressam em sua superfície a proteína Fas que seria pró-apoptótica, nem a proteína c-myc um potente indutor de apoptose (CALIGARIS-CAPPIO, 1999; LARSSON, 1987).

2.2.4 Comprometimento Imunológico

Fenômenos de autoimunidade não são prevalentes em pacientes com LLC, mas alguns apresentam auto-anticorpos contra células sanguíneas causando uma citopenia autoimune. Paradoxalmente os pacientes também desenvolvem hipogamaglobulinemia progressiva que geralmente se desenvolve em todos os pacientes, e que implica no reconhecimento de antígenos (CALIGARIS-CAPPIO, 1999; ROZMAN, 1995).

As células LLC produzem TGF- β que é um potente inibidor da proliferação de células B (CALIGARIS-CAPPIO, 1999; LOTZ, 1994) além de liberar altos níveis de receptor de IL-2, que provavelmente atuam como uma esponja endógena de IL-2 regulando negativamente a resposta das células T auxiliaadoras . As células LLC falham na apresentação de antígenos solúveis e aloantígenos (CALIGARIS-CAPPIO, 1999; LANZAVECCHIA, 1985). Essa característica pode ser explicada devido aos baixos níveis de slg e uma deficiente expressão de moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 (DAZZI, 1995).

Pode-se concluir que o acúmulo das células de LLC é um obstáculo obstrutivo na produção de anticorpos normais levando para uma progressiva imunoincompetência. Cerca de 25% dos pacientes com LLC desenvolvem doenças autoimune como anemia hemolítica, trombocitopenia e mais raramente neutropenia ou aplasia de células vermelhas (CALIGARIS-CAPPIO, 1999; HAMBLIN, 1986).

2.2.5 Sobrevida e Alteração no Gene IgVH

A LLC é caracterizada por uma evolução clínica bastante heterogênea entre os indivíduos acometidos, com sobrevida que varia de alguns meses até algumas décadas (FARIA *et. al*, 2000). Estes dois extremos de apresentação clínica têm correlatos biológicos hoje bem definidos que é a presença de mutações somáticas nos genes da região variável da cadeia pesada de imunoglobulinas (IgVH). Pacientes com mutações em IgVH apresentam maior sobrevida do que aqueles sem mutações (GARICOCHEA, 2005; VASCONCELOS, 2005).

A literatura evidencia que as células que se acumulam e proliferam em LLC são linfócitos B maduros que apresentaram exposição antigênica (GARICOCHEA, 2005).

Três tipos de genes IgVH são especialmente hiper-representados: Vh 3-07 é observado frequentemente em LLC com mutação somática, Vh1-69 em LLC não mutada e Vh 4-34 é encontrada igualmente distribuída nas duas formas (MESSMER *et. al*, 2004).

Estes achados indicam que provavelmente existe um papel específico para certos antígenos na gênese de LLC com e sem mutação somática. Acredita-se que este uso repetido de certos genes IgVH indicaria que o estímulo antigênico inicial em LLC com mutação somática seria causado por um grupo limitado de antígenos, ao passo que nos casos não mutados, a exposição seria a um superantígeno (CALLIGARIS-CAPPIO *et al*, 2004).

Além da avaliação da mutação da IgVH, outro fator relevante em LLC é a análise de CD38 e ZAP70 que são dois outros marcadores associados à sobrevida e que se correlacionam diretamente ao estado mutacional de IgVH. Pacientes com IgVH não mutado apresentam freqüentemente a expressão anormal de CD38 e ZAP70, sugerindo que este subgrupo de indivíduos, que corresponde a cerca de 40% de todos os casos de LLC, trata-se de uma população bastante homogênea (FERRARINI *et al*, 2004).

A proteína zeta-associada de 70 kD (ZAP70) é uma tirosina-cinase essencial para o disparo de sinais promovidos pela ativação do receptor de linfócitos T. Apesar de não ser encontrada em linfócitos B normais, ZAP70 é expressa em células de LLC em que VH não está mutado. Linfócitos de LLC com mutação em VH raramente mantêm a expressão desta proteína (ROSENWALD *et. al*, 2001). Como era de se

esperar, a expressão de ZAP70 associa-se a doença com pior prognóstico. Ainda não se sabe com certeza se a expressão de ZAP70 indica uma origem celular distinta do clone ou se ela representa estados de ativação distintos das células leucêmicas (GARICOCHEA, 2005).

2.2.6 Ontogênese da Células LLC

Provavelmente a célula precursora de LLC (a célula que sofre o primeiro evento leucemogênico) consegue escapar dos *checkpoints* na medula óssea e evadir a apoptose, para poder se diferenciar em um linfócito B maduro que retém propriedades de células T, mas possui um BCR funcional. A funcionalidade do BCR é observada indistintamente em casos mutados como não mutados, indicando que alguma forma de estimulação antigênica é comum provavelmente em todos os casos de LLC. A natureza deste “antígeno” é desconhecida, mas, independente da mesma, seja, microbiano autólogo ou superantígeno, o papel desempenhado pela estimulação de BCR é incontestável e desempenha um papel central na patogênese da LLC (GARICOCHEA, 2005).

O BCR é muito importante para a manutenção e expansão dos clones de LLC, promovendo o controle de cinases como a tirosina cinase esplênica (Syk), tirosina cinase de Bruton's (Btk) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K).

Syk é tirosina quinase intracelular que é ativada quando ocorre ligação do BCR, integrinas ou receptor de quimiocinas. A Syk transfere e amplifica o sinal do BCR. A ativação do Syk resulta na sobrevivência das células devido à ativação do fosfatidilinositol 3-quinase e da serina-treonina quinase (AKT) (POGUE, 2000). Na LLC, promove sobrevivência e migração após a ligação do BCR. Deleção da Syk promove efeitos severos na linfopoiese das células B com bloqueio da transição pro-B para pré-B (BURGER, 2011). A Btk que é a tirosina cinase de Bruton é uma tirosina quinase intracelular que é ativada quando ocorre ligação do BCR, integrinas ou receptor de quimiocinas. A Btk na LLC promove sobrevivência, proliferação e migração. Mutação nessa molécula promove agamoglobulinemia ligado ao cromossomo X (BURGER, 2011). Já a PI3K que é a fosfatidilinositol 3-quinase, promove a sobrevivência e migração das células LLC, induzindo a secreção de quimiocinas como CCL3 e CCL4 (BURGER, 2011).

Acredita-se que quando acontece a ligação do BCR ao antígeno desconhecido ocorre um disparo da célula LLC, isso associado a outros sinais co-estimulatórios, promovendo a proliferação do clone de LLC (CATERA, 2008, BURGER, 2011; CHIORAZZI, 2005). A ligação do antígeno ao BCR induz a fosforilação de $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ que recruta Syk que ativa Btk e PI3K. A fosforilação de Syk, Btk e PI3K propaga o sinal recebido ativando vias como mobilização e ativação do cálcio da cinase AKT, ERK1/2 e célula mielóide leucêmica-1(MCL-1) promovendo sobrevivência, proliferação e migração das células LLC (CHEN, 2002).

A ativação do BCR das LLC induz a secreção de CCL3 que atua no microambiente atraindo células acessórias como os linfócitos T e monócitos. Receptores de quimiocinas como CXCR4 e CXCR5 associados as suas moléculas de adesão como VLA-4, promovem o tráfego e o *homing* dos tecidos devido ao gradiente do respectivo ligante. Membros da família TNF como CD40 ligantes, fator de células B ativadas da família do TNF (BAFF) e ligante induzido por proliferação (APRIL) promovem a ativação da LLC via os receptores correspondentes estimulando o reconhecimento e/ou sobrevivência e/ou expansão das células leucêmicas (BURGER, 2011).

As BMSC são células do estroma da medula óssea, e foram as primeiras células que dão suporte as células LLC caracterizadas. Assim como nas células hematopoiéticas normais, as BMSC promovem fatores de crescimento para as células LLC, protegendo também essas células da ação de agentes citotóxicos (BURGER, J.A., BURGER M, KIPPS T J. 1999; BURGER, 2011 PANAYIOTIDIS, 1996). As BMSC são vistas no estroma mesenquimal e em outros tecidos linfóides secundários, e acredita-se que esses tecidos sejam importantes para a manutenção da célula LLC fora da medula óssea (PEDERSEN, 2002). Outro grupo celular importante para o desenvolvimento das células LLC são as NLCs, células semelhantes a nutrízes. São monócitos diferenciados, grandes e aderentes que atraem células LLC as protegendo da morte ou por drogas ou programação própria. Essas células podem ser encontradas no baço ou em outros tecidos linfóides secundários de pacientes com LLC. Essas células expressam CXCL12, CXCL13, CD31, plexina b1, BAFF, APRIL e vimentina que promovem a ativação e sobrevivência das células LLC (BURGER, 2000; BURGER, 2011; BÜRKLE, 2007; DEAGLIO, 2005; NISHIO, 2005)

O CXCR4 é um receptor de quimiocina (CD184) altamente expresso na superfície das células LLC periféricas, mediando quimiotaxia, migração, cruzamento do endotélio vascular, polimerização da actina mediante a expressão e ligação ao seu ligante CXCL12, que também promove sinal para a sobrevivência da outro receptor de quimiocina altamente expresso é o CXCR5 (CD185), que tem como ligante CXCL13 que regula o *homing* dos linfócitos, a posição dessas células no folículo linfóide e a organização desse folículo. Na LLC a ativação do CXCR5 pelo CXCL13 também induz a ativação de proteínas G, PI3Ks, e p44/42 MAPK, resultando na polimerização da actina e quimiotaxia (BURGER, 2011; BÜRKLE, 2007).

BAFF e APRIL são ligantes da família do TNF que tem como alvo receptores da família do TNF como o antígeno de maturação de células B (BCMA), ativador transmembrânico e modulador do cálcio e interativo do ligante de ciclofilina (TACI), e o BAFF-R. As células LLC com esses receptores liga-se com BAFF e APRIL oriundos das células NLC induzindo a ativação da via NF-κB protegendo as células LLC da apoptose (BURGER, 2011).

A participação dos linfócitos T na LLC é muito controversa, e é visto nos pacientes um aumento tanto de células T CD4 quanto CD8. Provavelmente esse aumento esteja relacionado ao contato das células LLC, com antígenos microbianos, que são mais prevalentes nos pacientes com LLC ou por outras razões ainda desconhecidas. Células T tanto podem suprimir quanto estimular a expansão dos clones LLC (RAMSAY, 2008), e acredita-se que sub-populações de linfócitos T promovam a expansão de clones de LLC (BURGER, 2011).

2.2.7 Aberrações Cromossômicas e Análises Citogenéticas

Outra técnica bastante utilizada no diagnóstico e prognóstico da LLC é a análise de alterações cromossômicas através citogenética. A citogenética está dividida em clássica e molecular, e a clássica baseia-se na análise dos cromossomos da célula em divisão, em particular, na metáfase da mitose, que é a fase em que os cromossomos estão mais condensados (CHAUFFAILLE, 2005).

Já a citogenética molecular independe de divisão celular, pois se baseia na análise do DNA, agrupando as técnicas de hibridação *in situ* por fluorescência

(FISH), hibridação genômica comparativa (CGH) e cariotipagem espectral (SKY), dentre outras.

Dentre as técnicas citogenético-moleculares, aquela que proporciona resultados mais expressivos em LLC é a FISH, que fundamenta-se no uso de uma seqüência de bases nitrogenadas (sonda) complementar ao alvo (DNA) que se pretende estudar. É, portanto, uma alternativa para as situações em que não se têm metáfases para análise. Tem a vantagem de ser rápida, específica e sensível e, por identificar lócus gênico, auxilia no diagnóstico de micro deleção, ou seja, deleções além da sensibilidade da banda G (CHAUFFAILLE, 2005).

Na LLC, a utilização do FISH é mais vantajosa pelo fato da análise cromossômica convencional ser pouco eficaz face à dificuldade em se obter metáfase da célula maligna pelo seu precário crescimento *in vitro*, tendo-se, muitas vezes, mitoses não representativas do clone anormal.

Com efeito, anormalidades cromossômicas têm sido observadas em 40%-50% das LLC pelo cariótipo convencional (HALLEK *et. al*, 1997), enquanto por FISH em cerca de 80% (DOHNER *et. al*, 2000; JULIUSSON *et al*, 1998). A razão para isto é que a FISH permite a detecção de anormalidades específicas, ou seja, no alvo predeterminado e suplantando o empecilho maior da citogenética clássica, que é o fato dos linfócitos B malignos permanecerem fora da fase de divisão (G0/G1) (CHAUFFAILLE, 2005). As anomalias mais comuns são: trissomia do cromossomo 12 (+12) (CALIGARIS-CAPPIO, 1999; HAN, 1984), translocação ou deleção do braço longo do 13 (t/del(13q)) caracterizada como um curso benigno da doença (CALIN, 2002). Ocorrem também a deleção do braço longo do 6 (del(6q)), alterações envolvendo braço longo do 11, na banda q22-23 (11q22-23), translocação do braço longo do 14 (t(14q)) e deleção do braço curto do 17 [del(17p)] (CALIGARIS-CAPPIO, 1999; DOHNER, 1995; FITCHETT, 1987; OFFIT, 1993). Essas anomalias perfazem cerca de 60% das alterações encontradas nos linfócitos B malignos (HALLEK *et al*, 1997; JULIUSSON *et al*, 1998).

Pacientes com anormalidades cromossômicas têm sobrevida menor que aqueles com cariótipo normal, que respondem significativamente melhor à quimioterapia (HAN *et al*, 1988). Aqueles com anomalias complexas (mais de três anormalidades) têm pior sobrevida e apresentam doença mais agressiva. Indivíduos com alta porcentagem de células anormais também têm pior sobrevida.

A trissomia 12 foi a primeira anormalidade cromossômica descrita associada a LLC. Isso ocorreu no final dos anos 70 e início dos 80 do século passado. Confere prognóstico desfavorável em relação ao cariótipo normal, e está associada a uma doença progressiva e uma morfologia de células atípicas (OSCIER, 1997; STILGENBAUER, 2000; TEFFERI, 1997).

A deleção do cromossomo 13q [del(13q)], que ocorre em 10% dos casos, é indicativa de sobrevida mais longa caracterizando uma doença benigna, cursando com uma linfocitose de progressão lenta (ESCUDIER *et. al*, 1993; JULIUSSON *et. al*, 1998; XUE *et. al*, 1993). Entretanto, mutação na região 13q14 vem sendo proposta como um gene candidato na LLC, pois nessa região está o gene do retinoblastoma (RB1) que é um gene supressor de tumor (WEINBERG, 1995). Essa mutação está associada a uma menor sobrevida comparada com os pacientes que não há possuem (STILGENBAUER, 2000).

A deleção do braço longo do cromossomo 11 pode ser encontrada em aproximadamente 25% dos pacientes virgens de tratamento, geralmente é intersticial e está relacionada a doença mais avançada. Esta deleção frequentemente promove a remoção da banda 11q23 localização do gene *ATM*. A deleção do braço longo do cromossomo 11 mostra uma típica linfadenopatia extensa, linfonodomegalia, rápida progressão e redução da sobrevida global, ou seja, um pior prognóstico (DÖHNER, 1997). Outra aberração cromossômica que pode ocorrer é a translocação t(11;14)(q13;q32) classificado como linfoma do manto onde ocorre um rearranjo entre o gene da ciclina D1(CCND1) (*Bcl1*) com o gene da IgH (STILGENBAUER, 2000).

Deleção do braço curto do cromossomo 17 é encontrado em 5-8% dos casos essa deleção geralmente inclui a banda 17p13.1 onde o gene *TP53* está localizado (HALLEK, 2015; 2010). Pacientes com LLC carregando a mutação no TP53 possuem um prognóstico muito ruim sendo classificado como de risco ultra alto (ZENZ, 2010). Esta aberração está particularmente associada com uma atípica morfologia celular, doença avançada, alta taxa de proliferação e curta sobrevida (CALIGARIS-CAPPIO, 1999). Pacientes portadores dessa mutação, geralmente possuem ausência de resposta a alquilantes, análogos de purina e rituximab (anti-CD20) (BYRD *et al*, 2004; SHANAFELT *et al*, 2004; STILGENBAUER *et al*, 2004).

Os genes TP53 e a ATM codificam proteínas envolvidas na sinalização de danos e reparo ao DNA (JACKSON, 2009). Intrigantemente, tanto as Del(17p) e

Del(11q) quanto as mutações em TP53 e ATM são freqüentes em pacientes com resistência secundária para quimioterapia de dano de DNA. (PUENTE, 2011; QUESADA, 2011)

Embora o envolvimento da região 14q32 fosse freqüente em estudos de cariótipo de LLC na década passada, atualmente considera-se que a $t(11;14)(q13;q32)$ com o rearranjo dos genes BCL1 ou CCND1 e IGH é marcadora de linfoma de zona do manto (JAFFE et al, 2001; RESNITZKY *et. al*, 1996;). A semelhança desta situação há outras translocações que envolvem 14q32, tais como a translocação $t(14;19)(q32;q13)$, hoje considerada como indicativa de linfoma leucemizado, e a translocação $t(14;18)$ de linfoma folicular. Entretanto, quando presente em LLC, o rearranjo da região 14q32 confere prognóstico favorável. A translocação $t(2;14)(p13;q32)$ é extremamente rara, assim como outras englobando esta região. A deleção $del(6q)$, +8q24, +3 e +18 são igualmente observadas em LLC, mas em menor número de casos (CHAUFFAILLE, 2005).

Apesar de todo esse arsenal molecular para o diagnóstico da LLC, é freqüente na prática clínico-laboratorial a saída de laudos inconclusivos para LLC, as chamadas LLC atípicas, onde as dúvidas mais comuns são entre o diagnóstico de linfoma folicular e o linfoma de células do manto, que possuem tratamentos e progressões diferentes. Essa inconclusividade ocorre, principalmente devido a resultados limítrofes na imunofenotipagem, logo tornando necessária a investigação citogenética molecular por FISH.

2.3 LINFOMA FOLICULAR

O Linfoma Folicular (LF) é o segundo linfoma mais comum, e corresponde a cerca de 25% de todos os linfomas não-Hodgkin (LNH), sendo o mais frequente nos países ocidentais. Na classificação REAL (Classificação e Revisão Europeia – Americana para Neoplasias Linfoides) (1994) é designado como "Linfoma do Centro Folicular", pois é composto de células normalmente encontradas nos centros germinativos, ou seja, centrocitos e centroblastos. Na histologia, o padrão de crescimento é, pelo menos parcialmente, nodular.

A imunofenotipagem é característica, mas não específica, com CD5 negativo e frequentemente CD10 positivo, podendo apresentar também CD23 positivo

(OLTEANU, 2011). A grande maioria tem presente a translocação t(14;18) e o rearranjo do gene *bcl-2*, que resulta na super expressão da proteína BCL-2, podendo com isso proteger a célula da apoptose. Dados *in vitro* sugerem que IL-4, TNF e IFN-g inibem a apoptose da célula LLC provavelmente devido a indução da expressão de *bcl-2* (BUSCHLE, 1993; DANCESEU, 1992; PANAYIOTIDIS, 1993; PANAYIOTIDIS, 1994)

A translocação t(14;18), que é a marca do LF, parece ser necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento tumoral. Mutações nas proteínas reguladoras do ciclo celular e outros eventos genéticos são associados com a evolução para neoplasia mais agressiva. A maioria dos pacientes apresenta-se com doença disseminada, incluindo o envolvimento da medula óssea, entretanto, muitos podem ser assintomáticos na época do diagnóstico (CHIATTONE, 2000).

2.4 LINFOMA DE CÉLULAS DO MANTO

Os linfomas de células do manto (LCM) são neoplasias linfoides usualmente disseminadas no momento do diagnóstico, que representam aproximadamente 6% dos linfomas não-Hodgkin (LNHs). São incuráveis e de comportamento agressivo, com sobrevida média de três a cinco anos. Os pacientes são, comumente, masculinos, com idade mediana de 60 anos, apresentando linfadenomegalia generalizada, esplenomegalia e infiltração da medula óssea. Pode haver envolvimento do trato gastrointestinal com múltiplos pólipos linfomatosos (CAMPOS *et. al*, 2009).

A LCM corresponde a uma neoplasia de célula B madura, periférica. Às suas características morfológicas somam-se a translocação t(11;14); *bcl-1*, rearranjo do gene ciclina D1, expressão forte da imunoglobulina M de superfície (SIgM) e IgD, CD5 positivo, CD20 positivo, CD23 negativo, CD10 negativo, CD43 positivo e CD103 negativo (DOBBIN *et al*. 2002).

Segundo Swerdlow (2016) que trata das atualizações estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde sobre as classificações das neoplasias linfóides, o linfoma de células do manto que apresenta uma clinica indolente esta subdividida em duas variantes. Uma das variantes apresenta geralmente baixa ou ausência de mutação na IGVH das células B e expressão SOX11, o que promove a um

comprometendo em linfonodos e outros sítios extra nodais. Entretanto quando ocorre mutação no IGVH e SOX11⁺ promove o surgimento de um linfoma de células do manto não-nodal o que leva, geralmente, a um comprometimento do sangue periférico, medula óssea e baço. Estes casos geralmente possuem uma clínica indolente, mas caso ocorra outras alterações como nas envolvidas na *TP53*, pode transformá-las e uma doença agressiva.

Narurkar (2016) mostra que o fator de transcrição neural 11 (SOX11) pode ser usado como um biomarcador específico para os casos de linfoma do manto que são ciclina D1 negativo, pois ocorre a expressão do SOX11 tanto nos casos de linfoma de células do manto com a ciclina D1 positiva quanto negativa.

2.5 TRATAMENTO PARA AS NEOPLASIAS HEMATOPOIÉTICAS

Para o tratamento das neoplasias hematopoiéticas utilizam-se os agentes citostáticos em monoterapia, como os agentes alquilantes que tem sido a primeira linha de frente no tratamento. Como exemplo tem-se o clorabucil que possui baixa toxicidade, baixo custo e pode ser de uso oral. Entretanto, estudos mostram que ele possui desvantagens em uso prolongado como, citopenia, mielodisplasia e leucemia aguda secundária. Porém, estudos recentes mostram que quando utilizado juntamente com anti-CD20 apresentam uma efetividade maior (HALLEK, 2015). Outro exemplo é a Bendamustina - Ácido butanóico 4-[5-[bis(2-cloroetil)amino] 1metilbenzimidazol-2-yl]. Quando comparado ao clorabucil, apresenta um aumento na resposta, mas uma maior toxicidade, porém na sobrevida global não há diferença (HALLEK, 2015).

Outro modo de tratamento é a utilização de anticorpo monoclonal anti-CD20. Ainda não se sabe com como ele atua, mas acredita-se que nos canais de cálcio. A utilização de anticorpos anti-CD20 como exemplo Rituximab e Ofatumumab (humanizado) tem ampliado as possibilidades de tratamento devido a morte das células que expressam CD20 em sua superfície através da ativação do complemento e da toxicidade celular dependente de anticorpo (HAGEMEISTER, 2010; HUHN, 2001; O'BRIEN, 2001; TEELING, 2006).

Uma nova forma de tratamento é o ataque a receptores de sinalização de células B. Os receptores de sinalização desempenham um importante papel na

sobrevivência das células de LLC. Vários receptores tem sido reconhecidos como marcadores de prognóstico na LLC, como o gene da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina (IgHv) e o receptor de células B (BCR). Isso pode explicar a inibição da sinalização do BCR e a nova e potente estratégia contra a LLC. Os receptores de sinalização na LLC estão amparados por diferentes tirosinas cinases como tirosina cinase de Bruton's (BTK), Tirosina cinase esplênica (Syk), ZAP70, família cinase da Src (em particular Lyn) bem como PI3K (HALLEK, 2015; WIESTNER, 2012). A expressão do Syk é aumentada na LLC tornando-se um promissor alvo terapêutico (HALLEK, 2015). A Btk é uma tirosina cinase citoplasmática que gera ativação e sobrevivência das células B assim como as vias NF- κ B e MAP cinases. Essas vias disparam um relevante papel na transdução de sinal do BCR (HERMAN, 2011). O Ibrutinib é um inibidor irreversível de Btk, induzindo apoptose em células de LLC e linfomas (HERMAN, 2011).

2.6 FAMÍLIA NTRK

Os Receptores Tirosina Quinase Neurotróficos (NTRK), são uma família de receptores transmembrânicos composta por três elementos que são proto-oncogênicos. Esses receptores quando ligam-se a fatores de crescimento chamados de neurofinas promovem a sobrevivência e a diferenciação das células neuronais (BARBACID, 1994; MARCHETT, 2008; NILSSON et al, 2009). As neurofinas tem ação paracrina e tem como representantes o Fator de Crescimento de Nervo (NGF); Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF); Neurotrofina3 (NT-3) e Neurotrofina 4 (NT-4) (BERKEMEIER, 1991; HOHN, 1990; IP, 1992; LEIBROCK, 1989; LEVI-MONTALCINI, 1996; MAISONPIERRE, 1990; NILSSON, 2009; ROSENTAL, 1990).

A família NTRK é composta por NTRK1, NTRK2 e NTRK3. O NTRK1 é também chamado de Receptor de tirosina cinase A (TrkA). Seu gene está localizado no cromossomo 1 mais precisamente na região 1q 23.1. O receptor é ativado por NGF e NT-3. O NTRK 2 também encontrado com o nome de Receptor de tirosina cinase B (TrkB), tem como localização o cromossomo 9 na região 9q 21.33. O NTRK2 é ativado pelo BDNF, NT-3 e NT-4. NTRK3 ou Receptor tirosina cinase C (TrkC), tem localização gênica no cromossomo 15 na região 15q 25.3, sendo o receptor ativado pelo NT-3 (SEGAL, 2003).

Quando há a interação ligante receptor ocorre no receptor uma dimerização e autofosforilação promovendo recrutamento de diferentes proteínas adaptadoras e enzimas. Esse processo leva a ativação da célula levando a sinalização para diversos alvos como PI3 cinase, via MAPK, fosfolipase C- γ e proteína cinase C (AREVALDO e WU, 2006; MARCHETTI, 2008). Todas essas vias são relatadas como relacionadas com a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. O NTRK pode disparar um importante papel na tumorigenese e progressão do tumor (MARCHETTI, 2008). Tem sido mostrado que a super-expressão de neurotrofina ou seus receptores é um evento comum em diferentes doenças neoplásicas. Alterações em NTRK pode representar um importante alvo para drogas inibidoras desse receptor (MARCHETTI, 2008; MIKNYOCZKI, 1999, YANG, 2005).

Alterações gênicas na família NTRK estão associadas a várias doenças. Em NTRK1 é visto anidrose, insensibilidade congênita a dor e também a vários cânceres como de pulmão com translocações com o gene *MPRIIP* (cromossomo 17), *CD74* (cromossomo 5).Tiróide com translocação com *TFG* (cromossomo 3) e inversão com o gene *TPM3* (Tropomiosina 3) e *TPR*. No Câncer de colo retal também já foi encontrado inversão com *TPM3*(MARCHETTI, 2008).

Alterações no NTRK2 promovem obesidade hiperfágica, retardo no desenvolvimento e vários tipos de câncer como neuroblastoma, de próstata e de colo retal. A literatura mostra que a inversão com o gene *NACC2* e a translocação com o gene *QKI* (cromossomo 6) está associado a cânceres no sistema nervoso central (WOOD, 2006).

As alterações em NTRK3 têm sido relatadas em cânceres de pulmão, mama, colo retal e de pâncreas. A translocação com o gene *ETV6* (cromossomo 12) está associado a vários tipos de cânceres como o de mama, rins, colo retal, glândula salivares, tiróide, pâncreas, trato urinário e tecido hematopoiético e linfóide (BARDELLI, 2003; DAVIES, 2005; MARCHETTI, 2008; STEPHENS, 2005, WOOD, 2006).

2.7 VITAMINA D

A vitamina D, ou colecalciferol, é um hormônio esteróide, cuja principal função consiste na regulação da homeostase do cálcio, formação e reabsorção óssea, através da sua interação com as paratireóides, os rins e os intestinos. (ARNSON, 2007) A principal fonte da vitamina D é representada pela formação endógena nos tecidos cutâneos após a exposição à radiação ultravioleta B (ARNSON 2007; BRINGHURST, 2008; LEVENTIS, 2008).

Uma fonte alternativa e menos eficaz de vitamina D é a dieta, responsável por apenas 20% das necessidades corporais, mas que assume um papel de maior importância em idosos, pessoas institucionalizadas e habitantes de climas temperados (BRINGHURST, 2008). Quando exposto à radiação ultravioleta, o precursor cutâneo da vitamina D, o 7-desidrocolesterol, sofre uma clivagem fotoquímica originando a pré-vitamina D₃. Essa molécula termolábil, em um período de 48 horas, sofre um rearranjo molecular dependente da temperatura, o que resulta na formação da vitamina D₃ (colecalciferol) (MARQUES, 2010)

A pré-vitamina D₃ também pode sofrer um processo de isomerização originando produtos biologicamente inativos (luminosterol e taquisterol) e esse mecanismo é importante para evitar a super produção de vitamina D após períodos de prolongada exposição ao sol (BRINGHURST, 2009)

O grau de pigmentação da pele é outro fator limitante para a produção de vitamina D, uma vez que peles negras apresentam limitação à penetração de raios ultravioleta (BRINGHURST, 2008).

A principal função da vitamina D consiste no aumento da absorção intestinal de cálcio, participando da estimulação do transporte ativo desse íon nos enterócitos (BRINGHURST, 2008; SZODORAY, 2008). Atua, também, na mobilização do cálcio a partir do osso, na presença do PTH, e aumenta a reabsorção renal de cálcio no túbulo distal (DELUCA, 2001; MARQUES, 2010).

A deficiência prolongada de vitamina D provoca raquitismo e osteomalacia e, em adultos, quando associada à osteoporose, leva a um risco aumentado de fraturas (RUIZ-IRASTORZA, 2008). Outras ações da vitamina D regulando positivamente a formação de osso incluem: inibição da síntese de colágeno tipo1; indução da síntese de osteocalcina; promoção da diferenciação, *in vitro*, de precursores celulares monócitos-macrófagos em osteoclastos (MARQUES, 2010).

A vitamina D parece interagir com o sistema imunológico através de sua ação sobre a regulação e a diferenciação de células como linfócitos, macrófagos e células *natural killer* (NK), além de interferir na produção de citocinas *in vivo* e *in vitro*. (MARQUES, 2010)

A vitamina D também está associada com a regulação da diferenciação celular, proliferação, apoptose, potencial metastático e angiogenese (BIKLE, 2009). Estudos sugerem que baixas concentrações séricas de 25-(OH) vitamina D pode estar associada com o aumento da incidência de câncer colo retal, mama entre outros cânceres (Chen, 2010; CREW, 2009; GARLAND, 2009; GORHAM , 2005; YIN, 2005) e um pior prognóstico nos cânceres de colorretal, mama, melanoma e pulmão (GOODWIN; 2009; NEWTON-BISHOP, 2009; NG, 2008; ZHOU, 2007). Testes *in vitro* com a vitamina D tem demonstrado a capacidade dessa vitamina de inibir a proliferação de células T CD4 ativadas para induzir células do linfoma folicular, bloqueando indiretamente o desenvolvimento do linfoma (HICKISHI, 1993). Aref (2013) mostra que a vitamina D tem se transformado em um fator prognostico na LLC e a deficiência está associada a um pior prognostico e uma curta sobrevivência global (MOLICA et al., 2012) . A deficiência de vitamina D também tem sido utilizado como fator prognostico no linfoma folicular (KELLY et al., 2014) e no linfoma difuso de células B (DRAKE et al., 2010).

3. JUSTIFICATIVA

As neoplasias linfóides, em especial a LLC, têm como característica acometer com mais freqüência indivíduos no final da idade adulta e início da idade senil.

Esse fato é de grande preocupação, principalmente no Brasil, pois é um país que tende a ser de maioria idosa em poucos anos, entretanto é uma nação em franco crescimento econômico, mas que ainda é carente em educação e saúde o que dificulta um diagnóstico precoce e mais preciso que poderia aumentar significativamente a sobrevida global do individuo acometido. Promovendo assim subsídios para o desenvolvimento de programas de melhor atendimento para esses pacientes.

Uma análise cromossômica nos casos atípicos de LLC é de extrema utilidade, pois além de diferenciar se a LLC atípica é um linfoma folicular ou linfoma de célula do manto que possuem tratamentos diferentes, é capaz indicar qual o melhor tratamento fornecer ao individuo.

Apesar desses benefícios da análise cromossômica, ainda não é uma tecnologia muito utilizada no Brasil, devido a dificuldades na aquisição de reagentes e de apoio das agências de fomento para a realização de pesquisas nessa área.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

- Estudar a produção de citocinas, a imunofenotipagem, a presença de aberrações cromossômicas e a quantificação de vitamina D em pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide crônica atípica.

4.1.1 Objetivos Específicos

- Levantar a prevalência de LLC atípica em dados de um serviço de referência em doenças hematológicas.
- Verificar o perfil imunofenotípico de pacientes com diagnóstico de LLC.
- Verificar a produção de citocinas em pacientes com LLC atípica.
- Verificar o perfil imunofenotípico de pacientes com LLC atípica.
- Verificar a presença de translocações cromossômicas 11:14 e 14:18, e outras aberrações cromossômicas em pacientes com diagnóstico de LLC atípica .
- Verificar a produção de vitamina D em pacientes com LLC atípica.
- Verificar a presença de alterações cromossômicas nos genes da família NTRK em pacientes com LLC atípica.

5. MANUSCRITO 1

LEVANTAMENTO DOS CASOS DE LLC CLÁSSICA E ATÍPICA DETERMINADA ATRAVÉS DA IMUNOFENOTIPAGEM EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA NO ESTADO DA BAHIA

5.1. INTRODUÇÃO

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é o tipo mais freqüente de leucemia em adultos nos países ocidentais, correspondendo de 25 a 30%. Acomete geralmente pessoas com média de idade de 50 anos, e uma presença ligeiramente maior no sexo masculino (1,7:1) (HALLEK, 2015; MOLICA, 2006; VASCONCELOS, 2005; WATSON, 2008;). Dados mostram que no Brasil tem-se a cada ano 0,8 novos casos para cada 100.000 habitantes (FARIA, 2000).

A doença é caracterizada por uma evolução clínica bastante heterogênea entre os indivíduos acometidos, com sobrevida que varia de alguns meses até algumas décadas (FARIA, 2000; VASCONCELOS, 2005). Cerca de 70% dos pacientes apresentam-se assintomáticos ao diagnóstico, e mais da metade destes não irá apresentar quaisquer evento secundário à doença hematológica. Por outro lado, os demais indivíduos costumam apresentar progressão da doença, demanda terapêutica e causas de morte relacionadas à LLC (DIGHIERO *et. al*, 1998; VASCONCELOS, 2005).

A LLC é uma doença onco-hematológica que caracteriza-se por um aumento no número de linfócitos B maduras no sangue e em órgãos imunes primários e secundários. Segundo o Workshop Internacional em LLC para o diagnóstico da LLC é necessário uma contagem absoluta de células B maior ou igual a 5000 células/uL ou $5 \times 10^9/L$ (CAMPO, 2008; SWERDLOW, 2016). Entretanto para um diagnóstico mais confiável torna-se necessário o estudo imunofenotípico dessas células e quando possível a análise celular por citogenética molecular.

As principais análises imunofenotípicas realizadas são CD5, CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, CD38, CD79b, CD200 e aumento da monoclonalidade da cadeia kappa ou lambda (SILVA L.B et al 2009; YEE, K.W, O'BRIEN, S.M, 2006). Os

indivíduos são classificados como positivos para LLC quando apresentam positividade para CD5, CD19, CD20, CD23, negatividade para CD10 e CD79b, podendo apresentar baixa expressão ou negatividade para CD22. As células também apresentaram uma maior monoclonalidade para a cadeia Kappa ou Lambda (SILVA, L.B. et al 2009; YEE KW, O'BRIEN, S.M., 2006).

Os CD19, CD20, CD22 são marcadores de células B, e CD79b o que está presente em células B de linfomas. O CD38 é um marcador de célula ativada que está presente na superfície de células LLC-B e sua expressão foi diretamente correlacionada com a não mutação da região variável da IGH. A expressão de CD38 é um indicador de mal prognóstico (FERRARINI M, CHIORAZZI N, 2004; SILVA L. B. et al. 2009).

O CD5 é um marcador de células T que também está presente em uma subpopulação de células B chamadas de B1. Células B maduras malignas na LLC e células do linfoma do manto também expressam esse marcador, tornando um importante marcador para diferenciar outras doenças onco hematológicas. A função biológica do marcador CD5 ainda é desconhecida, entretanto acredita-se que seja uma importante molécula de ativação para as células T já para as células B1 tenha uma função na autoimunidade (HAYAKAWA, K., HARDY R.R. 1988; LAVABRE-BRERTRAND T., *et. al*, 1994; MATUTES, E., 1995).

O CD23 é uma glicoproteína transmembrânica expresso em várias células hematopoiéticas (BONNEFOY , 1997; KIJIMOTO-OCHIAI , 2002), envolvido na regulação da produção de IgE, além de promover a sobrevivência de células B no centro germinativo (BONNEFOY, 1997; LIU, 1991). É um marcador usado para diferenciar entre LLC que geralmente é positivo, de linfoma do manto que geralmente é negativo (MATUTES, 1994; SCHLETTE, E., 2003). Entretanto a literatura mostra casos de linfoma folicular com CD23 também positivo (KATZENBERGER, 2009; OLTEANU, 2011; THORNS, 2007;).

O CD10 é uma enzima proteolítica que é expressa na superfície de células hematopoiéticas do centro germinativo é de linfomas derivado dessas células. Também conhecido como antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda (CALLA). Promove migração, crescimento e sobrevivência celular, contribuindo assim para o surgimento e progressão de neoplasias. Há uma forte associação entre expressão de CD10 e linfoma folicular (ALMASRI, N.M., 1998).

O CD200 é uma glicoproteína transmembrânica altamente conservada pertencente a superfamília das imunoglobulinas com papel imunossupressor e pró-tumoral. É expresso com relativa frequência em linfócitos B e T, células endoteliais, dendríticas e neurônios (BARCLAY, 2002; MOREAUX, 2006). Estudos mostram que há expressão de CD200 em LLC, linfoma linfocítico de pequenas células, leucemia mieloide aguda e mieloma múltiplo (MCWHIRTER, 2006; OLTEANU, 2011; TONKS, 2007). O receptor de CD200 está presente em células apresentadoras de antígeno de origem mieloide e em algumas populações de células T (WRIGHT, 2003). Pesquisas elucidaram que o CD200 transmite um sinal imunorregulatório quando ocorre a ligação com o receptor de CD200 levando a supressão das células T e da resposta imune (MOREAUX, 2006; OSMANA, 2014). Foi confirmado que a ativação do receptor de CD200 induz a diferenciação de linfócitos T para linfócitos Treg que regula a resposta Th1 e Th2 na zona tumoral, suprimindo a resposta antitumoral das células T (HOLMANNOVÁ, 2012; OSMANA, 2014).

Ao longo da literatura observa-se uma carência em estudos de LLC na população brasileira principalmente no estado da Bahia, logo esse trabalho tem como objetivo verificar a ocorrência dessa doença no estado baiano.

5.2. MATERIAIS MÉTODOS

A parte inicial desse trabalho caracterizou-se por um estudo descritivo, longitudinal, retrospectivo. Utilizou-se dados obtidos no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. A segunda parte do trabalho caracterizou-se pelas análises dos materiais biológicos dos pacientes, que ocorreram no mesmo laboratório. O LABIMUNO caracteriza-se por realizar testes para o diagnóstico de doenças onco-hematológica no Estado da Bahia. Os exames foram realizadas no período entre 2012 até 2015.

5.2.1. Análise Imunofenotípica por Citometria de Fluxo.

Para a determinação dos marcadores imunológicos foram utilizados anticorpos monoclonais, ligados a diferentes fluorocromos (FITC, RPE, PERCP), dirigidos contra antígenos de células B (CD19, CD20, CD22, CD79b, anti-IgM, anti-Kappa, anti-Lambda), células T (CD5), células ativadas CD23, CD25, CD38, CD200, e também o antígeno CALLA (CD10) Todos os anticorpos utilizados foram da empresa Becton Dickinson (BD) Biosciences. Após a incubação dos anticorpos com as células dos pacientes fez-se a análise pela citometria de fluxo, do qual quantificou as células e determinou a positividade quanto a negatividade dos marcadores, mediante ao preconizado pelo fabricante de cada anticorpo monoclonal.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Dados do Laboratório

Verificou-se que entre o período de 2012 a 2015 ocorreram 2819 atendimentos para exames no Labimuno relacionados a varias situações hematológicas, tendo uma média anual de aproximadamente 705 atendimentos. Os pacientes são oriundos de varias regiões do estado da Bahia.

Na análise dos dados foram excluídos os exames para avaliação da doença residual mínima, pois esses indivíduos já possuíam o diagnóstico de alguma patologia hematológica, estavam sob tratamento e o exame foi realizado para acompanhar a evolução. Logo, considerou-se somente casos novos diagnosticados. Verificou-se que, ao longo do período de estudo, que ocorreram 2049 diagnosticos sendo uma média anual de aproximadamente 512. Deste total anual 113 (22%) foram diagnosticados como LLC, onde 72 (14%) correspondeu ao diagnóstico da LLC clássica e 41 (8%) corresponderam ao diagnóstico de LLC atípica ou inconclusiva (Fig. 1). Essa inconclusividade ocorre, principalmente devido a resultados limítrofes na imunofenotipagem

MÉDIA ANUAL DE LLC NA BAHIA

■ LLC comum ■ LLC atípico ■ Outros

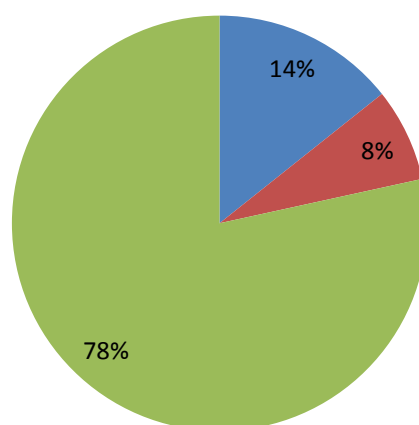


Figura1: Análise da media anual de ocorrências de Leucemia Linfóide Crônica (LLC) no Estado da Bahia

Esses resultados encontrados no Estado da Bahia corroboram com os dados relatados por Keating (2002), Yamamoto e Figueiredo (2005). Mostram que a LLC é a leucemia mais freqüente nos países ocidentais, ocupando 22 a 30% de todas as leucemias do adulto, sendo extremamente rara nos países asiáticos. A prevalência de LLC no centro de pesquisa estudo está em aproximadamente 3/100.000/ano. A incidência mundial está por volta de 4,2/100.000/ano (ALTEKRUSE et al, 2010; EICHHORST et al 2011). Essa diferença pode estar relacionada à miscigenação da população ou por nem todos os casos chegarem até o centro de referência onde foi feito o estudo.

Quando realizou-se a análise por ano, verificou-se que em 2012 ocorreram 456 novos casos de patologia onco-hematológica, sendo que 13% correspondeu ao diagnóstico de LLC clássica com perfil imunofenotípico característico da doença, 8% de LLC atípica e 79% de outras patologias hematológicas. Já no ano de 2013 observou-se 353 novos casos diagnosticados de patologias onco-hematológicas, com 17% de LLC clássica 10% de LLC atípica. Em 2014 verificou-se 562 casos sendo 12% de LLC clássica e 9% inconclusiva. No ano de 2015 verificou-se 678 diagnósticos sendo 15% LLC clássica e 4% inconclusivo (Fig. 2).

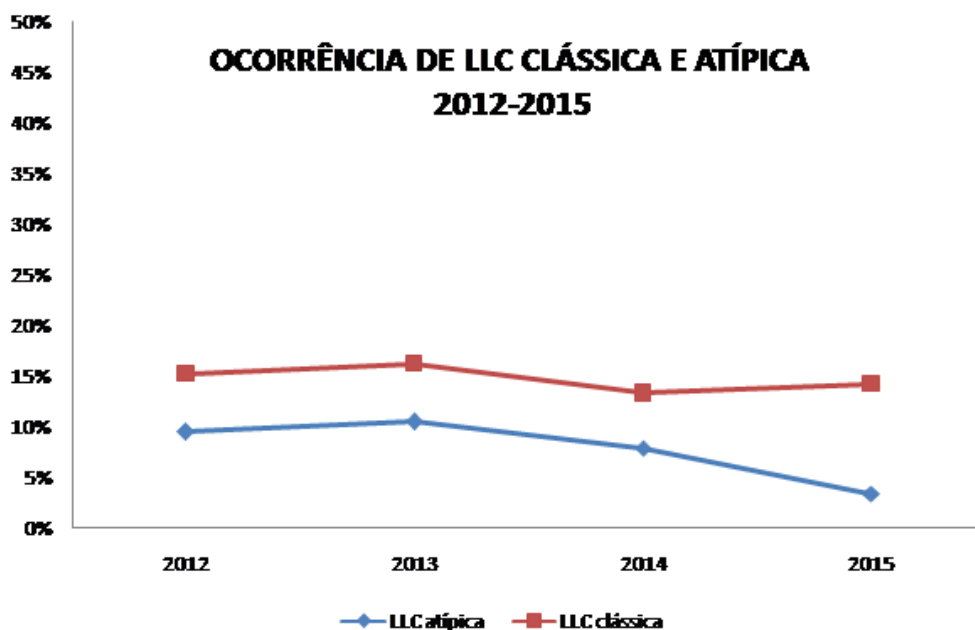


Figura 2: Análise da ocorrência anual de LLC comum e LLC atípica no período de 2012 – 2015 no Laboratório de imunologia e Biologia Molecular.

Para a obtenção desses resultados foi necessária a análise do material sanguíneo dos pacientes por citometria de fluxo, com o objetivo de obter o perfil imunofenotípico.

Os indivíduos controle, sem LLC, apresentam baixa expressão dos marcadores (menor que 25%), sendo classificados como não respondedores ou negativos (Fig 3 e 4). Os indivíduos classificados como LLC clássicos ou típicos possuíam o perfil com CD5, CD19, CD20, CD23 e CD200 positivo, tendo CD22, CD38, CD79b fracos e CD10 negativo. Esses resultados corroboram com o descrito por Silva, L.B., *et al* (2009).

Já os indivíduos classificados como atípicos ou inconclusivo possuíam o perfil com CD19, CD20 e CD79b positivos, podendo apresentar baixa expressão ou negatividade para CD22, negatividade para CD23, CD38 e CD200. O CD5 e CD10 podem se apresentar tanto como negativo ou positivo (Fig. 3 e 4). Em todos os casos as células também apresentaram uma maior monoclonalidade para a cadeia Kappa ou Lambda, pois apresentavam uma proporção de três ou mais moléculas de Kappa para uma de Lambda, ou duas ou mais moléculas de Lambda para uma de Kappa, (MARTI *et. al*, 2005).

IMUNOFENOTIPAGEM

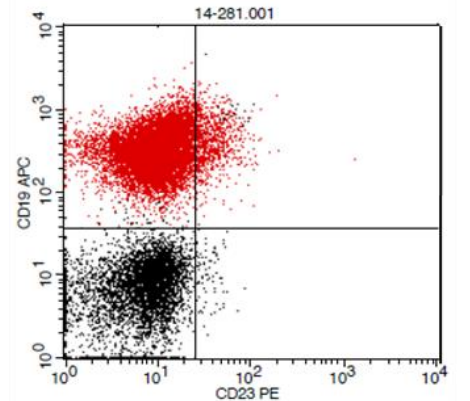
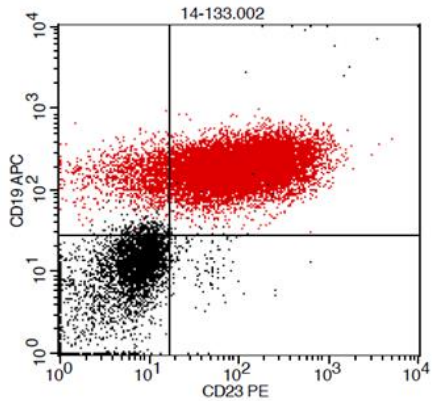
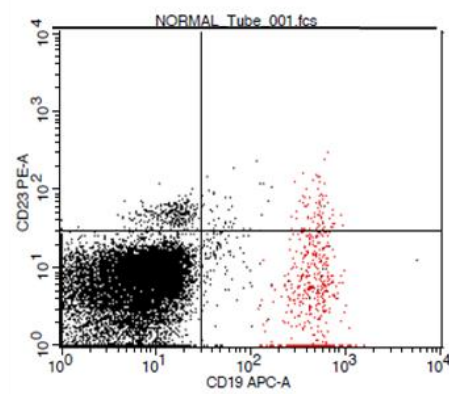
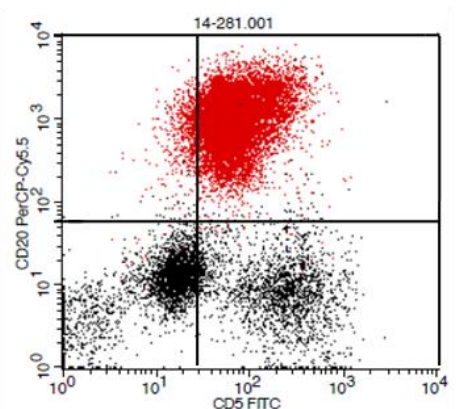
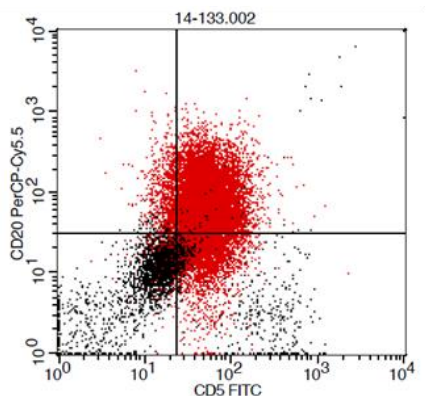
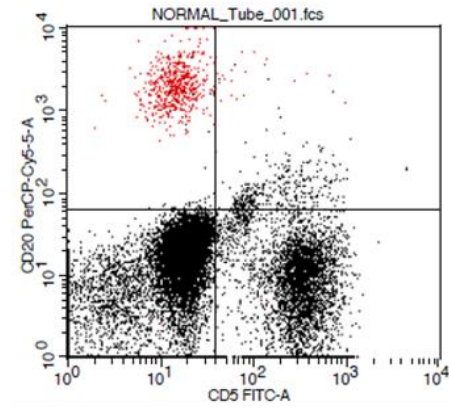
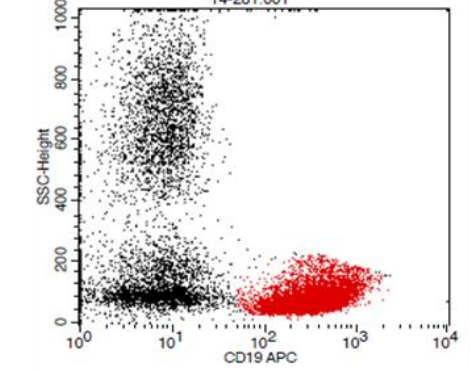
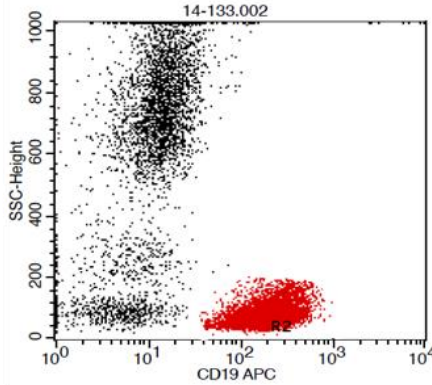
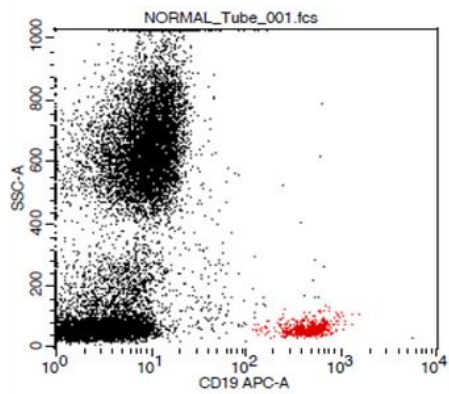
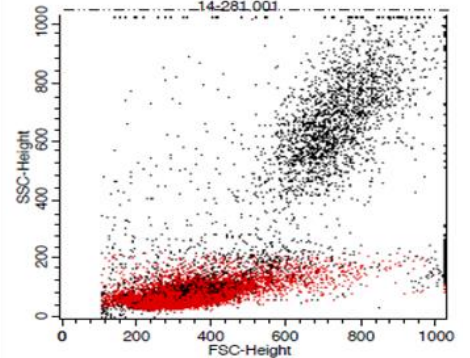
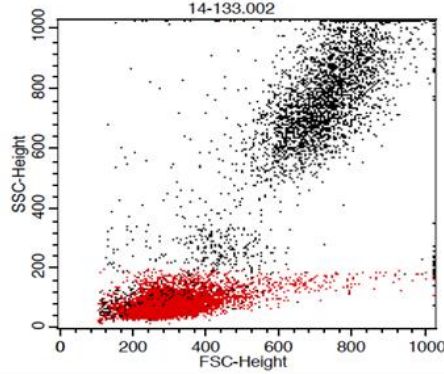
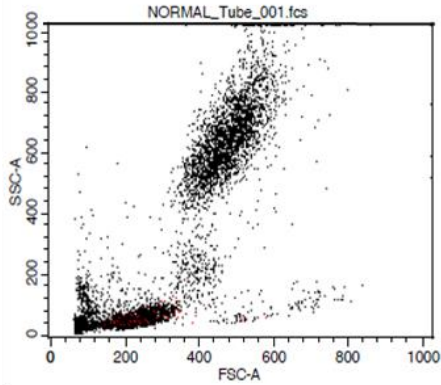
	CD5	CD10	CD19	CD20	CD22	CD23	CD38	CD79b	CD200	K ou L
Controle Sem LLC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LLC Clássica	Pos	Neg	Pos	Pos	Fraco	Pos	Fraco	Fraco	Pos	Pos
LLC Atípica	Pos ou Neg	Pos ou Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos

Figura 3: Painel dos marcadores da imunofenotipagem utilizados para a determinação da LLC. O grupo controle sem LLC mostra-se negativo pois apresenta menos de 20% de expressão dos marcadores. Os grupos com LLC clássica ou atípica apresentam expressão positiva, negativa ou fraca dependendo do marcador analisado.

**CONTROLE
SEM LLC**

LLC CLÁSSICA

LLC ATÍPICA



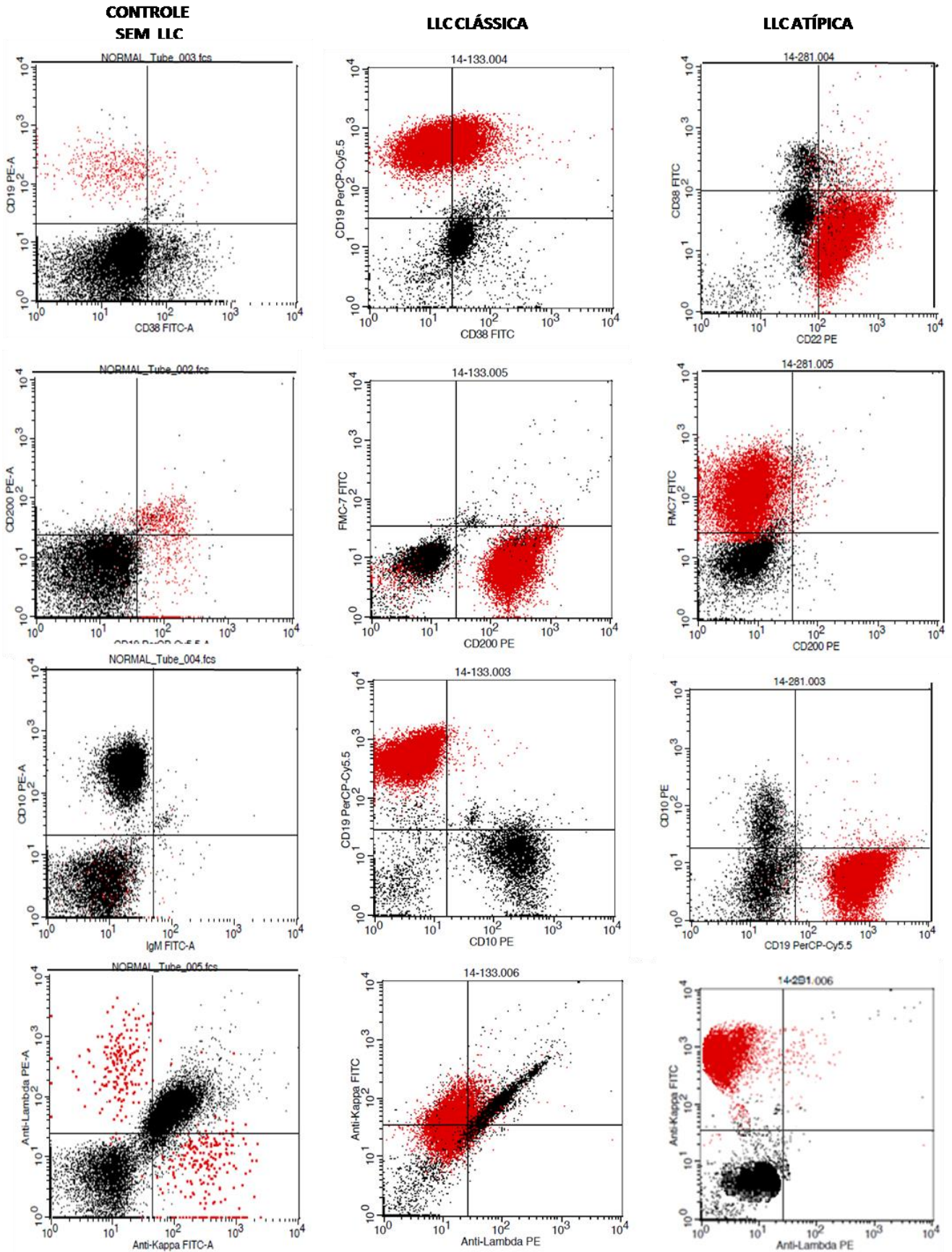


Figura 4: Imagens dos resultados da imunofenotipagem para controle negativo sem LLC, LLC clássica e LLC atípica. As imagens foram obtidas do FACSCalibur da BD.

Apesar de um arsenal de testes realizados para o diagnóstico imunofenotípico, ainda é alta a liberação de laudos inconclusivos, o que é preocupante, pois são liberados por ano uma média de 8% de diagnóstico atípico.

Quando esses resultados foram estratificados em relação ao gênero, verificou-se que do total analisado com diagnóstico de LLC, 55% corresponderam a homens e 45% a mulheres (Fig. 5). Observa-se também que para o diagnóstico de LLC atípica o gênero masculino apresenta-se ligeiramente maior, apresentando 23% contra 19% apresentado pelo gênero feminino.

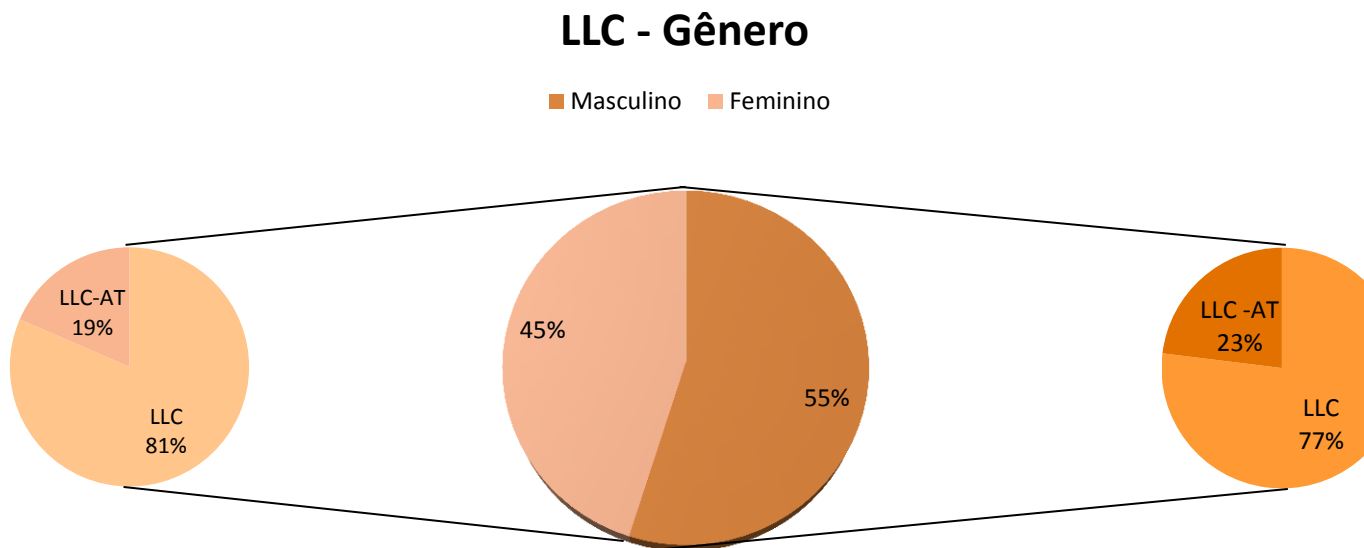


Figura 5: Representação da ocorrência de LLC por gênero e a sub-divisão em LLC típica e atípica dentro de cada gênero.

Com base na figura 6 verificou-se que do período avaliado a média de idade dos indivíduos ao diagnóstico foi de aproximadamente 69,7 anos. Entretanto a média mundial está por volta de 72 anos (ALTEKRUSE *et. al*, 2010; EICHHORST *et. al* 2011). Essa diferença provavelmente se deva a uma maior atenção a saúde na população estudada. A mediana obtida foi de 70 anos, e a moda de 70. Um indivíduo do gênero feminino apresentou a maior idade de diagnóstico que foi 109

anos e um do masculino a menor idade de diagnóstico que foi 29 anos. Provavelmente esse indivíduo possui alguma mutação que favoreça o aparecimento desta patologia, já que a LLC é uma doença predominantemente do idoso, com a idade mediana ao diagnóstico de 64-70 anos, e sendo rara a sua ocorrência em indivíduos com idade menor que 30 anos (YAMAMOTO E FIGUEIREDO, 2005).

	Geral	Masculino	Feminino
Média	69,68333	69,39055794	70,0481283
Mediana	70	70	70
Máx	109	99	109
Mín	29	29	35
Total	443	243	200

Figura 6: Representação da população estudada em relação ao gênero e a idade com distribuição da média, mediana, moda a maior idade de ocorrência de LLC e a menor idade.

Quando a frequência de diagnóstico de LLC foi realizada por intervalos de 10 em 10 anos, verificou-se que os intervalos com maior número de indivíduos foram entre 60-69 e 70-79. Quando separado por gênero, verificou-se que o intervalo 60-69 tem uma frequência maior nas mulheres e o intervalo 70-79 tem uma frequência maior nos homens. O que observa-se é um salto na ocorrência da doença nessa faixa etária no grupo feminino, onde na faixa de 50-59 seu número equivalente foi multiplicado por aproximadamente por 3 no grupo de 60-69 (Fig. 7) .

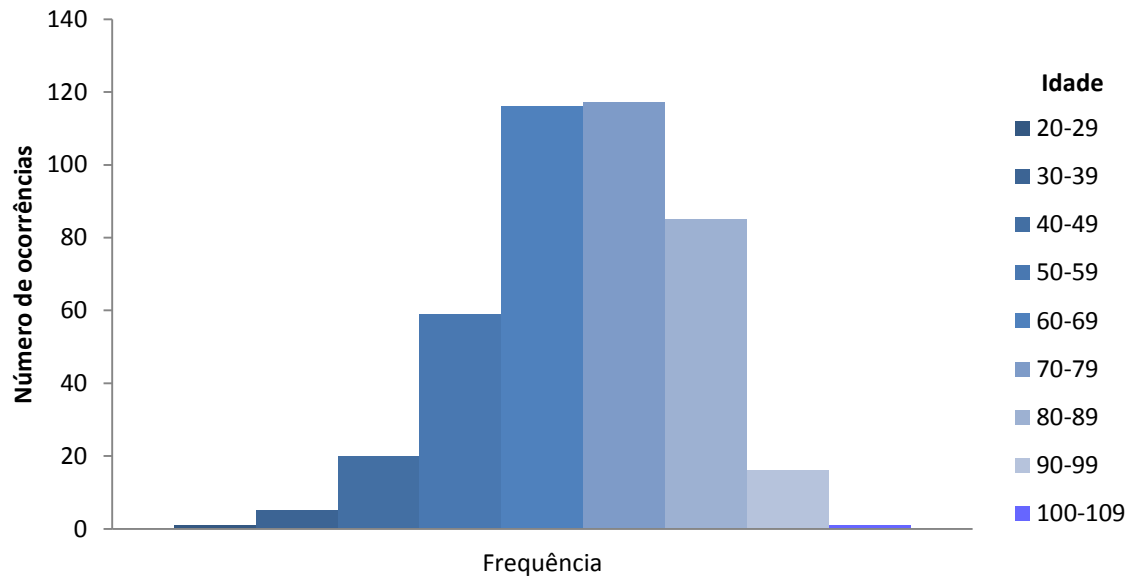
Esses resultados podem estar relacionados a uma atenção maior à saúde por parte das mulheres e/ou então devido ao término do período de reposição hormonal nas mulheres, mostrando que essa reposição pode conferir alguma proteção contra o desenvolvimento da LLC, pois no período da fase fértil a frequência de LLC é bem mais baixa quando comparada ao sexo masculino. Esse resultado corrobora com o que foi verificado nas associações de estudo do câncer americana quanto inglesa

(2013) onde mostram que as mulheres exibem baixa incidência de cânceres hematológicos (linfóide e mieloide), quando comparadas aos homens, sugerindo forte contribuição dos hormônios sexuais na predisposição para o desenvolvimento dessas doenças.

O estrógeno é um potente regulador de células hematopoiéticas maduras, tanto mielóide quanto linfóide. Além de outras células e tecidos o receptor de estrógeno é expresso em percussores de células B, células T CD8, no timo e no baço (KAWASHIMA et al., 1992; KUIPER et al., 1997; MOSSELMAN et al., 1996; SÁNCHEZ-AGUILERA et al 2014; SMITHSON et al., 1995; STIMSON, 1988;).

Estudo de Sánchez-Aguilera et al (2014), mostra que a regulação dos receptores de estrógenos pelo estrógeno ou por Moduladores Seletivos do Receptor de Estrogênio (SERM) nas células tronco hematopoiéticas promove multiplicação e sobrevivência dessas células. Entretanto, induz o bloqueio do desenvolvimento de células da neoplasia mieloproliferativa, bem como uma maior susceptibilidade à quimioterapia nas células indutoras de leucemia mielóide aguda. Neste estudo, utilizou-se como modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) o tamoxifeno, que nas células estudadas atuou como agonista do estrógeno, pois em outras células e tecidos, a exemplo do mamário, atua como antagonista.

Frequência Total



Frequência

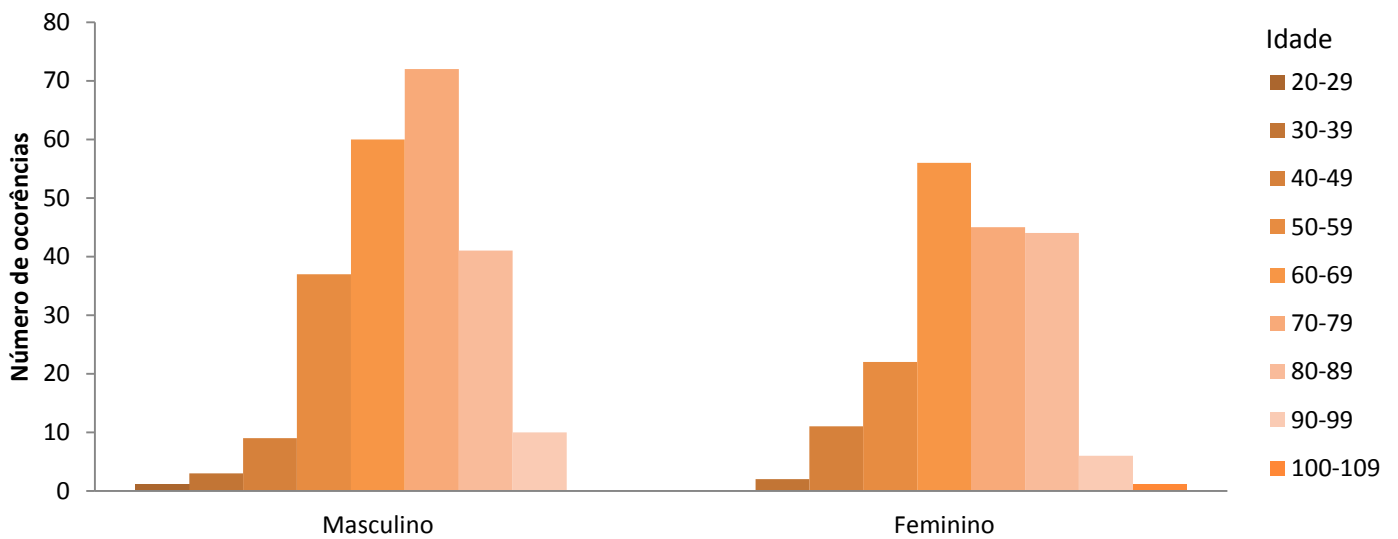


Figura 7: Distribuição da frequência estratificada em 10 em 10 anos. Gráfico superior frequência geral, gráfico inferior frequência analisada por gênero.

5.4. CONCLUSÃO

Analises inconclusivas ainda são altas e precisa-se de outras metodologias para a confirmação de diagnóstico pois assim poderia diferenciar o tratamento para esses pacientes de forma mais eficaz.

Pode-se verificar que os homens são mais acometidos pela LLC, entretanto, eles apresentam a manifestação da doença de forma mais tardia em relação as mulheres, que manifestam mais precocemente a doença, o que pode acontecer devido a baixa hormonal abrupta nas mulheres devido a menopausa, mostrando um possível potencial protetor dos hormônios sexuais.

Políticas públicas voltadas para a terceira idade precisam começar já no final da segunda idade visando proporcionar um diagnóstico precoce das doenças e garantindo, com isso um tratamento mais eficaz, aumentando assim as possibilidades de cura.

5.5. REFERÊNCIAS

ALMASRI NM1, ITURRASPE JA, BRAYLAN RC. **CD10 expression in follicular lymphoma and large cell lymphoma is different from that of reactive lymph node follicles.** *Arch Pathol Lab Med.* 1998 Jun;**122(6):539-44.**

BARCLAY AN, WRIGHT GJ, BROOKE G, BROWN MH. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol.* 2002; 23:285-290.

BONNEFOY JY, LECOANET-HENCHOZ S, GAUCHAT JF, et al. Structure and functions of CD23. *Int Rev Immunol.* 1997;16:113-128.

CAVALCANTI G. B. J. , *Acta Cirúrgica Brasileira - Vol 20 - Supl no 1 2005*

DIGHIERO G, MALOUM K, DESABLENS B et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1998;338(21):1.506-1.514.)

FARIA JR, DE OLIVEIRA JS, DELBONE DE FARIA RM et al. Prognosis related to staging systems for chronic lymphocytic leukemia. *Sao Paulo Med J* 2000;118(4):83-88.

FERRARINI M, CHIORAZZI N. Recent advances in the molecular biology and immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol.* 2004;41(3):207-23.

HALLEK M, TEFFERI A. CME Information: Chronic Lymphocytic Leukemia: 2015 Update on Diagnosis, Risk stratification, and Treatment. *American Journal of Hematology*, vol 90 No. 5 2015. doi: 10.1002/ajh.00046

Harris , N; Stein,E. Banks, P. et. al A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal From the International Lymphoma Study Group. 1994 *Blood*, Vol 84, No 5 (September 1),: pp 1361-1392

HAYAKAWA K, HARDY RR. Normal, autoimmune and malignant CD5+ B cells: The Ly-1 B lineage? *Ann Rev Immunol.* 1988; 6: 197-218.

Hickish T, Cunningham D, Colston K, et al. The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on lymphoma cell lines and expression of vitamin D receptor in lymphoma. *Br J Cancer* 1993;68(4):668-672.

HOLMANNOVÁ D, KOLÁCKOVÁ M, KONDÉLKOVÁ K, KUNES P, KREJSEK J, ANDRÝS C. CD200/CD200R paired potent inhibitory molecules regulating immune and inflammatory responses; part I: CD200/CD200R structure, activation, and function. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2012; **55:12–17.**

KATZENBERGER T, KALLA J, LEICH E, et al. A distinctive subtype of t(14;18)-negative nodal follicular non-Hodgkin lymphoma characterized by a predominantly diffuse growth pattern and deletions in the chromosomal region 1p36. *Blood*. 2009;113:1053-1061.

KAWASHIMA, I., SEIKI, K., SAKABE, K., IHARA, S., AKATSUKA, A., AND KATSUMATA, Y. 1992. Localization of estrogen receptors and estrogen receptor-mRNA in female mouse thymus. *Thymus* 20, 115–121.

KEATING MJ. Chronic Lymphocytic Leukemia. IN: ES Henderson, TA Lister & MF Greaves. *Leukemia* 7th edition, Saunders Co, Philadelphia, 2002, pp 656.

KIJIMOTO-OCHIAI S. CD23 (the low-affinity IgE receptor) as a C-type lectin: a multidomain and multifunctional molecule. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59:648-664.

KUIPER, G.G., CARLSSON, B., GRANDIEN, K., ENMARK, E., HA" GGBLAD, J., NILSSON, S., AND GUSTAFSSON, J.A. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863–870.

LAVABRE-BRERTRAND T, JANOSSY G, EXBRAYAT C, BOURQUARD P, DUPERRAY C, NAVARRO M. Leukemia-Associated changes identified by quantitative flow cytometry. CD5 Over expression and monitoring in B-CLL. *Leukemia* 1994; 8:1557-63.),

LIU YJ, CAIRNS JA, HOLDER MJ, et al. Recombinant 25-kDa CD23 and interleukin 1 alpha promote the survival of germinal center B cells: evidence for bifurcation in the development of centrocytes rescued from apoptosis. *Eur J Immunol*. 1991;21:1107-1114.

Marti, E.; Rawstron, A; Ghia, P; Hillmen, P; Houlston, R. S.; Kay, N; Schleinitz, T. A.; Caporaso, N. 2005 Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis . Blackwell Publishing Ltd, *British Journal of Haematology*, 130, 325–332 doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05550.x

MATUTES E, OWUSU-ANKOMAH K, MORILLA R, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994;8:1640-1645.

MATUTES E. Contribution of immunophenotyping in the diagnosis and classification of haemopoietic malignancies. *J Clin Pathol* 1995; 48:194-7.

MCWHIRTER JR, KRETZ-ROMMEL A, SAVEN A, MARUYAMA T, POTTER KN, MOCKRIDGE CI, et al. Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor

antigen that plays a key role in immunomodulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**:1041–1046.

MOLICA S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma* 2006;47:1477–1480.

MOREAUX J; HOSE D, REME T, JOURDAN E, HUNDEMER M, LEGOUFFE E, MOINE P, BOURIN P, MOOS M, CORRE J, MOHLER T, DE VOS J, FRANCOIS J. R, GOLDSCHMIDT H, KLEIN B. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *BLOOD*, 15 DECEMBER 2006 _ VOLUME 108, NUMBER 13 DOI 10.1182/blood-2006-06-029355.

MOSSELMAN, S., LOOIJENGA, L.H., GILLIS, A.J., VAN ROOIJEN, M.A., KRAFT, H.J., VAN ZOELLEN, E.J., AND OOSTERHUIS, J.W. 1996. Aberrant platelet-derived growth factor alpha-receptor transcript as a diagnostic marker for early human germ cell tumors of the adult testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2884–2888.

OLTEANU H; FENSKE T. S, ; HARRINGTON A. M; SZABO A ; HE P, ; KROFT, S. H. CD23 Expression in Follicular Lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2011;135:46-53 46 DOI: 10.1309/AJCP27YWLIQRAJPW

OLTEANU H, HARRINGTON AM, HARI P, KROFT SH. CD200 expression in plasma cell myeloma. *Br J Haematol* 2011; **153**:408–411.

OSMANA A. A., EISSAA D.G., MOUSSAB M. M. CD200 is an independent prognostic factor in multiple myeloma *Egyptian Journal of Haematology* 2014, Vol 39 No 3. DOI: 10.4103/1110-1067.148254

Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Wholegenome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011;475:101–105.

Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2011;44:47–52.

SÁNCHEZ-AGUILERA, A; ARRANZ, L; MARTÍN-PÉREZ, D; GARCÍA-GARCÍA, A; STAVROPOULOU, V; KUBOVCAKOVA, L; ISERN, J; MARTÍN-SALAMANCA, S; LANGA, X; SKODA, R. C; SCHWALLER, J, MÉNDEZ-FERRER, S. Estrogen Signaling Selectively Induces Apoptosis of Hematopoietic Progenitors and Myeloid Neoplasms without Harming Steady-State Hematopoiesis 2014, *Cell Stem Cell* 15, 791–804 December 4, 2014 ^a2014 Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2014.11.002>

SCHLETTE E; FU, K; MEDEIROS L. J. CD23 Expression in Mantle Cell Lymphoma: Clinicopathologic Features of 18 Cases. *Am J Clin Pathol* 2003;120:760-766 760 DOI: 10.1309/XV4AG7EMWQU7ER67

SILVA LB et al Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009;31(4):228-234

SMITHSON, G., MEDINA, K., PONTING, I., AND KINCADE, P.W. 1995. Estrogen suppresses stromal cell-dependent lymphopoiesis in culture. *J. Immunol.* 155, 3409–3417.

STIMSON, W.H. (1988). Oestrogen and human T lymphocytes: presence of specific receptors in the T-suppressor/cytotoxic subset. *Scand. J. Immunol.* 28, 345–350.

SWERDLOW, H., ELIAS CAMPO, STEFANO A. PILERI, NANCY LEE HARRIS, HARALD STEIN, REINER SIEBERT, RANJANA ADVANI, MICHELE GHIELMINI, GILLES A. SALLES, ANDREW D. ZELENETZ AND ELAINE S. JAFFE. The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016 :blood-2016-01-643569; doi:10.1182/blood-2016-01-643569

THORNS C, KALIES K, FISCHER U, et al. Significant high expression of CD23 in follicular lymphoma of the inguinal region. *Histopathology.* 2007;50:716-719.

TONKS A, HILLS R, WHITE P, ROSIE B, MILLS KI, BURNETT AK, DARLEY RL. CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2007; 21:566–568.

VASCONCELOS, Y. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia 2005

WATSON L, WYLD P, CATOVSKY D. Disease burden of chronic lymphocytic leukemia within the European Union. *Eur J Haematol* 2008;81:253–258.

WRIGHT GJ, CHERWINSKI H, FOSTER-CUEVAS M, et al. Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J Immunol.* 2003;171:3034-3046.

YAMAMOTO, M., FIGUEIREDO, V. L. P. Epidemiology of chronic lymphocytic leukemia and familial chronic lymphocytic leukemia 2005

YEE KW, O'BRIEN SM. Chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2006;81(8):1105-29.

6. MANUSCRITO 2

ESTUDO DE PACIENTES PORTADORES DE LLC ATÍPICA QUANTO A PRESENÇA DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS, PRODUÇÃO DE CITOCINAS E VITAMINA D

6.1. INTRODUÇÃO

A leucemia linfóide crônica (LLC) é uma neoplasia de linhagem B, sendo a mais frequente nos países ocidentais, correspondendo a cerca de 30% das leucemias do adulto (HALLEK *et. al*, 2010).

A LLC caracteriza-se pela proliferação e acúmulo de pequenas células B maduras, no sangue, medula óssea, linfonodos e baço (ROSSMAN, 1995). Mais de 99% das células LLC circulantes estão na fase G0 do ciclo celular (ANDREEFF, 1980). Anormalidades cromossômicas têm sido observadas em 40%-50% das LLC pelo cariótipo convencional (HALLEK *et al*, 1997), enquanto por FISH em cerca de 80% (DOHNER *et al*, 2000; JULIUSSON *et al*, 1998). A razão para isto é que a FISH permite a detecção de anormalidades específicas, ou seja, no alvo predeterminado e suplantando o empecilho maior da citogenética clássica, que é o fato dos linfócitos B malignos permanecerem fora da fase de divisão (G0/G1) (CHAUFFAILLE, 2005).

Pacientes com anormalidades cromossômicas têm sobrevida menor que aqueles com cariótipo normal, que respondem significativamente melhor à quimioterapia (HAN *et al*, 1988). Aqueles com anomalias complexas (mais de três anormalidades) têm pior sobrevida e apresentam doença mais agressiva. Indivíduos com alta porcentagem de células anormais também têm pior sobrevida.

As anormalidades que geralmente ocorrem na LLC são a trissomia do cromossomo 12 (HAN, 1984; CALIGARIS-CAPPIO, 1999), as deleções e translocações no braço longo do cromossomo 13 (13q14) e as deleções do 11q23 (DOHNER, 1995) e do 6q (OFFIT,1993; CALIGARIS-CAPPIO, 1999), além das alterações envolvendo translocações do braço longo do cromossomo 14 (t(14q)) e a deleção do braço curto do cromossomo 17 [del(17p)], todas essas anormalidades

perfazem cerca de 60% das alterações. (HALLEK et al, 1997; JULIUSSON et al, 1998). É freqüente na prática clínico-laboratorial os resultados inconclusivos para LLC, chamadas de LLC atípicas, onde a dúvida mais comuns são entre linfoma folicular e o linfoma de células do manto, que possuem tratamentos e progressão diferentes.

O Linfoma Folicular (LF) corresponde a cerca de 25% de todos os linfomas não-Hodgkin (LNH), sendo o mais frequente nos países ocidentais. A imunofenotipagem é característica, mas não específica, com CD5 negativo e frequentemente CD10 positivo, podendo apresentar também CD23 positivo (OLTEANU, 2011). A grande maioria tem presente a translocação t(14;18) e o rearranjo do gene bcl-2, que resulta na super expressão da proteína BCL-2, podendo com isso proteger a célula da apoptose (BUSCHLE, 1993; DANCESEU, 1992; PANAYIOTIDIS, 1993; PANAYIOTIDIS, 1994). Mutações nas proteínas reguladoras do ciclo celular e outros eventos genéticos são associados com a evolução para neoplasia mais agressiva. A maioria dos pacientes apresenta-se com doença disseminada, incluindo o envolvimento da medula óssea, entretanto, muitos podem ser assintomáticos na época do diagnóstico (CHIATTONE, 2000).

Os linfomas de células do manto (LCM) representam aproximadamente 6% dos linfomas não-Hodgkin (LNHs). São incuráveis e de comportamento agressivo, com sobrevida média de três a cinco anos. Os pacientes são, comumente, masculinos, com idade mediana de 60 anos, (CAMPOS *et. al*, 2009). A LCM corresponde a uma neoplasia de célula B madura, periférica. Às suas características morfológicas somam-se a translocação t(11:14); bcl-1, rearranjo do gene ciclina D1, expressão forte SIgM e IgD, CD5 positivo, CD20 positivo, CD23 negativo, CD10 negativo, CD43 positivo e CD103 negativo (DOBBIN et al. 2002).

Essa inconclusividade ocorre, principalmente devido a resultados limítrofes na imunofenotipagem, o que torna necessária a utilização da técnicas moleculares como a citogenética molecular tendo como exemplo a Hibridação *In Situ* por Fluorescência (FISH). Costa-Silva et. al (dados ainda não publicados), verificaram que em 2049 diagnósticos de alguma doença hematológica 22% correspondeu ao diagnóstico de LLC e desse resultado 8% correspondia a LLC atípica o estudo foi realizado em um centro de referência em diagnóstico de doenças hematológicas na cidade de Salvador.

Os estudos de Burger et al. (2002) e Rozovski et al. (2013) mostram que na LLC ocorre uma elevação de diferentes citocinas com ações sobrepostas e antagônicas o que pode contribuir direta ou indiretamente para a sobrevivência das células LLC. Logo a análise da produção de citocinas nos casos atípicos da leucemia linfóide crônica poderá auxiliar na definição dos casos inconclusivos, e transformar a dosagem de citocinas em uma ferramenta de diagnóstico e/ou prognóstico.

A vitamina D, ou colecalciferol, é um hormônio esteróide, cuja principal função consiste na regulação da homeostase do cálcio, formação e reabsorção óssea. (ARNSON, 2007). A principal fonte da vitamina D é representada pela formação endógena nos tecidos cutâneos após a exposição à radiação ultravioleta. O grau de pigmentação da pele, a exemplo a pele negra, é um fator limitante para a produção de vitamina D, devido a limitação à penetração de raios ultravioleta (ARNSON 2007; BRINGHURST, 2008; LEVENTIS, 2008). A dieta é responsável por apenas 20% das necessidades corporais, mas que assume um papel de maior importância em idosos, pessoas institucionalizadas e em habitantes de climas temperados (BRINGHURST, 2008).

A deficiência prolongada de vitamina D provoca raquitismo e osteomalacia e, em adultos, quando associada à osteoporose, leva a um risco aumentado de fraturas (RUIZ-IRASTORZA, 2008). A vitamina D também está associada com a regulação da diferenciação celular, proliferação, apoptose, potencial metastático e angiogênese (BIKLE, 2009). Estudos sugerem que baixas concentrações séricas de 25-(OH) vitamina D pode estar associada com o aumento da incidência de câncer colo retal, mama entre outros cânceres além de fator de pior prognóstico na LLC. (CHEN, 2010; CREW, 2009; GARLAND, 2009; GORHAM , 2005; MOLICA et al., 2012; YIN, 2005. O estudo da vitamina D mostra-se importante pois, poderá auxiliar no entendimento e/ou classificação dos casos de LLC atípica .

A definição do diagnóstico das LLC é importante pois o tratamento de escolha difere quanto ao tipo de leucemia/linfoma. Sendo assim, um maior conhecimento dessas LLC atípicas contribuirá para diminuição desses casos não definidos. O presente estudo teve como meta analisar a presença de aberrações cromossômicas, avaliar a produção de citocinas e dosagem de vitamina D, objetivando ampliar o entendimento e caracterização dos casos atípicos.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1. Análise Imunofenotípica por Citometria de Fluxo

Para a caracterização da população com LLC atípica utilizou-se anticorpos monoclonais, ligados com diferentes fluorocromos (FITC, RPE, PERCP), dirigidos contra antígenos de células B (CD19, CD20, CD22, CD79b, anti-IgM, anti-Kappa, anti-Lambda), células T (CD5), células ativadas CD23, CD25, CD200, e também foi utilizado o antígeno CALLA (CD10). Todos os anticorpos utilizados foram da empresa Becton Dickinson (BD) Biosciences. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACScalibur [Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA USA (BD)] e analisadas no programa CellQuest (BD).

6.2.2. Identificação de oito Aberrações Cromossômicas em Células de Indivíduos com LLC Atípica - Análise por Hibridação *In Situ* por Fluorescência (FISH) para as Sondas, MYB, Trissomia do 12, Deleção da ATM, Translocação (14;18), Quebra do 14, Deleção do P53, Translocação (11;14), Deleção do 13

Células de 16 pacientes com diagnóstico inconclusivo de LLC e células de 6 indivíduos saudáveis foram submetidos ao teste de FISH para a identificação de 8 aberrações cromossômicas totalizando um número de 22 pacientes. Foi utilizado o kit Cytocell Chromoprobe Multiprobe CLL, e seguido o protocolo estabelecido pelo fabricante. Os indivíduos que apresentassem anormalidade cromossômica acima de 25% após a contagem de 100 núcleos esses seriam considerados positivos.

6.2.3. Dosagem de Citocinas

Foi realizada a dosagem de citocinas pelo kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine no plasma de seis indivíduos controle sem LLC, dezesseis indivíduos com diagnóstico de LLC atípica e de cinco indivíduos com LLC clássica totalizando 27 indivíduos. A coleta foi realizada uma única vez, após o

diagnóstico de LLC para verificar o comportamento dessas citocinas. Utilizou-se o plasma de cinco indivíduos com LLC clássica com o objetivo de comparação.

O kit possuía a capacidade de detectar e quantificar simultaneamente sete citocinas que são IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , IL-17 que foram dosadas em cada amostra de plasma dos pacientes, seguindo-se o protocolo fornecido pelo fabricante.

6.2.4. Dosagem de Vitamina D

Para a realização da dosagem de vitamina D foi utilizado o plasma dos 27 participantes. A dosagem realizada foi a da 25-OH vitamina D que é a principal forma de armazenamento da vitamina D, e que está presente no sangue numa concentração 1000 vezes maior, e com uma meia vida de 2 a 3 semana quando comparado com a forma ativa que é a 1,25 – (OH)₂ – vitamina D, que tem uma meia vida de 4 horas. O protocolo utilizado foi o estabelecido pelo fabricante do kit ABBOTT ARCHITECT 25-OH Vitamin D, que é através do teste de imunoensaio por quimioluminescência.

6.2.5. Análise Estatística

Para a dosagem de citocinas realizou-se o Análise de variância (ANOVA) com correção de Dunnett, estabelecendo significância estatística quando o p valor foi menor que 0,05 ou 0,01. Para o estudo da produção de vitamina D utilizou-se ANOVA com correção de Tukey estabelecendo significância estatística quando o p valor foi menor que 0,05

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Característica dos Pacientes

Com a análise dos resultados verificou-se que 68% (11 indivíduos) dos casos de LLC atípicas corresponde ao gênero masculino e 32% (5 indivíduos) ao feminino. Esses resultados corroboram com os dados apresentados por Hallek, (2015) e Molica (2006) que evidenciam na análise da LLC entre os gêneros, que o gênero masculino geralmente é mais freqüente.

6.3.2. Imunofenotipagem

O painel para a imunofenotipagem mostrou que para os indivíduos atípicos estudados, 12 apresentaram positividade para os três principais marcadores de células B (CD19, CD20, CD22) e o marcador CD79b, que está presente em células B de linfomas. Verificou-se que nove indivíduos apresentaram positividade pra o marcador CD5, sendo que desses, oito também apresentavam positividade para todos os outros marcadores de células B. Pelo menos 1 marcador de células ativadas (CD23, CD38 e CD200) esteve presente em 13 indivíduos. Quando analisada o marcador CALLA (CD10) verificou que quatro indivíduos apresentaram o marcador positivo, sendo que um apresentou CD10 e CD5 positivos simultaneamente. Observou-se que nos pacientes estudados a cadeia leve Kappa foi mais presente.

Apesar desses pacientes possuírem resultado de LLC atípica, eles foram separados em grupos de acordo com a suspeitas como pode-se observar no quadro 1. O primeiro grupo tinha suspeita de linfoma de manto, pois esses indivíduos possuíam CD5 positivo ou fraco, CD23 negativo ou fraco, além de CD200 e CD10 negativos. O outro grupo foi o dos suspeitos de linfoma folicular, pois apresentavam CD5 e CD23 negativos ou fracos, com CD200 e CD10 positivos. O último grupo foi intitulado de inconclusivo, pois não se consegue enquadrar e nenhum dos grupos, pois apresentam indivíduos com CD5 positivo, bem como CD200 e CD10, ou são negativos para CD5 e CD10, entre outros arranjos.

PACIENTE		CD19	CD20	CD22	CD79b	CD5	CD23	CD38	CD200	CD10	CADEIA LEVE	SUSPEITA
7	M	+	+	+	+	Fr	Fr	-	-	-	KAPPA	LINFOMA DO MANTO (LM)
8	M	+	+	+	+	+		+	-	-	KAPPA	
18	F	+	+	+	+	+	-	-	-	-	KAPPA	
22	M	+	+	+	+	+	-	+	-	-	LAMBDA	
10	F	+	+	+	+	+	-	+	-	-	KAPPA	
9	M	+	+	+	+	-	Fr	-	+	+	LAMBDA	LINFOMA FOLICULAR (LF)
15	M	+	+	+	+	Fr	-	+	+	+	LAMBDA	
11	F	+	+	+	+	+	-	+	+	+	LAMBDA	INCONCLUSIVO
12	F	+	+	+	+	-	-	+	Fr	-	KAPPA	
13	F	+	-	Fr	Fr	Fr	Fr	Fr	+	+	KAPPA / LAMBDA	
14	M	+	+	+	+	-	Fr	-	Fr	-	KAPPA	
17	M	+	Fr	+	Fr	-	+	-	Fr	-	LAMBDA	
19	M	+	+	+	+	+	+	-	+	-	KAPPA	
23	M	+	+	+	+	+	+	+	+	-	KAPPA	
24	M	+	Fr	+	+	+	+	-	+	-	KAPPA	
25	F	+	+	+	Fr	+	Fr	-	+	-	KAPPA	

Quadro 1: Painel dos marcadores da imunofenotipagem utilizados para a determinação da LLC. Mostrando o perfil atípico e as suspeitas diagnóstica..

Essa gama de possibilidades já é prevista na literatura, entretanto não possibilita o fechamento do diagnóstico de qual doença onco-hematológica que o indivíduo apresenta. Rego et al. (2009) apresenta uma lista de doenças possíveis como Leucemia linfóide crônica, Linfoma de manto, Leucemia prolinfocítica, Linfoma B da zona marginal, Linfoma difuso de grandes células B, Linfoma linfoplasmático, Linfoma folicular, Linfoma de Burkitt, Leucemia de células pilosas, Linfoma folicular CD10- e Linfoma do manto CD5-. Devido a essa gama de variações torna-se necessário a realização do teste de FISH para o fechamento do diagnóstico do paciente.

6.3.3. Análises Cromossômicas

Com base nos resultados da imunofenotipagem realizou-se, com base na técnica do FISH, as análises cromossômicas para a trissomia do cromossomo 12, deleção do braço longo do cromossomo 13, deleção do braço longo do cromossomo 11 (ATM), translocação (11;14), translocação (14;18), deleção do P53 e quebra do cromossomo 14.

A trissomia do cromossomo 12, primeira anormalidade cromossômica associada a LLC, foi descrita no final dos anos 70 e início dos 80 do século passado. Confere prognóstico desfavorável em relação ao cariótipo normal, está associada a uma doença progressiva e uma morfologia células atípicas (OSCIER, 1997; TEFFERI, 1997; STILGENBAUER, 2000).

A deleção do cromossomo 13 del(13q), que ocorre em 10% dos casos, é indicativa de sobrevida mais longa caracterizando uma doença benigna cursando com uma linfocitose de progressão lenta (ESCUDIER et al, 1993; XUE et al, 1993; JULIUSSON et al, 1998). Entretanto uma mutação principalmente na região 13q14 vem sendo proposta como um gene candidato na LLC, pois nessa região está o gene do retinoblastoma (RB1) que é um gene supressor de tumor (WEINBERG, 1995). Essa mutação está associada a uma menor sobrevida comparada com os pacientes que não há possuem(STILGENBAUER, 2000).

A deleção do braço longo do cromossomo 11 pode ser encontrada em aproximadamente 25% dos pacientes virgens de tratamento e está relacionada a

doença mais avançada. Esta deleção frequentemente promove a remoção da banda 11q23 onde está localizado o gene *ATM*. A deleção do braço longo do cromossomo 11 tipicamente mostra uma extensa linfadenopatia, linfonodomegalia, rápida progressão e redução da sobrevida global, ou seja, um pior prognóstico (DÖHNER, 1997). Outra aberração cromossômica que pode ocorrer é a translocação t(11;14)(q13;q32) classificado como linfoma do manto onde ocorre um rearranjo entre o gene da ciclina D1(CCND1) (*Bcl1*) com o gene da IgH (STILGENBAUER, 2000).

A deleção do braço curto do cromossomo 17 é encontrada em 5-8% dos casos e ela geralmente inclui a banda 17p13.1 onde o gene *TP53* está localizado (Hallek, 2010, 2015). Pacientes com LLC carregando a mutação no TP53 possui um prognóstico muito ruim sendo classificado como de risco ultra alto(ZENZ, 2010). Esta aberração está particularmente associada com uma morfologia celular atípica, doença avançada, alta taxa de proliferação e curta sobrevida(CALIGARIS-CAPPIO, 1999). Pacientes portadores dessa mutação, geralmente possuem ausência de resposta a alquilantes, análogos de purina e rituximab(anti-CD20)(BYRD et al, 2004; SHANAFELT et al, 2004; STILGENBAUER et al, 2004).

A TP53 e ATM codificam proteínas envolvidas na sinalização de danos e reparo ao DNA (JACKSON, 2009). Intrigantemente tanto as Del(17p) e Del(11q) quanto as mutações na TP53 e ATM são freqüentes em pacientes com resistência secundária para quimioterapia de dano de DNA.

Embora o envolvimento da região 14q32 fosse freqüente em estudos de cariótipo de LLC, atualmente considera-se que a t(11;14)(q13;q32) com o rearranjo dos genes *BCL1* ou *CCDN1* e *IGH* é marcadora de linfoma de zona do manto (RESNITZKY et al, 1996; JAFFE et al, 2001). À semelhança desta situação há outras translocações que envolvem 14q32, tais como a t(14;19)(q32;q13), hoje considerada como indicativa de linfoma leucemizado, e a t(14;18), linfoma folicular. Entretanto, quando presente em LLC, o rearranjo da região 14q32 confere prognóstico favorável. A t(2;14)(p13;q32) é extremamente rara, assim como outras englobando esta região. A del(6q), +8q24, +3 e +18 são igualmente observadas em LLC, mas em menor número de casos (CHAUFFAILLE, 2005).

Quando realizou-se o teste FISH, observou-se que ele conseguiu concluir aproximadamente 87% dos casos de LLC atípicos, identificando pelo menos uma alteração cromossômica. Esses dados equiparam-se aos encontrados por Dohner *et. al.* (2000), quando compara resultados obtidos por cariotipagem convencional e pelo FISH. A aberração cromossômica mais presente foi a translocação 11:14 caracterizando o linfoma do manto o que correspondeu a aproximadamente 50% dos resultados encontrados seguida da trissomia do cromossomo 12 com 25%, deleção do P53 (cromossomo 17) com 18,75%, quebra do cromossomo 14 com 18,75%, deleção do cromossomo 13 com 12,5% e linfoma folicular com 12,5% dos resultados. A soma das porcentagens ultrapassam 100% pois alguns indivíduos possuíam múltiplas aberrações cromossômicas. No presente estudo, não foram observadas deleções do MYB (cromossomo 6), nem deleções do ATM (Cromossomo 11). Na figura 3 é possível observar alguns resultados positivos obtidos através do FISH.

Quando realizada a análise da frequência de ocorrências das aberrações cromossômicas, verificou-se que 39% corresponderam a translocação 11:14 . A trissomia do cromossomo 12 correspondeu a 17%. Para a deleção do p53, e quebra do cromossomo 14 foram encontrados o mesmo valor de 13%, para a deleção do 13, bem como, para a translocação 14:18 encontrou-se o valor de 9% (Fig.1) .

DISTRIBUIÇÃO DAS ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

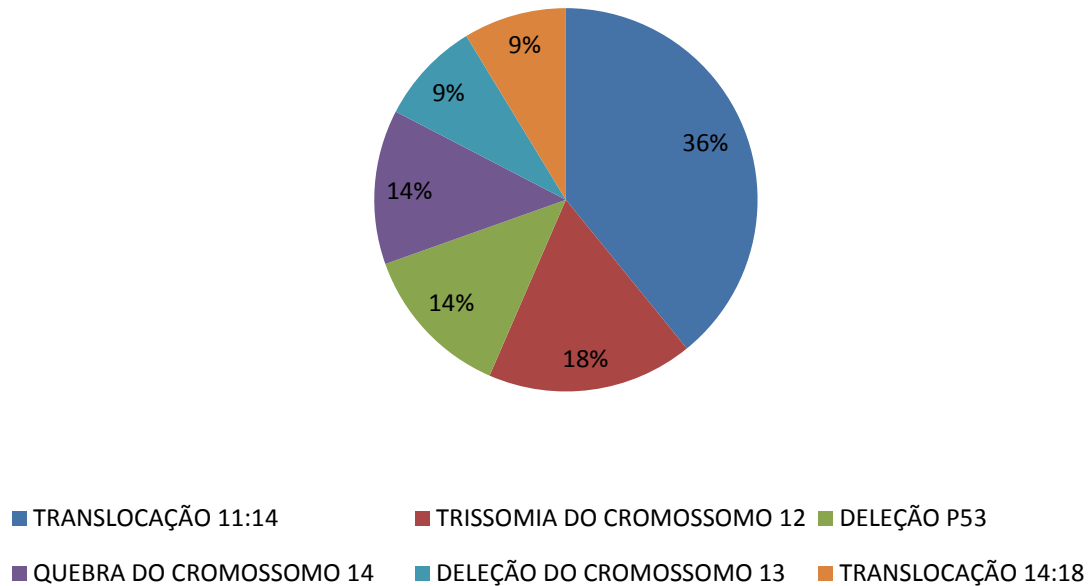


Figura 1: Distribuição das aberrações cromossômicas encontradas após o teste FISH

A análise dos resultados do FISH que estão representados no quadro 2 mostrou que dez pacientes apresentaram uma única aberração cromossômica, sendo que, quatro apresentaram a translocação 11:14, o que caracteriza o paciente como possuidor do linfoma do manto; três possuíam deleção do p53; um paciente possuía a translocação 14:18, que é característico de linfoma folicular; um paciente foi positivo para a trissomia do cromossomo 12; e um paciente possuía positividade para a deleção do cromossomo 13.

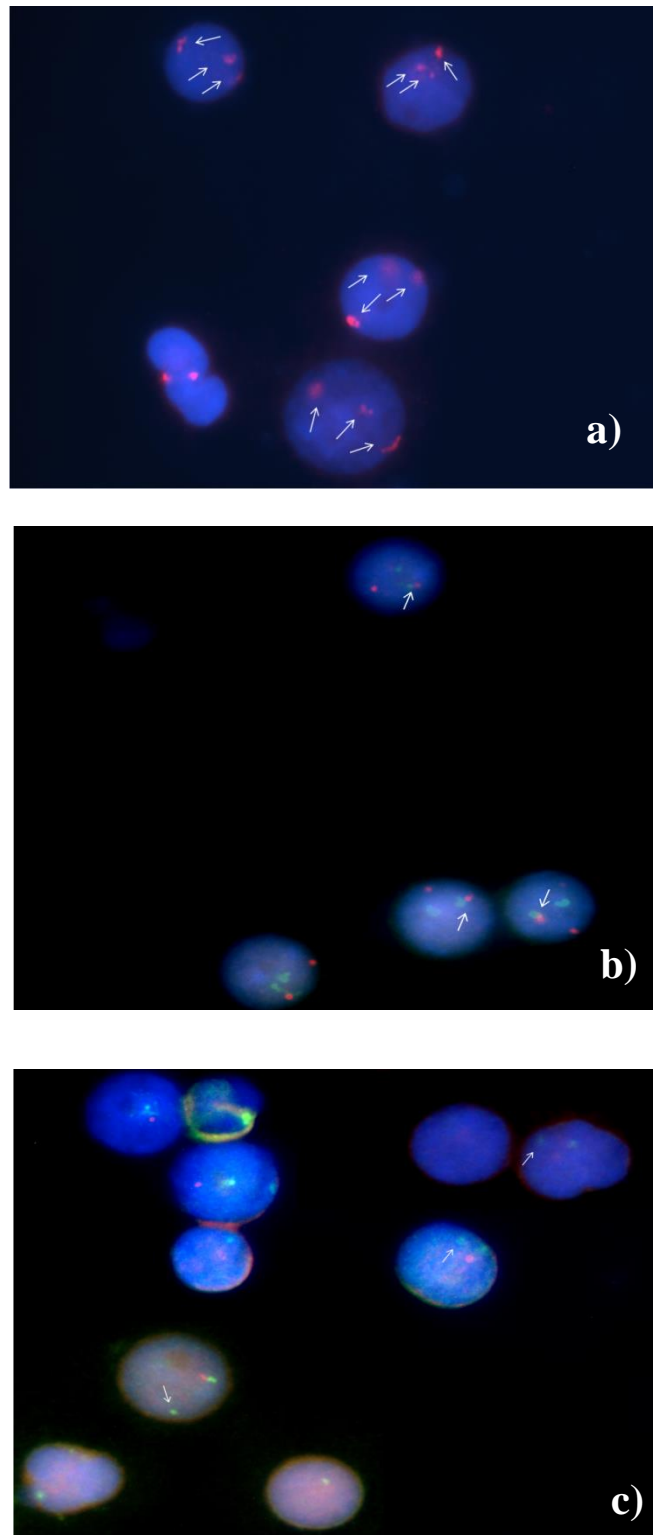


Figura 2: Imagens representando resultados positivos para o FISH: a) Resultado positivo para a trissomia do cromossomo 12, visualiza-se três sinais vermelhos. b) Resultado positivo para a translocação cromossômica 11:14, visualiza-se fusão entre os sinais verde e vermelho. c) Resultado positivo para a deleção do p53, visualiza-se ausência de um sinal vermelho. Todos os resultados foram obtidos de núcleos celulares de paciente com LLC atípica. Os núcleos estão em uma coloração azulada devido ao DAPI. A imagem foi adquirida em microscópio Olympus BX 51 com software Lucia cytogeneticsVersion 2,5.

Verificou-se nas análises que três pacientes apresentaram múltiplas aberrações cromossômicas. Um paciente possuía quatro aberrações, sendo elas a translocação 11:14, translocação 14:18, trissomia do cromossomo 12, e quebra do cromossomo 14. Dois paciente apresentavam três aberrações, eram elas translocação 11:14, quebra do cromossomo 14 e trissomia do cromossomo 12. Verificou-se também que um paciente possuía duas aberrações: a translocação 11:14 e a deleção do cromossomo 13.

Em dois pacientes com resultado de LLC atípica a análise do FISH não identificou nenhuma das aberrações cromossômicas estudadas.

A quebra do cromossomo 14 somente foi observada quando ocorria outra aberração, principalmente a translocação 11:14. Isso provavelmente ocorreu devido a região de quebra no cromossomo 14 é a mesma onde ocorre a translocação com o cromossomo 11. Segundo Koppers *et al.* (2001) regiões do cromossomo 14 são propensas a sofrer translocações acidentais, devido à instabilidade genômica, necessárias para os rearranjos da cadeia pesada das imunoglobulinas, cujo gene aí se encontra.

	PACIENTE		CD19	CD20	CD22	CD79b	CD5	CD23	CD38	CD200	CD10	CADEIA LEVE	Classificação pelo FISH	
Única aberração cromossômica	7	M	+	+	+	+	Fr	Fr	-	-	-	KAPPA	LM	
	8	M	+	+	+	+	+		+	-	-	KAPPA		
	12	F	+	+	+	+	-	-	+	Fr	-	KAPPA		
	14	M	+	+	+	+	-	Fr	-	Fr	-	KAPPA		
	11	F	+	+	+	+	+	-	+	+	+	LAMBDA	DELEÇÃO DO P53	
	13	F	+	-	Fr	Fr	Fr	Fr	Fr	+	+	KAPPA / LAMBDA		
	25	F	+	+	+	Fr	+	Fr	-	+	-	KAPPA		
	15	M	+	+	+	+	Fr	-	+	+	+	LAMBDA	LF	
	9	M	+	+	+	+	-	Fr	-	-	+	+	LAMBDA	TRISSOMIA DO CROMOSSOMO 12
	10	F	+	+	+	+	+	-	+	-	-	KAPPA	DELEÇÃO DO CROMOSSOMO 13	
Múltiplas aberrações cromossômicas	18	F	+	+	+	+	+	-	-	-	-	KAPPA	TRISSOMIA 12 + LF + QUEBRA DO CROMOSSOMO 14 + LM	
	24	M	+	Fr	+	+	+	+	-	+	-	KAPPA	TRISSOMIA 12 + QUEBRA DO CROMOSSOMO 14 + LM	
	22	M	+	+	+	+	+	-	+	-	-	LAMBDA		
	19	M	+	+	+	+	+	+	-	+	-	KAPPA	LM + DELEÇÃO DO CROMOSSOMO 13	
Sem aberrações cromossômicas	17	M	+	Fr	+	Fr	-	+	-	Fr	-	LAMBDA	_____	
	23	M	+	+	+	+	+	+	+	+	-	KAPPA	_____	

Quadro 2: Painel dos marcadores da imunofenotipagem utilizados para a determinação da LLC Após a realização do FISH. Verifica-se as aberrações cromossômicas encontradas.

Quando correlacionou-se os resultados obtidos com a análise do FISH e a imunofenotipagem (Quadro 1 e 2), verificou-se que o FISH foi capaz de caracterizar praticamente todos os pacientes com resultados de LLC atípicos (87%).

Verificou-se que dos cinco pacientes que outrora eram suspeitos de possuírem linfoma do manto, após a execução do FISH, dois deles possuíam a translocação 11:14 como única aberração cromossômica e outros dois pacientes possuíam múltiplas aberrações inclusive a que caracteriza o linfoma de manto, entretanto um paciente não possuía nenhuma aberração que o classificaria como manto.

Dois pacientes que antes eram classificados como inconclusivo foram enquadrados como possuidores de linfoma de manto, pois só possuíam a translocação cromossômica 11:14. Dois pacientes que antes eram classificados como inconclusivos, mostraram-se possuidores de múltiplas aberrações cromossômicas incluindo a translocação 11:14. Antes do FISH tinha-se a suspeita de cinco pacientes possuírem a translocação 11:14, entretanto após o teste verificou-se que oito possuíam.

Pela análise da imunofenotipagem suspeitava-se que dois pacientes eram portadores do linfoma folicular, entretanto após o FISH verificou-se que somente um possuía a translocação 14:18 o que caracterizava o linfoma, o outro individuo foi classificado como possuidor de trissomia do cromossomo 12.

Dos cinco pacientes restantes do grupo dos inconclusivos na análise da imunofenotipagem, o FISH conseguiu classificar três como possuidores de deleção do p53. Os outros dois pacientes não apresentaram nenhuma das aberrações cromossômicas estudadas, necessitando com isso de mais análises com outras sondas ou seqüenciamento gênico para sua classificação.

Com esses resultados verificou-se que tanto células com CD5 positivo quanto as que possuem esse marcador negativo podem apresentar a translocação 11:14 corroborando com o apresentado por Rego et al. (2009).

A análise dos pacientes com a técnica do FISH foi de grande importância, pois conseguiu identificar aberrações cromossômicas que esses indivíduos possuíam e classificá-los e/ou reclassificá-los quanto a sua doença. Isso possibilitou, quando possível, a mudança da conduta terapêutica para esses pacientes.

6.3.4. Produção de Citocinas

6.3.4.1. Produção de Interleucina 17 A (IL-17)

Quando avaliou-se a produção de citocinas em relação às aberrações cromossômicas apresentadas foi possível observar nesse estudo que para a produção de IL-17A os indivíduos do grupo com deleção de p53 apresentaram uma maior produção da citocina estatisticamente significativa com $p < 0,01$ quando comparado com o controle sem LLC e com o grupo com LLC clássica. Para a análise o teste utilizado foi ANOVA com correção de Dunnett. Ocorreu, também, significância estatística com $p < 0,01$ no grupo dos indivíduos atípicos entretanto sem aberração cromossômica. (Fig. 3).

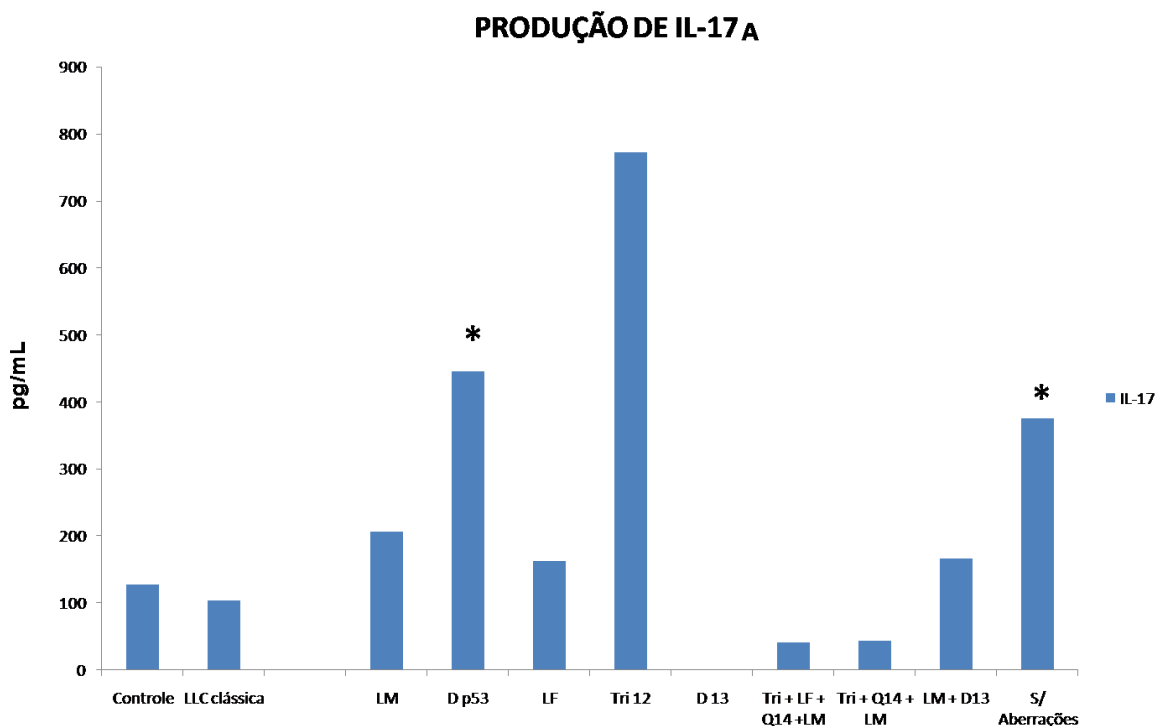


Figura 3: Análise da produção da citocina IL-17A em indivíduos com diagnóstico de LLC atípica após análise da presença de aberrações cromossômicas. O símbolo indica significância estatística : * = $(p < 0,01)$ quando comparado com o controle sem LLC e com LLC clássica no teste ANOVA com correção de Dunnett.

A IL-17A é a citocina produzida pela sub-população Th17 que exerce efeito pleomórfico em células imune e não imunes e é um importante mediador dos processos inflamatórios (GAFFEN, 2008). É importante para resposta imune contra bactérias extracelulares, vários fungos e vírus (KHADER, 2009). Entretanto elas também são envolvidos em inúmeras doenças autoimune e síndromes inflamatórias crônicas (GAFFEN, 2009; HUS, 2013).

A resposta Th17 pode suprimir ou promover o crescimento tumoral (JI, 2010; MURUGAIYAN, 2009). Alta frequência de células TH17 e de níveis de IL-17A em tecidos tumorais, fluido ascítico maligno e sangue periférico tem sido observadas em pacientes com tumores sólidos, bem como doenças onco-hematológicas como leucemia mielóide aguda e mieloma múltiplo (KORDASTI, 2009; KRYCZEK, 2009; PRABHALA, 2010; ZHOU, 2010).

O papel do TH17 no câncer ainda não está claro, aparentemente é divergente e controverso. Entretanto é possível que a função das células TH17 irá variar de acordo com o tipo do câncer e o local, bem como o estágio da doença, pois essas células podem induzir inflamação e promover iniciação e crescimento precoce de alguns tumores (HUS, 2013; WILKE, 2011; ZOU, 2010).

É possível que Th17 seja um elemento do sistema imune responsável pela proteção da proliferação de clones de células B neoplásicas mantendo o controle dessas células nos primeiros estágios. Altos níveis de IL-17A, quando comparado aos indivíduos saudáveis, sugerem um potencial papel dessa citocina na imunobiologia da LLC (HUS, 2013). Essa característica corrobora com os resultados encontrados nesse trabalho, pois indivíduos com LLC atípica sem apresentar as aberrações cromossômicas estudas apresentaram uma produção estatisticamente significativa dessa citocina.

O papel da IL-17A e da resposta TH17 na imunopatogenese da LLC ainda é indefinido, estudo mostra a presença de elevado número de células Th17 em sangue periférico de pacientes com LLC, tendo com isso um prognóstico favorável (JAIN, 2012). Os níveis plasmáticos de IL-17A estão inversamente correlacionados ao estagio da doença quanto mais inicial, mais alta é a produção. Aparentemente na LLC a resposta Th-17 tenha uma ação antitumoral.

Neste estudo foi verificado uma produção estatisticamente significativa dessa citocina nos indivíduos que possuíam deleção no p53 (Del 17p13), entretanto não corroboram com os encontrados por Huss *et. al.* (2013), pois verificou que indivíduos que possuíam as aberrações cromossômicas deleção 11q22 ou deleção 17p13.1 apresentavam uma produção bem menor de IL-17A para os indivíduos que não possuíam essas mutações. Provavelmente isso tenha ocorrido devido a diferenças na metodologia utilizada, pois a dosagem de IL-17 no nosso trabalho foi através da técnica de CBA utilizando citometria de fluxo, e no trabalho de Huss *et. al.* (2013) utilizou-se o teste ELISA. Ou então, como relatado por Jain *et. al.* (2012) a produção da IL-17 decai em um estágio mais tardio da doença. É possível que no nosso estudo o fenômeno de transformação para as aberrações de pior prognóstico tenha ocorrido há pouco tempo e a alta produção principalmente nos grupos com deleção do p53 e no indivíduo com a trissomia do cromossomo 12, seja um sinal dessa transformação, pois sua produção está bem acima dos produzidos pelos controles, seria uma forma do organismo controlar a proliferação dessas células.

Apesar de Huss *et. al.* (2013) observar uma alta produção de IL-17A nos indivíduos CD38 negativo quando comparados com CD38 positivo, no presente estudo essa associação não foi verificada.

6.3.4.2. Fator de Necrose Tumoral (TNF)

Quanto à análise da citocina TNF, verificou-se que ocorreu uma produção aumentada com significância estatística no grupo de indivíduos que possuía múltiplas aberrações cromossômicas simultaneamente (trissomia do cromossomo 12, linfoma folicular, quebra do cromossomo 14 e linfoma das células do manto), quando comparado com os controles sem LLC e com LLC clássica entretanto com $p < 0,05$. Verificou-se também que ocorreu significância estatística com $p < 0,05$ na produção de TNF no grupo com linfoma do manto quando comparado somente com o grupo controle sem LLC. Todas as análises foram feitas com o teste ANOVA com correção de Dunnett (Fig. 4).

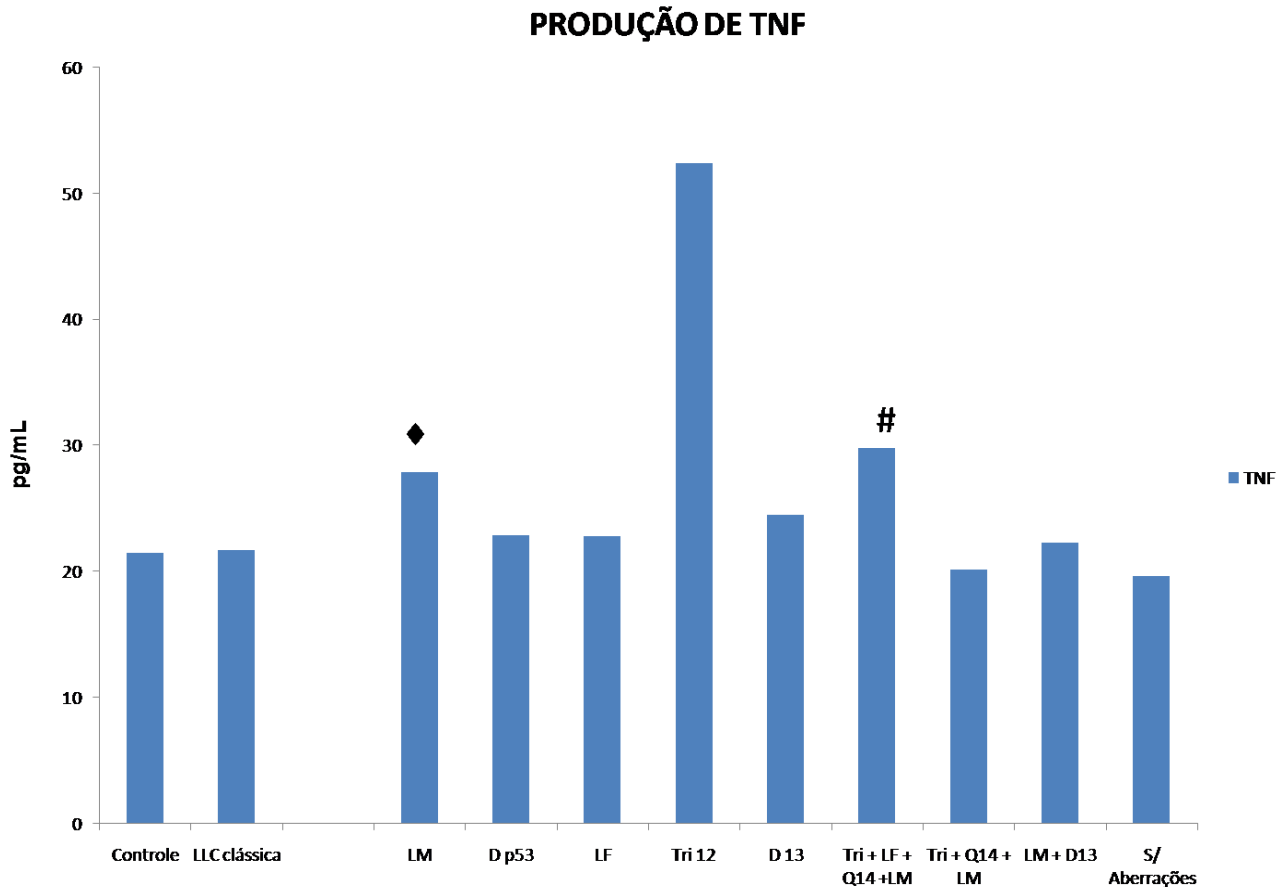


Figura 4: Análise da produção da citocina TNF em indivíduos com diagnóstico de LLC atípica após análise da presença de aberrações cromossômicas. Símbolos indicam significância estatística : # = $(p < 0,05)$ quando comparado com o controle sem LLC e com a LLC clássica; ♦ = $(p < 0,05)$ quando comparado com o controle sem LLC . No teste ANOVA com correção de Dunnett.

O TNF é uma citocina pró-inflamatória com efeitos pleiotrópicos, que possui importantes funções como a indução de outras citocinas, proliferação, diferenciação celular e apoptose. O TNF é induzido por vários estímulos, incluindo microrganismos, mediadores lipídicos, imunocomplexos e células tumorais (BEMELMANS et al. 1996; TRACEY et al. 2008).

Acredita-se que o TNF iniba a apoptose das células B leucêmicas devido a ativação do NF- κ B. Níveis de TNF em sangue periférico de pacientes com LLC uma forma clínica mais agressiva foram mais altos que em indivíduos saudáveis (BOJARSKA-JUNAK, 2008; FERRAJOLI, 2002). Esse dado corrobora com o encontrado no estudo, pois os possuidores de trissomia do cromossomo 12, linfoma do manto e múltiplas aberrações apresentam uma agressividade maior da doença. Exceto pelo indivíduo com trissomia do cromossomo 12, nossos dados corroboram

com os encontrados por Huss *et. al.* (2013) quando verificam que os níveis plasmáticos de IL-17A foram inversamente correlacionados com os níveis de TNF.

6.3.4.3. Produção de Interferon-gamma (IFN- γ)

Quando avalia-se a produção de IFN- γ verifica-se que ocorreu uma produção desta citocina no grupo com múltiplas aberrações cromossômicas simultâneas (trissomia do cromossomo 12, linfoma folicular, quebra do cromossomo 14 e linfoma das células do manto) com um $p < 0,05$. As análises foram feitas através do teste ANOVA com correção de Dunnett (Fig. 5).

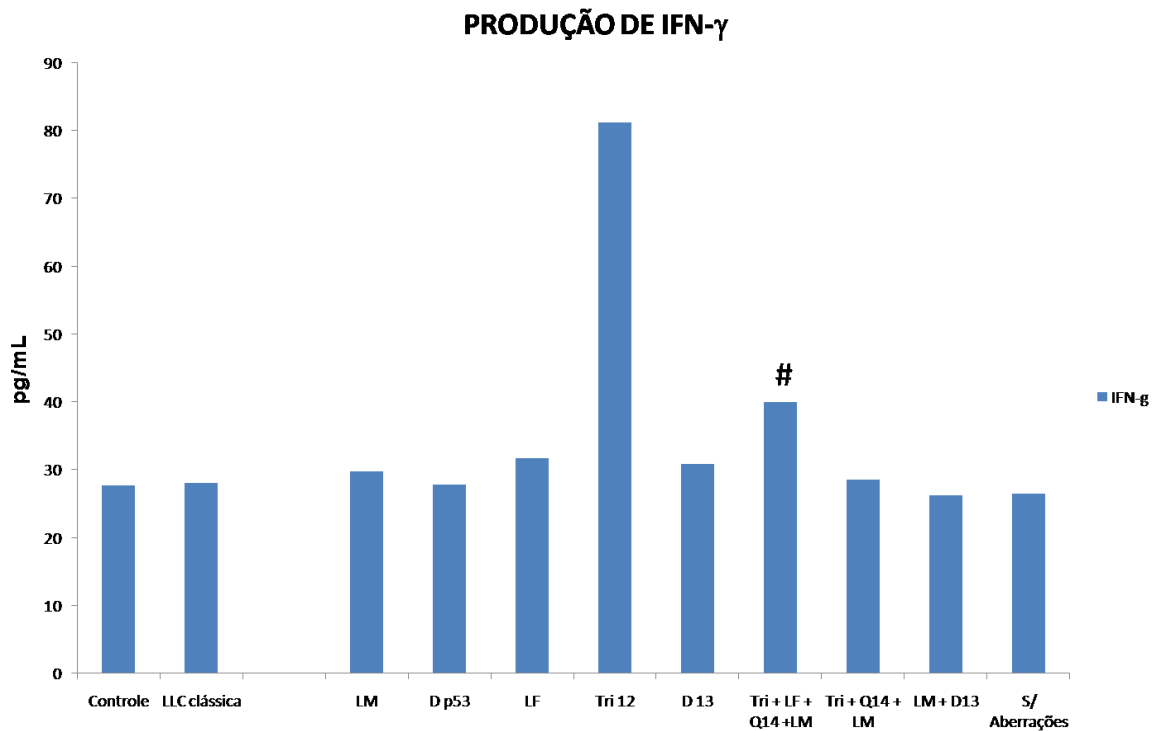


Figura 5: Análise da produção da citocina IFN- γ em indivíduos com diagnóstico de LLC atípica após análise da presença de aberrações cromossômicas. Símbolo indica significância estatística : # = $p < 0,05$ quando comparado com o controle sem LLC e com a LLC clássica, no teste ANOVA com correção de Dunnett.

O IFN- γ promove a sobrevivência de células leucêmicas, prevenindo a apoptose (BUSCHLE, 1993; CALIGARIS-CAPPIO, 1999), o que pode ser caracterizado por um pior prognóstico. No trabalho verificou-se que ocorreu uma elevação na produção dessa citocina em dois grupos de prognóstico desfavorável que foram o da trissomia do cromossomo 12 e no grupo com múltiplas aberrações cromossômicas simultâneas (trissomia do cromossomo 12, linfoma folicular, quebra do cromossomo 14 e linfoma das células do manto). Sendo que esse último apresentou uma produção estatisticamente significativa.

Observa-se no grupo com múltiplas aberrações que há uma produção com significância estatística das citocinas TNF e IFN- γ , sendo que, essa produção pode está auxiliando no desenvolvimento das células LLC, pois nota-se uma regulação no mesmo grupo da citocina IL-17, que teria a função de controlar o desenvolvimento das células LLC. Esse pode ser um dos fatores que piora o prognóstico dos indivíduos com essas múltiplas aberrações. Esses dados corroboram com os encontrados por Gallego et al. (2003) quando ele associa a progressão da LLC e a imunodeficiência com a produção dessas citocinas.

6.3.4.4. Produção de Interleucina10 (IL-10)

Quanto à produção de IL-10, verificou-se que ocorreu aumento na produção estatisticamente significantes com $p < 0,01$ no grupo de indivíduos com LLC atípica sem apresentar aberrações cromossômicas estudadas, isso quando comparados tanto com o controle negativo sem LLC e no grupo controle com LLC clássica (Fig. 6).

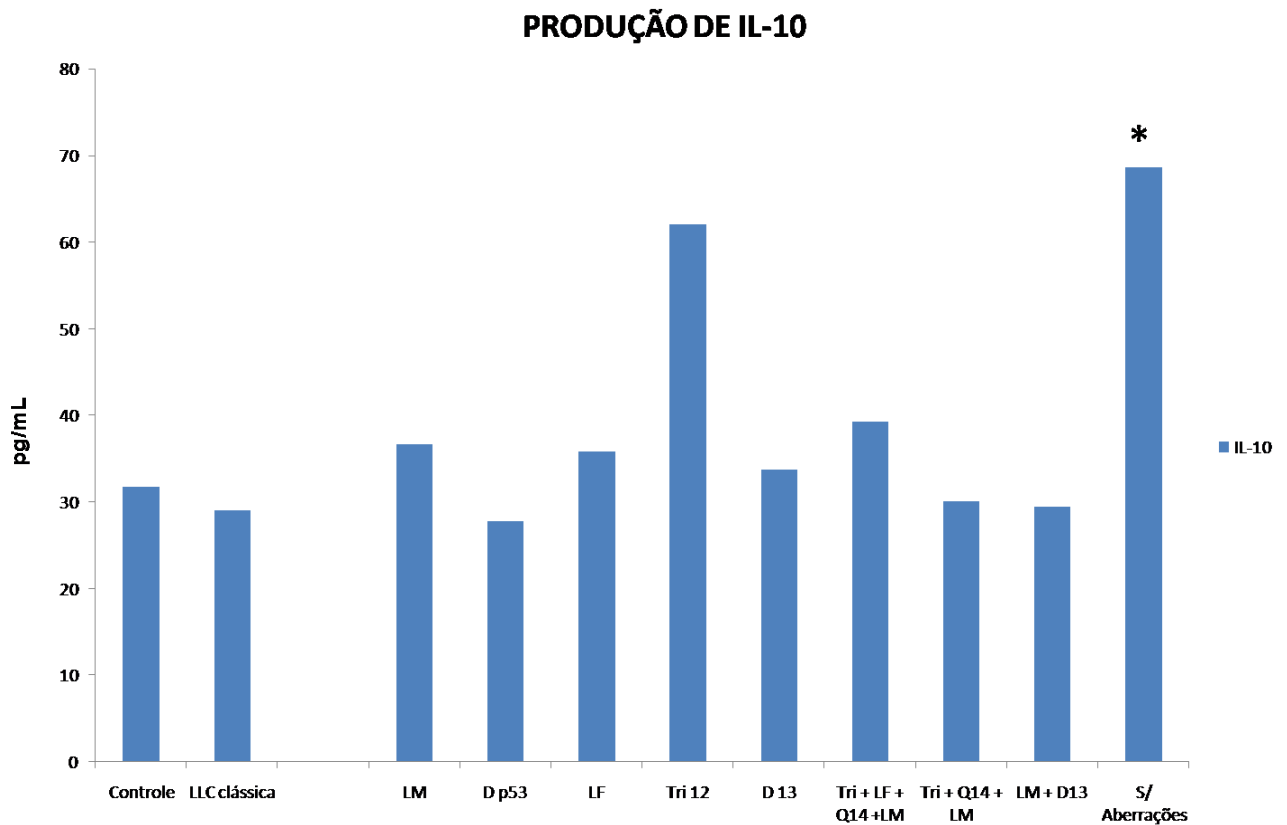


Figura 6: Análise da produção da citocina IL-10 em indivíduos com diagnóstico de LLC atípica após análise da presença de aberrações cromossômicas. Símbolo indica significância estatística O símbolo indica significância estatística : * .($p < 0,01$) quando comparado com o controle sem LLC e com LLC clássica no teste ANOVA com correção de Dunnett..

As células Treg, que são produtoras da citocinas IL-10, são responsáveis pela tolerância imunológica, o que acaba contribuindo para o desenvolvimento de tumor e para o crescimento tumoral em muitos tipos de câncer incluindo LLC (BEYER, 2005; BEYER, 2009; CURIEL, 2004; D'ARENA, 2011; SASADA, 2003)

A IL-10 não somente suprime diretamente a resposta imunológica, como também induz crescimento das células B malignas devido a inibição da apoptose (YEN, 2001). A produção de IL-10 no indivíduo com trissomia do cromossomo 12, pode estar ajudando no desenvolvimento de um pior prognóstico, que é observado nos indivíduos possuidores dessa aberração apresenta. Isso corrobora com os encontrados por Fayad *et. al.* (2001) em que níveis de IL-10 séricos estão

significativamente aumentados em pacientes com LLC associado a um pior prognóstico.

Os resultados de Huss *et. al* (2013) sugerem que a progressão da doença está relacionada a uma diminuição das células Th17 e expansão das células Treg. A premissa do papel benéfico da alta produção de IL-17 A com ação anti-tumoral pode ser suportada devido a positiva correlação entre Th17 e células iNKT e uma correlação negativa entre Th17 e Treg. Células iNKT tem sido recentemente relacionadas como uma chave disparando o sistema imune contra o tumor (SEINO, 2006). Nos nossos estudos foi possível observar uma ação de regulação da IL-10 na produção de TNF e de IL-17 principalmente no grupo sem aberrações cromossômicas, entretanto, mesmo com a regulação IL-17 apresentou significância estatística nesse grupo.

6.3.4.5. Produção de Interleucina4 (IL-4)

Quando se avaliou a produção de IL-4 verificou-se que somente indivíduos que possuíam trissomia do cromossomo 12 apresentou uma produção aumentada com tendência de ser estatisticamente significativa (Fig. 7).

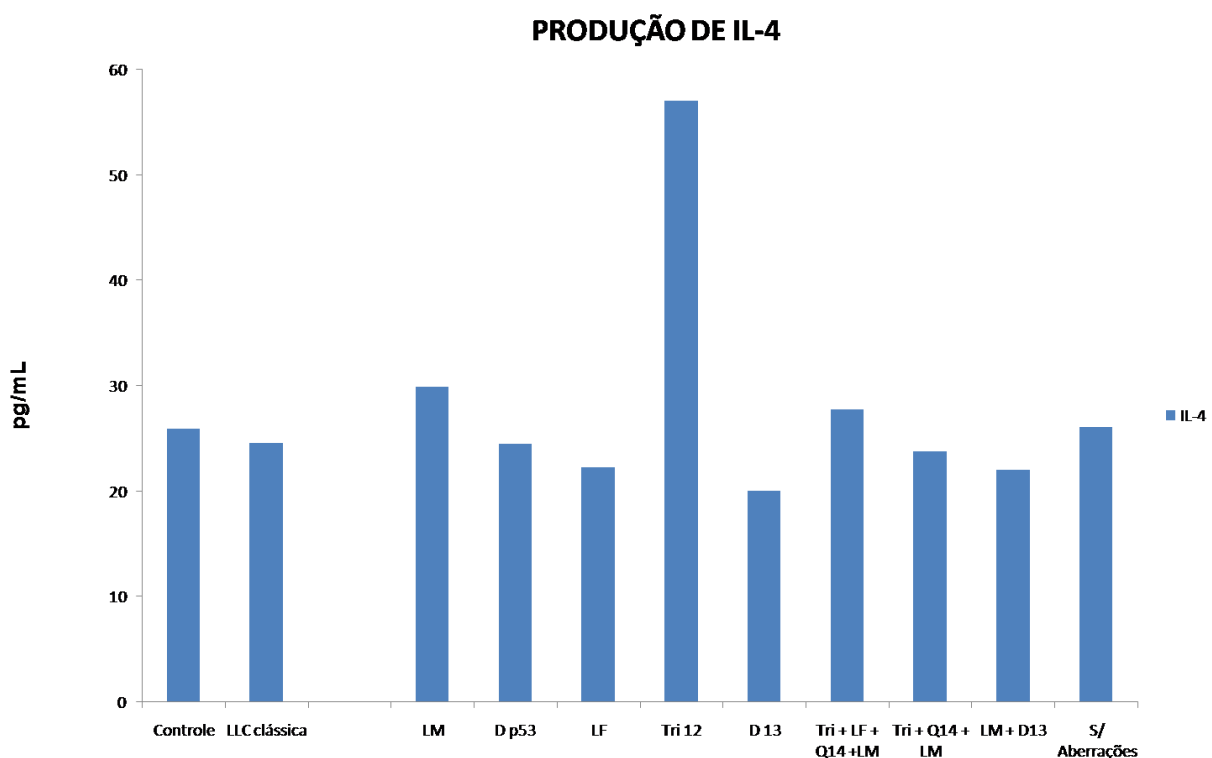


Figura 7: Análise da produção da citocina IL-4 em indivíduos com diagnóstico de LLC atípica após análise da presença de aberrações cromossômicas.

A IL-4 protege as células leucêmicas da apoptose devido ao aumento da expressão de Bcl-2 (DANCESCU, 1992) tornando o microambiente favorável para o seu desenvolvimento.

Porcentagem de células Th17 está correlacionada com IL4 produzida por TH2 e células TCD4 produtoras de TNF, já IL-17A está inversamente relacionada com os níveis de TNF e IL-10, o que pôde ser visto no estudo com o grupo linfoma do manto. Uma diminuição da porcentagem de Th17 foi acompanhada com o aumento da porcentagem de células Th2 com células Treg gerando uma indução de tolerância para o câncer (HUS, 2013; LECH-MARANDA, 2012)

Interessantemente na LLC ocorre uma diminuição das funções das células T auxiliares e aumento da função de supressão. Entretanto, a produção de auto-anticorpos e a supressão da hipersensibilidade tardia antecedem a progressão da doença, sugerindo que um perfil Th2 pode predominar nos estágios avançados da LLC (DANZANI, 1994; GALLEGO, 2003), o que pode está relacionado com a alta produção no indivíduo com trissomia do cromossomo 12.

6.3.4.6. Produção de Interleucina 6 (IL-6)

Quando avaliou-se a produção de IL-6 (Fig. 8) verificou-se que somente o indivíduo que possuía a trissomia do cromossomo 12 apresentou uma elevada produção, quando comparado com o controles sem LLC e com LLC clássica. Apesar de não ser estatisticamente significativa observa-se uma tendência de crescimento na produção de IL-6 no grupo de indivíduos com linfoma do manto.

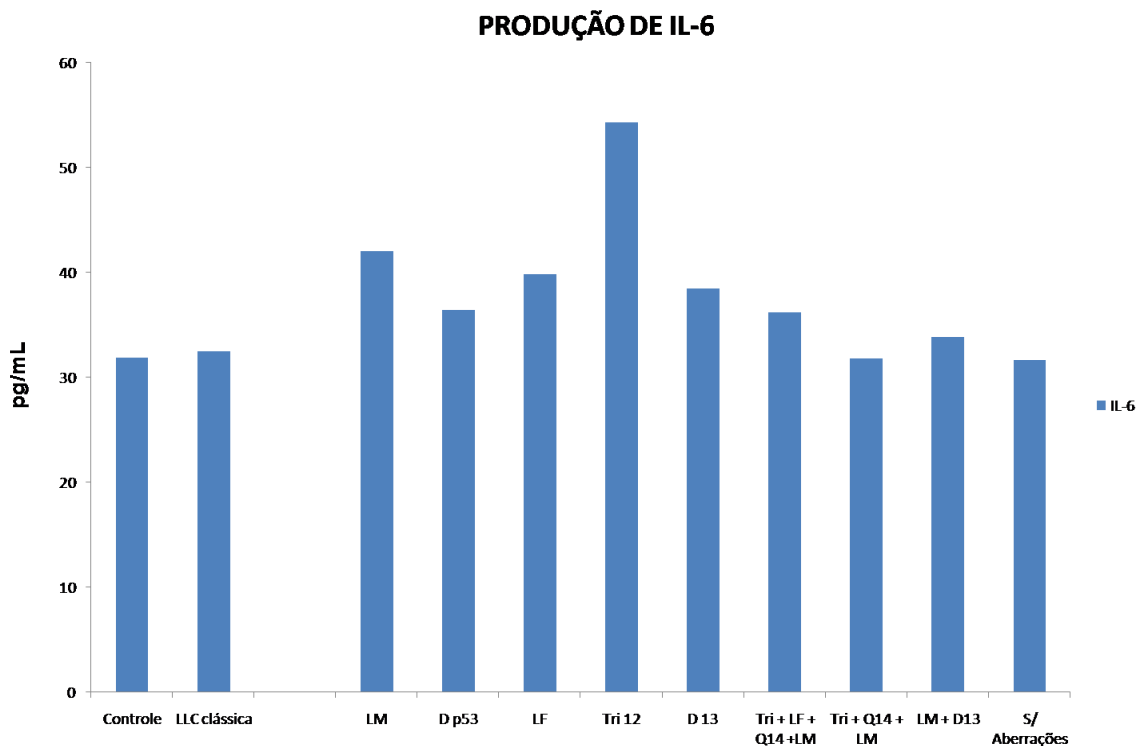


Figura 8: Análise da produção da citocina IL-6 em indivíduos com diagnóstico de LLC atípica após análise da presença de aberrações cromossômicas.

A IL-6 é uma citocina pleotrópica que promove ações fisiológicas ou patológicas. Liga-se com seus receptores induzindo reparo tecidual, diferenciação neuronal, hematopoiese, inflamação e regulação imune (LAM, 2010; MÖLLMANN, 20010; QIU, 1998; RAMSAY, 1994; RODRÍGUEZ, 2004). Também, liga-se com receptores em células tumorais induzindo resistência a drogas (GILBERT, 2011). Aumenta em linfoma de células do manto a expressão de proteínas de fase aguda como proteína C reativa que protege as células tumorais das drogas anti-tumorais indutoras de apoptose, estimulando as células tumorais a produzirem mais IL-6 (YANG, 2007; ZHANG, 2012).

Estudos de Zhang *et. al.* (2012) mostraram que IL-6 é uma importante citocina no linfoma do manto, promovendo crescimento, sobrevivência e resistência a drogas e que o uso de Rituximab, um anticorpo específico para CD20, induz a secreção de IL-6, logo a neutralização do IL-6 ou do receptor, possivelmente, aumenta a susceptibilidade das células tumorais a apoptose.

Hodge *et. al.* (2005) relaciona a IL-6 como fator pró-tumorogênico e está associado a um pior prognóstico. Esse dado corrobora com os encontrados no presente estudo, pois a presença da trissomia do cromossomo 12 está associada a um pior prognóstico. Apesar de não ser estatisticamente significativa, observa-se que no grupo com linfoma de manto ocorre uma tendência de aumento na produção da citocina, corroborando com o preconizado por Zhang *et. al.* (2012).

6.3.4.7. Produção de Interleucina 2 (IL-2)

Para a produção da IL-2 observou-se que somente o indivíduo que possuía a trissomia do cromossomo 12 apresentou uma produção aumentada possivelmente significativa (Fig. 9).

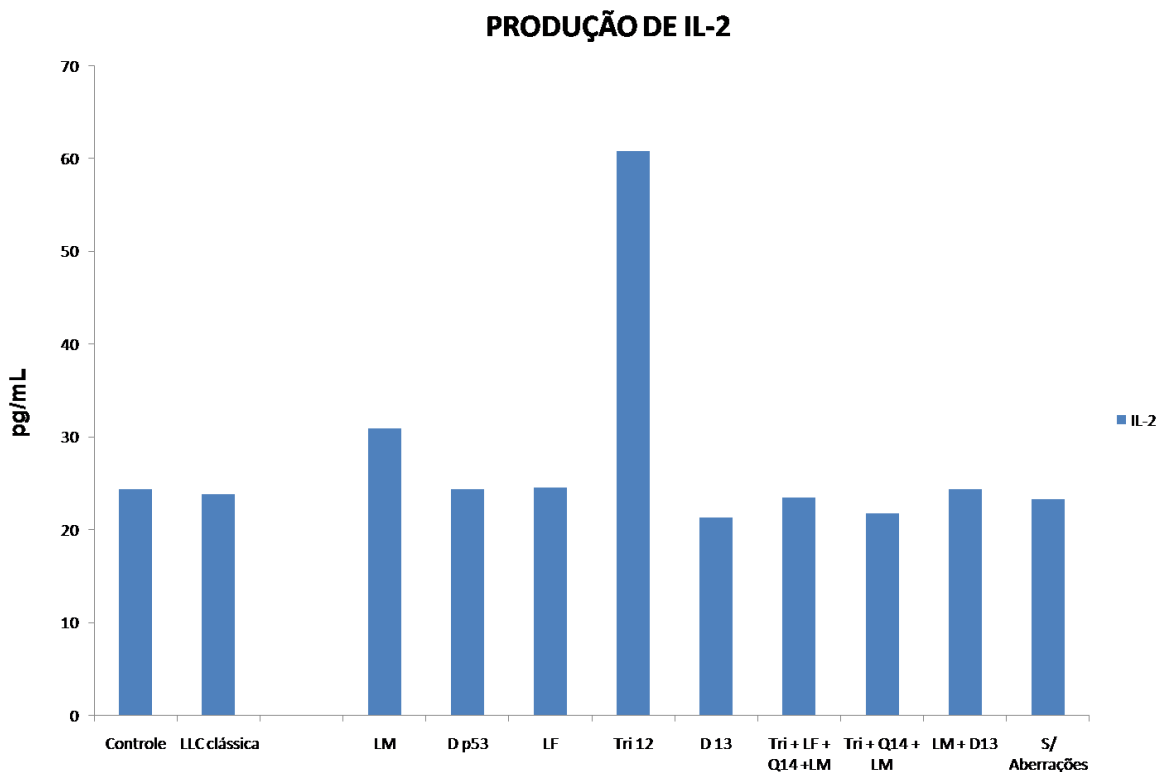


Figura 9: Análise da produção da citocina IL-2 em indivíduos com diagnóstico de LLC atípica após análise da presença de aberrações cromossômicas.

A IL-2 amplia e sustenta a proliferação de células LLC (HUANG, 1993; MAINOU-FOWLER, 1995), podendo também estar ativando a progressão da doença, e a imunodeficiência devido a associação com TNF e IFN- γ (GALLEGO *et. al*, 2003). Esses dados corroboram com os encontrados no presente estudo, pois mostram que no grupo de pacientes com trissomia do cromossomo 12 todas essas três citocinas estão aumentadas. Além disso nota-se uma tendência de crescimento no grupo de linfoma do manto onde a produção de TNF é aumentada e estatisticamente significativa.

O indivíduo com a trissomia do cromossomo 12, apesar de não formar um grupo foi analisado, pois disparou a produção de todas as citocinas estudadas. Isso pode estar associado à característica dessa aberração em possuir um pior prognóstico ou então esse indivíduo possuir outras mutações não estudadas nesse trabalho.

6.3.5. Produção de Vitamina D

Quando analisou-se a produção de vitamina D, foi observado, de acordo com os valores de referência estabelecidos pelo kit, que ocorreu produção suficiente dessa vitamina, exceto no grupo com deleção no p53, e essa insuficiência na produção foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no teste ANOVA com correção de Tukey, quando comparado com o grupo controle de indivíduos sem LLC (Fig. 10) .

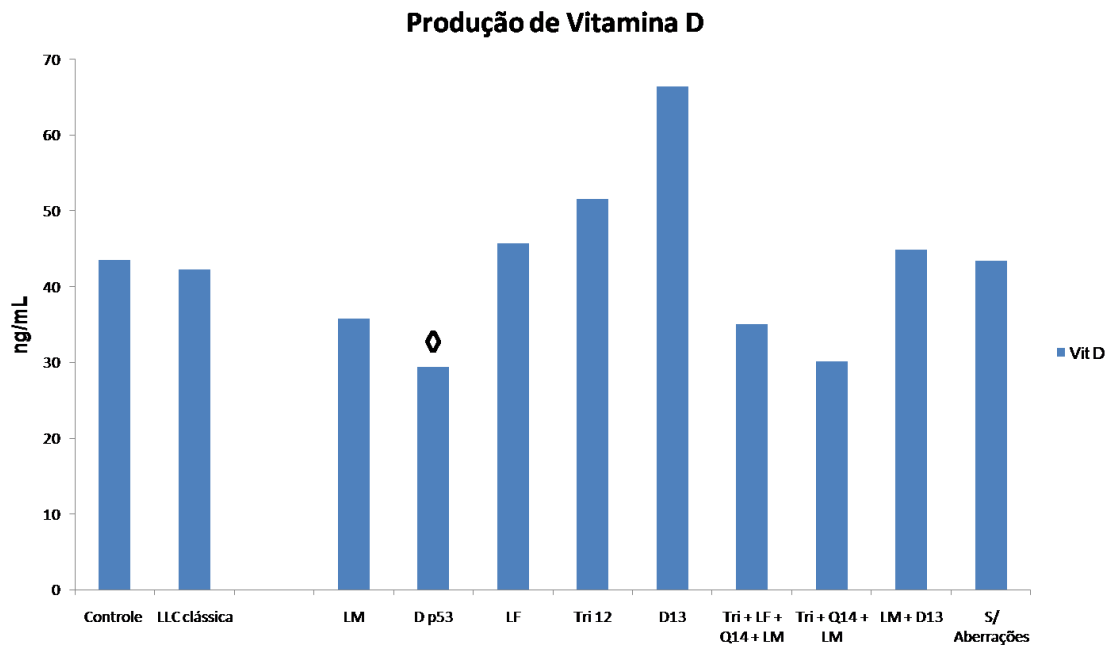


Figura 10: Análise da produção da vitamina D em indivíduos com diagnóstico de LLC atípica após análise da presença de aberrações cromossômicas. Símbolo indica significância estatística : $\diamond = .(p < 0,05)$ quando comparado com o controle sem LLC no teste ANOVA com correção de Tukey.

Não existe consenso sobre a concentração sérica ideal de vitamina D. A maioria dos especialistas concorda que o nível de vitamina D deva ser mantido em uma faixa que não induza aumento dos níveis de paratormônio (PTH) (BANDEIRA, 2006; LEVENTIS, 2008). Os valores normais nos diversos ensaios comerciais existentes variam de 25 a 37,5 nmol/L (10 a 15 ng/mL) a 137,5 a 162,5 nmol/L (55 a 65 ng/mL) (MARQUES, 2010; RUIZ-IRASTORZA, 2008).

Revisões recentes sugerem que a concentração ideal seja de 50 a 80 nmol/L enquanto outros sugerem valores entre 75 e 125 nmol/L (LAMB, 2002). Usando a elevação do PTH como biomarcador refletindo baixos níveis fisiológicos de vitamina D, a deficiência deve ser definida como concentração sérica inferior a 32 ng/mL (80 nmol/L). (LAMB, 2002).

Com base nos estudos de Lamb (2002) quanto a concentração sérica de vitamina D, verificou-se no presente trabalho que os indivíduos do grupo com deleção do P53 apresentaram deficiência na produção de vitamina D e essa deficiência pode estar associado ao pior prognóstico que os indivíduos com essa deleção apresentam. Os dados de Shanafelt (2011) mostram uma direta evidência de que os níveis de 25(OH)D pode ser um importante fator que influencia o prognóstico dos pacientes

com LLC. Aref et al. (2013) mostram que a vitamina D tem se transformado em um fator prognóstico na LLC e a deficiência está associada a um pior prognóstico e uma curta sobrevivência global (MOLICA et al., 2012). A deficiência de vitamina D também tem sido utilizado como fator prognóstico no linfoma folicular (KELLY et al., 2014) e no linfoma difuso de células B (DRAKE et al., 2010). O efeito da insuficiência de 25(OH)D pode ser particularmente relevante na LLC, pois é uma doença com uma história natural longa e os pacientes são geralmente observados por anos para iniciar a terapia.

A vitamina D é um hormônio esteróide, que possui como uma das funções a regulação da homeostase do cálcio, formação e reabsorção óssea. (ARNSON, 2007). Segundo estudos de Marques et al. (2010) essa vitamina parece interagir com o sistema imunológico através de sua ação sobre a regulação e a diferenciação de células como linfócitos, macrófagos e células *natural killer* (NK), além de interferir na produção de citocinas *in vivo* e *in vitro*. A literatura mostra que a vitamina D possui efeito imunomodulador promovendo a diminuição da produção de IL-2, do INF- γ e do TNF além da inibição da expressão de IL-6 e inibição da secreção e produção de autoanticorpos pelos linfócitos B (LEMIRE, 1992; LINKER-ISRAELI, 2001). Nossos dados corroboram com os encontrados em Lemire e Linker-Israeli, pois quando foi avaliada a produção da vitamina D, comparada com a produção das citocinas citadas, verificou-se uma provável regulação dessa vitamina sobre essas citocinas, que pode estar também sendo auxiliada pela ação de outras citocinas.

6.4. CONCLUSÃO

O FISH mostrou-se de grande importância para identificação das aberrações cromossômicas, o que possibilitou conclusão do diagnóstico das LLC e mudanças na conduta terapêuticas, quando possível, para os indivíduos, garantindo uma melhor qualidade de vida.

A implantação da técnica de FISH nos serviços públicos de saúde é importante para auxiliar no diagnósticos dos casos de LLC atípica.

A IL-17A mostrou-se como um possível marcador indicador de mudança para um pior prognóstico, quando em altas concentrações.

A produção associada das citocinas TNF e IFN- γ , mostraram-se, aparentemente, como um fator de pior prognóstico quando em altas concentrações. Entretanto novos estudos acompanhado a cinética de produção dessas citocinas precisam ser realizados.

A baixa na produção de vitamina D nos indivíduos com LLC atípica relacionou-se com a deleção no p53, associando-se a um pior prognóstico. Estudos com suplementação dessa vitamina nos portadores dessa deleção precisam ser realizados para confirmar o benefício da sua utilização.

6.5. REFERÊNCIAS

Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new etiological and therapeutic considerations. *Ann RheumDis* 2007; 66:1137-42.

Bandeira F, Griz L, Dreyer P, Eufrazino C, Bandeira C, Freese E. Vitamin D deficiency: a global perspective. *Arq Bras EndocrinolMetabol* 2006; 50(4):640-6.

Bemelmans M H, Greve J W, Gouma D J, Buurman W A 1996. Increased concentrations of tumour necrosis factor (TNF) and soluble TNF receptors in biliary obstruction in mice; soluble TNF receptors as prognostic factors for mortality. *Gut* 38(3):447-453.

Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, et al. (2005) Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood* 106: 2018–2025

Beyer M, Schultze JL (2009) Regulatory T cells: major players in the tumor microenvironment. *Curr Pharm Des* 15: 1879–1892

Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J ClinEndocrinolMetab.* 2009;94(1):26-34.

Bojarska-Junak A, Hus I, Szczepanek EW, Dmoszyńska A, Roliński J (2008) Peripheral blood and bone marrow TNF and TNF receptors in early and advanced stages of B-CLL in correlation with ZAP-70 protein and CD38 antigen. *Leuk Res* 32: 225–233

Bringhurst FR, Demay MB, Kronenberg HM. Hormones and Disorders of Mineral Metabolism. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR editors. *Williams Textbook of Endocrinology*, 11 ed. Philadelphia: Elsevier, 2008.

BUSCHLE M, CAMPANA D, CARDING SR, et al: Interferony inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 177:213-218, 1993

BURGER JA, KIPPS TJ. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk Lymphoma.* 2002;43(3):461–466. [\[PubMed\]](#)

CAMPOS, L.C.; ANDRADE, D.A.P; Mantle cell non-Hodgkin's lymphoma: case report. *Rev Med Minas Gerais* 2009; 19(2): 177-179

CHAUFFAILLE, M.L.L.F. ;Cytogenetics and molecular biology in chronic lymphocytic leukemia; *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v.27 n.4 São José do Rio Preto out./dez. 2005.

Chen P, Hu P, Xie D, Qin Y, Wang F, Wang H. Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;121(2):469-477.

CHIATTONE, C.S.: Linfomafolicular, *Rev.bras.hematol.*, 2000,22: 206-207

Crew KD, Shane E, Cremers S, McMahon DJ, Irani D, Hershman DL. High prevalence of vitamin D deficiency despite supplementation in premenopausal women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2009; 27(13):2151-2156.

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, et al. (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10: 942–949

D'Arena G, Laurenti L, Minervini MM, Deaglio S, Bonello L, et al. (2011) Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leuk Res* 35: 363–368

DANCESCU M, RUBIO-TRUJILLO M, BIRON G, et al: Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemia from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J Exp Med* **176**:1319-1326, 1992

DANZANI U, OMEDE P, MARMONT F, DIFRANCO D, FUSARO A, BRAGARDO M, REDOGLIA V, GIARETTA F, MAIRONE L, BOCCADORO M, RESEGOTTI L, PILERI A. Expansion of T cells expressing low CD4 or CD8 levels in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: correlation with disease status and neoplastic phenotype. *Blood* 1994; **83**: 2198–2205.

Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D – its role and uses in immunology. *FASEB Journal* 2001; 15:2579-85

DOBBIN, J.A; NAJMAN, H.L.; GADELHA, M.I.P.; Treatment of mantle-cell lymphoma with Rituximab. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2002, 48(2): 257-262

DOHNER H, STILGENBAUER S, BENNER A et al. Genomic aberrations and survival in CLL. *The New Engl J Med* 2000 343:1.910-6.

ESCUDIER SM, LEAHY JMP, DRACH JW et al. Fluorescent in situ hybridization and cytogenetic studies of trisomy 12 in CLL. *Blood* 1993; 81:2.702-7.

Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, O'Brien S, Lee BN, et al. (2001) Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood* 97: 256–263

Ferrajoli A, Keating MJ, Manshour T, Giles FJ, Dey A, et al. (2002) The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100: 1215–1219

FITCHETT M, GRIFFITHS MJ, OSCIER DG, et al: Chromosome abnormalities involving band 13q14 in hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* **24**:143-150, 1987

FREEDMAN AS. Immunology of chronic lymphocytic leukaemia. *Haematol Oncol Clin North Am* 1990; **4**: 405–429.

- Gaffen SL (2008) An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine* 43: 402–407
- Gaffen SL (2009) The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 11: 365–370
- Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Garland FC. Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann Epidemiol*. 2009;19(7):468-483.
- GALE RP, CALIGARIS-CAPPIO F, DIGHIERO G, KEATING M, MONTSERRAT E, RAI K, for the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukaemia. Recent progress in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1994; **8**: 1610–1614.
- Gallego, A.; Vargas, J.; Castejón, R.; Citores, M.; Romero, Y.; Millán, I.; Durántez, A. . Production of intracellular IL-2, TNF- α , and IFN- γ by T cells in B-CLL. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**
Volume 56B, Issue 1, pages 23–29, 2003 DOI: 10.1002/cyto.b.10052
- Gilbert LA, Hemann MT. Chemotherapeutic resistance: surviving stressful situations. *Cancer Res*. 2011;71(15):5062–5066.
- Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Koo J, Hood N. Prognostic effects of 25-hydroxyvitamin D levels in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(23): 3757-3763.
- Gorham ED, Garland CF, Garland FC, et al. Vitamin D and prevention of colorectal cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005;97(1-2):179- 194.
- HALLEK M, TEFFERI A. CME Information: Chronic Lymphocytic Leukemia: 2015 Update on Diagnosis, Risk stratification, and Treatment. *American Journal of Hematology*, vol 90
- HAN T, OZER H, SADAMORI N, et al: Prognostic importance of cytogenetic abnormalities in patients with chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **310**:288-292, 1984
- HAN T, SADAMORI N, BLACK AMW et al. Cytogenetic studies in CLL. *Nouv Rev Franç d'Hematol* 1988;30:393-395.
- Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer*. 2005;41(16):2502–2512
- Huang RW, Tsuda H, Takatsuki K. Interleukin-2 prevents programmed cell death in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Int J Hematol* 1993; **58**: 83–92.
- HUS, I., Bojarska-Junak, A., Chocholska, S; Tomczak, W.; Woś, J.; Dmoszyńska, A.; Roliński, J; Th17/IL-17A Might Play a Protective Role in Chronic Lymphocytic Leukemia Immunity. *PLoS One*. 2013; 8(11): e78091
- JACKSON SP, BARTEK J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009;461:1071–1078.

JAFFE ES, HARRIS NL, STEIN H, VARDIMAN JW (eds): WHO classification of tumors. Pathology and Genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon,2001.

JAIN P, JAVDAN M, FEGER FK, CHIU PY, SISON C, ET AL. (2012) Th17 and non-Th17 interleukin-17-expressing cells in chronic lymphocytic leukemia: delineation, distribution, and clinical relevance. *Haematologica* 97: 599–607

JI Y, ZHANG W (2010) Th17 cells: positive or negative role in tumor? *Cancer ImmunolImmunother* 59: 979–987

JULIUSSON G, MERUP M. Cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Sem in Oncol* 1998;25(1):19-26.

KHADER SA, GAFFEN SL, KOLLS JK (2009) Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol* 2: 403–411

Kordasti SY, Afzali B, Lim Z, Ingram W, Hayden J, et al. (2009) IL-17-producing CD4(+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 145: 64–72

Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, et al. (2009) Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114: 1141–1149

KUPPERS, R; DALLA-FAVELA,R; Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas; *Nature*, 10 September 2001, Volume 20, Number 40, Pages 5580-5594.

Lam SP, Luk JM, Man K, et al. Activation of interleukin-6-induced glycoprotein 130/signal transducer and activator of transcription 3 pathway in mesenchymal stem cells enhances hepatic differentiation, proliferation, and liver regeneration. *Liver Transpl.* 2010;16(10):1195–1206.

Lamb EJ, Wong T, Smith DJ, Simpson DE, Coakley AJ, Moniz C. Metabolic bone disease is present at diagnosis in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment PharmacolTher* 2002; 16(11):1985-92.

Lech-Maranda E, Grzybowska-Izydorczyk O, Wyka K, Mlynarski W, Borowiec M, et al. (2012) Serum tumor necrosis factor- α and interleukin-10 levels as markers to predict outcome of patients with chronic lymphocytic leukemia in different risk groups defined by the IGHV mutation status. *Arch ImmunolTherExp* 60: 477–486

Lemire JM, Ince A, Takashima M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity* 1992; 12(2):143-8.

Leventis P, Patel S. Clinical aspects of vitamin D in the management of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2008; 47:1617-21.

Linker-Israeli M, Elstner E, Klinenberg JR, Wallace DJ, Koeffler HP. Vitamin D(3) and its synthetic analogs inhibit the spontaneous *in vitro* immunoglobulin production by SLE-derived PBMC. *ClinImmunol* 2001; 99:82-93.

Mainou-Fowler T, Copplestone JA, Prentice AG. Effect of interleukins on the proliferation and survival of B cell chronic lymphocytic leukaemia cells. *J ClinPathol* 1995; **48**: 482–487

Marques, C.; Dantas, A.; Fragoso, T.; Duarte, A. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. *Rev Bras Reumatol* 2010;50(1):67-80

MOLICA S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma* 2006;47:1477–1480.

Möllmann H, Nef HM, Troidl C. 'Turning the right screw': targeting the interleukin-6 receptor to reduce unfavourable tissue remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2010;87(3):395–396.

MURUGAIYAN G, SAHA B (2009) Protumorvs antitumor functions of IL-17. *J Immunol* 183: 4169–4175

Newton-Bishop JA, Beswick S, Randerson-Moor J, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels are associated with breslow thickness at presentation and survival from melanoma. *J ClinOncol.* 2009; 27(32):5439-5444.

Ng K, Meyerhardt JA, Wu K, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin d levels and survival in patients with colorectal cancer. *J ClinOncol.* 2008; 26(18):2984-2991.

OSCIER DG, MATUTES E, COPPLESTONE A, et al: Atypical lymphocyte morphology: An adverse prognostic factor for disease progression in stage A CLL independent of trisomy 12. *Br J Haematol* **98**:934-939, 1997

PANAYIOTIDIS P, GANESHAGURU K, JABBAR SA, et al: Interleukin-4 inhibits apoptotic cell death and loss of the bcl-2 protein in B-chronic lymphocytic leukaemia cells *in vitro*. *Br J Haematol* **85**:439-445, 1993

PANAYIOTIDIS P, GANESHAGURU K, JABBAR SA, et al: Alpha-interferon (alpha-IFN) protects B-chronic lymphocytic leukaemia cells from apoptotic cell death *in vitro*. *Br J Haematol* **86**:169-173, 1994

Prabhala RH, Pelluru D, Fulciniti M, Prabhala HK, Nanjappa P, et al. (2010) Elevated Krczek IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma. *Blood* 115: 5385–5392

Qiu Z, Sweeney DD, Netzeband JG, et al. Chronic interleukin-6 alters NMDA receptor-mediated membrane responses and enhances neurotoxicity in developing CNS neurons. *J Neurosci.* 1998;18(24):10445–10456.

Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, et al. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses *in vivo*. *Science.* 1994;264(5158):561–563.

RESNITZKY, MATUTES E, HEDGES M et al. The ultrastructure of mantle cell lymphoma and other B-cell disorders with translocation t(11;14) (q13;q32). *Br J Haematol* 1996;94(2):352-61.

Rodríguez Mdel C, BernadA, Aracil M. Interleukin-6 deficiency affects bone marrow stromal precursors, resulting in defective hematopoietic support. *Blood*. 2004;103(9):3349–3354.

Rossmann ED, Lewin N, Jeddi-Tehrani M, Österborg A, Mellstedt H. Intracellular T cell cytokines in patients with B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Eur J Haematol* 2002; **68**: 299–306.

Rozovski, U; Keating, M. And Estrov, Z . Targeting Inflammatory Pathways in Chronic Lymphocytic Leukemia *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013 Dec;88(3):doi:10.1016/j.critrevonc.2013.07.011

Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Olivares N, Martinez-Berriotxo A, Aguirre C. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. *Rheumatology* 2008; 47:920-3.

Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A (2003) CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 98: 1089–1099

Seino K, Motohashi S, Fujisawa T, Nakayama T, Taniguchi M (2006) Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications. *Cancer Sci* 97: 807–812

SHANAFELT TD, CALL TG. Current approach to diagnosis and management of CLL. *Mayo ClinProc* 2004;79:388-98.

Shanafelt, T.; Drake, M.; Maurer, M.; Allmer,C.; Rabe, K.; Slager, S.; Weiner, G.; Call, T.; Link, B.; Zent, C.; Kay, N.; Hanson, C.; Witzig, T.; Cerhan, J. Vitamin D insufficiency and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *BLOOD*, 3 FEBRUARY 2011 VOLUME 117, NUMBER 5 doi:10.1182/blood-2010-07-295683

STILGENBAUER S, LICHTER P, DOHNER H. Genetic Features of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Rev ClinExpHematol*. Vol4.1 . March 2000

Szodoray P, Nakken B, Gaal J, Jonsson R, Szegedi A, Zold E et al. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Scand J Immunol* 2008; 68(3):261-9.

TEFFERI A, BARTHOLMAI BJ, WITZIG TE, et al: Clinical correlations of immunophenotypic variations and the presence of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Genet Cytogenet* **95**:173-177, 1997

Tracey D, Klareskog L, Sasso E H, Salfeld J G, Tak P P 2008. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *PharmacolTher* 117(2): 244-279.

Wilke CM, Kryczek I, Wei S, Zhao E, Wu K, et al. (2011) Th17 cells in cancer: help or hindrance? *Carcinogenesis* 32: 643–649

XUE TH, MARCO JG, ELLIS J ET AL. TRISOMY 12 in CLL detected by FISH. *Blood* 1993;82:571-5.

Yang J, Wezeman M, Zhang X, et al. Human C-reactive protein binds activating Fcγ receptors and protects myeloma tumor cells from apoptosis. *Cancer Cell*. 2007;12(3):252–265.

Yen Chong S, Lin YC, Czarneski J, Zhang M, Coffman F, et al. (2001) Cell cycle effects of IL-10 on malignant B-1 cells. *Genes Immun* 2: 239–247

Yin L, Grandi N, Raum E, Haug U, Arndt V, Brenner H. Meta-analysis: longitudinal studies of serum vitamin D and colorectal cancer risk. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;30(2):113-125.

Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: Evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 2010;24:2072–2079.

Zhang, L.; Yang, J.; Qian, J.; Li, H.; Romaguera, J.; Kwak, L.; Wang, M.; Yi, Q.; **Role of the microenvironment in mantle cell lymphoma: IL-6 is an important survival factor for the tumor cells. 2012**

Zhou P, Sha H, Zhu J (2010) The role of T-helper 17 (Th17) cells in patients with medulloblastoma. *J Int Med Res* 38: 611–619

Zhou W, Heist RS, Liu G, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels predict survival in early-stage non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol*. 2007;25(5):479-485.

Zou W, Restifo NP (2010) T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 10: 248–256

7. MANUSCRITO 3

ESTUDO DOS GENES DA FAMÍLIA NTRK EM CÉLULAS DE PACIENTES COM LLC ATÍPICAS

7.1. INTRODUÇÃO

Dentre as neoplasias linfóides a leucemia linfóide crônica (LLC) é a mais frequente nos países ocidentais, correspondendo a cerca de 30% das leucemias do adulto e 25% dos linfomas não-Hodgkin (LNH) (HALLEK *et al*, 2010).

A LLC caracteriza-se pela proliferação e acúmulo de pequenas células B maduras, CD5 positivo, no sangue, medula óssea, linfonodos e baço, que se rompem facilmente (ROZMAN, 1995). Estudos recentes mostram que eventos leucogênicos primários ocorrem na célula tronco hematopoiética, levando a alterações genômicas específicas causando deleções em genes de micro-RNA e aumentando a resistência das células B a apoptose (CALIN, 2002; CHIORAZZI, 2005; HALLEK, 2015; KIKUSHIGE, 2011). As alterações cromossômicas mais comuns na LLC são: trissomia do cromossomo 12 (+12) e translocação ou deleção do braço longo do cromossomo 13 (t/del(13q)) que são caracterizadas como um curso benigno da doença (CALIN, 2002).

Deleção do braço longo do cromossomo 6 (del(6q)), alterações envolvendo o braço longo do cromossomo 11, na banda q22-23 (11q22-23), translocação do braço longo do cromossomo 14 (t(14q)) e deleção do braço curto do cromossomo 17 (del(17p)), perfazem cerca de 60% das alterações (HALLEK *et al*, 1997; JULIUSSON *et al*, 1998).

Pacientes com anormalidades cromossômicas têm sobrevida menor que aqueles com cariótipo normal, que respondem significativamente melhor à quimioterapia (HAN *et al*, 1988). Estudo de novos marcadores ou de alterações cromossômicas são importantes para ampliar o entendimento dessa doença, promover novas abordagens terapêuticas e diminuir a liberação de laudos de LLC atípica. Que Apesar de todo um conjunto de marcadores moleculares ainda é frequente a saída de laudos inconclusivos. Isso ocorre, principalmente devido a resultados limítrofes na imunofenotipagem. Estudos de Costa-Silva *et al* (dados

ainda não publicados), verificou que ao analisar 2049 diagnósticos de diferentes doenças hematológicas em um centro de referência em Salvador 22% desses pacientes tinham o diagnóstico para LLC, desse resultado 8% correspondia a LLC atípica. Logo torna-se promissor o estudo da família NTRK.

NTRK são receptores tirosina quinase neurotróficos. É uma família de receptores transmembrânicos composta por três elementos (NTRK1, NTRK2 e NTRK3) que são proto-oncogênicos. Esses receptores quando ligam-se a fatores de crescimento chamados de neurofinas promovem a sobrevivência e a diferenciação das células neuronais (BARBACID, 1994; MARCHETTI, 2008; NILSSON et al, 2009). As neurofinas são Fator de Crescimento de Nervo (NGF); Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF); Neurotrofina3 (NT-3) e Neurotrofina 4 (NT-4) (BERKEMEIER, 1991; HOHN, 1990; IP, 1992; LEIBROCK, 1989; LEVI-MONTALCINI, 1996; MAISONPIERRE, 1990; NILSSON, 2009; ROSENTAL, 1990).

O NTRK1 está localizado no cromossomo 1 é ativado por NGF e NT-3. O NTRK 2 está no cromossomo 9 é ativado pelo BDNF, NT-3 e NT-4. NTK3 está no cromossomo 15 sendo ativado pelo NT-3 (SEGAL, 2003).

O NTRK pode disparar um importante papel na tumorigenese e progressão do tumor (MARCHETTI, 2008). Tem sido mostrado que a super-expressão de neurotrofina ou seus receptores é um evento comum em diferentes doenças neoplásicas. Alterações em NTRK pode representar um importante alvo para drogas inibidoras desse receptor (MARCHETTI, 2008; MIKNYOCZKI, 1999, YANG, 2005).

Alterações gênicas na família NTRK estão associadas a vários tipos de cânceres como pulmão, tiróide, colo retal, mama, próstata, pâncreas, rins, glândula salivares, trato urinário, neuroblastoma, tecido hematopoiético, linfóide e sistema nervoso central, (BARDELLI, 2003; DAVIES, 2005; MARCHETTI, 2008; STEPHENS, 2005, WOOD, 2006).

Translocações cromossômicas resultando na fusão de genes com mudanças na atividade são fundamentais na gênese da leucemia (KRALIK *et al*, 2011). Logo o estudo da família NTRK em pacientes com LLC atípica torna-se importante, podendo verificar assim se esses pacientes possuem essa alteração o que poderia direcioná-lo para outra abordagem terapêutica.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1. Desenho e Confeção das Sondas

As sondas para a família NTRK foram obtidas após estudo de toda a estrutura dos receptores, dos cromossomos e da região onde eles estão localizados. Para auxiliar a confecção dos desenhos das sondas utilizou-se o sítio <http://www.ensembl.org>. Após a confecção dos desenhos das sondas, esses foram enviados para a empresa CHORI (Oakland, CA) .

Após o envio dos desenhos as BACs foram obtidas da empresa CHORI juntamente com os *primers* para o teste de reação em cadeia de polimerase (PCR) para a confirmação da sequência de interesse. Logo após a chegada as BACs foram colocadas em meio de cultura Luria-Bertani (LB) contendo 12,5 µg/mL de cloranfenicol. Após 24 h de incubação sob agitação o meio de cultura contendo as BACs foi semeado em meio sólido para obtenção de colônias únicas. Cada colônia obtida foi colocada em tubos diferentes contendo 3 mL de meio de cultura LB com antibiótico, ficando sob agitação por 24 h à 37°C. Após esse tempo foi coletado 1 mL para realização do PCR a fim de verificar se a sequência da BAC estava correta.

Após a confirmação, foi extraído o DNA da cultura restante utilizando o KIT QIAamp DNA Mini da Qiagen (Cat# 51306). Para a amplificação do genoma da BAC utilizou-se o KIT REPLI-g Midi da Qiagen (Cat# 150045). Após a amplificação coletou-se uma alíquota de 1 µg de DNA amplificado de cada BAC para a marcação com a fluorescência vermelha toda a BAC com região 3' tanto para a BAC contendo o gene do *NTRK2* quanto *NTRK3*, e fluorescência verde foi conjugada na BAC contendo a região 5' de *NTRK2* e *NTRK3*. Para isso utilizou-se o kit Vysis Nick translation da Abbott Molecular.

7.2.2. Validação

Após a sonda pronta realizou-se a validação para confirmação da funcionalidade da sonda, através de um mapeamento cromossomal, utilizando-se o FISH (Hibridização Fluorescente in situ) em uma linhagem celular com cariótipo

normal. Realizou-se o FISH em uma linhagem celular com células em interfase e em metáfase. De acordo com o protocolo, fixou-se o material celular, utilizou-se 150 ng da sonda verde e da sonda vermelha, desnaturou a 80°C por 5 min e encubou-se em câmara úmida à 37°C por 72 h no escuro. Após esse tempo analisou-se ao microscópio e verificou-se em qual cromossomo estava ocorrendo a ligação e quantos sinais estavam aparecendo. Após validação das sondas foi realizado o FISH nos pacientes com LLC atípica.

7.2.3. FISH com Sondas da Família NTRK em Pacientes com LLC Atípica

7.2.3.1. Preparação para a Realização do FISH

Para a realização do FISH seguiu-se o protocolo estabelecido no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal da Bahia. As amostras de sangue periférico dos 22 indivíduos participantes do estudo foram coletadas em tubo estéril tipo vácuo tendo como anticoagulante heparina, sendo que, 16 portadores de LLC atípica e 6 indivíduos controle negativo sem a presença de nenhuma doença onco-hematológica, após a coleta 1 ml de sangue foi colocado em 5mL meio de cultura RPMI com 10% de soro fetal bovino e incubado em estufa de CO₂ a 37°C por 48h em posição inclinada para aumento da área de superfície. Após o tempo o material foi centrifugado a 4000rpm por 4min, então desprezou-se o sobrenadante e colocou no tubo 3ml de solução salina de KCL a 0,006 % em banho-maria a 37°C por 12min com o objetivo de lisar as hemácias. Após o tempo interrompeu-se a reação com 500 uL da solução de Carnoy modificado (3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético), sendo então homogeneizado vigorosamente e logo em seguida centrifugado sob a mesma rotação e tempo. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 4 ml de solução de carnoy, Homogeneizou-se vigorosamente e procedeu a centrifugação. Essa etapa foi repetida mais 4 vezes a fim de se obter somente os núcleos das células.

7.2.3.2. Fixação dos Núcleos na Lâmina

Após o processo de obtenção dos núcleos o material foi fixado em lâmina previamente lavada em álcool à 70°. Foi colocado 4uL de solução contendo os núcleos no centro da lâmina. Após esse processo a lamina foi envelhecida por 24h e câmara contendo sílica, para completa desidratação.

7.2.3.3. Hibridação

O processo de hibridação com as sondas foi realizado com as sondas para família NTRK. Foi feito teste para NTRK1, 2 e 3. Em lâminas limpas e lavadas com álcool á 70 foi adicionado e fixado o material de cada paciente, sendo que, cada paciente inclusive o controle possuíam três lâminas. Após o envelhecimento foi realizado o FISH. Selecionou-se uma área que tivesse uma boa distribuição de núcleos, colocou-se 150 ng da sonda marcada em verde e da marcada em vermelho e cobriu com uma lamínula de 12mm² passou-se cola ao redor para garantir uma maior vedação. Após a secagem colocou-se a lâmina em estufa à 80°C por 5 minutos para que ocorresse a desnaturação, sendo logo em seguida colocada em câmara úmida à 37°C por 48h. Todo esse processo foi ao abrigo da luz.

7.2.3.4. Pós hibridização

Após o tempo de incubação em estufa descartou-se a lamínula e promoveu-se a lavagem da lâmina em 0,4xSSC à 72°C por 2 minutos, logo em seguida colocou-se a lâmina em 2XSSC com 0,05% Tween20 para finalização da lavagem. Então colocou-se a lâmina para escorrer o excesso de liquido ao abrigo da luz. Com a lâmina ainda úmida realizou-se a montagem com 10µl de 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.3µg/ml in Vectashield Mounting Medium, Vector Laboratories), cobertas com nova lamínula e analisadas em microscópio de fluorescência

7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1. Desenho das Sondas NTRK

Com base no estudo da literatura se obteve os desenhos da sonda para NTRK2 e NTRK3, pois o desenho para a sonda NTRK1 já tinha sido obtida por colaboração com a Universidade do Colorado. Na figura 1 observa-se que para a sonda de NTRK2 temos duas possibilidades de arranjo ou por inversão ou por translocação e as BACs utilizadas foram RP11-142B11 para a região 5' conjugada com verde possuindo aproximadamente 177 KB, já para a região 3' utilizou-se a

NTRK2 - Desenho da região de quebra da sonda

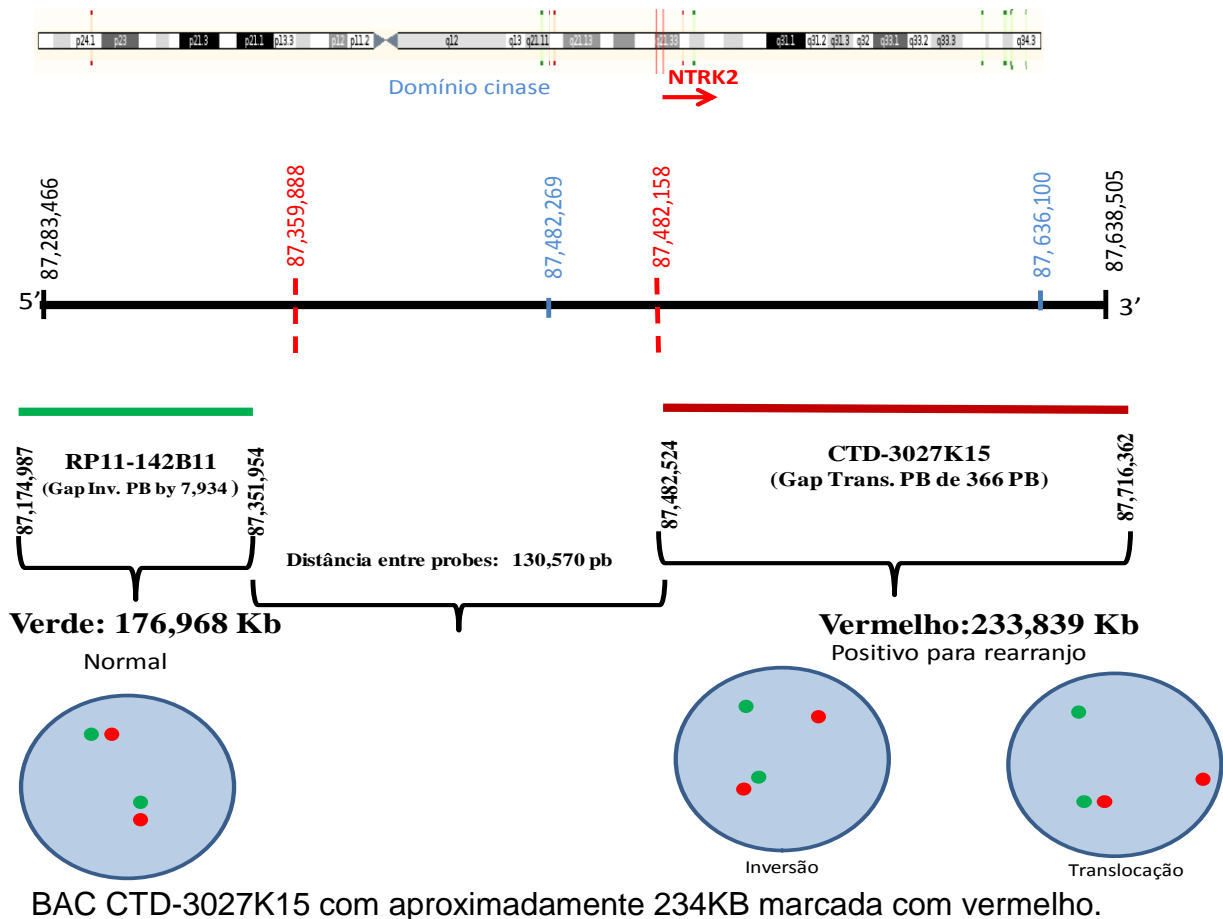


Figura1: Desenho esquemático da sonda NTRK2 com as possíveis regiões de quebra - linha tracejada em vermelho. Região do domínio cinase linha tracejada em azul. Região 5' da sonda marcada em linha verde (BAC RP11-142B11) e região 3' marcada em vermelho (BAC CTD-3027K15).

Na figura 2 observa-se que para a sonda de NTRK3 temos a possibilidade da ocorrência de uma translocação e as BACs utilizadas foram CTD-2573H21 para a região 5' conjugada com verde possuindo aproximadamente 203 KB, já para a região 3' utilizou-se a BAC RP11-336D02 com aproximadamente 176KB marcada com vermelho.

NTRK3 - Desenho da região de quebra da sonda

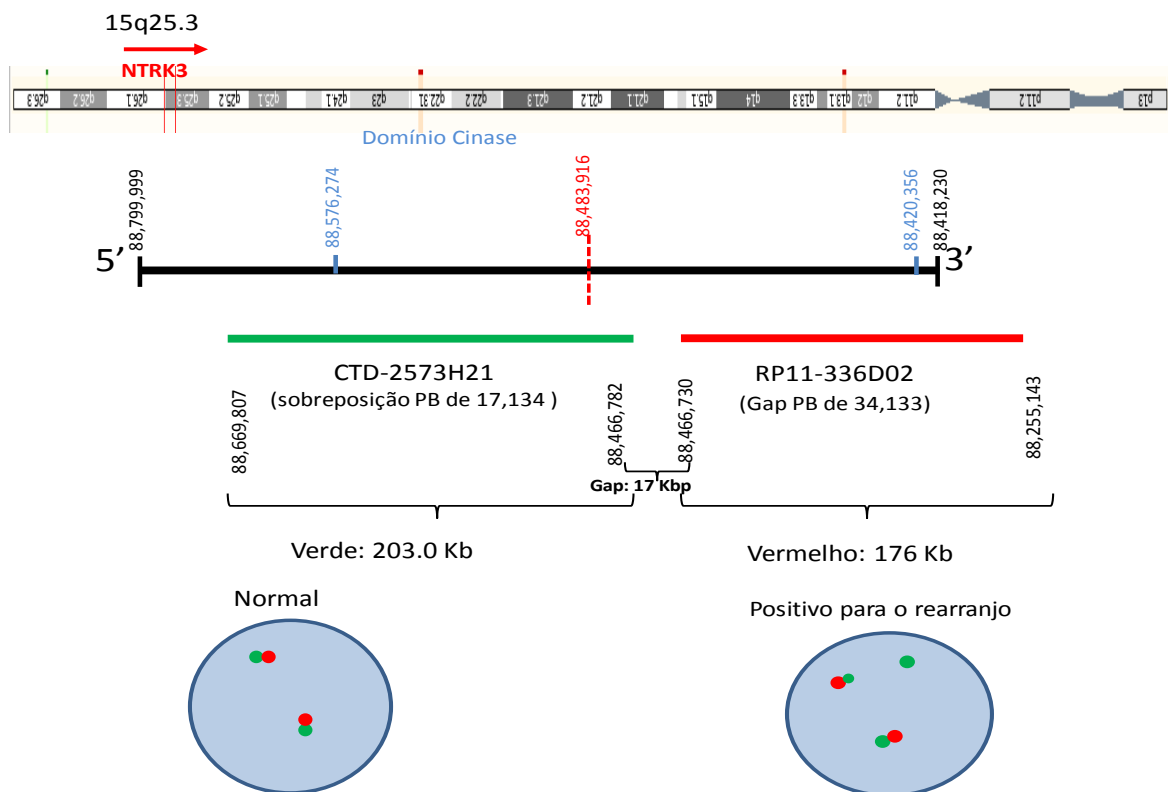


Figura 2: Desenho esquemático da sonda NTRK3 com a possível região de quebra - linha tracejada em vermelho. Região do domínio cinase linha tracejada em azul. Região 5' da sonda marcada em linha verde (BAC CTD-2573H21) e região 3' marcada em vermelho (BAC RP11-336D02)

Na validação para NTRK 2 e NTRK 3 verificou-se que as sondas desenhadas e desenvolvidas foram capazes de identificar seus cromossomos específicos, tanto no núcleo interfásico quanto metafásico. Para NTRK 2 reconheceu-se o cromossomo 9 (Fig. 3), e na validação do NTRK3 o cromossomo 15 (Fig. 4)

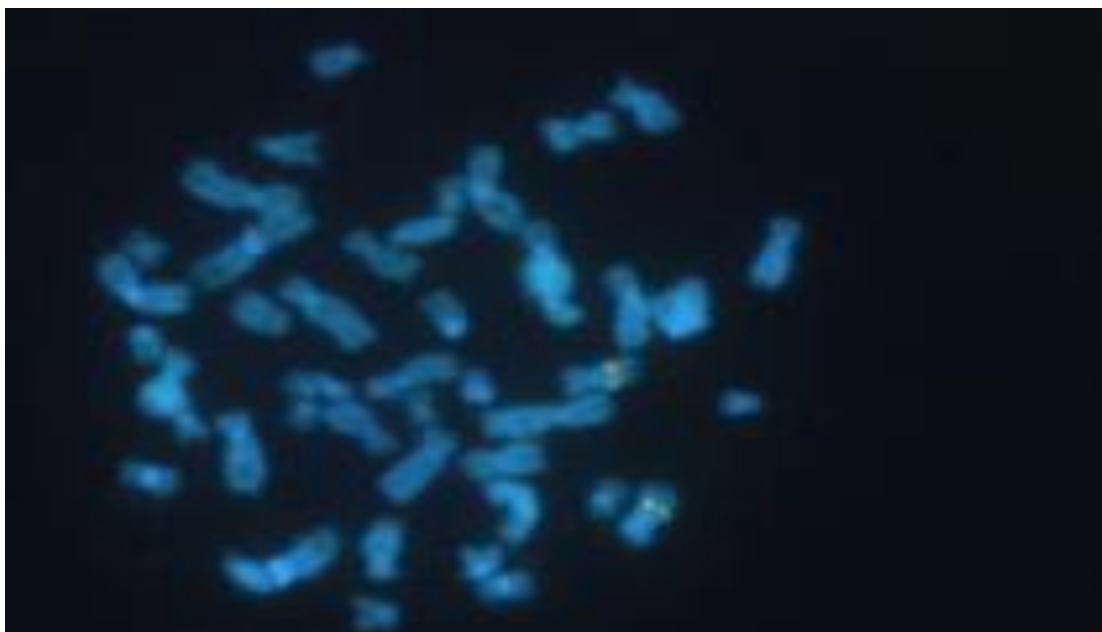


Figura 3: Imagem da validação para NTRK 2. a) Reconhecimento do cromossomo 9 pela sonda no núcleo em metáfase. Cromossomos azuis devido ao DAPI. b) Reconhecimento cromossômico no núcleo em interfase. A imagem foi adquirida em microscópio Olympus BX 51 com software Lucia cytogenetics Version 2,5

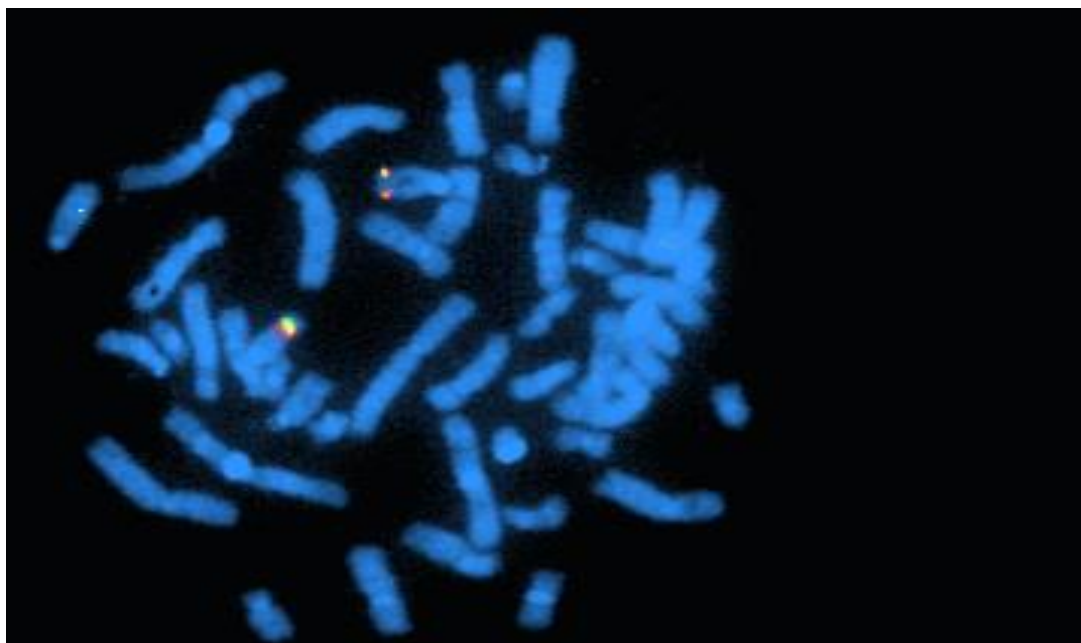


Figura 4: Imagem da validação para NTRK 3. a) Reconhecimento do cromossomo 15 pela sonda no núcleo em metáfase. Cromossomos azuis devido ao DAPI. b) Reconhecimento cromossômico no núcleo em interfase. A imagem foi adquirida em microscópio Olympus BX 51 com software Lucia cytogenetics Version 2,5.

7.3.2. FISH para Família NTRK

Quando se realizou o FISH para NTRK 1 na amostra de pacientes com LLC atípica verificou-se que do total de atípicos aproximadamente 12% possuíam mais de 25% dos núcleos apresentando separação nos sinais verde – vermelho o que pode caracterizar uma possível positividade para uma aberração cromossômica atingindo o cromossomo 1 (Fig. 6). Não há na literatura a correlação de LLC com alterações no NTRK1. Esse resultado mostra que as alterações no NTRK 1 podem também auxiliar no desencadeamento da LLC, abrindo possibilidades para alternativas de tratamento para indivíduos que possuam essa alteração.

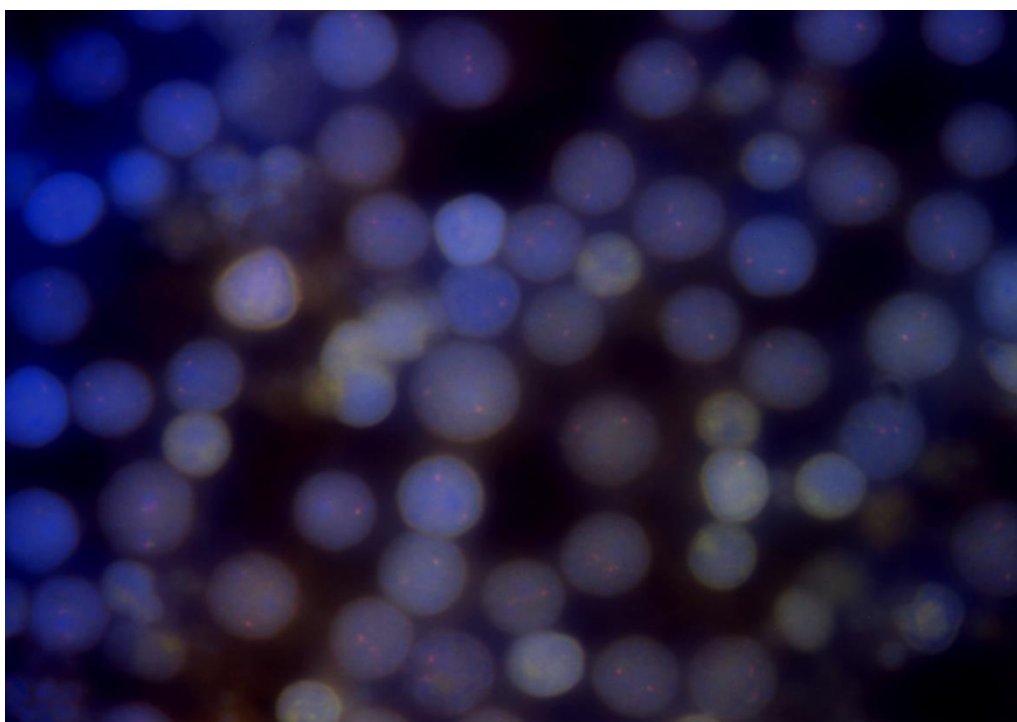


Figura 5: Imagem do resultado do controle negativo para o FISH em NTRK1 em núcleos de indivíduos controles. Visualiza-se os núcleos corados em azul devido ao DAPI e a junção dos sinais verde e vermelho, que em alguns sinais apresentam-se em tom amarelo. A imagem foi adquirida em microscópio Olympus BX 51 com software Lucia cytogenetics Version 2,5.



Figura 6: Imagem do resultado positivo para o FISH em NTRK1 em núcleos de paciente com LLC atípica. visualiza-se a separação dos sinais verde e vermelho nos núcleos que estão em uma coloração azulada devido ao DAPI. A imagem foi adquirida em microscópio Olympus BX 51 com software Lucia cytogenetics Version 2,5.

Na análise do NTRK2 nenhuma das amostras analisadas apresentaram alteração na região cromossômica do gene (Fig. 7).



Figura 7: Imagem do resultado do controle negativo para o FISH em NTRK em núcleos de paciente com LLC atípica. Visualiza-se os núcleos corados em azul devido ao DAPI e a junção dos sinais verde e vermelho, que em alguns sinais apresentam-se em tom amarelo. A imagem foi adquirida em microscópio Olympus BX 51 com software Lucia cytogenetics Version 2,5.

Quando se realizou o FISH nos pacientes com LLC atípica para verificar possíveis alterações na região do NTRK3, observou-se que aproximadamente 12% dos pacientes apresentaram translocação cromossômica, pois no estudo dos núcleos foi encontrado mais de 25% das células apresentando a separação do verde e vermelho (Fig. 9). Na literatura descreve a presença de alterações em NTRK3 translocado com ETV6 em um paciente com Leucemia Mielóide Aguda (KRALIK et al, 2011). Kin et al. (2013) evidência que há uma maior expressão do NTRK3 em pacientes com LLC quando comparados com indivíduos saudáveis o que pode promover uma maior sobrevivência das células leucêmicas.

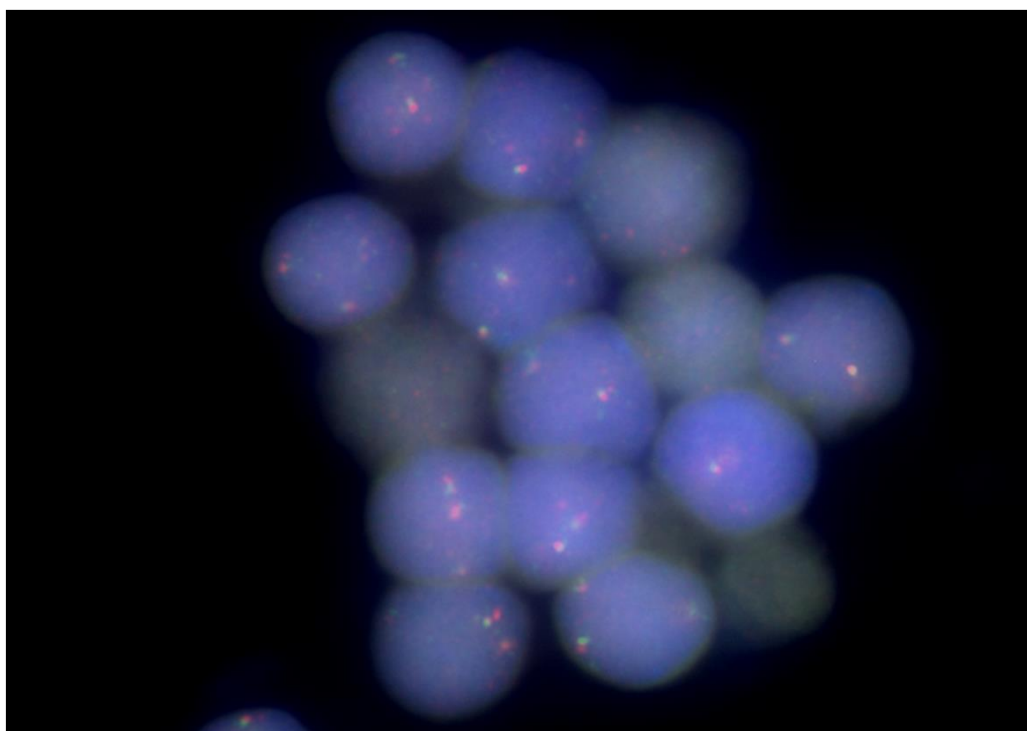


Figura 8: Imagem do resultado do controle negativo para o FISH em NTRK3 em núcleos de indivíduos controle. Visualiza-se os núcleos corados em azul devido ao DAPI e a junção dos sinais verde e vermelho, que em alguns sinais apresentam-se em tom amarelo. A imagem foi adquirida em microscópio Olympus BX 51 com software Lucia cytogenetics Version 2,5.

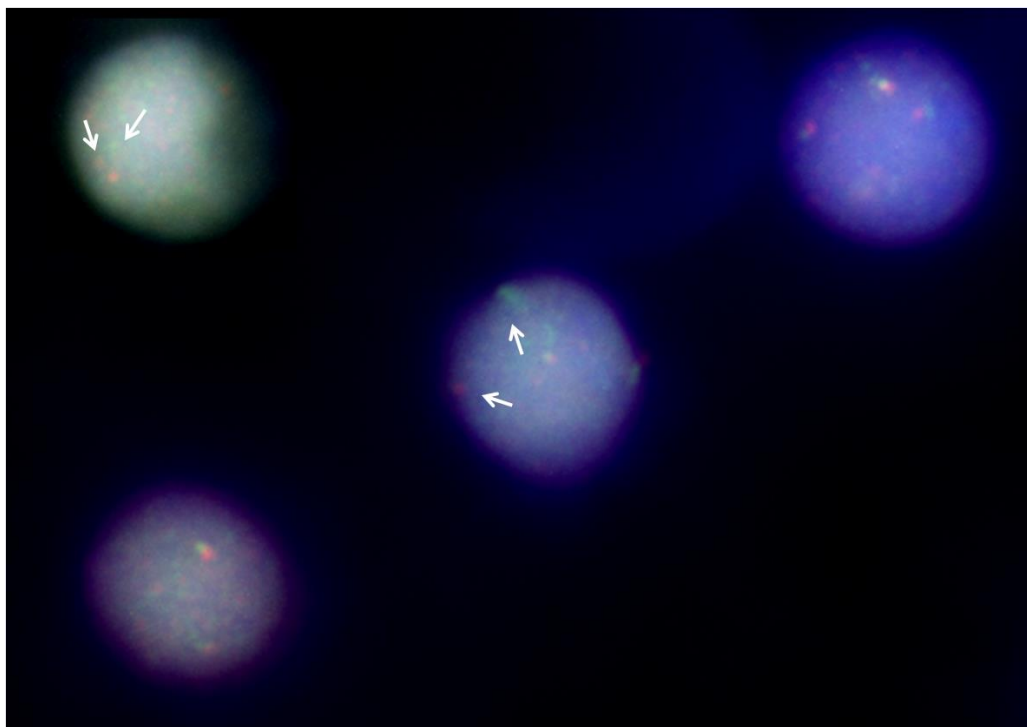


Figura 9: Imagem do resultado positivo para o FISH em NTRK3 em núcleos de paciente com LLC atípica. Visualiza-se a separação dos sinais verde e vermelho nos núcleos que estão em uma coloração azulada devido ao DAPI. A imagem foi adquirida em microscópio Olympus BX 51 com software Lucia cytogenetics Version 2,5.

7.4. CONCLUSÃO

Nossos estudos demonstraram a presença de alterações no gene NTRK1 e NTRK3 em 12% dos pacientes com LLC atípica. Isso é importante, pois ajuda a ampliar o entendimento dessa doença e possibilitar ao paciente que a possui, uma outra conduta terapêutica como a utilização de inibidores que tem como alvo elementos da família NTRK.

O estudo mostra também que essas aberrações cromossômicas participam de outros eventos neoplásicos, podendo estar presente em uma parte significativa dos indivíduos afetados por outras leucemias. A pesquisa de novas alterações cromossômicas e de alvos terapêuticos são importante devido principalmente ao crescimento do envelhecimento da população, resultando em aumento também do número de pessoas que apresentam a LLC.

Entretanto, mais estudos são necessários para a confirmação e o entendimento desses dados.

7.5. REFERÊNCIAS

Arevaldo JC, Wu SH. 2006. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci* 63:1523-1537

Barbacid M 1994 The Trk family of neurotrophin receptors. *Journal of Neurobiology* 25 1386–1403.

Bardelli A, Parsons DW, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Saha S, Markowitz S, Willson JK, Parmigiani G, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. 2003. Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science* 300:949

Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV & Rosenthal A 1991 Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* 7 857–866.

Davies H, Hunter C, Smith R, Stephens P, et al. 2005. Somatic mutation of the protein kinase gene family in human lung cancer. *Cancer res* 65:7591-7595

Hohn A, Leibrock J, Bailey K & Barde YA 1990 Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344 339–341.

Ip NY, Ibanez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR, Belluscio L, Le Beau MM, Espinosa R III, Squinto SP et al. 1992 Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *PNAS* 89 3060–3064.

Kim, MS; Kim, GM; Choi, YJ; Kim, HJ, Kim, YJ, Jin, W. 2013. Trkc Promotes Survival and growth of Leukemia Cell Through Akt-mTOR-dependent Up-Regulation of PLK-1 and Twist-1, *Mol. Cells* 36 177-184

Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H & Barde YA 1989 Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341 149–152.

Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L & Leon A 1996 Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokinin. *Trends in Neurosciences* 19 514–520.

Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM & Yancopoulos GD 1990 Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247 1446–1451.

Marchetti, A; Felicione, L; Pelosi, G; Grammastro, MD; et al. 2008. Frequent Mutation in the Neurotrophic tyrosine Receptor Kinase Gene Family in Large Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Lung. *Human mutation* 29(5), 609-616

Miknyoczki, SJ; Lang, D, Klein-Szanto, A; Dionne, CA, Ruggeri, BA. 1999b. Neurotrophins and Trk receptors in human pancreatic ductal adenocarcinoma: expression patterns and effects on *in vitro* invasive behavior

Segal RA 2003 Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annual Review of Neuroscience* 26 299–330.

Stephens P, Hunter C, Bignell G, Edkins S, Davies H, et al. 2004. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* 431:525-526

Wood LD, Calhoun ES, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Powell SM, Riggins GJ, Wang TL, Yan H, Gazdar A, Kern SE, Pennacchio L, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. 2006. Somatic mutation of GUCY2F, EPHA3, and NTRK3 in human cancer, *Hum Mutat* 27:1060-1061

Yang ZF, Ho DW, Lam CT, Luk JM, Lum CT, Yu WC, Poon RT, Fan ST. 2005. Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel functional protein in hepatocellular carcinoma. *Cancer res* 65:219-225

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Os hormônios sexuais femininos podem ser fator protetor contra as doenças onco-hematológicas.
- ✓ É grande a liberação de laudos inconclusivos para LLC e o FISH mostrou-se fundamental para a resolução desses casos , além de ser capaz de detectar múltiplas aberrações cromossômicas.
- ✓ IL-17 mostrou-se um possível marcador da evolução da doença.
- ✓ A produção associada das citocinas TNF e IFN- γ , aparentemente mostrou-se de pior prognóstico.
- ✓ A baixa produção de vitamina D pode estar associada a uma pior evolução da doença.
- ✓ Verificou-se a presença de alterações na família NTRK, principalmente NTRK1 e NTRK3, perfazendo um total de 24%.
- ✓ O indivíduo que possuía a trissomia do cromossomo 12 disparou a produção de todas as citocinas estudadas no trabalho, e apresentava alteração no NTRK 1 e no NTRK 3.
- ✓ É necessária a criação a de políticas públicas para a promoção de uma melhor qualidade de vida para a população de terceira idade que tenha como objetivo a prevenção e/ou detecção precoce das doenças onco-hematológicas comuns da idade.
- ✓ Mais estudos das aberrações cromossômicas e do comportamento imunológico dos indivíduos com doenças onco-hematológicas tornam-se importante pois poderá garantir aos pacientes abordagens terapêuticas mais eficazes, quando possível.

REFERÊNCIAS GERAIS

ANDREEFF M, DARZYNKIEWICZ Z, SHARPLESS TK, et al: Discrimination of human leukemia subtypes by flow cytometric analysis of cellular DNA and RNA. *Blood* **55**:282-293, 1980

AREF S, IBRAHIM L, AZMY E. Prognostic impact of serum 25-hydroxvitamin D [25(OH)D] concentrations in patients with lymphoid malignancies. *Hematology*. 2013;18(1):20–5. doi: 10.1179/1607845412Y.0000000025.

BYRD JC, STILGENBAUER S, FLINN IW. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2004;163-83. Review.

BURGER JA, BURGER M, AND KIPPS TJ (1999) Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Express Functional CXCR4 Chemokine Receptors That Mediate Spontaneous Migration Beneath Bone Marrow Stromal Cells. *Blood* 94(11):3658–3667.

BURGER JA, TSUKADA N, BURGER M, ZVAIFLER NJ, DELL'AQUILA M, AND KIPPS TJ (2000) Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 96(8):2655–2663.

BURGER JA, GHIA P, ROSENWALD A, AND CALIGARIS-CAPPIO F (2009) The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 114(16):3367–3375.

BURGER JA; Nurture versus Nature: The Microenvironment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology* 2011

BÜRKLE A, NIEDERMEIER M, SCHMITT-GRAFF A, WIERDA WG, KEATING MJ, AND BURGER JA (2007) Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 110(9):3316–3325.

BUSCHLE M, CAMPANA D, CARDING SR, et al: Interferony inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* **177**:213-218, 1993

CALIN GA, DUMITRU CD, SHIMIZU M, et al. Frequent deletions and down-regulation

CALLIGARIS-CAPPIO F, HAMBLIN T.J.; B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: A Bird of a Different Feather. *Journal of Clinical Oncology*, vol 17, No 1, 1999 pp 339-408

CALLIGARIS-CAPPIO F, GHIA P. The nature and origin of the B-chronic lymphocytic leukemia cell; n of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15524–15529. a tentative model. *Hematol Oncol Clin N Am*, 2004;18:849-862.

CAMPOS, L.C.; ANDRADE, D.A.P; Mantle cell non-Hodgkin's lymphoma: case report. *Rev Med Minas Gerais* 2009; 19(2): 177-179

CATERA R, SILVERMAN GJ, HATZI K, et al. (2008) Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Recognize Conserved Epitopes Associated With Apoptosis And Oxidation. *Mol Med* 14(11-12):665–674.

CHAOUCHI N, ARVANITAKIS L, AUFFREDOU MT, et al: Characterization of transforming growth factor-beta 1 induced apoptosis in normal human B cells and lymphoma B cell lines. *Oncogene* 11:1615-1622, 1995

CHAUFFAILLE, M.L.L.F.; Cytogenetics and molecular biology in chronic lymphocytic leukemia; *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v.27 n.4 São José do Rio Preto out./dez. 2005.

CHEN L, WIDHOPF G, HUYNH L, et al. (2002) Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100(13):4609–4614.

CHIATTONE, C.S.: Linfoma folicular, *Rev.bras.hematol.*, 2000,22: 206-207

Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;352:804–815.

DAMLE RN, WASIL T, FAIS F et al. IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;14:1.840-1.847.

DANCESCU M, RUBIO-TRUJILLO M, BIRON G, et al: Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemia from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J Exp Med* 176:1319-1326, 1992

DAZZI F, D'ANDREA E, BIASI G, et al: Failure of B cells of chronic lymphocytic leukemia in presenting soluble and alloantigens. *Clin Immunol Immunopathol* 75:26-32, 1995

DEAGLIO S, VAISITTI T, BERGUI L, et al. (2005) CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 105(8):3042–3050.

DIGHIERO G., BINET J.L. *Chronic lymphocytic leukemia. Hematol Cell Ther* 1996; 38: S41-S61.

DIGIUSEPPE J.A, BOROWITZ M.J. *Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias. Semin Oncol* 1998; 25: 6-10.

DOBBIN, J.A; NAJMAN, H.L.; GADELHA, M.I.P.; Treatment of mantle-cell lymphoma with Rituximab. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2002, 48(2): 257-262

Döhner H, Fischer K, Bentz M, *et al.* p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*, **85**: 1580–1589, 1995.

DOHNER H, STILGENBAUER S, LIEBISCH P, *et al.*: 11q deletions are the second most common chromosome aberration in B cell chronic lymphocytic leukemia and are associated with advanced stages and marked lymphadenopathy. *Blood* 86:1369a, 1995 (suppl 1)

DOHNER H, STILGENBAUER S, JAMES MR, *et al.* 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997;89:2516–2522.

DOHNER H, STILGENBAUER S, BENNER A *et al.* Genomic aberrations and survival in CLL. *The New Engl J Med* 2000 343:1.910-6.

DOUGLAS RS, CAPOCASALE RJ, LAMB RJ, *et al.*: Chronic lymphocytic leukemia B cells are resistant to the apoptotic effects of transforming growth factor- β . *Blood* **89**:941-947, 1997

DRAKE MT, MAURER MJ, LINK BK, HABERMANN TM, ANSELL SM, MICALLEF IN, *et al.* Vitamin D insufficiency and prognosis in non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2010;28(27):4191–8. doi: 10.1200/JCO.2010.28.6674.

DYER MJS, ZANI VJ, LU WZ, *et al.*: BCL2 translocations in leukemias of mature B cells. *Blood* **83**:3682-3688, 1994

ESCUDIER SM, LEAHY JMP, DRACH JW *et al.* Fluorescent in situ hybridization and cytogenetic studies of trisomy 12 in CLL. *Blood* 1993; 81:2.702-7.

FARIA JR, OLIVEIRA JS, DELBONE F.RM. Prognosis related to staging systems for chronic lymphocytic leukemia. *SP. Med J* 2000;118(4):83-88.

FERRARINI M, CHIORAZZI N. Recent advances in the molecular biology and immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Sem Hematol* 2004;41:207-223.

FITCHETT M, GRIFFITHS MJ, OSCIER DG, *et al.*: Chromosome abnormalities involving band 13q14 in hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* **24**:143-150, 1987

FLEISCHMAN EW AND PRIGOGINA EL. Karyotype peculiarities of malignant lymphomas. *Hum Genet*, **35**: 269–279, 1977.

GAHRTON G, ROBERT KH, FRIBERG K, *et al.* Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell-mitogen stimulation. *Blood*, **56**: 640–647, 1980.

GARAND R., ROBILLARD N. *Immunophenotypic characterization of acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders.* **Hematol Cell Ther** 1996; 38:471-486.

GARICOCHEA, B.; Pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia; Rev. Bras. Hematol. Hemoter. v.27 n.4 São José do Rio Preto out./dez. 2005

GENERAL HAEMATOLOGY TASK FORCE OF BCSH Immunophenotyping in the diagnosis of chronic lymphoproliferative disorders. J Clin Pathol 1994; 47: 871-875.

Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, et al. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol* 1998;51:364–369.

GREER JP, FOERSTER J, LUKENS JN, et al - Wintrobe's Clinical Hematology, 11. ed. americana. Philadelphia (USA): Lippincott Williams & Wilkins, 2003, 2800 p.

GONZALEZ H, MALOUM K, REMY f et al. Cleaved lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia: a detailed retrospective analysis of diagnostic features. *Leukemia & Lymphoma* 2002;43:555-564.

HAGEMEISTER F. Rituximab for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 2010;70:261–272.

HALLEK M, KUHN-HALLEK I, EMMERICH B. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1997 11(suppl 2):S4-13.

HALLEK M, CHESON BD, CATOVSKY D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: A report from the international

HALLEK,M; PFLUG,N: Chronic lymphocytic leukemia;Annals of Oncology, 2010

HALLEK M, TEFFERI A. CME Information: Chronic Lymphocytic Leukemia: 2015 Update on Diagnosis, Risk stratification, and Treatment. *American Journal of Hematology*, vol 90 No. 5 2015. doi: 10.1002/ajh.00046

HAMBLIN TJ, OSCIER DG, YOUNG BJ: Autoimmunity in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Pathol* 39:713-716, 1986

HAMBLIN TJ, OSCIER DG: Chronic lymphocytic leukemia, in Whittaker JA, Holmes J (eds): *Leukaemia and Associated Diseases*. Oxford, UK, Blackwell Science, 1998, pp 105-135

HAN T, OZER H, SADAMORI N, et al: Prognostic importance of cytogenetic abnormalities in patients with chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 310:288-292, 1984

HAN T, SADAMORI N, BLACK AMW et al. Cytogenetic studies in CLL. *Nouv Rev Franç d'Hematol* 1988;30:393-395.

HERMAN SE, GORDON AL, HERTLEIN E, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 2011;117:6287–6296.

HUHN D, VON SCHILLING C, WILHELM M, et al. Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;98:1326–1331.

JACKSON SP, BARTEK J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009;461:1071–1078.

JAFFE ES, HARRIS NL, STEIN H, VARDIMAN JW (eds): WHO classification of tumors. Pathology and Genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon,2001.

JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43–66.

JULIUSSON G, MERUP M. Cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Sem in Oncol* 1998;25(1):19-26.

KELLY JL, SALLES G, GOLDMAN B, FISHER RI, BRICE P, PRESS O, et al. Low serum Vitamin D levels are associated with inferior survival in follicular lymphoma: a prospective evaluation in SWOG and LYSA studies. *J Clin Oncol*. 2015;33(13):1482–90. doi: 10.1200/JCO.2014.57.5092.

Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2011;20:246–259.

KONOPLEV S, MEDEIROS LJ, BUESO-RAMOS CE et al. Immunophenotypic profile of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macro-globu-linemia. *Am J Clin Pathol* 2005;124:414-420.

KUPPERS, R; DALLA-FAVELA,R; Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas; *Nature*, 10 September 2001, Volume 20, Number 40, Pages 5580-5594.

JAFFE ES, HARRIS NL, STEIN H, VARDIMAN JW. Eds. IARC Press 2001;127-130.

LANZAVECCHIA A: Antigen-specific interactions between T and B cells. *Nature*314:537-539, 1985

LARSSON LG, GRAY HE, TOTTERMAN T, et al: Drastically increased expression of MYC and FOS protooncogenes during *in vitro* differentiation of chronic lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:223-225, 1987

LORAND-METZE, I.; CHIARI, A.C.; PEREIRA, F. G.; The value of a small panel of monoclonal antibodies for the differential diagnosis of lymphoproliferative syndromes.; *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v.22 n.1 São José do Rio Preto jan./abr. 2000

LORAND-METZE, I.; CLL: Diagnostic criteria, immunophenotyping and differential diagnosis; *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v.27 n.4 São José do Rio Preto out./dez. 2005

LOTZ M, RANHEIM E, KIPPS TJ: *Transforming growth factor β as endogenous growth inhibitor of chronic lymphocytic leukemia B cells. J Exp Med* **179**:999-1004, 1994

MATUTES E., OWUSU-ANKOMAH K., MORILLA R., et al. *The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. Leukemia* 1994; 8: 1640-1645.

MAURO FR, FOA R, GIANNARELLI D et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood* 1999;94:448-454.

MESSMER BT, ALBESIANO E, EFREMOV DG et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2004;200:519-25.

MOLICA S. Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leuk Lymphoma* 2006;47:1477–1480.

MOLICA S, DIGIESI G, ANTENUCCI A, LEVATO L, MIRABELLI R, MOLICA M, et al. Vitamin D insufficiency predicts time to first treatment (TFT) in early chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leuk Res.* 2012;36(4):443–7. doi: 10.1016/j.leukres.2011.10.004.

Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* 1997;108:378–382.

MÜLLER-HERMELINK HK, CATOVSKY D, MONTSERRAT E, HARRIS NL. Chronic lymphocytic leukaemia / small lymphocytic lymphoma - in: WHO Classification of Tumours; Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.

NASCIMENTO MC, YAMAMOTO M, RODRIGUES MM, et al. Chromosomal Abnormalities (FISH) and their Relation with Clinical Stage, CD38 and ZAP-70. *Rev Bras. Hematol. Hemoter.* 2006;28 (1):5-10.

National Cancer Institute [Website]. Surveillance Epidemiology and End Results Cancer Statistics review. 2009. Available at: <http://seercancer.gov/statfacts/html/clylhtml>. Last accessed March 29 2010.

NARURKAR, ROSHNI; ALKAYEM, MOHAMMAD AND LIU, DELONG. SOX11 is a biomarker for cyclin D1-negative mantle cell lymphoma. *Biomarker Research* 2016;4:6 DOI: 10.1186/s40364-016-0060-9

NISHIO M, ENDO T, TSUKADA N, et al. (2005) Nurse-like cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 α . *Blood* 106(3):1012–1020.

O'BRIEN S, KANTARIJAN H, THOMAS D, et al. Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Oncol* 2001;19:2165–2170.

OFFIT K, PARSA NL, GAIDANO G, et al: 6q deletions define distinct clinico-pathologic subsets of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* **82**:2157-2162, 1993

OSCIER DG, MATUTES E, COPPLESTONE A, et al: Atypical lymphocyte morphology: An adverse prognostic factor for disease progression in stage A CLL independent of trisomy 12. *Br J Haematol* **98**:934-939, 1997

OWEN RG, BARRANS SL, RICHARDS SJ et al. Waldenström macro-globulinemia: development of diagnostic criteria and identification of prognostic factors. *Am J Clin Pathol* 2001;116:420-428.

PANAYIOTIDIS P, GANESHAGURU K, JABBAR SA, et al: Interleukin-4 inhibits apoptotic cell death and loss of the bcl-2 protein in B-chronic lymphocytic leukaemia cells *in vitro*. *Br J Haematol* **85**:439-445, 1993

PANAYIOTIDIS P, GANESHAGURU K, JABBAR SA, et al: Alpha-interferon (alpha-IFN) protects B-chronic lymphocytic leukaemia cells from apoptotic cell death *in vitro*. *Br J Haematol* **86**:169-173, 1994

PANAYIOTIDIS P, JONES D, GANESHAGURU K, FORONI L, AND HOFFBRAND AV (1996) Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells *in vitro*. *Br J Haematol* 92(1):97–103.

PEDERSEN IM, KITADA S, LEONI LM, et al. (2002) Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood* 100(5):1795–1801.

PEZZELLA F, TSE AGD, CORDELL JL, et al: Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* **137**:225-232, 1990

POGUE SL, KUROSAKI T, BOLEN J, et al. B cell antigen receptor-induced activation of akt promotes B cell survival and is dependent on syk kinase. *J Immunol* 2000;165:1300–1306.

RAMSAY AG, JOHNSON AJ, LEE AM, et al. (2008) Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest* 118(7):2427–2437.

REITTIE JR, HOBBLAND AV: Interleukin-4 (IL-4) inhibits proliferation and spontaneous cytokine release by chronic lymphocytic leukaemia cells. *Leuk Res* **18**:55-60, 1994

RESNITZKY, MATUTES E, HEDGES M et al. The ultrastructure of mantle cell lymphoma and other B-cell disorders with translocation t(11;14) (q13;q32). *Br J Haematol* 1996;94(2):352-61.

ROBERT KH, MÖLLER E, GAHRTON G, et al. B-cell activation of peripheral blood lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Clin Exp Immunol*, **33**: 302–308,1978.

ROSENWALD A, ALIZADEH AA, WIDHOPF G et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194:1.639-47.

ROZMAN C, MONTSERRAT E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995;333:1052–1057.

SCHENA M, LARSSON LG, GOTTARDI D, et al: Growth and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* **79**:2981-2989, 1992.

SEIFFERT M, DIETRICH S, JETHWA A, et al. Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2012;53:1023–1031.

SHANAFELT TD, CALL TG. Current approach to diagnosis and management of CLL. *Mayo Clin Proc* 2004;79:388-98.

STILGENBAUER S, LICHTER P, DOHNER H. Genetic Features of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*. Vol 4.1 . March 2000

STILGENBAUER S, DOHNER H. Molecular genetics and its clinical relevance. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004;18(4):827-48, viii.

SWERDLOW, H., ELIAS CAMPO, STEFANO A. PILERI, NANCY LEE HARRIS, HARALD STEIN, REINER SIEBERT, RANJANA ADVANI, MICHELE GHIELMINI, GILLES A. SALLES, ANDREW D. ZELENETZ AND ELAINE S. JAFFE. The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016 :blood-2016-01-643569; doi:10.1182/blood-2016-01-643569

TEELING JL, MACKUS WJ, WIEGMAN LJ, et al. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol* 2006;177:362–371.

TEFFERI A, BARTHOLMAI BJ, WITZIG TE, et al: Clinical correlations of immunophenotypic variations and the presence of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Genet Cytogenet* **95**:173-177, 1997

VASCONCELOS, Y; Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia; *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v.27 n.4 São José do Rio Preto out./dez. 2005

WATSON L, WYLD P, CATOVSKY D. Disease burden of chronic lymphocytic leukemia within the European Union. *Eur J Haematol* 2008;81:253–258.

WEINBERG RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81: 323–330, 1995.

WIESTNER A. EMERGING role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:88–96.

workshop on chronic lymphocytic leukemia updating the national cancer Instituteworking group 1996 guidelines. *Blood* 2008;111: 5446–5456.

XUE TH, MARCO JG, ELLIS J ET AL. TRISOMY 12 in CLL detected by FISH. *Blood* 1993;82:571-5.

YAMAMOTO M, FIGUEIREDO VLP. Epidemiologia da Leucemia Linfocítica e Leucemia Linfocítica Crônica Familiar. *Revista Brasileira de Hematologia Clínica*. 2005;27 (4): 229-232.

Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: Evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 2010;24:2072–2079.