



Dissertação – Artigo de Revisão Bibliográfica

Mestrado Integrado em Medicina – 2016/2017

NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS NO TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA

Autora: Inês Fernandes Carvalho dos Santos Cruz

Orientadora: Dra. Cristina Maria Andrade Pereira Gonçalves

Coorientadora: Dra. Ana Margarida Dantas de Brito Rodrigues

Porto 2017

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Dissertação – Artigo de Revisão Bibliográfica

Mestrado Integrado em Medicina – 2016/2017

NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS NO TRATAMENTO DA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA

Autor: Inês Fernandes Carvalho dos Santos Cruz, estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto. Contacto: inessantoscruz@gmail.com.

Orientadora: Dra. Cristina Maria Andrade Pereira Gonçalves, Assistente Hospitalar Graduada de Hematologia, Professora Auxiliar Convidada de Hematologia da Disciplina de Clínica Médica do Mestrado Integrado em Medicina no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar/ Centro Hospitalar do Porto.

Coorientadora: Dra. Ana Margarida Dantas de Brito Rodrigues, Hematologista Clínica Lovisenberg Diakonale Sykehus, Oslo.

AGRADECIMENTOS

À Doutora Cristina Gonçalves, por me ter mostrado a beleza da hematologia durante o 5º ano do curso e ter aceite ser minha orientadora neste trabalho.

À Dra. Ana Margarida Rodrigues, pela sua orientação, total apoio, disponibilidade, pelas opiniões e críticas, ajuda a solucionar os problemas e dúvidas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho e por todas as palavras de incentivo.

Aos meus pais, por serem o meu pilar, por todo o apoio incondicional, incentivo e paciência demonstrados ao longo desta caminhada.

À minha família e amigos, que são imprescindíveis e estão sempre presentes na minha vida.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	4
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
MATERIAL E MÉTODOS.....	8
INTRODUÇÃO	9
EPIDEMIOLOGIA E FISIPATOLOGIA.....	10
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	15
CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO COMPLEMENTAR	16
PROGNÓSTICO E ESTADIAMENTO	19
OPÇÕES TERAPÊUTICAS.....	22
Agentes alquilantes e análogos das purinas	22
Anticorpos monoclonais	23
Inibidores do BCR	24
Inibidores do Bcl-2.....	28
Terapêutica com CAR T.....	30
Abordagem terapêutica na prática clínica.....	30
Abordagem terapêutica na recidiva	31
Tratamento das complicações da LLC	32
CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

- AHA: Anemia hemolítica autoimune
BCR: Recetor da célula B
 β 2M: Microglobulina beta-2
BR: Bendamustina e rituximab
BTK: Bruton tirosina cinase
CAR-T: Células T com recetor de antígeno quimérico
CIRS: *Cumulative illness rating scale*
CLB: Clorambucil em monoterapia
CLB-O: Clorambucil combinado com obinutuzumab
CLB-R: Clorambucil combinado com rituximab
DRM: Doença residual mínima
ECOG: *Eastern cooperative oncology group*
FC: Fludarabina e ciclofosfamida
FCR: Fludarabina, ciclofosfamida e rituximab
FISH: Hibridização *in situ*
GCSF: Fator estimulador de colónias de granulócitos
Ig: Imunoglobulina
IGVH: Genes da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina
ITAM: Motivos de ativação baseados nos imunorecetores de tirosina
LBM: Linfocitose monoclonal de células B
LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B
LH: Linfoma de Hodgkin
LLC: Leucemia linfocítica crónica
LNH: Linfoma não Hodgkin
M-LLC: Mutação nos genes IGVH
MO: Medula óssea
PI3K: Fosfatidilinositol-3-cinase
PKC: Proteína cinase C
PLCY2: Fosfolipase CY2
RC: Remissão completa
R-CHOP: Rituximab, ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina e dexametasona
RP: Remissão parcial
RP-L: Remissão parcial com linfocitose persistente
SLD: Sobrevivência mediana livre de doença
SP: Sangue periférico

Syk: *Spleen* tirosina cinase

TDL: Tempo de duplicação dos linfócitos

TK: Timidina cinase

TRG: Taxa de resposta global

U-LLC: genes IGVH não mutados

RESUMO

Introdução: a leucemia linfocítica crônica é caracterizada pela acumulação de linfócitos B monoclonais no sangue periférico, medula óssea e órgãos linfóides. É a leucemia mais comum nos adultos e tem uma evolução clínica muito heterogênea. A sobrevivência mediana dos doentes pode variar entre meses a décadas. Nos últimos anos têm surgido diferentes opções terapêuticas, fruto de investigação básica e clínica. Os novos medicamentos atuam em alvos moleculares específicos e aumentaram o leque de opções terapêuticas. Estes fármacos são particularmente importantes para o tratamento de doentes com mau prognóstico.

Objetivos: revisão bibliográfica da literatura, com enfoque na fisiopatologia desta doença, caracterização das principais vias de sinalização celular envolvidas e dos fármacos que inibem de forma específica as células tumorais.

Desenvolvimento: o conhecimento da biologia da leucemia linfocítica crônica tem permitido o desenvolvimento de novas terapêuticas sendo de salientar o advento do anticorpo monoclonal rituximab no final da década de 90. Entretanto novos fármacos com diferentes alvos terapêuticos foram sendo desenvolvidos. Os inibidores das cinases ibrutinib e idelalisib, que têm como alvos a BTK e a PI3K respetivamente e os inibidores do Bcl-2, ABT-199 (venetoclax), têm demonstrado grande eficácia particularmente em doentes com fatores de mau prognóstico. Um grupo de agentes futuros são os recetores do antigénio quimérico da célula T, sobre os quais recai grande expectativa graças ao desempenho favorável que têm demonstrado nos ensaios clínicos de fase I e II. Assim, o objetivo deste trabalho é fazer uma revisão bibliográfica dos conhecimentos atuais sobre as anomalias celulares, em particular o papel do recetor da célula B e vias de sinalização associadas, alterações genéticas na leucemia linfocítica crônica, a sua identificação e caracterização clínica e laboratorial. Além disso, pretende-se analisar de que modo estes novos marcadores moleculares constituem importantes alvos terapêuticos.

Conclusão: o avanço da ciência permitiu um melhor conhecimento da fisiopatologia da doença e, portanto, desenham-se estratégias terapêuticas cada vez mais específicas. São descritos neste trabalho novos fármacos, o seu mecanismo de ação e tolerância. Alguns destes, encontram-se ainda em estudo em ensaios clínicos em fase I ou II, sendo por isso, pouco conhecidos. A Leucemia Linfocítica Crônica é a leucemia mais comum entre adultos e prevendo-se que a sua incidência esteja a aumentar, considero um contributo importante a realização deste trabalho, no sentido de dar a conhecer aos clínicos as opções que dispõem, pesando as características do doente (comorbilidades), tolerância ao tratamento e eventualmente os custos do mesmo.

Palavres – chave: leucemia linfocítica crônica, novos agentes, tratamento, prognóstico, diagnóstico.

ABSTRACT

CLL is characterized by the accumulation of monoclonal B lymphocytes in the peripheral blood, bone marrow and lymphoid organs. It is the most common leukemia in adults in the Western world with a very heterogeneous clinical course and a survival rate ranging from months to decades. In the last few years different therapeutic options have arisen, fruit of basic and clinical investigation. The new drugs act on specific molecular targets and have increased the range of therapeutic options. These drugs are particularly important for the treatment of patients with poor prognosis.

The present work is a literature review, focusing on the pathophysiology of this disease, characterization of the main cellular signaling pathways involved and the drugs that specifically inhibit tumor cells.

The biology knowledge of CLL has allowed the development of new therapeutics, and an important milestone came with the advent of rituximab at the end of the 90s. Meanwhile, new drugs with different therapeutic targets have been developed. The kinase Inhibitors like Ibrutinib and idelalisib, which have targeted BTK and PI3K respectively and the Bcl-2 inhibitors, ABT-199 (venetoclax) have shown great effectiveness particularly in patients with poor prognostic factors. The Chimeric antigen receptor T- Cell have demonstrated good outcomes in early clinical trials.

The advances in science allow for a better understanding of the pathophysiology of the disease allowing for more targeted therapeutical strategies.

This bibliographic review covers new drugs and their mechanisms of action. Some of these drugs are on phase I or II of their development and, therefore, little is known. Thus, the objective of this work is to make a literature review of the current knowledge about cellular abnormalities, in particular the role of the B cell receptor and associated signaling pathways, genetic alterations in CLL, their identification and clinical and laboratory characterization.

Chronic Lymphocytic Leukemia is the most common form of Leukemia among adults and its incidence is expected to increase. I consider this work to be an important contribution to make known the options available to clinicians whilst taking in consideration the patient's characteristics (comorbidities), their tolerance to the treatment, when present, and weighing out costs.

Key - words: chronic lymphocytic leukemia, new agentes, treatment, prognosis, diagnosis.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste artigo de revisão bibliográfica foi efetuada uma pesquisa de artigos na base de dados bibliográfica *PubMed*. As palavras-chave usadas foram: leucemia linfocítica crónica, novos agentes, tratamento, prognóstico e diagnóstico. Os artigos foram selecionados ou excluídos conforme o conteúdo, título e/ou resumo. Apenas foram selecionados artigos publicados em inglês ou português e que foram publicados durante o período de 2006 e 2017. A pesquisa inclui também a procura de artigos nas referências bibliográficas de estudos analisados, assim como literatura pertinente e a livros publicados no âmbito da temática abordada.

INTRODUÇÃO

A Leucemia linfocítica crônica (LLC) é uma neoplasia hematológica linfoproliferativa que resulta da proliferação e acumulação de linfócitos B monoclonais patológicos. A manifestação pode consistir em leucemia ou linfoma, de acordo com o local preferencialmente afetado, sangue periférico (SP) e medula óssea (MO) ou gânglios linfáticos, respetivamente. Embora a verdadeira etiologia para esta anomalia biológica permaneça desconhecida na maioria dos casos, a crescente compreensão e estudo das anomalias celulares e vias de sinalização associadas, bem como das alterações genéticas têm permitido desenvolver uma grande variedade de investigações orientadas para terapêuticas alvo. Assim, são explorados os inibidores do recetor da célula B (BCR) e explicada a sua sinalização celular para melhor compreensão dos seus alvos, como por exemplo o ibrutinib e idelalisib, que têm como alvos a Bruton tirosina cinase (BTK) e a Fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) respetivamente. Por outro lado, a desregulação das proteínas da família do Bcl-2 é responsável pela evasão à apoptose observada nas células neoplásicas, sendo pertinente falar dos inibidores do Bcl-2, como o ABT-199 (venetoclax). Um grupo de novos agentes que se encontra, ainda, sobre investigação são as células T com recetor de antígeno quimérico (CAR-T), que têm demonstrado resultados promissores nos doentes com LLC refratária e recidivante.

EPIDEMIOLOGIA E FISIPATOLOGIA

A LLC e o Linfoma Não Hodgkin Linfocítico (LNH linfocítico), também designado por Linfoma de pequenos linfócitos B enquadram-se nas neoplasias hematológicas linfoproliferativas. A LLC constitui a leucemia mais comum no mundo, sendo mais prevalente em indivíduos caucasianos. Tem uma incidência de 4.2:100000/ano e prevê-se um aumento da prevalência e mortalidade da doença nas próximas décadas resultante das alterações demográficas da população.(1, 2) A mediana de idades ao diagnóstico varia entre os 67 e os 72 anos, sendo os homens são mais afetados que as mulheres (1.7:1) e há uma suscetibilidade hereditária para o desenvolvimento da LLC nos familiares de membros com a doença, risco de 6 a 9 vezes superior.(1, 2) Não estão identificados fatores de risco ocupacionais ou ambientais que predisponham para o desenvolvimento de LLC, há no entanto, relatos de um aumento do risco da doença entre agricultores, trabalhadores expostos ao benzeno, solventes e borracha, porém estas associações não estão cientificamente comprovadas.(3, 4)

A LLC resulta da proliferação e acumulação de linfócitos B maduros monoclonais.(5) Assim, para a compreensão da fisiopatologia da doença e mecanismos de ação dos fármacos é importante entender a evolução das células B progenitoras até células maduras, bem como a estrutura e sinalização do BCR.

O desenvolvimento das células B na MO inicia-se com a diferenciação das células precursoras linfoides diferenciadas em células da linhagem B mais precoce, as células progenitoras (células pró-B). A maturação das células B depende do rearranjo do DNA das imunoglobulinas (Igs) das células tronco linfoides, sendo que o primeiro rearranjo ocorre no estadió de célula pró-B, o rearranjo dos genes de cadeia pesada D_H-J_H seguido pelo rearranjo $V_H-D_H-J_H$. Assim que o rearranjo da cadeia pesada é finalizado, a célula é classificada como célula pré-B. O desenvolvimento da célula pré-B em célula B imatura requer o rearranjo dos genes da cadeia pesada (V_L-J_L). As células B imaturas expressam mIgM (IgM de membrana) juntamente com Ig- α ou Ig- β , na superfície celular, formando o BCR. Estas células entram na circulação sanguínea para alcançarem a sua maturação completa, que é marcada pela coexpressão de IgD e IgM na membrana celular.(6)

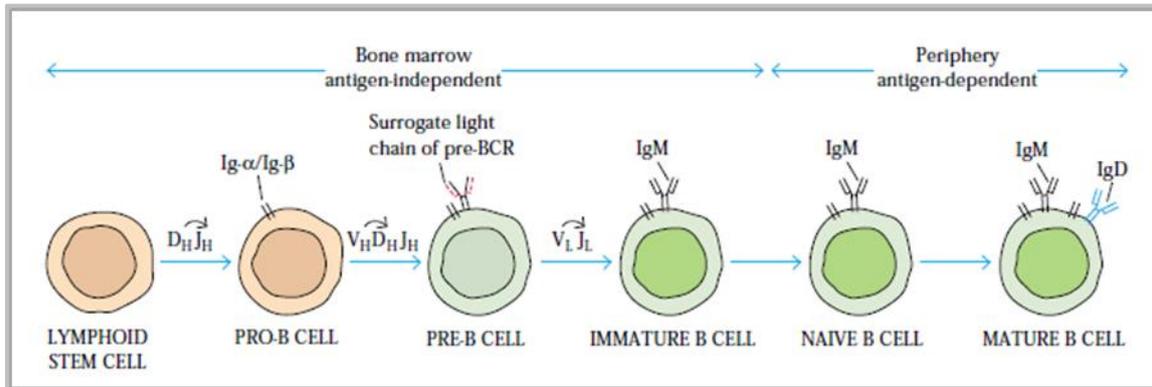


Figura 1: Maturação da célula B(6)

Após a saída da MO, a ativação, proliferação e diferenciação ocorrem na periferia em resposta a um antígeno, na sua ausência, as células B morrem por apoptose. A ativação e a seleção clonal leva à produção de células plasmáticas e células B de memória.(6) Os gânglios linfáticos são filtros extremamente eficientes capazes de aprisionar mais de 90% dos antígenos que a eles chegam pelos linfáticos aferentes. No córtex do gânglio existem folículos primários e predominam células B, no paracórtex predominam as células T. Os folículos primários, após exposição a algum antígeno, desenvolvem-se em folículos secundários, caracterizados por terem centralmente um centro germinativo que contém linfócitos, macrófagos e células dendríticas, todos ativados. Os centros germinativos surgem entre 7 e 10 dias após a exposição inicial ao antígeno e ocorrem três importantes eventos de diferenciação das células B: maturação da afinidade, mudança de classe e formação de células B de memória e células plasmáticas. Mediante hipermutação somática e translocação de cadeias pesadas, ocorre transformação dos linfócitos em centroblastos, estes, param de se dividir e aumentam a expressão das Igs de superfície, passando a denominar-se centrócitos. Os centrócitos devem interagir com as células dendríticas foliculares e com as células T auxiliares para sobreviver, as células B portadoras de Igs de membrana de alta afinidade recebem o segundo sinal de sobrevivência das células T auxiliares e diferenciam-se em células de memória ou células plasmáticas produtoras de anticorpos. O encontro com as células T auxiliares pode, também, induzir troca de classe.(6)

Um BCR funcional é essencial tanto para o desenvolvimento, maturação e libertação das células B da MO e desempenha um papel fundamental na ativação das células B maduras nos órgãos linfoides secundários. O BCR é composto por uma molécula de imunoglobulina transmembranar associada a um heterodímero $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ (CD79A/CD79B) ligados por uma ponte dissulfídica. O antígeno é reconhecido pela Ig

transmembranar e a transdução de sinal é iniciada na cauda citoplasmática do complexo Ig α Ig β . A estimulação dos recetores por antígenos pode ser modificada por sinais enviados a partir de correceptores. Um componente da membrana, denominado correceptor da célula B (um complexo de três proteínas: CD19, CD21 e CD81) fornece sinais estimuladores e outra proteína de membrana, o CD22, fornece sinais inibitórios.(6)

A ligação inicial do antígeno leva à formação do sinalossoma, um complexo de cinases e proteínas ancoradas na membrana plasmática associadas ao BCR. O *trigger* para a formação do sinalossoma é a fosforilação dos motivos de ativação baseados nos imunorreceptores de tirosina (ITAM) na cauda do Ig α Ig β pelas proteínas tirosina cinase da família Src (como a Lyn, Blk e Fyn). Estas fosforilações, criam locais de ancoramento aos quais a *spleen tyrosine kinase* (Syk) se liga, sofrendo assim ativação. Por sua vez, a Syk ativada fosforila a proteína adaptadora BLNK, criando locais de ancoramento para a fosfolipase CY2 (PLCY2) e para a BTK. A Syk ativa a BTK que ativa secundariamente a PLCY2. Por outro lado, a fosforilação do CD19 pelas tirosina cinases Src leva ao recrutamento da PI3K.(7)

Após a formação do sinalossoma, a segunda fase da transdução de sinal do BCR envolve a ativação distal de outras moléculas como o inositol-1,4,5-trifosfato e o diacilglicerol que induzem a libertação de cálcio intracelular e ativam a Proteína cinase C (PKC), esta por sua vez, ativa fatores de transcrição incluindo o NF- κ B e o fator nuclear das células T ativadas. O recrutamento da PI3K para a membrana plasmática induz a produção de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato que é essencial para o perfeito funcionamento da BTK e também para a subsequente ativação da AKT. A PLCY2 está, também, envolvida na via de ativação de proteínas cinases ativadoras de mitógenos, como a ERK1/2, JNK e p38. De notar que a ERK 1/2, também, pode ser regulada pelo RAS/RAF1.(7)

A terceira e última fase de eventos, envolve modulação de múltiplos reguladores que, em última instância, vão mediar mudanças na proliferação celular, sobrevivência e migração celular.(7)

É importante salientar que os reguladores negativos do sinalossoma, como CD22, CD5, CD72 e Fc γ RIIIB, são essenciais para o controlo da duração e intensidade da sinalização celular do BCR.(7)

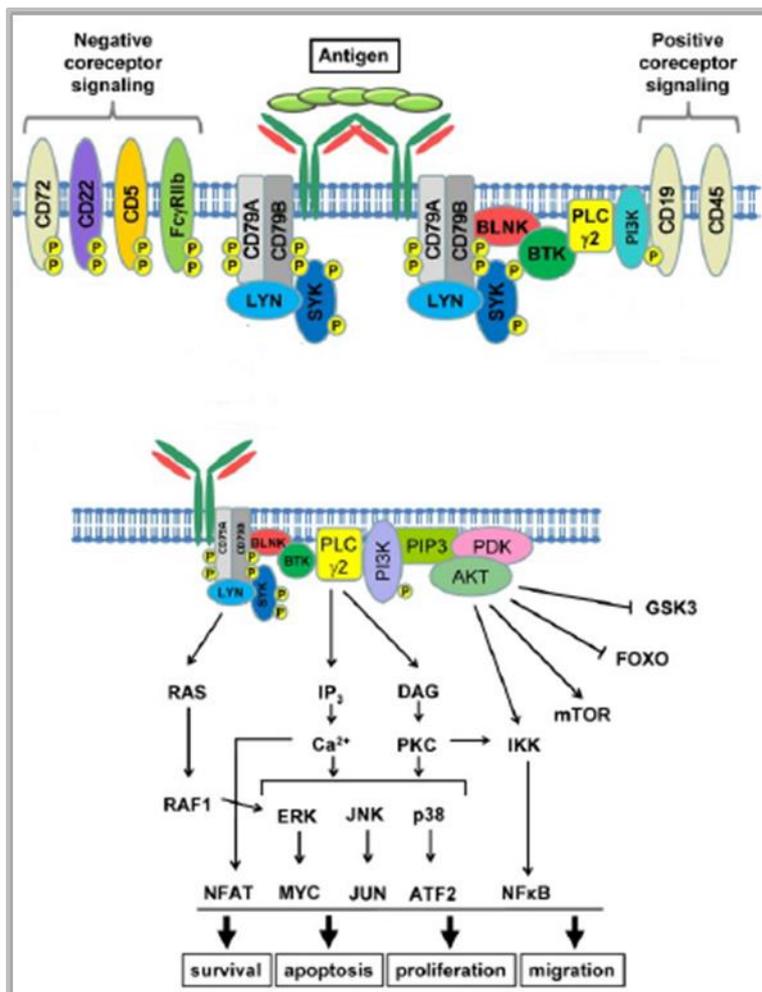


Figura 2: BCR e suas vias de sinalização celular(7)

A Linfocitose monoclonal de células B (LMB) é uma condição que apresenta similaridades biológicas com a LLC e que poderá ser um precursor pré maligno da mesma.(8) A frequência da LMB na população geral é de cerca de 4% mas, é superior em familiares próximos de doentes com LLC (entre 14-18%) e a sua frequência é cerca de 100 vezes superior à LLC.(8) Os critérios de diagnóstico da LMB são os seguintes(8):

- População monoclonal de células B <5000 células/μL.
- A monoclonalidade é documentada pelo rearranjo da cadeia pesada da Ig ou pela restrição da cadeia leve.
- Nenhuma característica sistêmica de doença linfoproliferativa (por exemplo, sem linfadenopatia, hepato-esplenomegalia, febre, perda de peso ou suores).
- Nenhuma doença autoimune ou infecciosa.

A LMB pode ainda ser subclassificada como LLC-*Like* apresentando-se fenotipicamente semelhante à LLC com positividade para o CD5 e CD23 e baixa expressão de CD20 e CD79B. Apesar de similares, são duas condições diferentes, já que os indivíduos com

LBM têm um prognóstico mais favorável, com uma progressão para LLC de 1.1%/ano. Porém, verificou-se que a maioria dos indivíduos com LBM não desenvolvem LLC, assim, a LBM poderá não ser necessariamente um precursor pré-maligno da LLC, no entanto, indivíduos com LBM devem ter vigilância clínica. Os fatores de risco que contribuem para a evolução da LMB ainda não estão completamente esclarecidos, sendo a contagem absoluta de células B >3.7x10⁹ células é o único fator independente para a progressão de LMB em LLC. A LBM evolui de forma variável podendo persistir estável, evoluir para doenças linfoproliferativas ou eventualmente regredir espontaneamente.(8) Relativamente à progressão para LLC, a fisiopatologia pode ser dividida em 2 passos sequenciais:

- Origem da LBM: enquanto que o processo iniciador é desconhecido, a LBM parece resultar de múltiplos fatores, como a resposta a estimulação antigénica, suporte do microambiente, mutação génica, alterações epigenéticas e anormalidades citogenéticas. O resultado é um clone de células B com o fenótipo da LLC.(9)
- Progressão da LBM para LLC: agressões continuadas ao clone da célula B, tanto por alterações genéticas adicionais, como por alterações no microambiente da MO, resultam na progressão da LBM para LLC. Esta progressão ocorre numa minoria de doentes com LBM.(9) As células tumorais da LLC, expressam o BCR com um repertório restrito de mutações, o que resulta numa sinalização autónoma, não dependente de estimulação com antígenios, promovendo assim, o aumento da sua sobrevivência.(10)

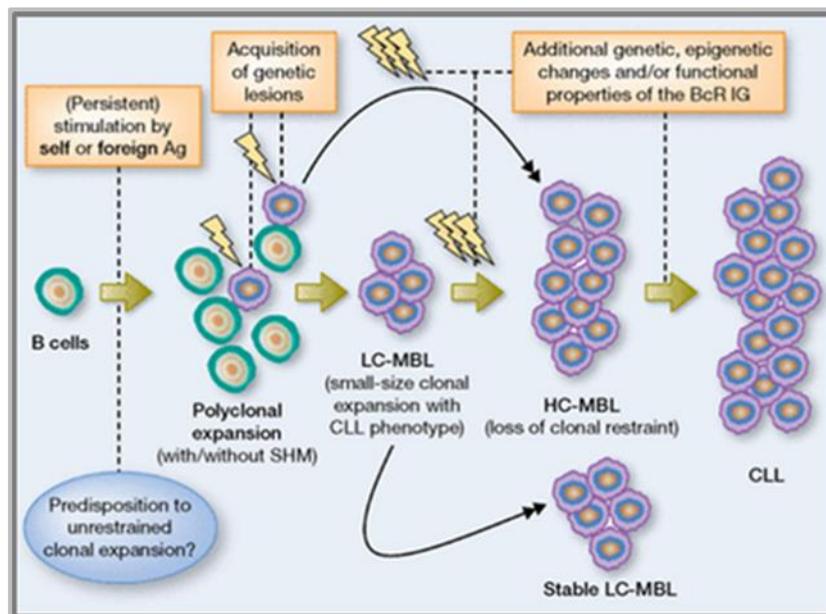


Figura 3: Fisiopatologia da LLC(11)

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Atualmente é mais comum diagnosticar a LLC em doentes assintomáticos. A suspeita surge por se verificar linfocitose persistente no hemograma. As manifestações clínicas são pouco específicas e consistem em sintomas B como, fadiga, anorexia, perda de peso $\geq 10\%$ nos últimos 6 meses, febre superior a 38°C e suores noturnos.(5)

As complicações mais comuns são infecção, anemia, trombocitopenia, linfadenopatia e esplenomegalia. As complicações raras, mas potencialmente fatais, incluem a leucostase, a síndrome de lise tumoral e as neoplasias secundárias.

A proliferação e acumulação de linfócitos monoclonais compromete o sistema imunitário e resulta em propensão para infecções e doenças autoimunes.

A infecção é uma das principais causas de morte em doentes com LLC, sendo a sua incidência maior no final do curso da doença, devido a uma combinação de infiltração da MO e disfunção imune induzida pelo tratamento. A maioria das infecções na CLL não tratada têm etiologia bacteriana (*Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus Influenzae*) e localizam-se nas vias respiratórias inferiores. As infecções recorrentes são comuns e em indivíduos suscetíveis podem originar sinusite crônica e bronquiectasias.(12, 13)

A maioria dos doentes com LLC desenvolverá hipogamaglobulinemia (IgG, A e M) no decurso da sua doença, a gravidade tende a aumentar com a duração e estadiamento da mesma, com cerca de 70% dos doentes a desenvolver hipogamaglobulinemia dentro de 7 anos do diagnóstico.(14) A diminuição da síntese de Ig está relacionada com libertação de citocinas inibitórias, infiltração da MO e toxicidade dos tratamentos efetuados, existindo uma correlação direta entre baixos níveis de IgG e a frequência e gravidade das infecções bacterianas.(15)

A anemia é uma complicação comum da LLC avançada e muitas vezes é multifatorial. Cerca de um terço dos pacientes com LLC pode desenvolver anemia hemolítica autoimune (AHA) ao longo da doença e a sua incidência pode ser mais elevada após tratamento com análogos das purinas, nomeadamente a fludarabina.(16)

A trombocitopenia pode ocorrer a qualquer momento no curso da LLC, se estiver presente no momento do diagnóstico, é tipicamente leve, já a contagem de plaquetas abaixo de 50.000 células/ μL geralmente ocorre apenas no final da doença. As causas de trombocitopenia em pacientes com LLC incluem: supressão da produção de plaquetas na presença de extensa carga tumoral, destruição autoimune, hiperesplenismo, infecção (particularmente sépsis e coagulação intravascular disseminada associada) e quimioterapia. A trombocitopenia imune clinicamente significativa desenvolve-se em cerca de 2 a 5% dos doentes com LLC. Até um terço dos casos terá AHA concomitante, cuja combinação é referida como síndrome de Evans.(17)

Estudos retrospectivos sugeriram que os doentes com LLC têm um maior risco de desenvolver outras neoplasias malignas hematológicas e sólidas. Desconhece-se quanto deste risco aumentado se deve à doença subjacente que acompanha a imunossupressão crônica e quanto é devido aos tratamentos administrados.(18) Em 2 a 15% dos doentes ocorre transformação da sua doença em linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) - transformação de Richter - ou linfoma de Hodgkin (LH). Por outro lado, doentes tratados para a LLC podem desenvolver neoplasias relacionadas com o tratamento como leucemia mieloide aguda ou síndromes mielodisplásicas.(2)

Os sintomas de leucostase são raros a menos que a contagem exceda 400.000 células/ μ L.(19)

A síndrome de lise tumoral é caracterizada por hiperfosfatemia, hipocalcemia, hipercalemia e insuficiência renal. A sua incidência na LLC depende da carga tumoral e também da modalidade terapêutica escolhida.(20)

CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO COMPLEMENTAR

No diagnóstico da LLC recorre-se ao hemograma, contagem diferencial de leucócitos, esfregaço de SP e imunofenotipagem por citometria de fluxo. Geralmente o exame da medula óssea é dispensável para o diagnóstico. Estabeleceram-se os seguintes critérios mínimos para o seu diagnóstico:

1. Linfocitose ≥ 5000 linfócitos B/ μ L no sangue periférico por um período mínimo de 3 meses. A clonalidade das células B circulantes deve ser confirmada por citometria de fluxo.
2. No esfregaço de SP as células são caracteristicamente pequenos linfócitos maduros com pouco citoplasma, núcleo denso e sem nucléolo diferenciado. Linfócitos atípicos maiores ou pró linfócitos podem estar presentes numa percentagem que não exceda os 55% (acima deste valor favorece o diagnóstico de Leucemia Pró linfocítica). Um aspeto típico no esfregaço de SP são as células *smudge* também conhecidas como manchas de *Gumprecht*, originadas pela destruição de células aquando do esfregaço de SP, devido à sua fragilidade.(1, 2)

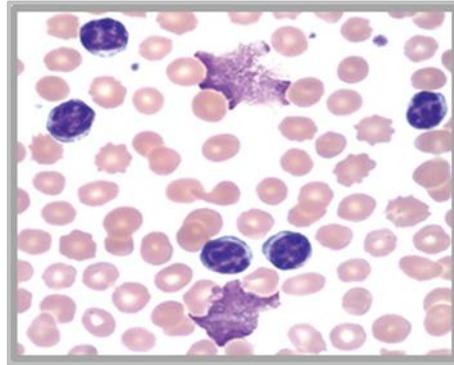


Figura 4: Esfregaço de SP evidenciando 5 células típicas da LLC com cromatina proeminente e 2 células *smudge*.

Segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde para as neoplasias hematológicas, a LLC e o LNH linfocítico são considerados uma única entidade. O diagnóstico de LNH linfocítico requer a presença de linfadenopatia e/ou esplenomegalia com um número de linfócitos B $<5000/\mu\text{L}$ no sangue periférico e deve ser confirmado por uma biópsia de gânglio linfático.(2)

Na ausência de linfadenopatia ou organomegalia, citopenia ou sintomas relacionados com a doença, uma contagem <5000 linfócitos B/ μL no sangue periférico é definido como LBM. (1, 21)

A citometria de fluxo permite o estudo dos marcadores de superfície celular. Na LLC existe uma proliferação de linfócitos B com expressão dos antígenos de superfície CD19, CD20, CD23, FMC7 e coexpressão de um marcador linfóide T, o CD5. Os níveis das Igs de superfície CD20 e CD79B são caracteristicamente baixos em comparação com as células B normais. Cada clone de células leucémicas é restrito à expressão de uma das cadeias leves *kappa* ou *lambda*.(1)

Os diagnósticos diferenciais mais importantes são: o linfoma da zona marginal, a leucemia de células cabeludas, o linfoma folicular e o linfoma de células do manto.(2)

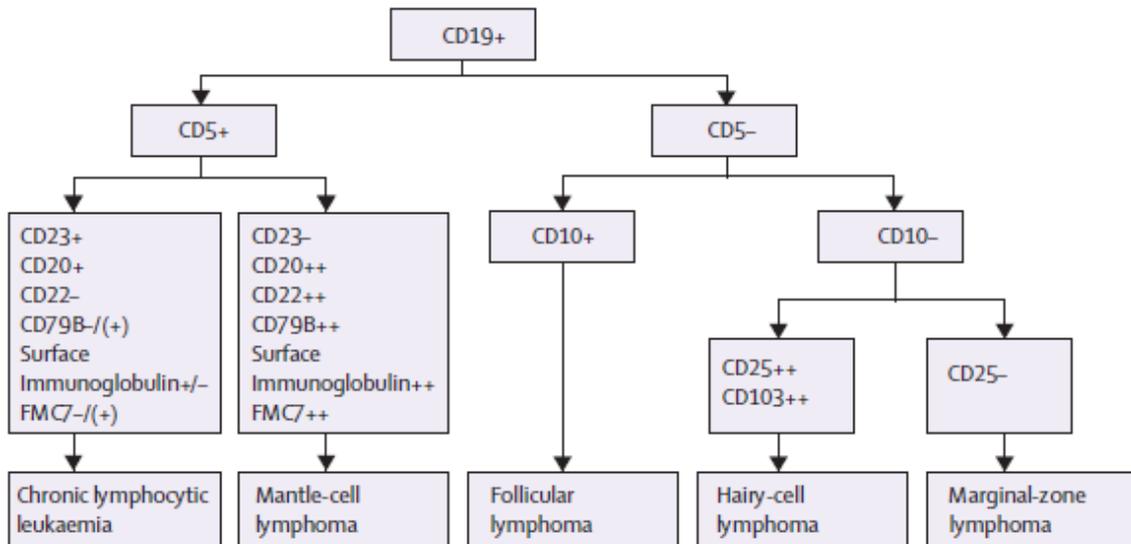


Figura 5: Principais diagnósticos diferenciais da LLC(22)

Determinados exames complementares de diagnóstico podem ser úteis no decurso da doença, particularmente quando se pondera iniciar tratamento específico(2):

1. Prova de Coombs.
2. Doseamento das Igs.
3. Avaliação da MO (aspirado medular e biópsia óssea).
4. Pesquisa de mutações, nomeadamente a del(17p).
5. Tomografia computadorizada (tórax, abdómen e pélvis) se suspeita de adenopatias volumosas.(2) Não é recomendada em doentes assintomáticos com LLC em estadio inicial.(23)
6. Biópsia ganglionar com intuito de diagnóstico diferencial ou suspeita de transformação histológica.
7. Radiografia do tórax, eletrocardiograma de eventuais comorbidades.

O mielograma e a biópsia óssea não são necessários para estabelecer o diagnóstico, mas devem ser realizados antes do início do tratamento.

Há várias escalas de avaliação de comorbidades, nomeadamente os *scores Cumulative Illness Rating Scale (CIRS)* e *Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)*, porém nenhuma está especificamente validada para LLC. Porém, estas são bastantes úteis, como demonstrou um estudo em que se comparou a avaliação de comorbidades com base no senso clínico versus a aplicação de escalas e obtiveram-se diferenças significativas já que uns doentes tinham sido elegíveis para tratamento enquanto que outros deixaram de o ser.(24, 25)

PROGNÓSTICO E ESTADIAMENTO

A LLC tem uma enorme heterogeneidade clínica entre os indivíduos afetados, podendo apresentar-se de uma forma indolente, na qual os doentes não necessitam de tratamento durante décadas, ou mais agressiva, com morte em poucos anos apesar da terapêutica. A mediana de sobrevivência na LLC é cerca de 10 anos, mas pode variar de 2 a 20 anos desde o diagnóstico. (24)

Os sistemas de estadiamento são importantes ferramentas de prognóstico, os sistemas de Rai e Binet estão validados na LLC e de acordo com as recomendações do *International Workshop Group on CLL*, devem utilizar-se ambos na prática clínica.(26)

O sistema de estadiamento de Binet tem em consideração cinco locais ganglionares potencialmente envolvidos e a presença de anemia e/ou trombocitopenia.(27)

Tabela 1 – Sistema de Binet(2)

Estádio	Definição	Sobrevida mediana (anos)
A	<3 áreas linfoides ^{a)}	>10
B	> 3 áreas linfoides ^{a)}	7
C	Hb ≤ 10 g/dL e/ou Plaquetas < 100.000/μL	2

^{a)} As 5 áreas linfoides compreendem a região cervical, axilar, inguinal, hepatomegalia ou esplenomegalia.

O sistema Rai baseia-se no conceito de que na LLC existe um aumento gradual e progressivo da carga de linfócitos leucêmicos, começando no SP e na MO, envolvendo progressivamente gânglios linfáticos (linfadenopatia), baço e fígado (organomegalia), com eventual comprometimento da função da MO (anemia e trombocitopenia).(28)

Tabela 2 - Sistema de Rai(2)

Estádio	Definição	Sobrevida mediana (anos)
0 – Baixo risco	Linfocitose no sangue e medula	>10
I – Risco intermédio	Linfocitose e linfadenopatia	7
II – Risco intermédio	Linfocitose, linfadenopatia, esplenomegalia com ou sem hepatomegalia	
III – Alto risco	Linfocitose e anemia	1.5
IV – Alto risco	Linfocitose e trombocitopenia	

Estão identificados vários marcadores prognósticos adicionais, nomeadamente marcadores clínicos e biológicos tanto pela avaliação de marcadores séricos como características genéticas das células tumorais. Na prática clínica utiliza-se principalmente

o tempo de duplicação dos linfócitos, a beta-2 microglobulina ($\beta 2M$) e as alterações genéticas.(29)

O tempo de duplicação dos linfócitos (TDL), representa o número de meses que a contagem absoluta de linfócitos leva para se duplicar, apesar de fornecer uma estimativa do ritmo da doença, é um parâmetro limitado já que é necessário algum tempo para o medir. Um TDL em doentes não tratados inferior a 12 meses está associado a doença progressiva e um TDL mais longo está associado a um curso indolente.(30)

Os parâmetros séricos como a $\beta 2M$ e a timidina cinase (TK) estão normalmente baixos, já valores elevados de $\beta 2M$ e TK correlacionam-se com uma progressão acelerada da doença e pior prognóstico.(31, 32). O aumento destas proteínas ocorre por mecanismos pouco claros, mas acredita-se ser mediado por citocinas exógenas.(33)

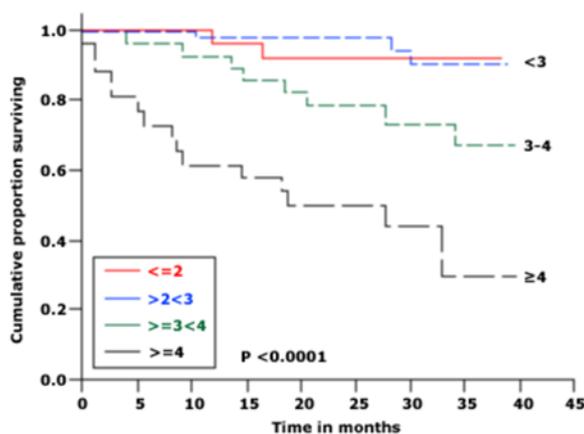


Figura 6: Impacto prognóstico da B2M na sobrevivência dos doentes com LLC. (33)

Salienta-se a mutação nos genes IGVH, pois verificou-se que os indivíduos com mutação nestes genes (M-LLC) têm uma evolução clínica mais indolente e maior sobrevida global, por outro lado, os doentes com os genes não mutados (U-LLC) possuem doença mais agressiva com maior demanda terapêutica e mediana de sobrevida inferior, bem como taxas de mortalidade superiores.(24, 32, 34, 35) Atualmente recomenda-se que nos países com disponibilidade económica se avalie o estado mutacional das Igs na altura do diagnóstico da LLC.(36) A ZAP-70 é uma proteína cinase normalmente expressa nos linfócitos T e células NK, mas ausente nos linfócitos B, no entanto, ela é expressa nas células B de doentes com U-LLC, além disso, observa-se que a expressão da ZAP-70 é estável nestes doentes ao longo do tempo (37). Assim, têm-se realizado estudos no sentido de validá-la como marcador para o estado de mutação dos genes IGVH.(38) Adicionalmente, a expressão de CD38, está relacionado com a presença da U-LLC e é um fator de mau prognóstico independente.(39)

Estão também descritas alterações genéticas recorrentes na LLC com importante valor prognóstico, detetadas pela técnica de *hibridização in situ* (FISH).(24) A mutação no gene TP53 representa a mutação com pior prognóstico na LLC, a sua incidência é relativamente baixa no início da doença, mas tende a aumentar com o tempo e especialmente após tratamento, por esse motivo, é uma das mais frequentes anomalias adquiridas.(40) O gene codifica a proteína supressora tumoral p53 que está localizado no braço curto do cromossoma 17. De um modo geral a mutação no gene TP53/del17p está associada a curta sobrevivência global, diminuição da resposta aos regimes convencionais e doença mais agressiva.(34, 35) Verificou-se que aproximadamente 5% dos doentes com LLC têm uma mutação TP53 na ausência de deleção 17p, assim, além da deleção a mutação TP53 é um fator prognóstico independente na LLC. Deste modo, algumas *guidelines* recomendam a pesquisa simultânea da del17p e a análise de mutações no gene TP53, porém ainda se encontra em discussão qual será o melhor método de análise.(41)

A deleção do braço longo do cromossoma 13 (del 13q14) é encontrada em mais de 50% dos casos de LLC, sendo associado a bom prognóstico. Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que alguns genes localizados na região 13q estariam implicados na patogênese da doença, os genes miR-15a e miR16-1, localizados numa região de mínima deleção, com provável função de supressão tumoral. Até ao momento parece não haver diferença significativa na sobrevida, devendo ser considerada de baixo risco para progressão.(42)

A deleção do braço longo do cromossoma 11 (del11q) está associada a mau prognóstico, sendo comumente afetada a região 11q22.3-q23.1, onde se encontra o gene ATM. Do ponto de vista clínico, doentes com esta anormalidade cromossômica podem apresentar doença mais agressiva.(43)

A trissomia do cromossoma 12 é considerada uma anomalia clonal inicial, que facilitaria o aparecimento de outras anormalidades cromossômicas ou mesmo mutações. A sua relevância clínica ainda está em discussão.(44)

Nos últimos anos e graças ao *Whole Genome Sequencing Project* na LLC foram descobertas outras mutações genéticas recorrentes que ocorrem em paralelo com as supramencionadas, alguns exemplos são mutações nos genes NOTCH1, MYD88, SF3B1 e o BIRC3, entre outros.(40)

Após o tratamento, o marcador de prognóstico mais relevante é o tempo até recidiva e a doença residual mínima (DRM). A maioria dos doentes que alcança remissão completa tem níveis persistentemente baixos de doença, que necessitam de métodos mais sensíveis como a citometria de fluxo ou métodos moleculares para a sua

deteção,(45) já que as células malignas residuais vão ser responsáveis pela recidiva.(45-47)

Tabela 3 – Marcadores de prognóstico na LLC(48)

Marcadores de prognóstico clássicos	Estadiamento clínico
	Contagem de linfócitos
	Tempo de duplicação dos linfócitos
Marcadores prognóstico biológicos	<u>Alterações cromossômicas:</u> del(13q), trissomia 12, del(11q), del(17p)
	Estado mutacional dos genes da região variável das cadeias pesadas das imunoglobulinas
	Marcadores séricos: β 2 Microglobulina, TK
	Expressão da proteína ZAP-70; Expressão de CD38
Marcador relacionado com o tratamento	Resposta à terapêutica (doença residual mínima)

OPÇÕES TERAPÊUTICAS

Aos doentes recentemente diagnosticados, com doença assintomática, no estadio Binet A e B e Rai 0, I e II, recomenda-se vigilância clínica a cada 3 a 6 meses.(2) Em contraste, nos doentes com doença ativa associada a sintomas, Binet estadio C, Rai III e IV o tratamento deve ser iniciado.(2) Assim, define-se doença ativa:

1. Sintomas B significativos, perda de peso não intencional ≥ 10 % durante um período prévio de 6 meses; fadiga significativa (por exemplo, ECOG ≥ 2); febre $> 38^{\circ}\text{C}$ com duração de 2 ou mais semanas sem evidência de infeção; suores noturnos com duração superior a 1 mês sem evidência de infeção.
2. Citopenias não explicadas por autoimunidade ou AHA e/ou trombocitopenia que não respondem a corticosteroides ou outras terapêuticas standard.
3. Esplenomegalia volumosa ($>6\text{cm}$ abaixo do rebordo costal esquerdo), progressiva ou sintomática.
4. Adenomegalias volumosas (≥ 10 cm no maior diâmetro), progressivas ou sintomáticas.
5. Tempo de duplicação de linfócitos de <6 meses.

Agentes alquilantes e análogos das purinas

Desde há cerca de 40 anos que perante indicação terapêutica se utilizavam protocolos baseados em agentes alquilantes orais, eventualmente associados a corticosteroides e/ou ciclofosfamida, obtendo-se remissão completa (RC) em apenas 5% dos doentes. Foi também comum a prescrição de radioterapia localizada a adenopatias.(49) A bendamustina é um fármaco alquilante cujo efeito antineoplásico se baseia na ligação

cruzada de cadeias simples e duplas de DNA por alquilação. Ela foi comparada com o clorambucil, outro agente alquilante que foi o *gold standard* de tratamento durante várias décadas não apresentou melhores resultados, tendo contudo, maior número de efeitos adversos, nomeadamente mielossupressão, aumento do número de infeções, efeitos arritmogénicos por hipercalemia e síndrome de lise tumoral.(1)

Dos análogos das purinas utilizados na LLC, a fludarabina é o mais estudado e o que demonstra taxas de resposta superiores. Apesar de estar associada a mielossupressão e aumento de infeções graves é até à data, um dos elementos base dos protocolos de tratamento da LLC em doentes jovens uma vez que tem impacto na sobrevivência global.(1)

Anticorpos monoclonais

Um importante avanço surgiu com o advento do anticorpo monoclonal rituximab no final da década de 90.(50)

O rituximab tem como alvo o CD 20 que é uma fosfoproteína glicosilada expressa na superfície das células B maduras. Esta proteína não tem nem ligando nem função conhecida, suspeita-se que funcione como um canal de cálcio na membrana celular. A combinação de rituximab com fludarabina foi avaliada em vários estudos de fase II, demonstrando o sinergismo entre os dois agentes. Num estudo obteve-se uma taxa de resposta de 87% com 32% de RC.(51) Noutro estudo, a SLD e a taxa de resposta global (TRG) foi superior nos doentes que receberam o tratamento combinado.(52) A combinação FCR foi comparada com o uso de FC (fludarabina e ciclofosfamida) tendo obtido valores superiores a nível da TRG e da RC. Uma observação importante deste estudo, foi que o esquema FCR não melhorou a sobrevivência dos doentes com a del(17p).(53) Por outro lado, regimes combinando BR, também, foram investigados obtendo TRG similares ao FCR, porém menores RC e com menor indução de neutropenia.(54, 55)

O ofatumumab é um anticorpo monoclonal humanizado de segunda geração que tem como alvo um único epítipo na molécula do CD20, resultando numa maior afinidade de ligação, taxa de dissociação mais prolongada e maior morte celular comparativamente com o rituximab.(56) A Agência Europeia do Medicamento recentemente licenciou o ofatumumab em monoterapia para o tratamento para os doentes com LLC refratária à fludarabina e alemtuzumab.(57)

O obinutuzumab integra a terceira geração de anticorpos monoclonais anti CD20 e vários estudos de fase I demonstraram a eficácia deste agente no tratamento da

LLC.(58-60) Num destes, foi avaliada a eficácia e segurança do fármaco em monoterapia em doentes com LLC refratária/recidivante, o estudo mostrou uma TRG de 62% numa primeira fase e de 30% numa segunda fase, justificando assim ensaios adicionais em regimes de combinação com outros agentes.(58) O CLL11 foi um estudo de fase III em que doentes com várias comorbilidades (um CIRS> 6) e doença previamente sem tratamento foram divididos em 3 grupos: num grupo recebiam clorambucil (CLB), noutra obinutuzumab combinado com clorambucil (CLB-O) e por fim no terceiro grupo clorambucil combinado com rituximab (CLB-R). Os resultados dos grupos com tratamento CLB-O e CLB-R apresentaram taxas de resposta e SLD significativamente superiores ao grupo com CLB, o grupo CLB-O em comparação com o CLB teve uma sobrevivência superior e comparativamente com o grupo CLB-R teve superiores SLD e taxas de RC. Estes resultados mostram que a combinação de um anticorpo anti-CD20 com quimioterapia melhora os resultados clínicos em doentes com LLC e outras comorbilidades e que o obinutuzumab é superior ao rituximab quando combinado com o clorambucil.(61)

O Alemtuzumab é um anticorpo monoclonal recombinante humanizado contra o antígeno de superfície CD52. A monoterapia com este agente tem taxas de resposta de 33-35% com uma duração média de resposta que varia entre os 8.7 aos 15.4 meses, em doentes com LLC avançada e com tratamento prévio que fracassou.(62-64) Adicionalmente, a terapêutica com este agente mostrou-se eficaz em doentes com marcadores de mau prognóstico como a del(17p) e mutação TP53.(65, 66) O Alemtuzumab está associado a vários efeitos secundários adversos que têm desencorajado o seu uso, nomeadamente reações associadas à perfusão que se devem à libertação de citocinas, para contornar este problema pode-se optar pela via de administração subcutânea (eficácia semelhante à intravenosa) associada a anti-histamínicos. Foram reportados casos de autoimunidade em doentes tratados com o fármaco que incluíam AHA, doença anti membrana basal glomerular e doença da tiroide. Houve um aumento das infeções graves, por vezes fatais, de origem viral, bacteriana, protozoária e fúngica, incluindo casos de reativação de infeção pelo Citomegalovirus e efeitos secundários hematológicos como trombocitopenia e neutropenia que são mais comuns nas primeiras 8 semanas de tratamento.(67)

Inibidores do BCR

O BCR é um dos responsáveis major do desenvolvimento, sobrevivência, proliferação, diferenciação e migração das células B, desempenhando um papel importante na patogénese de várias neoplasias de células B.(68, 69) Estudos genéticos e funcionais

têm implicado o BCR como um elemento chave no desenvolvimento da LLC. A BTK, a PI3K e a Syk são essenciais na transdução de sinal do BCR que faz a mediação entre a estimulação antigênica e respostas intracelulares. Fatores de mau prognóstico, em particular os U-LLC e a expressão do ZAP70 estão relacionados com a sinalização do BCR e interações no micro ambiente tumoral, suportando assim a importância destas vias na patogênese da doença.(70)

O benefício dos inibidores do BCR é bastante evidente, principalmente nos doentes com doença refratária ou em recidiva após tratamento com os agentes convencionais. Esta nova classe de fármacos é altamente eficaz e bem tolerada.(70)

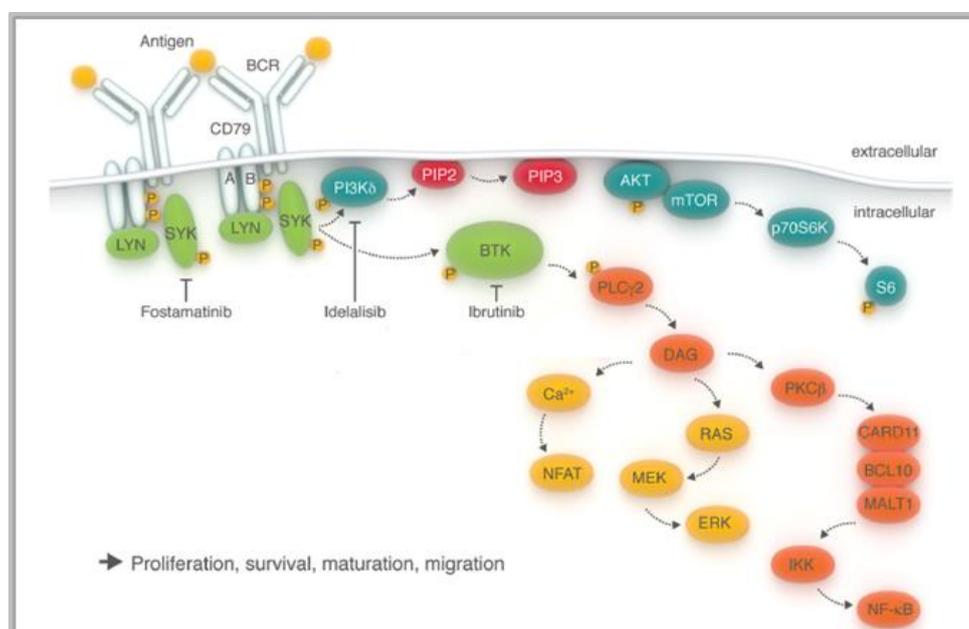


Imagem 7: BCR e vias de sinalização(70).

O ibrutinib é uma pequena molécula de toma oral que inativa irreversivelmente a BTK através da ligação covalente a um resíduo de cisteína próximo do local de ativação.(71) A atividade da BTK parece estar limitada às células B, levando à ativação de vias de sinalização celular como as NF-κB e as cinases MAP, a sua inibição induz a apoptose das células da LLC.(72, 73) O ibrutinib é, na sua generalidade, bem tolerado. Os efeitos adversos mais frequentes (20%) são náuseas, vômitos, dispepsia, diarreia, fadiga hipertensão, aumento frequência de infecções trato respiratório superior e do trato urinário inferior, artralguas e menos frequentemente (≤5%) equimoses, hemorragias e aumento da incidência de fibrilhação auricular.(74-77) O mecanismo pelo qual o ibrutinib causa hemorragia e fibrilhação auricular ainda não é completamente conhecido, pensa-se que a causa da hemorragia seja pela inibição da função plaquetária.(78) Sabe-se

que a combinação de agentes anticoagulantes e inibidores da função plaquetária aumentam o risco de hemorragias major, assim, o tratamento dos doentes que necessitam de anticoagulação e ibrutinib (por exemplo, doentes com fibrilhação auricular) é extremamente complicado. Nesse sentido, é recomendada uma abordagem individual de risco benefício sendo preferível o uso dos anticoagulantes varfarina e dabigatran pelo facto de existirem agentes que podem reverter as suas ações em caso de hemorragia grave.(78) É importante realçar que a maioria dos doentes tratados com o ibrutinib irá desenvolver uma linfocitose persistente, provavelmente devido ao facto de as células da LLC migrarem dos nódulos linfáticos e outros locais para o SP graças à inibição de vias de adesão, incluindo a CXCR4/5. A linfocitose isoladamente não deve ser considerada uma evidência de progressão da doença e com a continuação do tratamento acaba por desaparecer ao fim de 6-9 meses. Assim, desenvolveu-se uma nova categoria de resposta, tendo em conta esta linfocitose, a RP com linfocitose persistente (RP-L).(79) Todos os doentes sujeitos ao tratamento com ibrutinib devem fazer profilaxia para o Herpes Zoster (aciclovir) e para o *Pneumocystis Jirovecii* (cotrimoxazol), deve ser considerado alopurinol em doentes com risco de síndrome de lise tumoral e o fator estimulador de colónias de granulócitos (GCSF) em caso de neutropenia relacionada com o tratamento. Este fármaco tem ainda inúmeras interações medicamentosas e alimentares.(80)

Relativamente à eficácia do ibrutinib em monoterapia, um estudo recente de fase Ib/II reportou uma TRG de 90% em doentes com doença refratária ou recidivante (RC em 7%, RP em 80% e RP-L em 3%) e 84% de TRG em doentes sem qualquer tratamento prévio (2% de RC, 55% de RP e 6% de RP-L). A resposta à terapêutica foi independente do grupo de risco, observando-se inclusivamente, no grupo com marcadores de mau prognóstico. A SLD aos 30 meses foi de 96% para os doentes sem tratamento prévio e de 69% para os doentes com doença refratária ou recidivante.(77) Noutro estudo, envolvendo doentes com a del(17p)/mut TP53, verificou-se que a TRG e a SLD às 24 semanas de tratamento era de 92% e de 82%, respetivamente.(75) Achados pré clínicos sugeriam que o ibrutinib poderia antagonizar a ação do anti-CD20 rituximab, a sua combinação foi testada num estudo de fase II em doentes com anormalidades citogenéticas ou baixa SLD e após QIT de primeira linha.(81-83) Os resultados obtidos demonstraram que a combinação dos dois agentes é bem tolerada e induz altas taxas de remissão em doentes com LLC de alto risco (87% alcançaram RP, 8% RC e uma TRG de 95%).(83)

É importante referir que a duração do tratamento tanto para o ibrutinib, como para o Idelalisib ainda não está claramente definida. As recomendações são para que o

tratamento continue até que haja progressão da doença ou surjam efeitos tóxicos inaceitáveis, isto deve-se ao facto de a grande maioria das respostas serem RP.(79)

O idelalisib é um agente seletivo, de toma oral que inibe reversivelmente a isoforma PI3K delta. Esta cinase regula a via de sinalização celular responsável pelo crescimento, proliferação e sobrevivência das células B com relevância na oncogénese.(84, 85) A hepatotoxicidade foi transversal nos ensaios clínicos do Idelalisib, ocorrendo em 14% dos participantes e foi o principal responsável pela necessidade de redução de dose e descontinuação do tratamento.(86) Outros efeitos adversos verificados são diarreia severa ou colite, perfuração intestinal, pneumonite, neutropenia e morte.(86) A diarreia associada ao idelalisib deve ser tratada inicialmente com medidas nutricionais e loperamenida, se estas medidas forem ineficazes deve-se suspender o idelalisib e após exclusão causa infecciosa iniciar budesonido.(86) É recomendada profilaxia contra *Pneumocystis jirovecii* e vigilância clínica e laboratorial para reativação de Citomegalovírus.(87)

Num estudo de fase I em doentes com LLC refratária ou recidivante e marcadores de mau prognóstico o Idelalisib apresentou uma TRG de 72% e a SLD foi de 15.8 meses.(88) Um estudo multicêntrico de fase III envolvendo doentes com doença refratária não candidatos a quimioterapia, comparou a combinação do idelalisib com o rituximab e o rituximab com placebo. A TRG foi de 81% (todas RP) no grupo do idelalisib e de 13% no grupo placebo, a SLD às 24 semanas foi de 93% e de 46%, no grupo do Idelalisib e no placebo, respetivamente. Este estudo levou à aprovação da combinação do Idelalisib com rituximab em doentes com doença refratária não candidatos a quimioterapia.(89)

O fostamatinib é o primeiro agente inibidor da Syk de toma oral que induz a apoptose da célula B através da disrupção do BCR.(90) A ativação da Syk resulta no aumento da sobrevivência celular e a sua atividade está aumentada na LLC, tornando-a um alvo terapêutico importante. Num estudo de fase I/II a TRG foi de 54%, todas respostas parciais, a SLD foi de 6.4 meses e os efeitos adversos responsáveis pela diminuição de dose foram neutropenia, diarreia e trombocitopenia.(91)

Uma observação consistente ao longo dos ensaios clínicos envolvendo os inibidores do BCR em doentes com fatores de mau prognóstico (del(17p), mutação P53, U-LLC, entre outros) é, que, a resposta ao tratamento é igual aos doentes sem os fatores de mau prognóstico.(76, 89) Verifica-se, no entanto, que em seguimentos mais prolongados, os doentes com estas características têm recidivas mais frequentes.(75, 77, 92) Em alguns doentes, a progressão da doença manifesta-se como um LDGCB ou um LH

(transformação de Richter).(92) Os mecanismos de resistência diferem consoante o alvo terapêutico, ou seja, a cinase. Recentemente foram descobertas mutações adquiridas na PLCY2 da BTK em doentes com resistência secundária ao ibrutinib, adicionalmente, mutações na serina-cisteína do BTK impedem a ligação covalente do fármaco, diminuindo a eficácia do mesmo.(93) Os mecanismos de resistência envolvidos nos inibidores da PI3K e da Syk são, ainda, pouco conhecidos, sabendo-se que a mudança de um inibidor das cinases para outro é eficaz e que os mecanismos de resistência são raros no início do tratamento.(77, 93)

Inibidores do Bcl-2

Bcl-2 refere-se a uma família de genes e às proteínas que dão origem. Estas são responsáveis pela regulação da morte celular programada (apoptose) através da manutenção do equilíbrio entre fatores pró apoptóticos (BAX, BAK e proteínas BH3) e fatores anti apoptóticos (BCL2, BCLXL, BCLW e MCL-1). A desregulação das proteínas da família do Bcl-2 contribui para a evasão da apoptose que constitui um dos mecanismos centrais para o desenvolvimento de neoplasias. Na LLC, estas proteínas encontram-se sobre expressas.(94) Assim, as proteínas do Bcl-2 são um alvo promissor no tratamento das neoplasias hematológicas.(95)

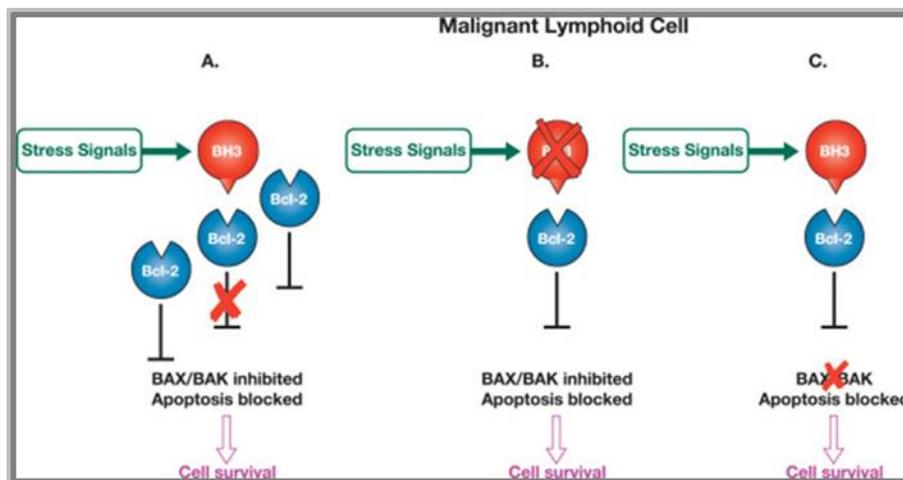


Imagem 8: Nas neoplasias linfoides (como por exemplo a LLC), a apoptose pode ser prejudicada através de vários mecanismos diferentes, incluindo: (A) hiperatividade das proteínas BCL2 anti-apoptóticas; (B) expressão reduzida da proteína BH3; (C) perda de BAX e / ou BAK(96)

O AT-101 mimetiza a proteína pró apoptótica BH3, o primeiro inibidor do Bcl-2 de toma oral que tem uma atividade pouco específica, inibindo toda a família do Bcl-2 com atividade anti apoptótica.(95, 97) Um ensaio clínico de fase II examinou a atividade oral do AT-101 em combinação com o rituximab nos doentes com LLC refratária e/ou recidivante. Uma variável confundidora deste estudo foram as elevadas doses de

rituximab administradas e, por isso mesmo, a interpretação dos resultados obtidos (44% de RP) ficou comprometida.(98)

O ABT-263 (navitoclax) pertence à segunda geração dos inibidores do Bcl-2 com um mecanismo de ação mais específico, ligando-se com grande afinidade às proteínas anti apoptóticas BCL2, BCLXL e BCLW.(95) Estudos iniciais demonstraram resultados promissores em monoterapia, no entanto, devido a severas trombocitopenias, este agente foi reformulado no ABT-199 (venetoclax).(99) Este é, por sua vez, um BH3 mimético, de toma oral pertencente à terceira geração destes novos agentes.(95) Bloqueia a atividade de várias proteínas da família do Bcl-2, porém e ao contrário dos seus antecessores, poupa o BCLXL não apresentando assim, a toxicidade plaquetária.(100) Num estudo de fase I/II com o venetoclax em monoterapia, devido a severos eventos de síndrome de lise tumoral foi implementado, durante uma semana, tratamento com doses crescentes do fármaco. Este estudo analisou doentes com LLC refratária e/ou recidivante com marcadores de mau prognóstico. Os efeitos adversos mais comuns foram diarreia, náuseas, neutropenia, infeções do trato respiratório superior e fadiga, os efeitos menos comuns foram anemia, síndrome de lise tumoral e hipocalémia. A TRG foi de 77%, com uma RC em 22%. Aos 12 meses, 91% dos RC e 65% dos RP continuavam sem progressão da doença.(100) Num estudo recente de fase I, analisou-se a combinação do venetoclax com o rituximab em doentes com LLC refratária e/ou recidivante com marcadores de mau prognóstico. O protocolo da escalada de dose foi igual ao estudo do fármaco em monoterapia, e só depois da primeira semana se adicionou o rituximab. Os efeitos adversos foram semelhantes aos observados no estudo anterior. A combinação foi bastante eficaz com uma TRG de 88% e uma RC de 31%.(101)

Estas moléculas que se encontram nas fases finais dos ensaios clínicos demonstram grande eficácia no tratamento da LLC refratária e/ou recidivante. As elevadas taxas de RC observadas no estudo do ABT-199 em monoterapia são um marco, já que com os inibidores do BCR as taxas de RC são bastante mais baixas.(102)

Nos raros doentes com doença recidivante o mecanismo de resistência não é conhecido. A TR é uma forma comum de doença recidivante nos doentes tratados com o ABT-199, tal como acontece com os inibidores do BCR. Ainda não é claro se o LDGCB é uma doença de base destes doentes ou se a pressão seletiva pelo uso dos novos agentes encoraja o desenvolvimento de células resistentes. (102)

Terapêutica com CAR T

Em várias doenças neoplásicas as células T são conhecidas por terem atividade anti tumoral. Na LLC, no entanto, os linfócitos T não conseguem desencadear uma resposta imune eficaz, possivelmente devido à manipulação do microambiente por parte das células B leucémicas que promove a sobrevivência e a evasão dos mecanismos de defesa.(103) Assim, um grupo adicional de novos agentes terapêuticos futuros, os CAR-T, procura ultrapassar esta tolerância por parte das células T à LLC através da sua manipulação. Investigações recentes mostraram que dotando as células T de novos recetores antigénicos, estas podem ser redirecionadas para os antigénios expressos na superfície das células tumorais, através dos CAR. Os primeiros ensaios clínicos utilizando os CAR-T na LLC foram direcionados para o antígeno CD19, ou seja, as células que expressarem esse antígeno de superfície serão lisadas pelo CAR específico – CD19.(104) Têm-se observado períodos prolongados de estabilização da doença, redução da linfadenopatia e casos de aplasia de células B.(105-107)

Apesar de a terapia com os CAR-T poder ter um impacto significativo na doença, este é dependente da função das células T transferidas. De facto, os CAR-T são “fármacos vivos” na medida em que podem proliferar, produzir citocinas e matar células tumorais. São, também, suscetíveis de ser moduladas, tal como acontece com as células T não manipuladas, por citocinas e quimiocinas, fatores do microambiente e fármacos linfotóxicos. Assim, é crucial o entendimento da função das células T na LLC e que fatores podem levar à expansão das células manipuladas/redirecionadas de modo a ser o mais eficaz possível no tratamento desta doença.(104)

Abordagem terapêutica na prática clínica

Na prática clínica habitualmente estratificam-se os doentes com necessidade de tratamento com base na sua idade e comorbilidades, bem como prognóstico.

Doentes com a mutação no gene TP53/del17p têm pior prognóstico mesmo após tratamento com o protocolo FCR, assim muitas *guidelines* recomendam o ibrutinib ou idelalisib com ou sem rituximab como tratamento de primeira linha.(1, 2) Esta terapêutica parece ser bem tolerada nos idosos. Entre os doentes com mau prognóstico, mas jovens o transplante alogénico de células pluripotenciais pode ser equacionado. Esta é uma abordagem que oferece a possibilidade de cura, sendo que o seu efeito anti leucémico aparenta ter origem na atividade anti hospedeiro mediada imunologicamente pelo enxerto (reação enxerto-versus-leucemia). Tem mortalidade e morbidade significativas, pelo que não é um tratamento recomendado à maioria dos doentes principalmente depois do advento dos inibidores do BCR.(1, 2, 108)

Os doentes jovens que não apresentam a mutação no gene TP53/del17p e têm boa condição física (baixo CIRS e função renal normal) a terapêutica de eleição são protocolos baseados na fludarabina, nomeadamente FCR.

Os idosos que não apresentam a mutação no gene TP53/del17p há diferentes opções terapêuticas. O protocolo FCR tem pouca tolerabilidade e está associado a um aumento da taxa de infeções severas quando comparado com a combinação de bendamustina e rituximab (BR). Assim, neste grupo de doentes, o protocolo BR deve ser considerado, apesar de apresentar menor RC.(1, 2) Relativamente aos doentes com má condição física ou comorbilidades mas elegíveis para tratamento a combinação de clorambucil geralmente associado a um anticorpo anti-CD20 (rituximab, obinutuzumab ou ofatumumab) é a terapêutica indicada.(2)

Tabela 4 – Tratamento primeira linha LLC(1)

Estádio	Condição física	Del(17p) /mut p53	Tratamento
Binet A-B; Rai 0-II Doença indolente	-	-	Não
Binet C; Rai III-IV Doença ativa	Boa	Não	Fludarabina + ciclofosfamida + rituximab
		Sim	Ibrutinib, idelalisib + rituximab (Transplante alogénico de células pluripotenciais)
	Má	Não	Clorambucil + obinutuzumab ou + rituximab ou + ofatumumab
		Sim	Ibrutinib, alemtuzumab, alta dose de rituximab ou ofatumumab

Abordagem terapêutica na recidiva

Como regra geral, o tratamento de primeira linha deve ser repetido se a duração da primeira remissão for superior a 24-36 meses.(1) Os inibidores das cinases como o idelalisib ou ibrutinib, protocolos experimentais usando novos agentes (como por exemplo, ABT-199), o transplante alogénico de células pluripotenciais e o alemtuzumab em monoterapia ou em combinação, são estratégias que devem ser equacionadas nestas situações. A escolha de um destes esquemas baseia-se na condição física do doente, na disponibilidade do tratamento e na citogenética. De acordo com *guidelines*

recentes, o transplante deve ser recomendado se houver recaída após tratamento inicial com inibidor das cinases, mas com resposta subsequente a um segundo regime do mesmo tratamento. De notar que os doentes com doença refratária ao tratamento devem ser enquadrados em ensaios clínicos sempre que possível.(1, 108)

Tratamento das complicações da LLC

Os avanços na terapêutica da LLC têm sido feitos não só ao nível do tratamento da doença propriamente dita, mas também no controlo das complicações da doença.

Hipogamaglobulinemia: o uso de imunoglobulina intravenosa profilática para restaurar os níveis de IgG permanece controverso. Este tratamento é, geralmente, reservado para doentes selecionados que têm infeções recorrentes e que também têm uma IgG sérica <500 mg/dL.(12)

Infeção: o tratamento de infeções em doentes com LLC depende dos fatores de risco do doente (como por exemplo, neutropenia ou tratamento recente) e se este aparenta estar séptico na apresentação. Doentes com septicémia ou contagem de neutrófilos inferior a 500-1000 células/ μ L devem ser tratados o mais precocemente possível com antibioterapia empírica de amplo espectro com atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e outros bacilos gram-negativos. Por outro lado, doentes com uma contagem absoluta de neutrófilos acima de 1000 células/ μ L devem ser tratados com antibioterapia dirigida ao microrganismo mais provável tendo em conta os sinais e sintomas de apresentação.(12, 13) Relativamente à prevenção da infeção, sabe-se que a vacinação tem melhores resultados se usada precocemente, quando os níveis de imunoglobulina ainda estão preservados. A vacinação antipneumocócica e anual da gripe, estão recomendadas a todos os doentes com LLC.(2) É, importante ter em conta que os doentes com LLC não devem receber vacinas de vírus vivos (pólio, tifoide, febre amarela, sarampo, parotidite, *Bacillus Calmette-Guérin*, rubéola e Herpes Zoster).(12, 13, 109)

Citopenias autoimunes (AHA e trombocitopenia autoimune): estes doentes podem ou não ter necessidade de fazer tratamento específico da LLC. No caso de não haver necessidade de tratamento específico recomenda-se a corticoterapia com prednisolona durante 2 a 3 semanas, seguida de descontinuação progressiva ao longo de 3 meses. Os doentes que não apresentem resposta aos corticóides ou necessitem de doses elevadas de corticóides para manutenção da resposta deverão fazer terapêutica com ciclosporina. Os doentes que não apresentem resposta às terapêuticas anteriores, ou apresentem contraindicações para a sua realização deverão ser propostos para tratamento com Rituximab durante 4 semanas. Doentes refratários à terapêutica instituída, e na presença de AHA severa pode ser proposta esplenectomia, ou na

presença de contraindicações ao procedimento cirúrgico poderá ser efetuada radioterapia esplênica. Os doentes com citopenias autoimunes com indicação para tratamento de quimioterapia devem fazer terapêutica associada a imunoterapia – Rituximab (deverá ser utilizada a terapêutica com maior eficácia).(2)

A transformação em doença de Hodgkin geralmente responde bem à quimioterapia para o LH alcançando remissões de longa duração. A transformação em LDGCB (transformação de Richter) tem muito mau prognóstico, os esquemas de tratamento incluem rituximab com ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina e dexametasona (R-CHOP), a resposta é de curta duração e o transplante alogénico deve ser recomendado.(2)

CONCLUSÃO

O nosso entendimento sobre a LLC sofreu avanços dramáticos e constantes nas últimas décadas. O aparecimento de novas técnicas moleculares e ensaios clínicos com novos agentes, permitiu mudar a história natural da doença e conseqüentemente, melhorar a qualidade de vida dos doentes.

A QIT tem sido o tratamento de eleição para a maioria dos doentes com LLC, porém, com a chegada dos inibidores do BCR, tem-se assistido a uma mudança paradigmática nos tratamentos de primeira linha. Estes agentes trouxeram uma nova esperança aos doentes com del(17p) e outros marcadores de mau prognóstico.

Futuramente, os objetivos para os doentes mais jovens e com boa condição física será o de aumentar a proporção de doentes com RC e DRM negativos. Para os doentes mais idosos e/ou com má condição física poderão ser mantidos com os agentes orais inibidores das cinases indefinidamente. Nos doentes resistentes e/ou refratários ao tratamento e aos que necessitarão de terapêuticas combinadas por tempo indefinido para controlar a sua doença, são necessários mais estudos que avaliem as conseqüências do uso a longo prazo, nomeadamente, a toxicidade, atividade sinérgica ou interações com outros fármacos.

Tendo em consideração a quantidade de fármacos em estudo e a tendência de evolução do conhecimento, encontramos-nos otimistas quanto ao desenvolvimento de um tratamento efetivo com menos efeitos adversos para a LLC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *American journal of hematology*. 2015;90(5):446-60.
2. Eichhorst B, Dreyling M, Robak T, Montserrat E, Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2011;22 Suppl 6:vi50-4.
3. Blair A, White DW. Leukemia cell types and agricultural practices in Nebraska. *Archives of environmental health*. 1985;40(4):211-4.
4. Monson RR, Fine LJ. Cancer mortality and morbidity among rubber workers. *Journal of the National Cancer Institute*. 1978;61(4):1047-53.
5. Kasper DL, Fauci AS, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine 19 ed*: McGraw-Hill Education; 2015.
6. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J, Kuby J. *Kuby immunology*. New York: W.H. Freeman; 2007.
7. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(16):4313-20.
8. Matos DM, Falcão RP. Monoclonal B-cell lymphocytosis: a brief review for general clinicians. *Sao Paulo Medical Journal*. 2011;129:171-5.
9. Ghia P, Caligaris-Cappio F. Monoclonal B-cell lymphocytosis: right track or red herring? *Blood*. 2012;119(19):4358-62.
10. Duhren-von Minden M, Ubelhart R, Schneider D, Wossning T, Bach MP, Buchner M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature*. 2012;489(7415):309-12.
11. Vardi A, Agathangelidis A, Sutton LA, Ghia P, Rosenquist R, Stamatopoulos K. Immunogenetic studies of chronic lymphocytic leukemia: revelations and speculations about ontogeny and clinical evolution. *Cancer research*. 2014;74(16):4211-6.
12. Dearden C. Disease-specific complications of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2008:450-6.
13. Molica S. Infections in chronic lymphocytic leukemia: risk factors, and impact on survival, and treatment. *Leukemia & lymphoma*. 1994;13(3-4):203-14.
14. Davey FR, Kurec AS, Tomar RH, Smith JR. Serum immunoglobulins and lymphocyte subsets in chronic lymphocytic leukemia. *American journal of clinical pathology*. 1987;87(1):60-5.

15. Arens R, Nolte MA, Tesselaar K, Heemskerk B, Reedquist KA, van Lier RA, et al. Signaling through CD70 regulates B cell activation and IgG production. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;173(6):3901-8.
16. Mauro FR, Foa R, Cerretti R, Giannarelli D, Coluzzi S, Mandelli F, et al. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic, and prognostic features. *Blood*. 2000;95(9):2786-92.
17. Visco C, Ruggeri M, Laura Evangelista M, Stasi R, Zanotti R, Giaretta I, et al. Impact of immune thrombocytopenia on the clinical course of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;111(3):1110-6.
18. Royle JA, Baade PD, Joske D, Girschik J, Fritschi L. Second cancer incidence and cancer mortality among chronic lymphocytic leukaemia patients: a population-based study. *British journal of cancer*. 2011;105(7):1076-81.
19. Porcu P, Cripe LD, Ng EW, Bhatia S, Danielson CM, Orazi A, et al. Hyperleukocytic leukemias and leukostasis: a review of pathophysiology, clinical presentation and management. *Leukemia & lymphoma*. 2000;39(1-2):1-18.
20. Howard SC, Jones DP, Pui CH. The tumor lysis syndrome. *The New England journal of medicine*. 2011;364(19):1844-54.
21. Landgren O, Albitar M, Ma W, Abbasi F, Hayes RB, Ghia P, et al. B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2009;360(7):659-67.
22. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet*. 371(9617):1017-29.
23. Oscier D, Dearden C, Eren E, Fegan C, Follows G, Hillmen P, et al. Guidelines on the diagnosis, investigation and management of chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 2012;159(5):541-64.
24. Cramer P, Hallek M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nature reviews Clinical oncology*. 2011;8(1):38-47.
25. Hamaker ME, Schiphorst AH, ten Bokkel Huinink D, Schaar C, van Munster BC. The effect of a geriatric evaluation on treatment decisions for older cancer patients--a systematic review. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*. 2014;53(3):289-96.
26. Chronic lymphocytic leukemia: recommendations for diagnosis, staging, and response criteria. *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Annals of internal medicine*. 1989;110(3):236-8.
27. Binet JL, Leporrier M, Dighiero G, Charron D, D'Athis P, Vaugier G, et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer*. 1977;40(2):855-64.

28. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-34.
29. Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood*. 2004;103(4):1202-10.
30. Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1987;60(11):2712-6.
31. Konoplev SN, Fritsche HA, O'Brien S, Wierda WG, Keating MJ, Gornet TG, et al. High serum thymidine kinase 1 level predicts poorer survival in patients with chronic lymphocytic leukemia. *American journal of clinical pathology*. 2010;134(3):472-7.
32. Parikh SA, Shanafelt TD. Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in oncology*. 2016;43(2):233-40.
33. Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, O'Brien S, Lee B-N, Lerner S, et al. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*. 2001;97(1):256-63.
34. Shahjahani M, Mohammadiasl J, Noroozi F, Seghatoleslami M, Shahrabi S, Saba F, et al. Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis. *Cellular oncology (Dordrecht)*. 2015;38(2):93-109.
35. Chen C, Puvvada S. Prognostic Factors for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Current hematologic malignancy reports*. 2016;11(1):37-42.
36. Parikh SA, Strati P, Tsang M, West CP, Shanafelt TD. Should IGHV status and FISH testing be performed in all CLL patients at diagnosis? A systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2016;127(14):1752-60.
37. Nolz JC, Tschumper RC, Pittner BT, Darce JR, Kay NE, Jelinek DF. ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia*. 2005;19(6):1018-24.
38. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, Wierda WG, Grever MR, Byrd JC, et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(5):1923-30.
39. Chevallier P, Penther D, Avet-Loiseau H, Robillard N, Ifrah N, Mahé B, et al. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 2002;116(1):142-50.
40. Amin NA, Malek SN. Gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in oncology*. 2016;43(2):215-21.
41. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater AP, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012;26(7):1458-61.

42. Van Dyke DL, Shanafelt TD, Call TG, Zent CS, Smoley SA, Rabe KG, et al. A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 2010;148(4):544-50.
43. Hurtado AM, Chen-Liang TH, Przychodzen B, Hamed C, Munoz-Ballester J, Dienes B, et al. Prognostic signature and clonality pattern of recurrently mutated genes in inactive chronic lymphocytic leukemia. *Blood cancer journal*. 2015;5:e342.
44. Seiffert M, Dietrich S, Jethwa A, Glimm H, Lichter P, Zenz T. Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2012;53(6):1023-31.
45. Thompson PA, Wierda WG. Eliminating minimal residual disease as a therapeutic end point: working toward cure for patients with CLL. *Blood*. 2016;127(3):279-86.
46. Strati P, Keating MJ, O'Brien SM, Burger J, Ferrajoli A, Jain N, et al. Eradication of bone marrow minimal residual disease may prompt early treatment discontinuation in CLL. *Blood*. 2014;123(24):3727-32.
47. Bottcher S, Ritgen M, Fischer K, Stilgenbauer S, Busch RM, Fingerle-Rowson G, et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(9):980-8.
48. Montserrat E, Moreno C. Chronic lymphocytic leukaemia: a short overview. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2008;19 Suppl 7:vii320-5.
49. Galton DA, Wiltshaw E, Szur L, Dacie JV. The use of chlorambucil and steroids in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 1961;7:73-98.
50. Rai KR, Jain P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *American journal of hematology*. 2016;91(3):330-40.
51. Schulz H, Klein SK, Rehwald U, Reiser M, Hinke A, Knauf WU, et al. Phase 2 study of a combined immunochemotherapy using rituximab and fludarabine in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100(9):3115-20.
52. Byrd JC, Rai K, Peterson BL, Appelbaum FR, Morrison VA, Kolitz JE, et al. Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011. *Blood*. 2005;105(1):49-53.
53. Robak T, Dmoszynska A, Solal-Celigny P, Warzocha K, Loscertales J, Catalano J, et al. Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free

survival compared with fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(10):1756-65.

54. Fischer K, Cramer P, Busch R, Stilgenbauer S, Bahlo J, Schweighofer CD, et al. Bendamustine combined with rituximab in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(26):3559-66.

55. Fischer K, Cramer P, Busch R, Bottcher S, Bahlo J, Schubert J, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(26):3209-16.

56. Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman LJ, van den Brakel JH, Beers SA, French RR, et al. The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;177(1):362-71.

57. Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, Stilgenbauer S, Williams CD, Hellmann A, et al. Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(10):1749-55.

58. Cartron G, de Guibert S, Dilhuydy MS, Morschhauser F, Leblond V, Dupuis J, et al. Obinutuzumab (GA101) in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: final data from the phase 1/2 GAUGUIN study. *Blood*. 2014;124(14):2196-202.

59. Brown JR, O'Brien S, Kingsley CD, Eradat H, Pagel JM, Lymp J, et al. Obinutuzumab plus fludarabine/cyclophosphamide or bendamustine in the initial therapy of CLL patients: the phase 1b GALTON trial. *Blood*. 2015;125(18):2779-85.

60. Sehn LH, Assouline SE, Stewart DA, Mangel J, Gascoyne RD, Fine G, et al. A phase 1 study of obinutuzumab induction followed by 2 years of maintenance in patients with relapsed CD20-positive B-cell malignancies. *Blood*. 2012;119(22):5118-25.

61. Goede V, Fischer K, Engelke A, Schlag R, Lepretre S, Montero LF, et al. Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study. *Leukemia*. 2015;29(7):1602-4.

62. Rai KR, Freter CE, Mercier RJ, Cooper MR, Mitchell BS, Stadtmauer EA, et al. Alemtuzumab in previously treated chronic lymphocytic leukemia patients who also had received fludarabine. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(18):3891-7.

63. Osterborg A, Dyer MJ, Bunjes D, Pangalis GA, Bastion Y, Catovsky D, et al. Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1997;15(4):1567-74.
64. Keating MJ, Flinn I, Jain V, Binet JL, Hillmen P, Byrd J, et al. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood*. 2002;99(10):3554-61.
65. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, Smith L, Harbison J, Webb J, et al. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood*. 2004;103(9):3278-81.
66. Stilgenbauer S, Dohner H. Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. *The New England journal of medicine*. 2002;347(6):452-3.
67. Elter T, Hallek M, Montillo M. Alemtuzumab: what is the secret to safe therapy? *Clinical advances in hematology & oncology : H&O*. 2011;9(5):364-73.
68. Zhong Y, Byrd JC, Dubovsky JA. The B-cell receptor pathway: a critical component of healthy and malignant immune biology. *Seminars in hematology*. 2014;51(3):206-18.
69. Niemann CU, Wiestner A. B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution. *Seminars in cancer biology*. 2013;23(6):410-21.
70. Wiestner A. The role of B-cell receptor inhibitors in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2015;100(12):1495-507.
71. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(29):13075-80.
72. Buggy JJ, Elias L. Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy. *International reviews of immunology*. 2012;31(2):119-32.
73. Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, 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(23):6287-96.
74. O'Brien S, Furman RR, Coutre SE, Sharman JP, Burger JA, Blum KA, et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *The Lancet Oncology*. 2014;15(1):48-58.

75. Farooqui MZ, Valdez J, Martyr S, Aue G, Saba N, Niemann CU, et al. Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *The Lancet Oncology*. 2015;16(2):169-76.
76. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2013;369(1):32-42.
77. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Burger JA, Blum KA, Coleman M, et al. Three-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood*. 2015;125(16):2497-506.
78. Paolini A, Coluccio V, Luppi M, Marietta M. More About the Risk of Ibrutinib-associated Bleeding. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*. 2017.
79. Jain N, O'Brien S. Targeted therapies for CLL: Practical issues with the changing treatment paradigm. *Blood reviews*. 2016;30(3):233-44.
80. Derby-Burton Local Cancer Network -Ibrutinib <http://www.derbyhospitals.nhs.uk/search/?q=ibrutinib2017>
81. Kohrt HE, Sagiv-Barfi I, Rafiq S, Herman SE, Butchar JP, Cheney C, et al. Ibrutinib antagonizes rituximab-dependent NK cell-mediated cytotoxicity. *Blood*. 2014;123(12):1957-60.
82. Borge M, Belen Almejun M, Podaza E, Colado A, Fernandez Grecco H, Cabrejo M, et al. Ibrutinib impairs the phagocytosis of rituximab-coated leukemic cells from chronic lymphocytic leukemia patients by human macrophages. *Haematologica*. 2015;100(4):e140-2.
83. Burger JA, Keating MJ, Wierda WG, Hartmann E, Hoellenriegel J, Rosin NY, et al. Safety and activity of ibrutinib plus rituximab for patients with high-risk chronic lymphocytic leukaemia: a single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2014;15(10):1090-9.
84. Baracho GV, Miletic AV, Omori SA, Cato MH, Rickert RC. Emergence of the PI3-kinase pathway as a central modulator of normal and aberrant B cell differentiation. *Current opinion in immunology*. 2011;23(2):178-83.
85. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(13):3603-12.
86. Coutre SE, Barrientos JC, Brown JR, de Vos S, Furman RR, Keating MJ, et al. Management of adverse events associated with idelalisib treatment: expert panel opinion. *Leukemia & lymphoma*. 2015;56(10):2779-86.

87. Idelalisib (Zydelig): updated indications and advice on minimising the risk of infection, volume 10 issue 2 (2016).
88. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110delta, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(22):3390-7.
89. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2014;370(11):997-1007.
90. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Carsetti L, Berno V, Sica S, et al. Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. 2009;23(4):686-97.
91. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, Johnston PB, Vose JM, Lacasce A, et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(13):2578-85.
92. Maddocks KJ, Ruppert AS, Lozanski G, Heerema NA, Zhao W, Abruzzo L, et al. Etiology of Ibrutinib Therapy Discontinuation and Outcomes in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JAMA oncology*. 2015;1(1):80-7.
93. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *The New England journal of medicine*. 2014;370(24):2286-94.
94. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1993;82(6):1820-8.
95. Scarfo L, Ghia P. Reprogramming cell death: BCL2 family inhibition in hematological malignancies. *Immunology letters*. 2013;155(1-2):36-9.
96. Anderson MA, Huang D, Roberts A. Targeting BCL2 for the Treatment of Lymphoid Malignancies. *Seminars in hematology*. 51(3):219-27.
97. Balakrishnan K, Burger JA, Wierda WG, Gandhi V. AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance. *Blood*. 2009;113(1):149-53.
98. Castro JE, Loria OJ, Aguillon RA, James D, Llanos CA, Rassenti L, et al. A Phase II, Open Label Study of AT-101 in Combination with Rituximab in Patients with Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. Evaluation of Two Dose Regimens. *Blood*. 2007;110(11):3119-.
99. Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL, et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *Journal of*

clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2012;30(5):488-96.

100. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature medicine*. 2013;19(2):202-8.

101. Roberts AW, Ma S, Brander DM, Kipps TJ, Barrientos JC, Davids MS, et al. Determination of Recommended Phase 2 Dose of ABT-199 (GDC-0199) Combined with Rituximab (R) in Patients with Relapsed / Refractory (R/R) Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Blood*. 2014;124(21):325-.

102. Tam CS, Seymour JF, Roberts AW. Progress in BCL2 inhibition for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in oncology*. 2016;43(2):274-9.

103. Riches JC, Ramsay AG, Gribben JG. T-cell function in chronic lymphocytic leukaemia. *Seminars in cancer biology*. 2010;20(6):431-8.

104. Fraietta JA, Schwab RD, Maus MV. Improving therapy of chronic lymphocytic leukemia with chimeric antigen receptor T cells. *Seminars in oncology*. 2016;43(2):291-9.

105. Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*. 2012;119(12):2709-20.

106. Savoldo B, Ramos CA, Liu E, Mims MP, Keating MJ, Carrum G, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(5):1822-6.

107. Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, Davila ML, Wang X, Stefanski J, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*. 2011;118(18):4817-28.

108. Dreger P, Schetelig J, Andersen N, Corradini P, van Gelder M, Gribben J, et al. Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: stem cell transplantation or novel agents? *Blood*. 2014;124(26):3841-9.

109. Pasiarski M, Rolinski J, Grywalska E, Stelmach-Goldys A, Korona-Glowniak I, Gozdz S, et al. Antibody and Plasmablast Response to 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients – Preliminary Report. *PloS one*. 2014;9(12):e114966.