

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Leucemia Linfocítica Crónica
Fisiopatologia, diagnóstico e abordagens
terapêuticas

Catarina do Vale Alves

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2017

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Leucemia Linfocítica Crónica
Fisiopatologia, diagnóstico e abordagens
terapêuticas

Catarina do Vale Alves

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentada à
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientador: Doutora Isabel Bettencourt Moreira da Silva,
Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia**

2017

Resumo

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é uma doença linfoproliferativa caracterizada pela acumulação de células B CD5+ no sangue, medula óssea e gânglios linfáticos. O mecanismo fisiopatológico da doença pode envolver não só a via de sinalização do BCR, como também alterações genéticas e alterações no balanço entre a apoptose e a proliferação celular. O curso clínico da LLC é muito heterogêneo, enquanto que a maior parte dos doentes segue um curso indolente da doença, outros expressam um curso clínico rápido e agressivo, requerendo uma terapia precoce. Nos últimos anos verificou-se uma evolução bastante significativa na compreensão da doença, determinando-se novos fatores de prognóstico (deleções, CD38, ZAP-70), melhorando a classificação do estadiamento da doença e também através da descoberta de novos agentes terapêuticos, que têm como alvo vias de sinalização fundamentais. Muitos destes novos agentes terapêuticos ainda se encontram em fase de ensaios clínicos, mas, no futuro, podem ser o passo necessário para a cura da doença.

Palavras-chave: leucemia linfocítica crônica; doença linfoproliferativa; leucemia; deleção 17p13

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a lymphoproliferative disorder characterized by the accumulation of CD5+ B cells in the blood, bone marrow and lymph nodes. The pathogenesis of CLL may involve not only the signaling pathway of BCR but also genetic alterations and alterations in the balance between apoptosis and cell proliferation. The clinical course of CLL is very heterogeneous: while most patients follow an indolent course of disease, others experience rapid and aggressive clinical course requiring early therapy. The understanding of the disease has considerably evolved in the last years determining new prognostic factors (deletions, CD38, ZAP-70), improving the classification of the disease stage and also through the determination of new therapeutic agents, which target important signaling pathways. Many of these new therapeutic agents are still in clinical trial phase but in the future may be the necessary step for curing the disease.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia; lymphoproliferative disorder; leukemia; 17p12 deletion

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Doutora Isabel Bettencourt Moreira da Silva, por ter tornado a realização da presente monografia possível, pela incessante disponibilidade e pelo seu esclarecimento de dúvidas, orientação e correção científica.

Aos meus pais, pelo incentivo ao longo de todos estes anos, pelo tempo que sempre me dedicaram, pelo apoio e amor incondicional.

Aos meus amigos, pelo apoio e presença incansáveis.

Índice Geral:

1	Introdução	11
2	Objetivos	12
3	Materiais e Métodos	13
4	Neoplasias Hematológicas	14
5	Leucemia Linfocítica Crônica.....	16
5.1	Definição.....	16
5.2	Incidência e Epidemiologia	18
5.3	Fatores de Risco.....	19
5.3.1	Fatores Intrínsecos	19
5.3.2	Fatores Extrínsecos	19
5.4	Etiologia.....	20
6	Fisiopatologia da LLC.....	21
6.1	Recetor dos Linfócitos B e Sinalização Celular	21
6.2	Alterações Genéticas.....	23
6.2.1	Deleção (17p13).....	23
6.2.2	Deleção (11q22-q23).....	24
6.2.3	Deleção (13q14).....	24
6.2.4	Trissomia 12	25
6.3	Mutações Somáticas.....	25
6.4	Alterações na Apoptose e na Proliferação Celular	26
6.5	Microambiente tumoral	26
7	Sinais e Sintomas.....	29
7.1	Citopenias Autoimunes	29
7.1.1	Anemia Hemolítica Autoimune	31
7.1.2	Trombocitopenia Imune.....	31
7.1.3	Aplasia Pura das Células Vermelhas	32
7.2	Infeções	32
7.3	Síndrome de Richter	33
8	Diagnóstico.....	34
8.1	Contagem de Células e Morfologia	34
8.2	Imunofenotipagem	35
8.3	Aspiração e Biópsia da Medula Óssea.....	35
8.4	Biópsia de Gânglios Linfáticos	36
8.5	FISH (Fluorescence in situ Hybridization)	36

8.6	Exames de Imagem	36
8.6.1	Tomografia Computorizada (TC).....	37
8.6.2	Ressonância Magnética	37
8.6.3	Ultrassom.....	37
8.7	Diagnóstico Diferencial	37
9	Estadiamento Clínico.....	39
9.1	Sistema de Estadiamento de Rai	39
9.2	Classificação de Binet.....	40
10	Fatores de Prognóstico.....	41
11	Terapêutica.....	43
11.1	Controlo da Doença Assintomática e Início da Terapêutica	43
11.2	Critérios de Resposta à Terapêutica	44
11.3	Agentes Utilizados na Terapêutica da LLC	45
11.3.1	Agentes Citostáticos	45
11.3.2	Anticorpos Monoclonais	46
11.3.3	Inibidores das Cinases.....	47
11.3.4	Corticoesteróides	48
11.4	Radioterapia	49
11.5	Combinações usando Quimioterapia	49
11.6	Quimioimunoterapia.....	50
11.6.1	Combinações usando Rituximab.....	50
11.6.2	Combinações usando Alemtuzumab.....	51
11.6.3	Combinações usando Ofatumumab	51
11.7	Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas.....	51
11.8	Guidelines Terapêuticas	52
11.9	Tratamento da Doença Refratária e Recidivas.....	53
11.10	Significado Clínico da Doença Residual Mínima (DRM).....	54
11.11	Terapêutica de suporte da LLC.....	54
12	Terapêuticas Emergentes.....	55
12.1	Agentes Imunomoduladores: Lenalidomida	55
12.2	Terapêutica de Células T com Recetores de Antígenos Quiméricos	55
12.3	Agentes Inibidores do Checkpoint Imunológico.....	56
12.4	Inibidores da BTK de Segunda Geração.....	57
12.5	Inibidores da BLC-2: Venetoclax.....	57
12.6	Inibidores da PI3K de segunda geração	58
13	Conclusões e Perspetivas	59
14	Referências Bibliográficas	61

Índice de Figuras

Figura 1 – Desenvolvimento das diferentes células sanguíneas a partir das células hematopoiéticas estaminais	14
Figura 2 – Variedade linfocítica no sangue periférico na LLC	16
Figura 3 – Origem celular das células na LLC	17
Figura 4 – Taxa de incidência bruta das Leucemias Linfoides em Portugal, 2010 ...	18
Figura 5 – Representação esquemática da via de sinalização do BCR	22
Figura 6 – Mapa genético da LLC.....	23
Figura 7 – Microambiente na LLC.....	28
Figura 8 – Mecanismos fisiopatológicos das citopenias autoimunes	30
Figura 9 – Esfregaço de sangue de doentes com LLC	34
Figura 10 – Biópsias da medula óssea em doentes com LLC	35
Figura 11 – Biópsias dos gânglios linfáticos de doentes com LLC	36
Figura 12 – Via de sinalização do BCR, possíveis alvos terapêuticos	45
Figura 13 – Algoritmo para a seleção da terapêutica de primeira linha na LLC	53
Figura 14 – Algoritmo da terapêutica LLC refratária e recidivas.....	53

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Diagnóstico diferencial entre a LLC e linfomas das células B.....	38
Tabela 2 – Sistema de Classificação de Rai	39
Tabela 3 – Sistema de Classificação de Binet	40
Tabela 4 – Indicação para Terapêutica	43
Tabela 5 – Critérios de Resposta à Terapêutica	44

Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

AKT – Proteína cinase B

BCR – Recetor das células B

BLNK – Proteína de ligação às células B

BTK – *Bruton's* tirosina cinase

CAR – *Chimeric antigen receptor* (Recetor de antígenos quiméricos)

DAT – Teste da antiglobulina direto

Del – Deleção

DRM – Doença Residual Mínima

DP – Doença em Progressão

FCA – Fludarabina-ciclofosfamida + alemtuzumab

FCR – Fludarabina-ciclofosfamida + rituximab

FISH – *Fluorescence in situ hybridization*

Hb – Hemoglobina

Ig – Imunoglobulina

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IGH – Gene que codifica a região variável da cadeia pesada da imunoglobulina

LDGCB – Linfoma Difuso de Grandes Células B

LDH – Desidrogenase láctica

LEF1 – *Lymphoid enhancer binding factor-1*

LLC – Leucemia Linfocítica Crónica

MAPK – Proteínas cinases ativadas por mitogénios

miR – MicroRNA

MO – Medula Óssea

NF-κB – Fator Nuclear Kb

NFAT – Fator nuclear das células T ativadas

NK – *Natural Killer*

NLC – *Nurse-like cells*

PI3K – Fosfatidilinositol 3-cinase

PLCy2 – Fosfolipase Cy2

RC – Remissão Completa

RP – Remissão Parcial

RS – *Richter Syndrome* (Síndrome de Richter)

SHM – *Somatic hypermutation* (Hipermutação Somática)

SLL – *Small Lymphocytic Lymphoma* (Linfoma linfocítico pequeno)

SNPs – *Single-Nucleotide Polymorphisms* (polimorfismo de um nucleótido simples)

TCEH – Transplante de célula estaminais hematopoiéticas

TDL – Tempo de Duplicação de Linfócitos

T-regs – Células T reguladoras

TNF – Fatores de Necrose Tumoral

ZAP-70 – Cadeia Zeta Associada a Proteína Cinase 70

1 Introdução

A leucemia linfocítica crónica (LLC) é uma doença linfoproliferativa crónica, caracterizada pela acumulação de pequenos linfócitos B monoclonais (≥ 5000 linfócitos/ μL , pelo menos nos últimos três meses) no sangue periférico, medula óssea e tecido linfoide, expressando marcadores de superfície como o CD5, CD19 e o CD23, com uma expressão reduzida de CD20 (1,2). Esta doença linfoproliferativa abrange 30% das leucemias nos adultos (3), sendo mais frequente na população idosa. Em Portugal, 70% dos doentes diagnosticados apresentam mais de 70 anos (1).

A evolução clínica da LLC é variável, considerando-se uma doença bastante heterogénea. Em alguns doentes a doença apresenta um curso indolente, permitindo que vivam décadas sem sintomas, enquanto que, noutros casos, a doença apresenta um curso clínico rápido e agressivo (1,3,4). A sua etiologia ainda não é conhecida (5), sendo que a existência de casos familiares sugere uma base genética da doença. No entanto, na base dos mecanismos fisiopatológicos que levam ao desenvolvimento da doença, encontram-se alterações na apoptose e na proliferação celular, alterações genéticas, bem como alterações a nível da sinalização celular. As alterações genéticas, são muitas vezes utilizadas como fatores de prognóstico, dando informações específicas sobre qual o tratamento a estabelecer, bem como o estadió clínico da doença (2,4).

A heterogeneidade da doença constitui um problema para a seleção da terapêutica e, apesar da pesquisa de novos agentes terapêuticos (lenalidomida, inibidores da BTK de segunda geração ou novos anticorpos monoclonais) ter permitido ampliar as opções terapêuticas, bem como a possibilidade de sucesso, até ao momento não há terapêuticas curativas, para além do transplante de células estaminais alogénico (3).

Diversas opções terapêuticas são propostas, entre elas a utilização de análogos de purina, corticosteroides, quimioimunoterapia, transplante de células estaminais, bem como uma outra série de combinações entre classes terapêuticas diferentes, sempre com o objetivo de atingir remissões cada vez mais duradouras.

2 Objetivos

A presente monografia tem como objetivo caracterizar a leucemia linfocítica crónica, investigando as possíveis causas fisiopatológicas, as possibilidades de diagnóstico, as abordagens terapêuticas disponíveis atualmente, bem como as terapêuticas emergentes que estão a ser investigadas nesta área. Assim, esta monografia constitui uma revisão bibliográfica subjacente ao tema “Leucemia Linfocítica Crónica: fisiopatologia, diagnóstico e abordagens terapêuticas”.

3 Materiais e Métodos

Para a redação da presente monografia foram efetuadas pesquisas nos motores de busca PubMed, Google Scholar e Up to Date, de modo a recolher informação de publicações científicas credíveis. Os artigos analisados pertencem a jornais científicos tais como Nature, Blood Journal, American Journal of Hematology, The Lancet.

As palavras chave utilizadas na pesquisa de artigos científicos foram: *chronic lymphocytic leukemia, pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia, diagnosis, signals and symptoms and treatment of chronic lymphocytic leukemia.*

A seleção dos artigos para a inclusão no trabalho de pesquisa teve por base a sua relevância para o tema, o jornal científico no qual o artigo foi publicado, a credibilidade da fonte e o ano de publicação, sendo que não foram incluídos artigos publicados antes de 2005. Foram, ainda, consultados endereços eletrónicos, como é o caso do Registo Oncológico Nacional, através do qual foi elaborado um gráfico exemplificativo no programa Microsoft Office 2016.

4 Neoplasias Hematológicas

As neoplasias hematológicas representam o sexto grupo de neoplasias mais comuns no mundo, representando os diferentes tipos de tumores que envolvem a medula óssea, o sangue periférico e o tecido linfático e que resulta da transformação neoplásica de células da linhagem linfoide (T ou B) ou mieloide em diferentes estágios de diferenciação, ou de macrófagos e seus precursores, ou ainda dos mastócitos.

Em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS), estabeleceu uma classificação para as neoplasias hematológicas, as quais se classificam segundo a sua linhagem (mieloide, linfoide, de células dendríticas/histocíticas e de mastócitos) (Figura 1), sendo que para cada categoria são utilizados critérios clínicos, morfológicos, imunofenótipos, genéticos e moleculares (6,7).

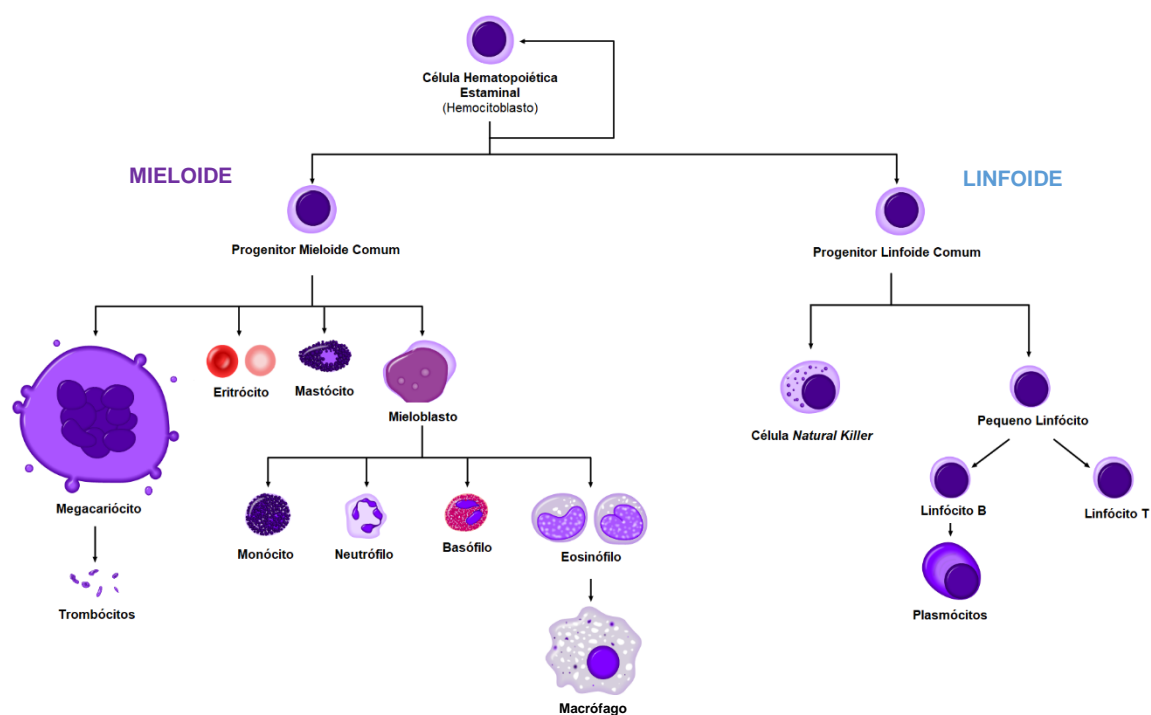


Figura 1 – Desenvolvimento das diferentes células sanguíneas a partir das células hematopoiéticas estaminais. Adaptado de (8)

Assim, a leucemia é classificada como linfoblástica, linfocítica ou leucemia linfoide, indicando uma alteração neoplásica em células da série linfoide, e como leucemia mieloide, caso a alteração tenha ocorrido na linhagem mieloide

(granulocítica, monocítica ou plaquetária). Podem, ainda, subdividir-se em leucemias agudas ou crónicas, segundo a sua evolução clínica (9).

Por outro lado, os linfomas são proliferações autónomas de linfócitos B e T. Estas transformações neoplásicas ocorrem nos órgãos linfoides primários (baço e timo) e nos órgãos linfoides secundários (gânglios linfáticos e tecidos linfoides) – por exemplo: linfoma de Hodgkin (9).

5 Leucemia Linfocítica Crónica

5.1 Definição

A Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) é definida como uma neoplasia linfoproliferativa crónica (10), caracterizada pela acumulação progressiva de linfócitos B CD5+ no sangue periférico (Figura 2), na medula óssea (MO) e órgãos linfoides secundários (gânglios linfáticos e baço) (11). Os linfócitos na LLC são células B clonais CD19-positivas, caracterizadas por um imunofenótipo particular, a expressão conjunta de CD5 e CD23, com baixa expressão de CD20 (1) e com expressão superficial reduzida de imunoglobulinas monoclonais (2).

É a mais comum das doenças linfoproliferativas e corresponde a uma doença na qual as taxas de proliferação celular não são acompanhadas por taxas idênticas de apoptose, o que resulta, na acumulação de células neoplásicas.

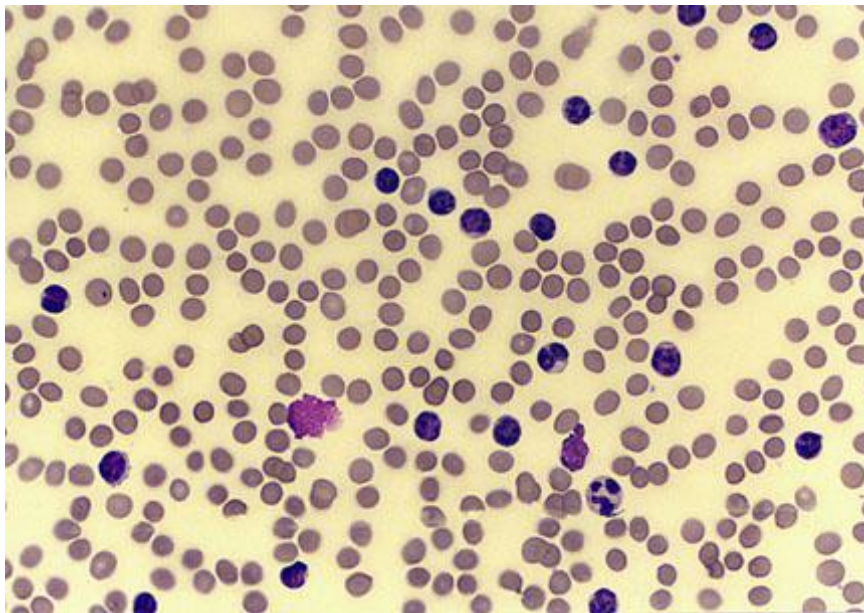


Figura 2 – Variedade linfocítica no sangue periférico na LLC. Adaptado de (12)

É possível observar a variedade de pequenos linfócitos B, assim como as sombras de Gumprecht ou *smudge cells*, linfócitos malignos que sofreram rutura durante a preparação do esfregaço de sangue (12).

A LLC pode ser dividida em dois subconjuntos diferindo entre si pelas suas características clínicas, que refletem o estado de diferenciação dos linfócitos B a partir do qual a LLC teve origem – células LLC que expressam o gene *IGH* mutado e não

mutado. As células da LLC que apresentam o gene que codifica para região variável da cadeia pesada da imunoglobulina (*IGH*) mutado, têm origem em linfócitos B CD5+ que passaram e sofreram uma diferenciação no centro germinativo e que expressam uma imunoglobulina (Ig) com uma hipermutação somática (SHM). A células da LLC que não apresentam o gene *IGH* mutado, têm origem em linfócitos B CD5+ que não passaram ou sofreram uma diferenciação no centro germinativo, apresentando um prognóstico mais agressivo da doença. Outro subconjunto, menos frequente, é o de células de LLC que expressam uma imunoglobulina com mutações somáticas limitadas, como *IGHV3-21* (Figura 3) (4).

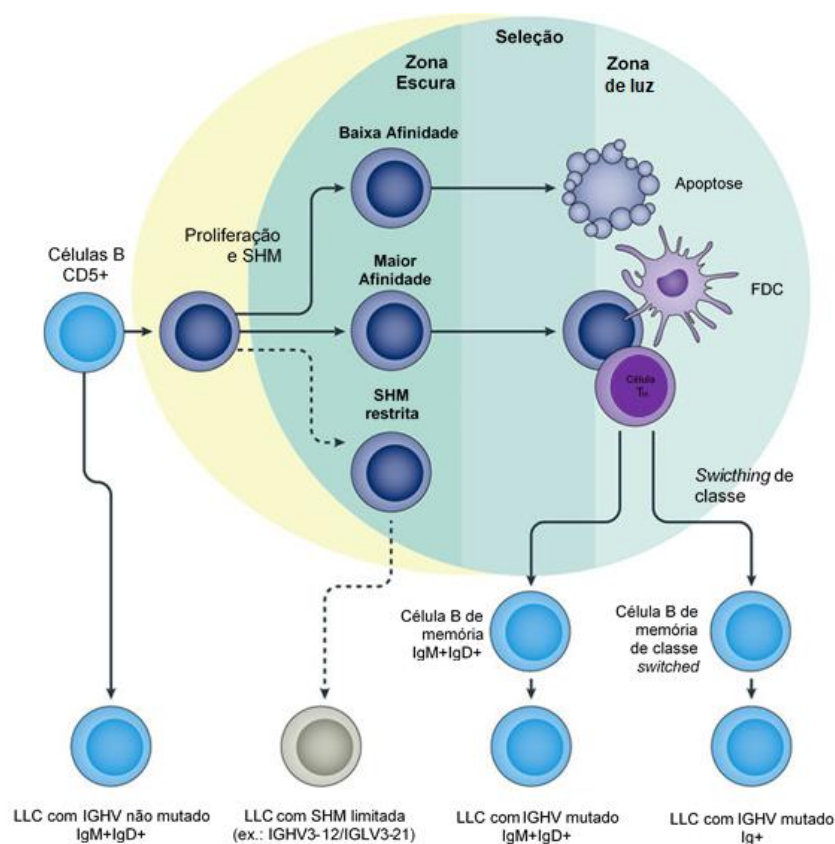


Figura 3 – Origem celular das células da LLC. Adaptado de (4)

Os linfócitos B que entram no centro germinativo, experienciam uma rápida proliferação e uma SHM nos genes que codificam para o gene *IGH*. À medida que vão progredindo no centro germinativo, os linfócitos B (agora na zona de luz do centro germinativo), que expressam recetores de células B mais fortes sofrem uma recombinação de troca de classe de imunoglobulina (4).

5.2 Incidência e Epidemiologia

A leucemia linfocítica crónica representa a leucemia mais comum entre a população adulta dos países Ocidentais. A taxa de incidência é bastante semelhante entre a Europa e os Estados Unidos, variando entre 4 a 6 casos por cada 100,000 pessoas por ano (1). Em Portugal, de acordo com o Registo Oncológico Nacional, registaram-se 363 novos casos de leucemia linfocítica, no ano de 2010, das quais 226 foram classificadas como LLC, 67 classificadas como leucemia linfocítica aguda e 30 classificadas como outros tipos de leucemias linfoides (13).

A incidência da LLC aumenta com a idade. Aproximadamente 70% dos doentes diagnosticados apresentam mais de 65 anos (1), sendo a idade média de diagnóstico aos 70 anos. Existe uma predisposição de género, com os homens a serem mais frequentemente diagnosticados com a doença do que as mulheres (14), tendo uma taxa de incidência de 6.75 (homens) e 3.65 (mulheres) por cada 100,000 pessoas, por ano, nos Estados Unidos (15). Em Portugal, a predisposição de género também se verifica, com os homens a serem mais frequentemente diagnosticados com LLC (Figura 4) (13).

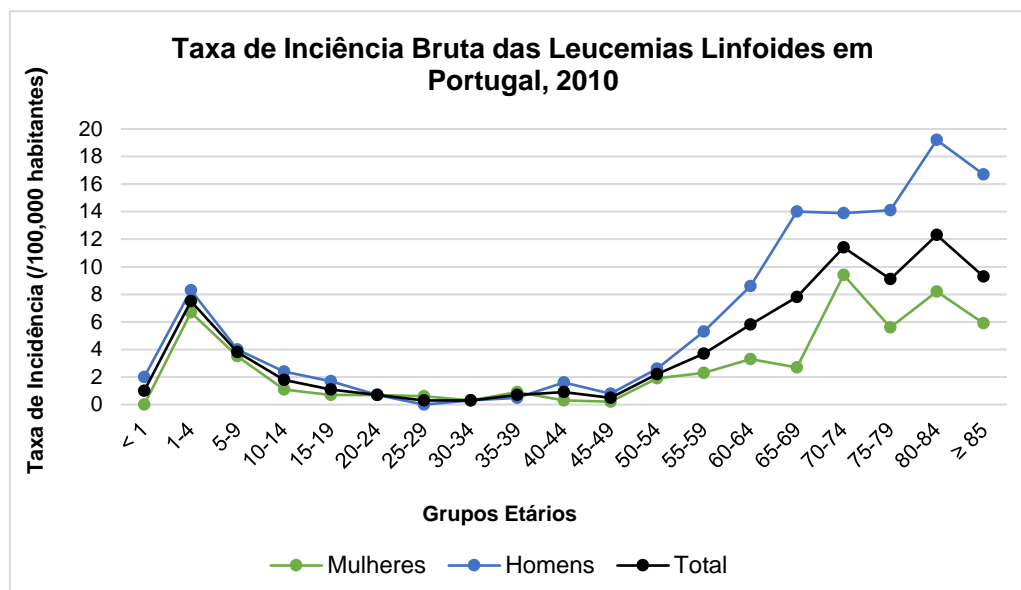


Figura 4 – Taxa de Incidência Bruta das Leucemias Linfoides em Portugal, 2010.

Gráfico elaborado com base nos dados retirados de (13)

Verifica-se uma maior taxa de incidência de Leucemias Linfoides no sexo masculino quando comparado com o sexo feminino, sendo essa diferença mais acentuada em faixas etárias mais velhas, ou seja, a partir dos 55-59 anos (13).

A incidência da LLC varia, ainda, por raça e por localização geográfica, havendo uma maior incidência de LLC na população Caucasiana quando comparada com as populações Africana e Asiática, sendo nos países asiáticos, como a China e o Japão, onde se verifica a taxa de incidência mais baixa de LLC, correspondendo a 10% da incidência verificada nos países Ocidentais (15).

5.3 Fatores de Risco

5.3.1 Fatores Intrínsecos

A predisposição genética é um dos fatores que predeterminam para o aparecimento da LLC, sendo o histórico familiar de doenças hematológicas cancerígenas o fator de risco mais forte e consistente para a suscetibilidade à LLC (16–18).

A alteração da expressão de genes que se localizam no ou próximo do polimorfismo de um nucleótido simples (SNP) associado à LLC, contribui para o desenvolvimento da doença. Por exemplo, os SNPs no LEF1 conduzem ao aumento da expressão dos linfócitos associado ao fator de ligação 1 e, conseqüentemente, ao aumento da resistência à morte celular. Os SNPs no BCL2, gene que codifica uma proteína anti-apoptótica, encontra-se aumentado na LLC. Por último, um SNP em TERT, associado ao aumento do comprimento dos telômeros dos linfócitos, contribui para o aumento das trocas entre cromátídeos irmãos, fenômeno observado na LLC. Este acontecimento leva a uma diminuição da erosão dos telômeros e conseqüentemente a um aumento da senescência celular (4).

5.3.2 Fatores Extrínsecos

Diversos estudos epidemiológicos dedicam-se a tentar identificar fatores de risco extrínsecos, ou seja, a verificar qual a contribuição dos fatores ambientais (como a radiação ionizante, compostos químicos) para o desenvolvimento da LLC, apesar de ser difícil estabelecer uma relação causal direta entre estes fatores e o desenvolvimento de LLC (1).

O “agente laranja”, uma mistura de dois herbicidas, utilizado no Sul do Vietname e no Camboja para destruir a floresta e as culturas e pelos Estados Unidos durante a guerra do Vietname, foi considerado um fator de risco para a LLC, sendo as alterações a nível da sinalização celular associadas ao desenvolvimento de LLC (19). Para além

disso, diversos estudos indicam que a exposição a inseticidas constitui um fator de risco para a LLC, através de diversos mecanismos incluindo imunodeficiência e genotoxicidade, aumento da proliferação celular e alterações cromossômicas (20). Por outro lado, o risco de LLC não está aumentado pela exposição a radiação ionizante (21,22). Alguns estudos sugeriam que havia uma associação entre a Hepatite C e outras infecções virais e o aumento do risco de desenvolver LLC (23), no entanto não foram encontradas evidências que as transfusões sanguíneas transmitissem a LLC (24).

5.4 Etiologia

O fator etiológico concreto da leucemia linfocítica crônica ainda não foi identificado. No entanto, na LLC ocorrem múltiplas mutações genéticas a nível do DNA das células B imaturas, mutações estas que levam à formação de linfócitos “anormais”, que são incapazes de cumprir as suas funções de defesa do organismo contra as infeções (5). Estas lesões genéticas resultam na transformação neoplásica dos linfócitos B que leva à ocorrência de leucemia.

Familiares de primeiro grau de doentes diagnosticados com LLC, apresentam uma suscetibilidade 5 a 7 vezes maior de desenvolver LLC (5).

6 Fisiopatologia da LLC

Na base da fisiopatologia da LLC encontram-se três fatores essenciais para a compreensão da doença, são eles os recetores dos linfócitos B (BCR), as alterações genéticas e as alterações decorridas no balanço entre a proliferação celular e a apoptose.

6.1 Recetor dos Linfócitos B e Sinalização Celular

As células da LLC expressam à sua superfície o recetor das células B (BCR), ao qual estão associadas as imunoglobulinas. Um BCR funcional é crucial para a sobrevivência e funcionamento das células B maduras e de muitas células B de doenças linfoproliferativas, incluindo a LLC (1,4).

O BCR é constituído por uma molécula de imunoglobulina transmembranar de ligação ao ligando (IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM) e pelos heterodímeros de sinalização $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ (CD79A e CD79B, respetivamente) (Figura 5) (25,26). Normalmente, as células da LLC expressam simultaneamente IgD e IgM, apesar de ser em níveis mais baixos, quando comparado com a expressão nas células B normais. Isto porque, as células *naïves*, caracterizadas pela presença do isotipo M da Ig, após se formarem na medula óssea, atingem a maturação nos órgãos linfoides secundários, nos quais passam a co-expressar o isotipo D. Assim, como a LLC é caracterizada pela acumulação progressiva de células maduras, a maior parte das células da LLC expressa simultaneamente IgD e IgM (4,26,27).

A sinalização do recetor das células B (Figura 5) é iniciada pela fosforilação das caudas citoplasmáticas de CD79A e CD79B, por uma proteína tirosina cinase (Lyn), o que desencadeia a ativação da tirosina cinase do baço – SYK (4). Por sua vez, a SYK proporciona a ativação da *Bruton's tirosina cinase* (BTK), fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), fosfolipase $Cy2$ (PLC γ 2) e da proteína de ligação às células B (BLNK) (10). O antigénio CD19 funciona como um co-receptor para a ativação da via de sinalização do BCR, sendo também importante para a ativação do PI3K. O PI3K, por sua vez, recruta e ativa PLC γ 2, BTK e AKT. A PLC γ 2 é responsável pela libertação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, desencadeando a ativação de cinases reguladas pelo sinal extracelular (ERK) e das vias de sinalização do fator nuclear κB (NF- κB) (4,26), traduzindo-se em sobrevivência e proliferação de sinais, bem como na regulação da maturação e migração celular (28).

Os casos de LLC com o gene *IGH* não mutado, são mais responsivos à estimulação do BCR, havendo uma ativação da via de sinalização celular (4,26). A ativação prolongada do ERK, após a estimulação da IgM, estimula a expressão do proto-oncogene MYC, o que sugere que a estimulação da IgM promove a entrada da célula no ciclo celular e o crescimento células de LLC (26).

Assim, a complexa via de sinalização do BCR é regulada pela ativação de moléculas a jusante do BCR, como a Lyn, a proteína HS1 e a cinase ERK (26), sendo a inibição destas moléculas considerada como um alvo terapêutico na LLC, com vista a aumentar a apoptose, inibir a proliferação celular e modificar as vias de sinalização das células leucémicas presentes no sangue, gânglios linfáticos, medula óssea e no baço (10).

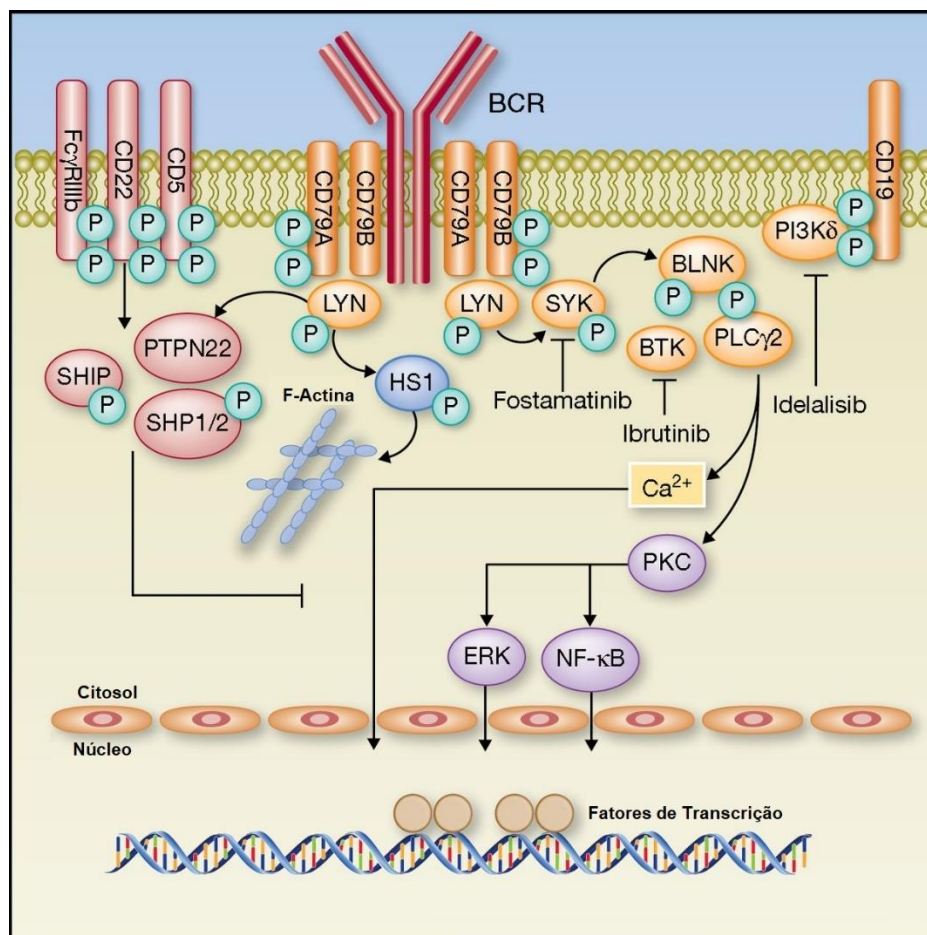


Figura 5 – Representação esquemática da via de sinalização do BCR. Adaptado de (26)

6.2 Alterações Genéticas

Os doentes com LLC apresentam, pelo menos, uma alteração a nível genético (Figura 6). Neste tipo de neoplasia são frequentes mutações, deleções ou trissomias.

As alterações genéticas são um fator predisponente importante para o aparecimento de LLC, no entanto, ainda não está completamente esclarecido que genes é que estão diretamente envolvidos no desenvolvimento da LLC. Certo é que, as alterações genéticas são de elevada importância na determinação do prognóstico da doença (5).

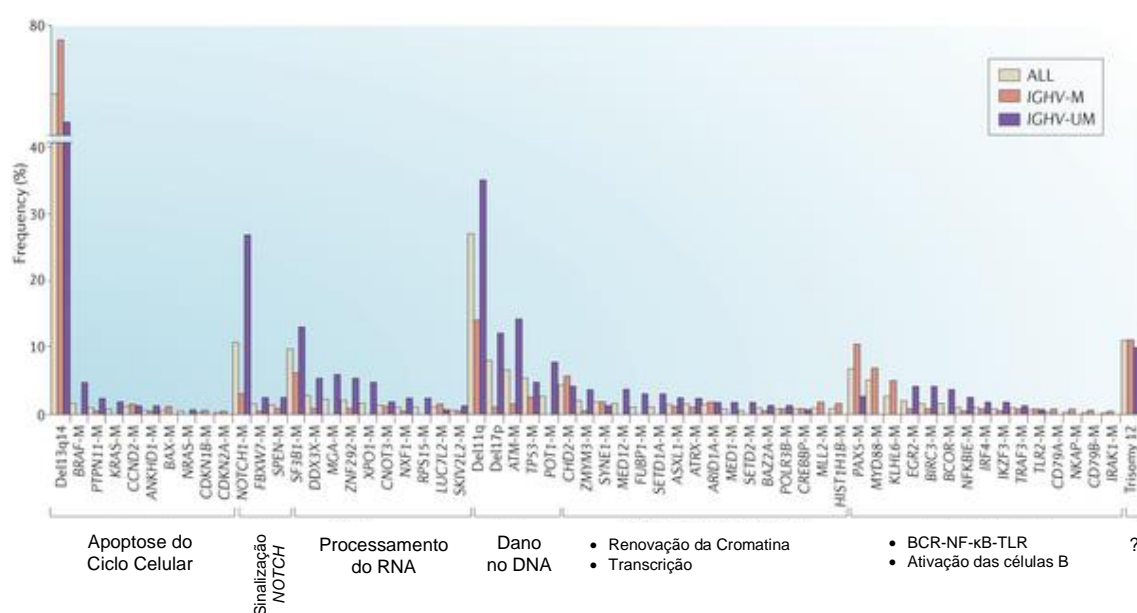


Figura 6 – Mapa genético da LLC. Adaptado de (29)

Neste mapa estão representadas as principais alterações genéticas ocorridas nos doentes com leucemia linfocítica crónica, bem como as respetivas percentagens de frequência (29).

6.2.1 Deleção (17p13)

A deleção no braço curto do cromossoma 17, del(17p13), é encontrada em menos de 10% dos doentes diagnosticados com LLC (1,29), sendo mais comum no subgrupo de doentes que apresentam o gene *IGH* mutado (29).

No braço curto deste cromossoma, encontra-se o gene supressor de tumores *TP53* (4), cuja função da respetiva proteína (p53) é inativada pela del(17p) (4,30). Na sua forma natural, o gene *TP53* é responsável pela paragem do ciclo celular, apoptose, senescência e diferenciação (10). Assim, mutações neste gene estão associadas a respostas fracas aos danos provocados no DNA (4). Os doentes que

apresentam esta deleção encontram-se na categoria de maior risco da doença, relacionada com um curso mais agressivo da doença (1,4,30).

6.2.2 Deleção (11q22-q23)

A deleção no braço longo do cromossoma 11, del(11q22-q23), representa cerca de 20% dos doentes diagnosticados com LLC, também é mais comum no subgrupo de doentes que apresenta o gene *IGH* mutado (1,29).

Esta deleção engloba uma mutação no gene supressor da telangiectasia atáxia (*ATM*), gene este que codifica uma proteína crucial para a resposta celular aos danos no DNA. Assim, a mutação no gene *ATM* está associada a uma instabilidade genómica, aquisição de alterações genéticas adicionais e quimiorresistência (1,10,29). Para além de mutações neste gene, a del(11q) pode envolver outros genes relevantes tais como o *BIRC3*, um regulador negativo da via do NF-κB, recentemente identificado como uma alteração genética característica dos casos de LLC refratária (1,29).

6.2.3 Deleção (13q14)

As alterações genéticas a nível do braço longo do cromossoma 13, del(13q14), são as mais frequentes nos doentes diagnosticados com LLC, presentes em mais de 50% dos casos diagnosticados e estão associadas a um prognóstico favorável (1,4,10,29), também esta deleção é mais frequentemente encontrada em doentes que apresentem o gene *IGH* mutado (29).

Localizados nesta região do cromossoma 13 estão dois genes de microRNA não codificantes, o miR-15a e o miR16-1 (1), que codificam para um regulador negativo do complexo transcricional NF-κB. Quanto maior a deleção, pior o prognóstico associado à doença (29).

O miR15a e o miR16-1 exercem função de supressores de tumores em células B, assim, a sua inibição impede a apoptose e permite a progressão do ciclo celular. Também foi demonstrado que estes microRNA regulam a expressão do BCL-2 (proteína anti-apoptótica) (1,4), dados estes que são consistentes com a elevada expressão de BCL-2 e a resistência à apoptose verificada nas células da LLC (29).

6.2.4 Trissomia 12

A trissomia 12, detetada em cerca de 10 a 20% dos doentes diagnosticados com LLC, foi classificada com um prognóstico intermédio (1,4,30) e as consequências da sua alteração ainda não encontram definidas (4). Pensa-se que a trissomia 12 possa estar associada a uma regulação positiva de vários genes, incluindo o *P27*, *CDK4*, *HIP1R*, *MYF6* e *MDM2*. Para além do referido, estudos recentes demonstraram haver uma associação da trissomia 12 com a mutação *NOTCH1* (1).

6.3 Mutações Somáticas

O processo de sequenciação das mutações somáticas permite compreender a heterogeneidade genética da LLC e permite perceber o elevado grau de variabilidade genética desta doença (1,4,31). Estas mutações correspondem a eventos mutacionais que ocorrem durante a divisão celular e que termina na célula cancerígena (32).

As mutações somáticas mais frequentemente observadas envolvem genes implicados em processos de sinalização celular críticos: danos do DNA e controlo do ciclo celular (*TP53*, *ATM*, *BIRC3*), processamento do mRNA (*SF3B1*, *XPO1*), sinalização Notch (*NOTCH1*), modificação da cromatina (*HIST1H1E*, *CHD2* e *ZMYM3*) e vias inflamatórias (*MYD88*) (1,4,10,31,33).

Dos doentes diagnosticados com LLC, 10 a 15% são portadores de mutações a nível do gene *NOTCH1*, sendo que muitos apresentam também trissomia 12, o que aumenta a evidência de associação entre estas duas lesões genéticas (1,29). Este gene, que codifica para as proteínas Notch (receptores transmembranares), é responsável pela regulação do desenvolvimento celular hematopoiético, sendo as mutações neste gene responsáveis pelo envio de sinais de pró-sobrevivência e anti-apoptóticos (1,4,29,34).

Estudos recentes, identificaram que a mutação no gene *SF3B1* está presente em cerca de 10% dos doentes com LLC (29). Este gene codifica um componente crucial na fase inicial do processo de *splicing* do mRNA. Assim, para além das consequências a nível do *splicing* do mRNA, as mutações no gene *SF3B1* estão envolvidas em alterações de resposta às lesões no DNA (1,29).

O gene *BIRC3* está, por sua vez, envolvido na apoptose e inibição do NF-κB, assim, mutações que tenham como consequência a inativação deste gene conduzem a ativação do complexo transcrricional do NF-κB (1,29).

O número de alterações genómicas tende a aumentar com a evolução da doença, sendo influenciado pelos tratamentos realizados que, por sua vez, condicionam a evolução clonal (1).

6.4 Alterações na Apoptose e na Proliferação Celular

A LLC é caracterizada quase exclusivamente pela acumulação de células B que “escaparam” da morte celular programada, ficando o ciclo celular estagnado na fase G0/G1. Estas células apresentam uma atividade proliferativa baixa, que juntamente com uma taxa apoptótica reduzida e com a desregulação de genes reguladores, explicam a acumulação das células B (27).

A apoptose pode ser inibida pela exposição a uma interleucina – IL4, e pela estimulação de CD40. Esta inibição ocorre nos pseudo-folículos, dos gânglios linfáticos, e em *clusters*, localizados na medula óssea. Os pseudo-folículos, em contacto com as células B em proliferação, aumentam o número de células T que expressam o ligando CD40. As células B cancerígenas podem recrutar células T CD40 ativadas, desde que estas apresentem as quimiocinas CCL17 e CCL22 (*T-cell-attracting*). Este mecanismo, explica a sobrevivência seletiva de determinadas células, que recebem sinais de sobrevivência particulares (27).

Nos centros de proliferação nos gânglios linfáticos, baço e medula óssea ocorre a estimulação de CD31, nas células endoteliais, e CD154, nas células T, que, conseqüentemente, vão ativar as células cancerígenas da LLC, aumentando a expressão de CD38 e ZAP-70 (fatores de prognóstico), aumentando a divisão celular e reforçando a resistência à apoptose. Do centro de proliferação a célula segue para a circulação, onde os níveis de marcadores de ativação vão diminuindo. As células que permanecem com os marcadores de ativação regressam ao centro de proliferação, atraídas por quimiocinas, repetindo o ciclo celular (27).

6.5 Microambiente Tumoral

Os principais mecanismos responsáveis pela patogénese da LLC são dependentes de sinais de sobrevivência provenientes dos tecidos linfoides, isto é, do microambiente tumoral (Figura 7) (4,35). Diversos desequilíbrios contribuem para a formação deste microambiente, como por exemplo, citocinas e interações célula-célula que resultam na desregulação das células T, responsáveis por evasão e morte celular e acumulação progressiva de células B malignas (35).

Em resposta a estímulos enviados por quimiocinas, as células da LLC formam centros proliferativos, nos gânglios linfáticos. Nestes centros, constituídos por células do estroma, células endoteliais, células T e NLC (*nurse-like cells*) (Figura 7), as células da LLC são expostas a quimiocinas, integrinas, citocinas e fatores de sobrevivência, como fatores de necrose tumoral (TNF) (BAFF e APRIL), que são responsáveis pela ativação do NF- κ B. Esta ativação, induz a expressão do miR-155 que, por sua vez, aumenta a sinalização do BCR. A secreção de IL-4, uma citocina produzida pelas células T, é responsável pelo aumento da quantidade de IgM à superfície das células B, o que facilita a interação das células da LLC com os autoantígenos. Para além disto, a ativação do ROR1, um recetor transmembranar tipo tirosina-cinase, pode aumentar a proliferação de células da LLC e promover a migração destas em resposta a quimiocinas (4,26,36).

Verifica-se um aumento da expressão de IgM e de CXCR4 (recetor da quimiocina 4) à medida que as células tumorais deixam os tecidos. O CXCR4 é, assim, responsável pela inibição da apoptose e pela progressão do ciclo celular (4). Por outro lado, as células T, juntamente com as células NK (*natural killer*), enviam sinais de sobrevivência para o microambiente tumoral, de modo que as células B malignas escapem aos estímulos imunitários citotóxicos (26).

Assim, torna-se evidente que as células da LLC criam um microambiente no qual as células tumorais conseguem contornar o estímulo da apoptose mediado pelo sistema imunitário (26).

O conhecimento sobre a influência do microambiente na fisiopatologia da LLC, tem disso de extrema importância por fornecer dados relevantes sobre agentes imunomoduladores que podem ser considerados como possíveis alvos terapêuticos na LLC (36).

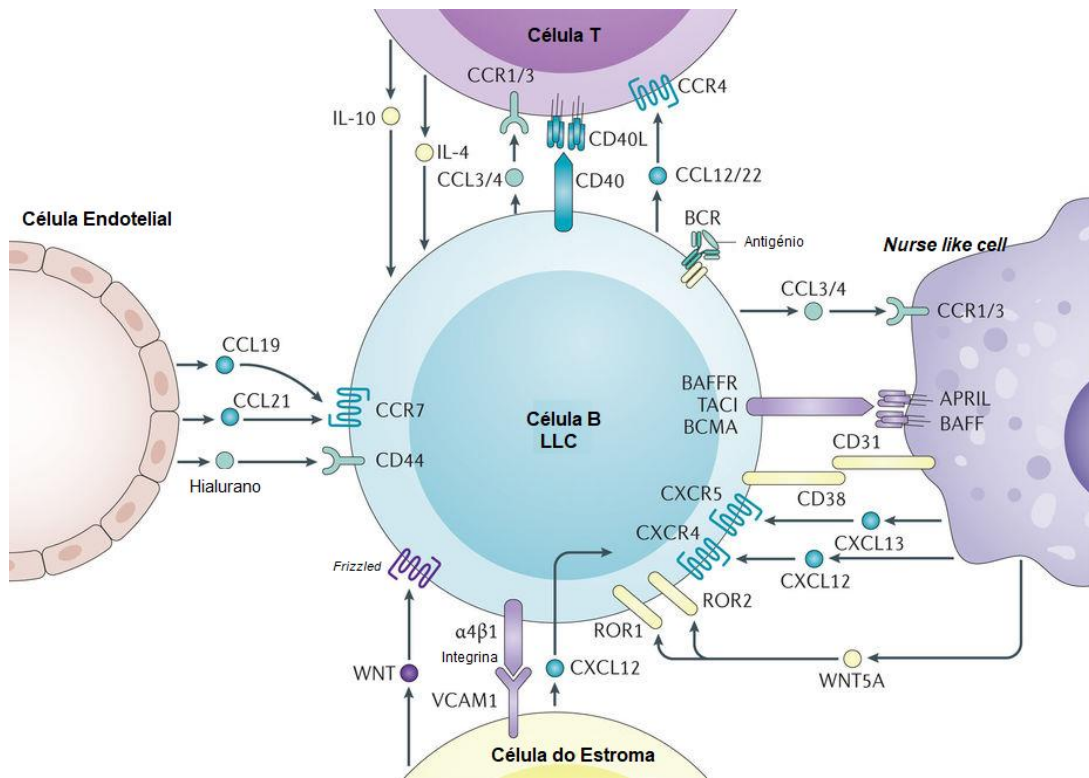


Figura 7 – Microambiente na LLC. Adaptado de (4)

Figura esquemática, na qual estão representados os mecanismos pelos quais as células B tumorais contornam os estímulos da apoptose e da proliferação celular provenientes do microambiente tumoral (4).

7 Sinais e Sintomas

Grande parte dos doentes com LLC não têm sinais ou sintomas, tratando-se de uma doença assintomática em 25 a 50% dos casos. A LLC é, assim, maioritariamente diagnosticada durante a execução de análises sanguíneas de rotina (12).

Na fase sintomática da doença podem surgir os chamados sintomas B, como febre (38°C) sem evidência de infeção, perda de peso acentuada em menos de 6 meses ou suores noturnos persistentes por mais de 1 mês (1). Podem ainda surgir outro tipo de sintomas secundários não hematológicos, como linfadenopatias, esplenomegalias e hepatomegalias palpáveis e glomerulonefrite membranoproliferativa (15), bem como artrite reumatoide, associada a um aumento do risco de desenvolver um linfoma (37).

7.1 Citopenias Autoimunes

As citopenias autoimunes ocorrem em cerca de 4 a 10% dos doentes diagnosticados com LLC, sendo a anemia hemolítica autoimune, a citopenia autoimune mais comum nestes doentes, seguida da trombocitopenia imune. A aplasia pura das células vermelhas é relativamente rara (38,39).

A nível fisiológico as citopenias autoimunes, associadas à LLC, podem ser mediadas por uma série de mecanismos (Figura 8). Geralmente, as células B não malignas produzem autoanticorpos policlonais com elevada afinidade para a IgG e que se encontram direcionados para antígenos presentes nos eritrócitos ou nas plaquetas, causando destruição das células sanguíneas e, conseqüentemente, anemia hemolítica autoimune ou trombocitopenia imune (Figura 8-1) (38,40). Também as células B malignas produzem anticorpos autoimunes, geralmente da classe da IgM, que levam a hemólise intravascular (Figura 8-2). Por outro lado, as células da LLC podem favorecer a ação auto-reativa das células T *helper* e das células T reguladoras (T-regs), por atuarem como células apresentadoras de antígenos (Figura 8-3). As células T-regs encontram-se consideravelmente aumentadas na LLC, produzindo citocinas imunossupressoras, como a TGF-beta e a IL10, que levam ao desenvolvimento de citopenias autoimunes (Figura 8-4) (38,40).

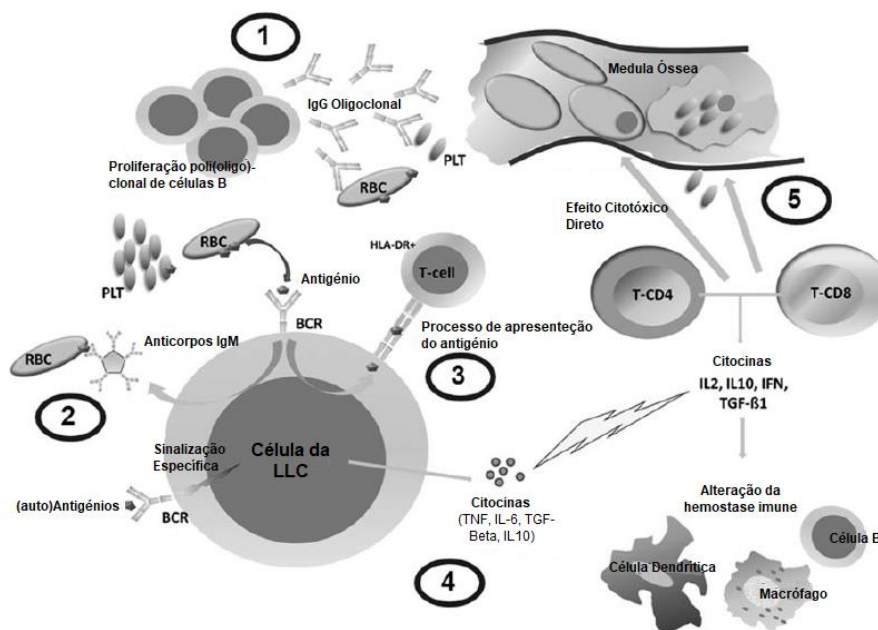


Figura 8 – Mecanismos fisiopatológicos das citopenias autoimunes. Adaptado de (40)
 1 - Citopenias autoimunes em consequência da produção de auto-anticorpos (IgG) direcionados para os antígenos presentes nos eritrócitos ou nas plaquetas. 2 - Células B malignas produzem anticorpos autoimunes (IgM), que levam a hemólise intravascular. 3 – Células atuam como células apresentadoras de antígenos. 4 - Células Tregs produzem citocinas imunossupressoras.

Doentes que apresentem os genes *IGH* não mutados têm maior propensão para o desenvolvimento de citopenias autoimunes, isto porque, nestes doentes, o recetor das células B encontra-se mais suscetível à estimulação por antígenos de eritrócitos, causando a ativação da produção de autoanticorpos (38).

Por último, alguns agentes terapêuticos utilizados na LLC, como a fludarabina, podem induzir o desenvolvimento de citopenias autoimunes, principalmente anemia hemolítica autoimune. Por isso, a fludarabina, utilizada em monoterapia está contraindicada em doentes com anemia hemolítica autoimune. No entanto, quando associada a outros agentes terapêuticos, como a ciclofosfamida ou anticorpos monoclonais, o risco de se desenvolver anemia hemolítica autoimune baixa consideravelmente (38,40).

Aparentemente, doentes com citopenias autoimunes secundárias, apresentam uma menor percentagem de sobrevivência, visto terem um maior risco de desenvolverem infeções, complicações cardiovasculares, hemorragias, sendo, por isso, as citopenias autoimunes consideradas indicadores da agressividade da LLC (40).

7.1.1 Anemia Hemolítica Autoimune

Esta doença autoimune envolve a destruição de glóbulos vermelhos ou eritrócitos mediada por anticorpos (38). A prevalência de anemia hemolítica autoimune é maior em indivíduos em estádios mais avançados de LLC (41,42) sendo, por isso, um indicador do estado da doença (42).

Uma vez excluída qualquer outra causa de anemia, o diagnóstico de anemia hemolítica autoimune é confirmado na presença dos seguintes critérios: níveis de hemoglobina (Hb) inferiores a 11 g/dL, na ausência de qualquer tratamento citotóxico no mês precedente; um ou mais sinais laboratoriais de hemólise (como aumento da bilirrubina conjugada, na ausência de doença hepática; aumento da desidrogenase láctica (LDH) e diminuição da haptoglobulina); reticulocitose ou teste da antiglobulina direto (DAT) positivo (38,40).

No entanto, o diagnóstico de anemia hemolítica autoimune é difícil nos doentes com LLC, dado os valores de hemólise se encontrarem alterados, devido à progressão da doença ou devido à terapêutica instituída (38,40).

7.1.2 Trombocitopenia Imune

A trombocitopenia autoimune corresponde ao segundo tipo de citopenia autoimune mais comum nos doentes com LLC e envolve a destruição de plaquetas mediada por anticorpos (38).

Este tipo de doença autoimune é difícil de diagnosticar, especialmente se os doentes forem assintomáticos e se a exame física não revelar uma esplenomegalia, devido à ausência de testes sensíveis e específicos para estes autoanticorpos.

Assim, o diagnóstico de trombocitopenia imune, associada a LLC, é confirmado tendo em conta os seguintes critérios: contagem de plaquetas inferior a $100 \times 10^9/L$; ausência de esplenomegalia; número normal ou aumentado de megacariócitos nos exames realizados à medula óssea; ausência de tratamentos citotóxicos no mês precedente; exclusão de outras causas de trombocitopenia (por exemplo: medicamentos) (38,40).

A avaliação da medula óssea mantém-se o método de eleição para o diagnóstico da trombocitopenia imune secundária. No entanto, em doentes com um vasto envolvimento da medula óssea ou no estadio C da classificação de Binet, a interpretação dos níveis de megacariócitos torna-se complexa. Nestes casos, o

diagnóstico de trombocitopenia imune secundária faz-se pela ausência de resposta a uma transfusão de plaquetas (40).

7.1.3 Aplasia Pura das Células Vermelhas

A aplasia pura das células vermelhas é uma citopenia relativamente rara, manifestando-se em menos de 1% dos doentes com LLC. Esta desenvolve-se em consequência de uma destruição das células precursoras dos eritrócitos e manifesta-se com reticulocitopenia e anemia (38).

O diagnóstico deve ser considerado em todos os doentes que apresentem reticulocitopenia e anemia (38,40), sendo confirmado se se verificarem os seguintes critérios de diagnóstico: presença de anemia normocrômica e normocítica, com Hb inferior a 11 g/dL; reticulocitopenia absoluta; quantidade reduzida de precursores de reticulócitos na medula óssea, com produção relativa de leucócitos e megacariócitos (38).

Assim, doentes com suspeita de aplasia pura das células vermelhas devem realizar uma biópsia à medula óssea, para verificar a total ausência de precursores das células vermelhas e a conservação das linhagens granulocítica e megacariocítica, para que possa ser confirmado o diagnóstico (38,40).

7.2 Infecções

As infeções têm um grande impacto no decurso da evolução clínica dos doentes com LLC, sendo responsáveis por uma elevada percentagem de mortes nestes doentes. Os doentes com LLC apresentam um sistema imunitário deprimido, com respostas imunitárias celulares e humorais reduzidas. Este decréscimo da resposta do sistema imunitário é consequência da doença subjacente, bem como das terapias implementadas na LLC (43).

A incidência de infeções nestes doentes aumenta com o agravar do estado da doença, bem como com o tratamento ativo da doença. Isto porque, as terapias utilizadas na LLC têm efeitos específicos na função do sistema imunitário, principalmente no sistema imunitário mediado por células (43).

A maioria das infeções são bacterianas, provocadas por microorganismos como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Staphylococcus*, que originam infeções a nível do trato respiratório (infeções pulmonares), sépsis e infeções a nível

do trato urinário. As infecções virais (por exemplo *herpes simplex* e *herpes zoster*), fúngicas e oportunistas são agora cada vez mais frequentes devido à utilização de terapêuticas com análogos de purinas e alemtuzumab (43).

7.3 Síndrome de Richter

A síndrome de Richter (RS) corresponde a uma complicação rara da leucemia linfocítica crônica (44), tendo uma incidência de 2 a 7% nos doentes com LLC (45). Apesar de rara, tem uma elevada relevância a nível clínico dado o seu mau prognóstico, com apenas meses de sobrevivência (44).

Definida como o desenvolvimento de um linfoma agressivo associado à leucemia linfocítica crônica, esta síndrome pode ser dividida em duas variantes, consoante o tipo de linfoma desenvolvido, o linfoma difuso de grandes células B (LDGCB-RS) ou linfoma não-Hodgkin (44–46).

O mecanismo fisiopatológico ainda não é bem conhecido, mas pensa-se que poderá ter origem em infecções virais ou alterações genéticas. Estudos recentes indicam que na origem da transformação da LLC para um LDGCB está a inativação do gene *TP53* e do gene *CDKN2A/B*, o que causa uma desregulação do ciclo celular, que culmina na transformação da LLC (44–46). Outra hipótese assenta na presença da trissomia 12, uma vez que 1 em cada 3 doentes com RS apresenta esta trissomia (45). Neste contexto, os doentes apresentam sintomas como perda de peso, perda de massa muscular, febre, linfadenopatias progressivas e hepatoesplenomegalia.

8 Diagnóstico

O diagnóstico inicial de um doente com suspeita de LLC requer uma contagem de células sanguíneas completa (15,47), com deteção do aumento do número de clones de células B, por citometria de fluxo. Apesar de não serem necessárias para o diagnóstico, também podem ser requeridas biópsias da medula óssea e/ou dos gânglios linfáticos (15).

8.1 Contagem de Células e Morfologia

O diagnóstico da LLC requer a presença de ≥ 5000 linfócitos B monoclonais/ μL no sangue periférico, particularidade esta designada por linfocitose (1,4,15,47,48), pelo menos nos últimos três meses. É, ainda, necessário realizar uma citometria de fluxo ou análise imunohistoquímica das células mononucleares do sangue, medula óssea ou dos gânglios linfáticos, para confirmar a clonalidade das células B e, assim, distinguir a LLC de outro tipo de linfomas (47,48).

Morfologicamente, as células da LLC são caracterizadas por pequenos linfócitos B maduros, com uma pequena linha de citoplasma e um núcleo denso, com uma cromatina condensada, e sem um nucléolo distinguível (Figura 9a). A presença de *smudge cells* é característica da LLC, representando linfócitos B malignos que sofreram rutura durante a preparação do esfregaço de sangue (Figura 9b). As células da LLC podem ainda surgir como células maiores, com um núcleo menos condensado e um nucléolo proeminente, sendo designadas por prolinfócitos (Figura 9c) (4,15,47).

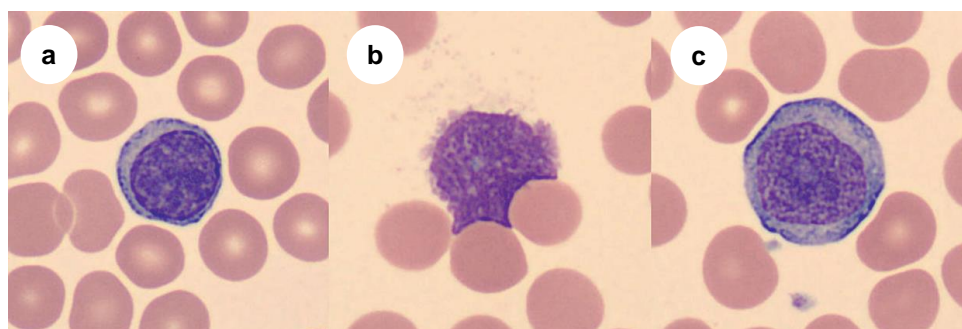


Figura 9 – Esfregaço de sangue de doentes com LLC. Adaptado de (4)

Nesta figura é possível observar as células linfocíticas típicas da LLC (a), as *smudge cells* (b) e um prolinfócito com um nucléolo proeminente (c) (4).

8.2 Imunofenotipagem

A realização de uma imunofenotipagem, geralmente por citometria de fluxo, constitui um meio essencial de diagnóstico da LLC (15). As células da LLC co-expressam o antígeno CD5 das células T, bem como os antígenos de superfície das células B, CD19, CD20 e CD23, e ainda o antígeno FMC7. Comparativamente com as células B normais, as células da LLC expressam níveis baixos de imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM), geralmente apenas uma cadeia é expressa (κ ou λ , nunca ambas) e baixos níveis dos antígenos CD20 e CD79B (4,15,47).

8.3 Aspiração e Biópsia da Medula Óssea

Apesar de não serem métodos indispensáveis para o diagnóstico da LLC, a aspiração e a biópsia da medula óssea são técnicas que permitem observar uma hiperplasticidade, resultante de um número aumentado de linfócitos B maduros. Durante a análise da biópsia podem ser observados três padrões de infiltração da medula óssea: nodular, intersticial ou difuso (Figura 10), sendo o padrão nodular o mais comum e o difuso associado a um estágio mais avançado da doença e, por sua vez, associado a um pior prognóstico. Através da biópsia é possível verificar que existe um número reduzido de células mieloides e eritroides que, em situações não malignas, teriam uma maturação normal (4,15).

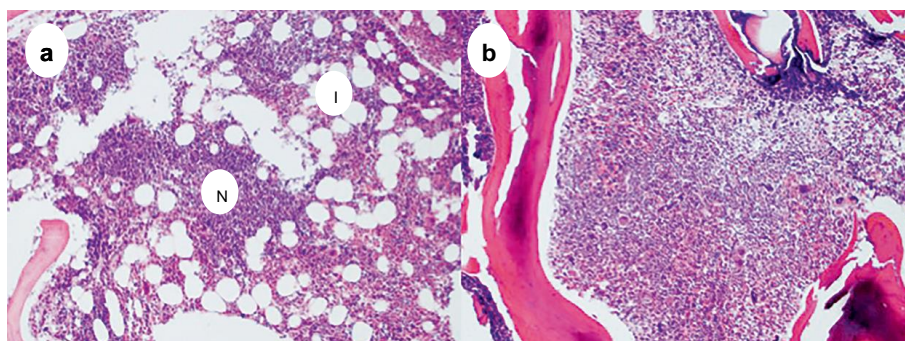


Figura 10 – Biópsias da medula óssea de doentes com LLC. Adaptado de (4)

Nesta figura é possível observar o tecido proveniente de biópsia da medula óssea, mostrando o padrão de infiltração celular da LLC (a) (intersticial – I, ou nodular – N), ou o envolvimento difuso das células medulares malignas da LLC (b) (4).

8.4 Biópsia de Gânglios Linfáticos

Pode ser realizada uma biópsia aos gânglios linfáticos de um doente em que se suspeite da presença de um linfoma linfocítico de pequenas células (SLL), por se tratar de uma doença com características muito semelhantes à LLC (4,15).

A nível histológico, os gânglios linfáticos apresentam uma arquitetura nodal difusa com centros germinativos residuais, parecendo pseudofolículos (Figura 11a), enriquecidos com prolinfócitos e paraimunoblastos (Figura 11b), característicos dos gânglios linfáticos de doentes com LLC e SLL (4).

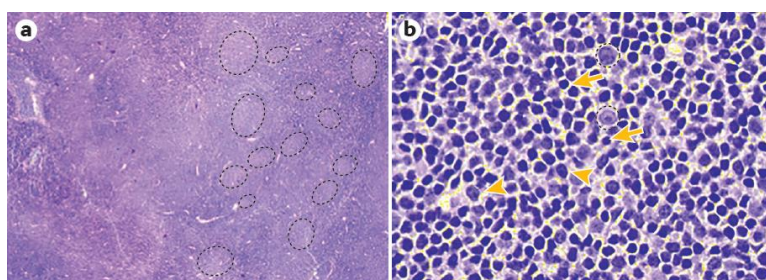


Figura 11 – Biópsia dos gânglios linfáticos de doentes com LLC. Adaptado de (4)
Nesta figura é possível observar uma secção do tecido do gânglio linfático no qual estão presentes os pseudofolículos (a) e, em ampliação (b) os centros proliferativos (setas: prolinfócitos; círculos: paraimunoblastos) (4).

8.5 FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*)

A FISH é um tipo de teste utilizado para analisar o DNA das células, sem ter de recorrer à cultura de células em laboratório. É um método citogénico realizado a partir de amostras de sangue, ou de medula óssea, e permite detetar alterações genéticas, estratificando o risco em doentes diagnosticados com LLC (49,50).

8.6 Exames de Imagem

Os exames de imagem, recorrem a raios-X, campos magnéticos e ondas sonoras, não para diagnosticar a LLC, mas sim para detetar metástases e verificar a extensão do tumor (49).

8.6.1 Tomografia Computorizada (TC)

A tomografia computadorizada consiste num tipo de raio-X que, com a ajuda de um contraste, fornece imagens mais claras dos órgãos e tecidos, permitindo verificar se alguma metástase atingiu outros órgãos, através do aumento do tamanho dos órgãos (49).

8.6.2 Ressonância Magnética

A ressonância magnética providencia imagens detalhadas dos tecidos moles do corpo, recorrendo a ondas de rádio e um campo magnético, em vez de raios X. Este tipo de exame apresenta maior utilidade para verificar se há ou não metástases no cérebro ou na medula espinhal (49).

8.6.3 Ultrassom

O ultrassom utiliza as ondas sonoras para criar uma imagem dos órgãos internos. Pode ser utilizado para analisar os gânglios linfáticos próximos da superfície do corpo, ou para verificar se houve aumento do volume de algum órgão, como o fígado ou baço (49).

8.7 Diagnóstico Diferencial

O diagnóstico de uma LLC é considerado quando, através da análise do sangue periférico, se verifica uma linfocitose absoluta. No entanto, a linfocitose não é um sinal exclusivo da LLC, estando presente noutras condições não neoplásicas, como infeções virais e, também, noutro tipo de neoplasias (como linfocitose monoclonal de células B, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma esplénico da zona marginal, linfoma das células do manto, tricoleucemia). É, por isso, importante realizar um diagnóstico diferencial da LLC, excluindo qualquer outro tipo de patologia, para que a terapêutica possa ser a mais direcionada possível (1,4,15). Esta distinção é realizada tendo por base diversos exames laboratoriais, como a citometria de fluxo e a análise FISH.

A distinção entre a LLC e patologias relacionadas com as células T é facilmente realizada através da imunofenotipagem. O diagnóstico diferencial de LLC e de outras leucemias e linfomas das células B encontra-se resumido na tabela 1 (51).

Tabela 1 – Diagnóstico Diferencial entre a LLC e linfomas das células B. Adaptada de
(51)

Característica	LLC	LCM	LEZM	LF	B-PLL	HCL
Morfologia						
Tamanho da célula	Pequeno	Médio	Pequeno	Muito Pequeno	Médio	Médio/Grande
Nucléolo	Ausente/Pequeno	Ausente/Pequeno	Ausente	Ausente	Proeminente	Ausente
Citoplasma	Escasso	Médio	Pequeno	Escasso	Médio	Abundante
Imunofenotipagem						
CD5	++	++	+	-	-/+	Negativa
CD23	++	-/+	-/+	-/+	-/+	Negativa
Ig de superfície	Fraca	Forte	Forte	Forte	Forte	Forte
FMC7	-/+	++	++	++	++	++
CD79b	Fraca	Forte	Forte	Forte	Forte	Moderada
Ciclina D1	Negativa	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa	Positiva
FISH						
Del13q	Presente	Presente	Presente	Ausente	Presente	Ausente
Del11q (ATM)	Presente	Presente	Presente	Ausente	Presente	Ausente
Trissomia 12	Presente	Rara	Ausente	Rara	Rara	Rara
Del17p (p53)	Rara	Presente	Rara	Ausente/Rara	50%	Ausente
T(11;14)	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	-	-
T(14;18)	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	-	-

LLC: leucemia linfocítica crónica; **LCM:** linfoma das células do manto; **LEZM:** linfoma esplénico da zona marginal; **LF:** linfoma folicular; **B-PLL:** Leucemia prolinfocítica das células B; **HCL:** tricoleucemia ou leucemia *hairy cells*; -: negativo ou positivo em <10% dos casos; -/+ : positivo em 10-25% dos casos; +: positivo em 25-75% dos casos; ++: positivo em >75% dos casos

9 Estadiamento Clínico

Após o diagnóstico da LLC, os doentes são classificados de acordo com dois sistemas de estadiamento, o sistema de Rai e a classificação de Binet. Através desta classificação é possível definir o estadiamento clínico da doença, bem como a terapêutica a instituir. Estes métodos, baseados na avaliação física e nos exames laboratoriais, são muito vantajosos e constituem fortes fatores de prognóstico (1,4,52,53).

9.1 Sistema de Estadiamento de Rai

O sistema modificado de Rai classifica a leucemia em três grupos consoante o grau de risco da doença, em risco baixo, risco intermédio e risco elevado (47,53).

Este sistema de classificação define a doença como sendo de risco baixo em doentes que apresentem linfocitose no sangue periférico e/ou medula óssea, juntamente com células leucémicas. Considerados com risco intermédio, encontram-se os doentes com linfocitose, linfadenopatias, esplenomegalia e/ou hepatomegalia. Por último, os doentes classificados como tendo um risco elevado apresentam anemia, subjacente à LLC, ou trombocitopenia (1,47,48,53,54) (Tabela 2). Originalmente, o sistema de classificação de Rai, incluía a sobrevivência média, a partir do momento do diagnóstico (estadio 0: >150 meses de sobrevivência; estadio I: 101 meses; estadio II: 71 meses; estadio III e IV: 19 meses).

Ao longo do tempo, os doentes tendem a evoluir de um estado de baixo risco, para um risco intermédio e, por fim, para uma condição mais avançada da doença. Por outro lado, se a terapêutica instituída for bem sucedida, o doente tende a evoluir de um risco elevado para uma categoria de menor risco, aumentando as hipóteses de sobrevivência (54).

Tabela 2 – Sistema de Classificação de Rai. Adaptada de (1,48,54)

<i>Risco</i>	Definição
Baixo (estadio 0)	Linfocitose no sangue/medula óssea
Intermédio (estadio I e II)	Linfocitose + linfadenopatias + hepatomegalia
Elevado (estadio III e IV)	Linfocitose + anemia ou trombocitopenia

9.2 Classificação de Binet

A classificação de Binet estabelece três categorias de risco (A, B e C), sendo os doentes classificados de acordo com o número de áreas envolvidas (cervical, axilar e gânglios inguinais, fígado e baço), definidas pela presença de gânglios linfoides aumentados ou organomegalia, e de acordo com a presença de anemia (Hb <10 g/dL) e/ou trombocitopenia (plaquetas <100.000/ μ L) (1,47,52–54).

Assim, a classificação C de Binet é considerada a mais grave e está, por isso, associada a um pior prognóstico, com um tempo de sobrevivência médio de 24 meses, segue-se a classificação B, com um tempo de sobrevivência de 84 meses e, por fim, a classificação A, associada a um melhor prognóstico (Tabela 3) (54).

Tabela 3 – Sistema de Classificação de Binet. Adaptada de (1,48,54)

<i>Risco</i>	Descrição
A	Ausência de anemia (Hb >10 g/dL) ou trombocitopenia (plaquetas >100.000/ μ L) e duas ou menos áreas linfoides envolvidas
B	Ausência de anemia (Hb >10 g/dL) ou trombocitopenia (plaquetas >100.000/ μ L) e três ou mais áreas linfoides envolvidas
C	Presença de anemia (Hb <10 g/dL) e/ou trombocitopenia (plaquetas <100.000/ μ L), independentemente do número de áreas linfoides envolvidas

10 Fatores de Prognóstico

Os sistemas de classificação de Rai e de Binet são bastante utilizados na prática clínica por fornecerem informações cruciais no prognóstico de doentes com LLC. No entanto, muitos doentes classificados como estando num estadio inicial da doença rapidamente evoluem para estadios mais avançados e de pior prognóstico. Por esta razão houve a necessidade de pesquisar novos fatores de prognóstico (1,54,55).

A **percentagem de smudge cells**, considerada um dos primeiros fatores de prognóstico a ser utilizado, é indicativa de um prognóstico favorável, quando na presença de um elevado número destas células (53,56).

O **tempo de duplicação de linfócitos (TDL)** corresponde ao período de tempo requerido para que o número absoluto de linfócitos seja duplicado, refletindo a progressão da doença (51,52,54). Um TDL superior a 12 meses é indicativo de um bom prognóstico, enquanto que um TDL igual ou inferior a 12 meses está associado a um pior prognóstico (54,56).

Através da análise *FISH* é possível identificar diversos fatores de prognóstico relacionados com alterações genéticas, como:

- **Deleção 17p13** – considerada a deleção de maior valor de prognóstico, por estar relacionada com a disfunção da via do gene *TP53* (56). Esta alteração está associada a uma maior resistência à quimioterapia, a recaídas precoces da doença e, por isso, a um pior prognóstico da LLC (1,53,55).
- **Deleção 11q22-q23** – envolve o gene *ATM*. Os doentes apresentam linfadenopatias volumosas e experienciam uma progressão rápida da doença, tendo, assim, uma taxa de sobrevivência reduzida (53,56).
- **Deleção 13q14** – quando isolada, é considerada um fator de prognóstico favorável (53). Os doentes com esta deleção apresentam um prognóstico melhor do que aqueles com um cariótipo normal (55).
- **Trissomia 12** – constitui um fator de prognóstico favorável, associado ao aumento da expressão de CD20, pois em doentes com LLC, pode amplificar as possibilidades terapêuticas com anticorpos anti-CD20 (56).

A **microglobulina-β2** é uma proteína extracelular (53), cujos níveis séricos indicam o estadio da doença, sendo que níveis elevados deste marcador correspondem a um prognóstico fraco (54), associado a linfadenopatia volumosa, estados avançados da doença e redução da taxa de sobrevivência (53,56).

O estado **mutacional do gene *IGH*** constitui um importante fator de prognóstico. Os doentes com LLC que apresentem mutações no gene *IGH*, são classificados com estando no estadio A da classificação de Binet e, por isso, têm um prognóstico favorável (53). Por outro lado, os doentes que não apresentem mutações no gene *IGH*, tendem para estados mais agressivos da doença (30,55,56) e têm maior propensão para a aquisição de alterações citogenéticas de elevado risco (56).

As **mutações no gene *TP53*** são dos fatores de prognóstico mais estudados da LLC e estão, muitas vezes, associadas à presença da deleção 17p (1). Estas mutações têm um valor de prognóstico adverso, o qual resulta de uma perda total de funcionalidade da via *TP53* na célula (56).

A **expressão** da glicoproteína transmembranar **CD38** tem uma influência importante na apoptose celular, promovendo a sobrevivência das células B após a transformação neoplásica. A presença de uma expressão elevada de CD38 está associada a um prognóstico fraco, com reduzidas taxas de resposta à terapêutica e de sobrevivência (30). Este fator de prognóstico tem demonstrado alguma importância na decisão de início da terapêutica (53).

ZAP-70 trata-se de uma tirosina cinase citoplasmática normalmente expressa nas células NK e T (30,54,56), mas não nas células B (53). No entanto, detetou-se a expressão desta proteína em algumas células B de doentes com LLC (30,54,56), estando a sua expressão associada a um pior prognóstico da doença (30).

Alguns fatores de prognóstico ainda não têm o seu valor clínico bem estabelecido. Assim, existem algumas mutações genéticas que parecem ter alguma relevância na doença refratária, são elas as mutações nos genes ***NOTCH1***, ***BIRC3*** e ***SF3B1*** (1). Mutações a nível do gene *NOTCH1* têm como consequência um aumento da resistência à apoptose e, por isso, estão associadas a um mau prognóstico. Estas mutações encontram-se frequentemente associadas à variante não mutada do gene *IGH*, o que contribui para uma rápida progressão da doença. Por outro lado, mutações no gene *BIRC3*, um regulador negativo da via de sinalização do NF-κB, levam à ativação desta mesma via, no entanto, o seu valor de prognóstico ainda não se encontra bem estabelecido. Por fim, mutações no gene *SF3B1* estão associadas a um mau prognóstico, com respostas reduzidas à quimioterapia, progressão rápida da doença e taxas de sobrevivência mais baixas (30).

Assim, os fatores de prognóstico constituem ferramentas importantes para que se consiga uma maior assertividade na previsão da resposta às terapêuticas, da duração da resposta e da decisão de iniciar a terapêutica (30).

11 Terapêutica

11.1 Controlo da Doença Assintomática e Início da Terapêutica

Nos doentes recentemente diagnosticados com LLC, que apresentam a doença num estadio inicial (estadio 0 de Rai, ou A de Binet) (47) e que permanecem assintomáticos, os cuidados iniciais passam pela observação e não pelo tratamento imediato. Este facto é confirmado por diversos estudos, que não observaram benefícios no início imediato da terapia, devendo o doente ser monitorizado, realizando exames a cada 3-4 meses, para avaliar o prognóstico da doença (48,57).

A decisão de iniciar a terapêutica depende do estadio em que a doença se encontra. Assim, doentes de elevado risco (estadio III e IV de Rai, ou C de Binet) e de risco intermédio (estadio I e II de Rai, ou estadio B de Binet), beneficiam se iniciarem imediatamente a terapêutica (47,48,58). No entanto, doentes de risco intermédio podem não iniciar imediatamente a terapêutica, tendo de ser monitorizados (47). Deste modo, o início da terapêutica é recomendado a todos os doentes com LLC que preencham um ou mais dos seguintes critérios (58):

- Sintomatologia relacionada com a LLC (fadiga severa, perda de peso significativa, suores noturnos, febre sem presença de infeção);
- Perda de função de órgãos, em consequência da LLC;
- Aumento do volume do baço (>6 cm) ou dos gânglios linfáticos (>10 cm);
- Anemia ou trombocitopenia progressivas e/ou sintomáticas;
- Citopenias autoimunes.

As indicações para terapêutica encontram-se resumidas na tabela 4 (1).

Tabela 4 – Indicação para Terapêutica. Adaptada de (1)

Estadio	Gestão da doença
Estadio Inicial (0 de Rai, A de Binet)	Monitorizar sem iniciar terapêutica, até progressão da doença
Estadio Intermédio (I ou II de Rai, B de Binet)	Monitorizar até doença ativa, ou iniciar terapêutica
Estadio Avançado (III de Rai, C de Binet)	Início imediato de terapêutica

11.2 Critérios de Resposta à Terapêutica

Os critérios de resposta à terapêutica devem ter em conta um exame físico, bem como os resultados de exames realizados ao sangue e à medula óssea (52). Assim, podem dividir-se em diferentes categorias: remissão completa (RC), remissão parcial (RP), doença em progressão (DP), doença estabilizada, doença refratária e doença residual mínima (47,52).

A **RC** requer a ausência total da doença a nível clínico, pelo menos 2 meses depois de completar o tratamento, enquanto que a **RP** requer a redução de 50% ou mais da carga da doença, sendo detetável a nível clínico. Por outro lado, a **doença em progressão** é definida como um aumento de 50% ou mais da carga da doença. Contrariamente, doentes que não atingiram a remissão completa ou a doença progressiva, são caracterizados como tendo a **doença estabilizada**. Além destas situações, existe ainda a **doença refratária**, definida como resultado de um tratamento fracassado ou resultado da progressão da doença nos 6 meses seguintes ao último tratamento e, por fim, a **doença residual mínima** (1,47,52). Na tabela 5 encontram-se resumidos os critérios de resposta à terapêutica.

Tabela 5 – Critérios de Resposta à Terapêutica. Adaptada de (1,52)

<i>Critérios</i>	RC	RP	DP
Grupo A			
Linfoadenopatias	< 1.5 cm	Redução ≥ 50%	Aumento ≥ 50%
Hepatoesplenomegalia	Não	Redução ≥ 50%	Aumento ≥ 50%
Contagem de linfócitos	< 4000/ μ L	Redução ≥ 50%	Aumento ≥ 50%
Medula Óssea	Normocelular, linfócitos < 30%	Redução 50% na medula	
Grupo B			
Contagem de Plaquetas	> 100 000/ μ L	> 100 000/ μ L ou > 50% em relação ao valor inicial	Redução ≥ 50% em relação ao valor inicial
Hemoglobina	> 11.0 g/dL	> 11.0 g/dL ou > 50% em relação ao valor inicial	Redução ≥ 50% em relação ao valor inicial
Neutrófilos	> 1500/ μ L	> 1500/ μ L ou > 50% em relação ao valor inicial	

Grupo A: define a carga tumoral; **Grupo B:** define a função do sistema hematopoiético; **RC (Remissão Completa):** todos os critérios têm de se verificar e os doentes não podem apresentar sintomas relacionados com a doença; **RP (Remissão Parcial):** têm de se verificar, pelo menos, 2 critérios do grupo A e 1 critério do grupo B; **PD (Doença em Progressão):** pelo menos 1 critério do grupo A ou do grupo B

11.3 Agentes Utilizados na Terapêutica da LLC

Os agentes utilizados no tratamento da LLC incluem não só a quimioterapia e quimioimunoterapia como, também, pequenas moléculas que têm como alvo cascatas de sinalização com elevada importância no crescimento e sobrevivência das células da LLC (Figura 12). Assim, de seguida, são apresentados os agentes mais utilizados na terapêutica da LLC.

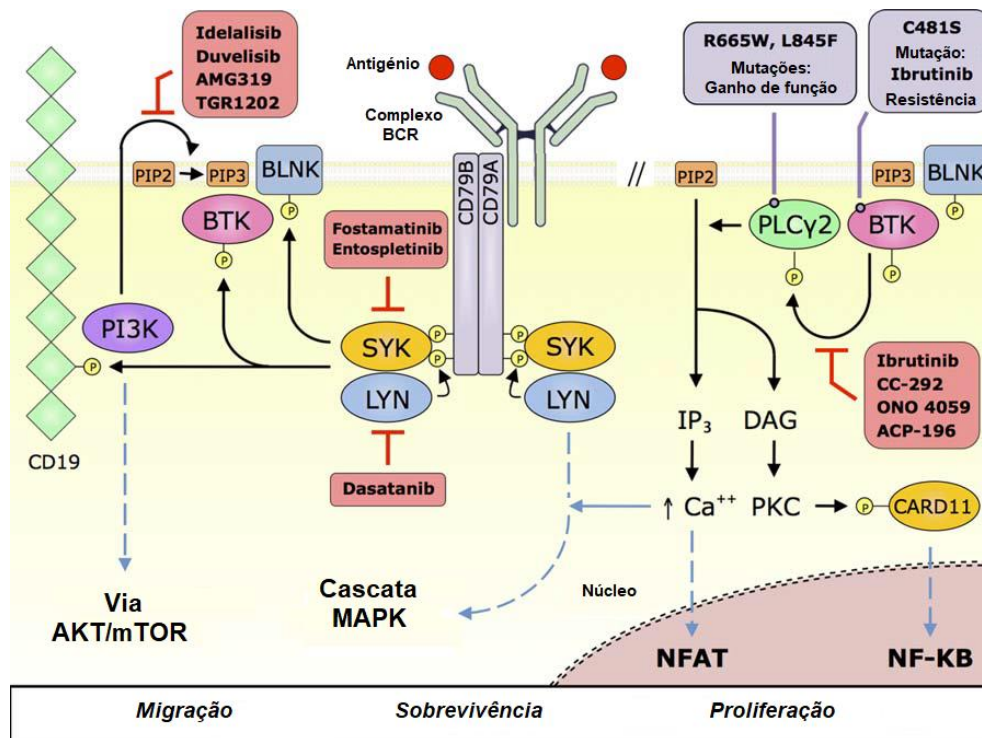


Figura 12 – Via de sinalização do BCR, possíveis alvos terapêuticos. Adaptado de (59) Observam-se os componentes do BCR, incluindo CD79a, CD79b, o coreceptor CD19, bem como outros componentes intracelulares da cascata de sinalização do BCR, potenciais alvos terapêuticos. Estes incluem as cinases Lyn, Syk, BLNK, BTK, PLC γ 2, PI3K, PKC β e a proteína 11, contendo a caspase CARD11. As vias a jusante medeiam a sobrevivência, proliferação e migração das células e, incluem a proteína cinase B (AKT), mTOR, o fator nuclear das células T ativadas (NFAT), as proteínas MAPK e o NF-K β (59).

11.3.1 Agentes Citostáticos

Os **agentes alquilantes** foram utilizados como terapia de primeira linha na LLC, durante muitos anos, sendo o **clorambucil** considerado como o *gold standard* da LLC, em monoterapia (47,60,61). No entanto, atualmente a sua utilização encontra-se restrita a doentes idosos debilitados ou incapacitados, devido à sua reduzida taxa de

remissão completa e a alguns efeitos secundários, como citopenias prolongadas, mielodisplasia e leucemia aguda secundária (61), apesar disto o clorambucil é um agente citostático com baixa toxicidade. Estes fármacos atuam por causarem danos no DNA das células malignas.

Os agentes **análogos de purina**, atuam por inibição da síntese do DNA, sendo a **fludarabina**, a pentostatina e a cladribina os mais utilizados na terapêutica da LLC (61,62). A fludarabina é o análogo de purina mais estudado e, em monoterapia, produz respostas superiores aos agentes alquilantes e corticosteroides, com taxas de remissão completa superiores (47,60,61). O tratamento de primeira linha com fludarabina deverá ser iniciado em doentes com doença avançada, ou estadio de Rai I/II, quando o doente tem sintomas relacionados com a doença ou evidência de doença progressiva (62).

Mais recentemente, surgiu a **bendamustina**, um fármaco antitumoral alquilante, cujo efeito antineoplásico reside na capacidade de ligação às cadeias de DNA, por alquilação, resultando no bloqueio da síntese e reparação do DNA. O tratamento de primeira linha da LLC é indicado em doentes em que a quimioterapia em associação com a fludarabina não é adequada (63). No entanto, apesar de fornecer melhores respostas terapêuticas, tem maior toxicidade (47,60,61).

11.3.2 Anticorpos Monoclonais

A terapêutica com anticorpos monoclonais tem por base os antígenos CD20 expressos na superfície da maioria das células B malignas. Assim, como terapêutica da LLC, podem ser usados em monoterapia ou terapêutica combinada, anticorpos anti-CD20.

Estes anticorpos induzem lise celular através de uma toxicidade dependente do complemento, mas também através de citotoxicidade celular dependente dos anticorpos e fagocitose celular dependente dos anticorpos (64).

O **rituximab**, anticorpo anti-CD20, é menos eficaz quando utilizado como agente simples, exceto sejam utilizadas doses muito elevadas. No entanto, quando combinado com a quimioterapia, constitui uma terapia eficaz no combate à LLC (47,60,65).

O **ofatumumab** é um anticorpo humanizado com especificidade para um epítipo expresso no antígeno de superfície CD20, diferente do epítipo do rituximab, aumentando a afinidade de ligação ao CD20, a taxa de dissociação e apoptose

celular, como consequência de uma atividade citotóxica celular aumentada. Este anticorpo induz a lise celular através de uma citotoxicidade dependente do complemento, mas também através da citotoxicidade dependente do anticorpo e da fagocitose dependente do anticorpo (47,60).

Para além dos anticorpos já referidos, o anticorpo **alemtuzumab**, anticorpo anti-CD52, é utilizado na terapêutica de estadios avançados de LLC, em estadios de elevado risco, como deleções no cromossoma 11 ou 17 e, ainda, nas mutações do gene *TP53*, bem como na LLC refratária ou em recidivas. No entanto, este anticorpo monoclonal está associado a uma elevada toxicidade que pode originar imunossupressão. Por este motivo a terapêutica com este anticorpo está reservada para doentes de elevado risco e com mau prognóstico (47,60,65).

Encontra-se em fase de ensaios clínicos um novo anticorpo monoclonal CD20 – **obinutuzumab** - (66), que mostrou excelentes resultados *in vitro* com elevadas taxas de apoptose de células B malignas (47,60). Obinutuzumab é o primeiro anticorpo monoclonal tipo II humanizado em fase de ensaios clínicos, demonstrando, até à data, perfil de segurança semelhante ao rituximab (65,66). Este anticorpo causa morte celular por agregação das células B malignas através dos anticorpos, sem envolvimento das células imunes efectoras (67)

11.3.3 Inibidores das Cinases

Os fármacos inibidores das cinases bloqueiam enzimas específicas na via de sinalização do BCR (68), constituindo assim, um alvo terapêutico, uma vez que o recetor BCR é de elevada importância na sobrevivência das células da LLC (47). A sinalização do recetor BCR é suportada por diversas tirosinas cinases, entre elas a BTK, Syk, ZAP-70, Lyn e, ainda, a PI3K (47,61) (Figura 12).

As **cinases Lyn e Syk**, têm alguns efeitos na sinalização do BCR. A Lyn tem efeitos positivos e inibitórios na sinalização do BCR. Na LLC, esta cinase é sobreexpressa, estando a sua sobreexpressão associada a um aumento da sobrevivência celular da LLC. Da mesma forma, a Syk encontra-se sobreexpressa na LLC e, por isso, a sua inibição resulta em apoptose celular (59).

O **dasatinib**, inibe a atividade da cinase Abl, cinases da família Src (incluindo a Lyn) entre outras cinases, induzindo apoptose nas células da LLC (69). Para além disso, o dasatinib aumenta o efeito apoptótico de vários agentes como a fludarabina, o clorambucil, a dexametasona, entre outros (47,59). Este fármaco reduz o número

de células malignas, no entanto apresenta uma eficácia reduzida nos linfócitos do sangue periférico (47).

O **fostamatinib**, inibidor da Syk, induz apoptose através da desregulação da via de sinalização do BCR (47). Num ensaio clínico de fase II, este fármaco demonstra ser bem tolerado, com resultados satisfatórios na redução do tumor (26,47).

A **cinase PI3K** é responsável pela proliferação, diferenciação e sobrevivência das células B (59). Desta forma, o **idelalisib** constitui um inibidor da subunidade catalítica p110 (preferencialmente exposta em células B) da PI3K, promovendo a apoptose celular nas células da LLC (68) de forma tempo e dose-dependente, sem induzir apoptose nas células T saudáveis e NK e sem diminuir citotoxicidade celular dependente de anticorpos (47,61). Para além disso, o idelalisib reduz os sinais de sobrevivência derivados do BCR ou das *nurse-like cells*, inibe, ainda, a ativação de AKT e da cinase MAP (ERK) (61) e inibe a ecotaxis e a retenção das células B malignas no microambiente tumoral, incluindo os tecidos linfóides e a medula óssea (70). Diversos estudos evidenciam que a combinação de idelalisib com rituximab está associada a uma taxa de resposta de 97%, tendo um perfil de toxicidade aceitável no tratamento da LLC refratária ou recidivas (59).

A **cinase BTK** desempenha um papel crítico na sinalização do BCR, é responsável pelo desenvolvimento, maturação, proliferação e diferenciação de células B malignas, estando sobreexpressa na LLC (59,71). O **ibrutinib** é um inibidor da BTK, responsável por induzir citotoxicidade celular dose e tempo dependente (59), causando apoptose celular (47), bem como redução do tamanho dos gânglios linfáticos (72). Em doentes com LLC o ibrutinib induz linfocitose assintomática, nas primeiras semanas de tratamento, devido a uma redistribuição das células da LLC no sangue periférico (25,73). Como agente único, é indicado para o tratamento de doentes adultos com LLC não tratados previamente (73).

11.3.4 Corticoesteróides

Como consequência da terapêutica utilizada na LLC surge frequentemente mielossupressão, associada à elevada toxicidade hematológica do tratamento, causando uma mortalidade e morbilidade significativas, principalmente em doentes idosos.

A metilprednisolona, quando utilizada em elevadas doses, tem atividade na LLC por induzir apoptose das células malignas, principalmente na presença das *nurse-like*

cells. Quando utilizada em monoterapia, a metilprednisolona, não induz remissões completas, no entanto, quando associada ao rituximab, produz um efeito sinérgico induzindo apoptose celular. Esta combinação está associada a um risco baixo de mielossupressão, tendo atingido taxas de resposta de 96% e remissões completas de 32% (74).

11.4 Radioterapia

A radioterapia utiliza radiação de elevada energia para eliminar células cancerígenas. Geralmente não é utilizada como tratamento de primeira linha em doentes com LLC, mas sim para tratar sintomas causados pelo aumento do volume de órgãos (como o baço) (75). Consiste num tratamento localizado, que incide diretamente nas células malignas, danificando o DNA e provocando apoptose celular, na área irradiada (76).

A irradiação do baço consiste num tratamento paliativo para a esplenomegalia sintomática secundária à LLC (77,78). Os resultados desta terapêutica incidem na redução do tamanho do baço, bem como numa melhoria das citopenias (77). A radioterapia é utilizada na esplenomegalia devido à sua baixa toxicidade e fácil aplicabilidade (78).

11.5 Combinações usando Quimioterapia

A terapêutica da LLC verificou uma grande melhoria dos seus resultados após a utilização de combinações de diferentes modalidades de tratamento (60,61).

Os análogos de purina e os agentes alquilantes têm mecanismos de ação e perfis de toxicidade diferentes e, por isso, são os agentes mais combinados em quimioterapia. A combinação da **fludarabina** com a **ciclofosfamida** é a combinação mais utilizada na terapêutica da LLC, produzindo uma melhoria na taxa de resposta, isto quando comparado com estes agentes isolados (79). Estes agentes, quando utilizados em simultâneo produzem efeitos sinérgicos, aumentando a taxa de remissão completa para 50% (60,61). Apesar de produzir respostas superiores, um estudo verificou que havia maior incidência de neutropenias quando se utiliza a fludarabina combinada com a ciclofosfamida (60,61,79). A fludarabina juntamente com a ciclofosfamida não é recomendada a doentes com a deleção 17p, porque estes doentes não respondem a esta terapêutica (79).

11.6 Quimioimunoterapia

11.6.1 Combinações usando Rituximab

A baixa expressão do antígeno CD20 nas células B da LLC, bem como a reduzida taxa de resposta às terapêuticas com uma dose *standard* de rituximab, levou à suposição de que este anticorpo poderia não ter benefícios clínicos suficientes na LLC, apesar de, em doses elevadas de rituximab e em monoterapia, melhorar as taxas de resposta (80).

Diversos ensaios clínicos investigam a combinação do **rituximab** com a **fludarabina** ou com regimes baseados em fludarabina, tendo já evidência de efeito sinérgico entre estas combinações (61), bem como uma melhoria nas taxas de remissão completa, na sobrevivência e na resposta global (60).

Quando a **fludarabina** e a **ciclofosfamida** são combinadas com o **rituximab (FCR)** as taxas de resposta global sobem para 95% e a de remissão completa para 70%. No entanto, este regime é mais tóxico para doentes com mais de 65 anos, limitando a sua utilização a doentes mais novos, com uma função renal adequada (81). Pelo facto de a LLC surgir, normalmente, em doentes com mais idade, com comorbilidades, sugeriu-se um regime em que se reduz a dose dos dois agentes citostáticos (fludarabina-ciclofosfamida) e se aumenta a dose do rituximab, mantendo a eficácia do tratamento, mas reduzindo a sua toxicidade (60,61). Este regime teve uma taxa de remissão completa de 77% e uma taxa de resposta geral de 100% (60). O tratamento da LLC com FCR demonstra resultados muito satisfatórios em doentes com o gene *IGH* mutado, deleção 13q e com trissomia 12 (61).

Estudos recentes sugerem também, a combinação do **rituximab** com a **bendamustina**, principalmente em doentes com LLC refratária, apresentando uma taxa de resposta de 59% (60). Este regime terapêutico também foi estudado como terapêutica de primeira linha para doentes com LLC, entre 34-78 anos, apresentando uma taxa de resposta de 88% e uma taxa de remissão completa de 23,1% (60,61). Estes resultados sugerem que, em comparação com o regime FCR, a bendamustina + rituximab é menos ativa, produzindo taxas de remissão completa mais baixas (60). Assim sendo, o regime terapêutico FCR continua a ser a terapêutica *standard* nos doentes com LLC (61).

11.6.2 Combinações usando Alemtuzumab

A atividade sinérgica da **fludarabina** e do **alemtuzumab** foi sugerida pela indução de remissões completas em doentes com LLC refratária, para cada agente isolado (60,61). Este regime terapêutico apresentou taxas de resposta de 83%, com remissões completas em 30% dos casos (60), sendo uma terapia bem tolerada. As infecções são pouco frequentes, tendo em conta o efeito imunodepressor de ambos os agentes (82), tendo por isso melhores resultados, isto quando comparado com os agentes isolados.

Alguns ensaios clínicos testaram a combinação da **fludarabina-ciclofosfamida** com o **alemtuzumab (FCA)**, na terapêutica de primeira linha, tendo sido terminados prematuramente devido à maior toxicidade e mortalidade, isto quando comparado com o regime com FCR (60,61).

A combinação do **alemtuzumab** com **rituximab** também foi estudada em doentes com LLC refratária, tendo atingido uma taxa de resposta de 52%. No entanto, estes resultados precisam de ser confirmados por ensaios de maiores dimensões (60).

11.6.3 Combinações usando Ofatumumab

O tratamento de pessoas idosas, com comorbilidades, está a sofrer alterações, visto estes doentes não tolerarem terapêuticas tóxicas, como os análogos de purina. Deste modo, diversos estudos avaliam a possibilidade de combinação do **ofatumumab** com o **clorambucil**, em comparação com o clorambucil em monoterapia. Verificou-se um aumento da sobrevivência dos doentes com LLC, com esta combinação, sem aumentar os efeitos tóxicos (64).

11.7 Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas

A elegibilidade para o transplante de células estaminais hematopoiéticas (TCEH) deve ser feita com base numa avaliação risco-benefício, estando este reservado para doentes com doença avançada, sintomática ou doença progressiva (83,84).

O transplante alogénico, de um dador compatível, é o único com possibilidade de cura, sendo o tratamento indicado para doentes jovens que não respondem à terapêutica ou têm recaídas muito precocemente (85). O TCEH mieoloablativo tem como vantagem a erradicação da doença, havendo, no entanto, há possibilidade de

rejeição do transplante. No TCEH não-mieloablativo, a redução da intensidade do transplante apresenta a vantagem de diminuição da mortalidade e morbidade, comparado com o anterior, no entanto mantém a possibilidade de rejeição do transplante. Este último tem sido utilizado em doentes mais idosos (84,85).

O transplante autólogo, ou autotransplante, pode prolongar a sobrevivência sem progressão da doença, mas não a sobrevivência no geral. Segundo diversos ensaios clínicos, o motivo é a redução da qualidade de vida dos doentes e, por isso, a quimioimunoterapia mantém-se a terapêutica de primeira linha para doentes não tratados com LLC (85).

11.8 *Guidelines* Terapêuticas

Em doentes **sem mutações/deleções no gene TP53**, mas com comorbidades associadas ou em doentes com idade ≥ 65 anos as opções terapêuticas de predileção na LLC são: o obinutuzumab + clorambucil, ibrutinib e ofatumumab + clorambucil (86).

Em doentes fisicamente bem, com uma função renal normal, **sem mutações/deleções no gene TP53** e com **idade < 65 anos**, a terapêutica de primeira linha é a quimioimunoterapia com FCR. Combinações baseadas em diferentes análogos de purina (cladribina ou pentostatina), bem como fludarabina + rituximab, ou bendamustina combinada ou não com o rituximab, podem ser alternativas para a quimioimunoterapia (48,86). Por outro lado, em doentes fisicamente bem, sem comorbidades significativas, **sem mutações/deleções no gene TP53**, mas com **idade ≥ 65 anos**, a terapêutica com FCR está associada a infeções graves. Por isso, a bendamustina combinada ou não com o rituximab é a terapêutica de eleição para estes doentes, caso sejam elegíveis para quimioimunoterapia. Obinutuzumab + clorambucil é a alternativa terapêutica para estes doentes (48,58,86) (Figura 13).

Doentes **com mutações/deleções no gene TP53** apresentam um prognóstico fraco e, como tal, a opção terapêutica de primeira-linha é o ibrutinib (46,83). Caso estes doentes tenham contra-indicações para o ibrutinib as alternativas terapêuticas são: elevada dose de metilprednisolona + rituximab, obinutuzumab + clorambucil e o alemtuzumab com ou sem rituximab (58,86). Aos doentes que respondam a terapêutica com ibrutinib, deve ser considerado um TCEH alogénico, se tiverem um cariótipo com mais de 5 alterações genéticas (86) (Figura 13).

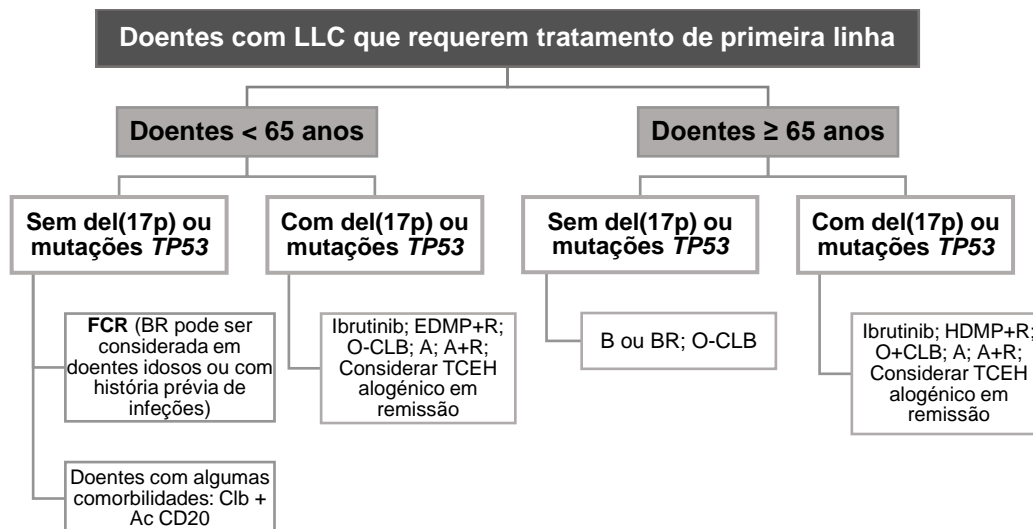


Figura 13 – Algoritmo para seleção da terapêutica de primeira linha na LLC. Adaptado de (48,58,86)

Tratamento de primeira-linha na LLC. FCR: fludarabina+ciclofosfamida+rituximab; B: bendamustina; BR: bendamustina+rituximab; EDMP: elevada dose de metilprednisolona; O-CLB: obinutuzumab+clorambucil; A: alemtuzumab; AR: alemtuzumab+rituximab. Ac CD20: anticorpo anti-CD20.

11.9 Tratamento da Doença Refratária e Recidivas

Muitos doentes com LLC submetidos a quimioimunoterapia têm uma resposta inicial total ou parcial, no entanto, com exceção dos doentes tratados com TCEH alogénico, surge uma recidiva da doença após o fim do tratamento (87).

As opções terapêuticas para a doença refratária e recidivas incluem: ibrutinib, venetoclax, idelalisib + rituximab e idelalisib (86) (Figura 14). Doentes que não respondam a qualquer uma destas terapêuticas devem submetidos a um TCEH alogénico (48).

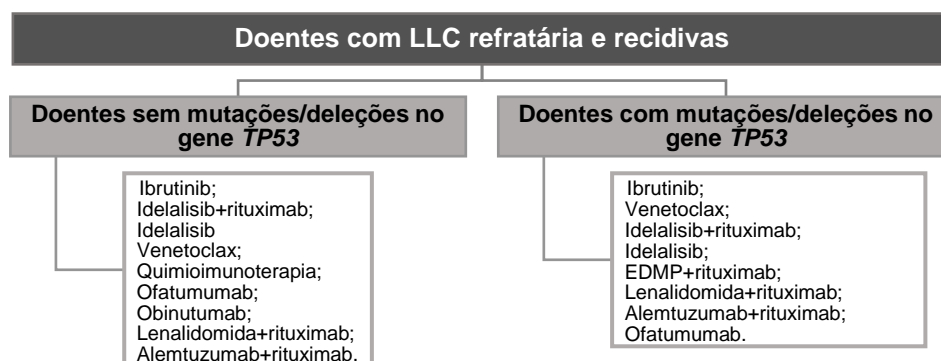


Figura 14 – Algoritmo da terapêutica da LLC refratária/recidivas. Adaptado de (46,84)
EDMP: elevada dose de metilprednisolona.

11.10 Significado Clínico da Doença Residual Mínima (DRM)

A doença residual mínima é definida pelos doentes que, apesar de atingirem remissões completas ou parciais, apresentam, muitas vezes, uma doença persistente que permanece indetetável (88), considerando-se a ausência de doença residual mínima quando se está na presença de 1 célula maligna ou menos em cada 10.000 linfócitos detetados através de PCR ou por citometria de fluxo (1,89).

A ausência de doença residual mínima tem vindo a demonstrar alguma importância e utilidade, principalmente como fator de predição de sobrevivência sem progressão da doença e sobrevivência geral, principalmente após terapêutica com FCR ou alemtuzumab (1).

11.11 Terapêutica de suporte da LLC

Os doentes com LLC apresentam um risco aumentado de infeções em consequência da progressão da doença ou dos efeitos imunodepressivos inerentes à terapêutica. Nos doentes com infeções frequentes e severas é recomendado o tratamento profilático com imunoglobulinas (1). Por outro lado, doentes com elevado risco de desenvolver infeções devem fazer profilaxia com antibióticos e antivirais (48). Doentes que estejam numa fase inicial da doença devem ser vacinados, principalmente para pneumococos e influenza (1,48)

As complicações autoimunes são muito comuns nos doentes com LLC, sendo a mais comum a anemia hemolítica. A maioria dos doentes com citopenias autoimunes respondem a terapêutica com corticosteroides; para os que não respondem, é recomendada a terapêutica com rituximab, antes de realizar uma esplenectomia (48).

Para além disto, o risco de adquirir neoplasias secundárias (como melanoma, sarcoma, cancro do pulmão, entre outros) é muito maior nestes doentes (1). Deste modo, os doentes com LLC têm de ser monitorizados e realizar exames a cada 3-12 meses, dependendo da evolução da LLC (48).

12 Terapêuticas Emergentes

12.1 Agentes Imunomoduladores: Lenalidomida

A lenalidomida é um análogo de segunda geração da talidomida, com significativa atividade em doentes com LLC refratária/recidivas (48,90). Esta molécula apresenta propriedades citotóxicas, anti-angiogénicas e imunomodulatórias (90).

Na LLC, a sua principal função é modular as interações entre as células da LLC e o meio ambiente, interferindo com a sobrevivência das células da LLC (91); a lenalidomida promove a adesão das células da LLC às NLC, aumentando a sua fagocitose. Aumenta ainda, o reconhecimento imunológico das células da LLC, bem como a reconstituição do sistema imunitário no geral (90,91).

Diversos ensaios clínicos demonstraram uma elevada toxicidade da lenalidomida, quando usada em monoterapia, causando, principalmente, mioelossupressão, neutropenia e trombocitopenia (90,91). Deste modo, tentou-se associar a lenalidomida ao rituximab, sendo que ensaios pré-clínicos mostraram tolerabilidade e reações menos graves do que a lenalidomida em monoterapia (48). A combinação da lenalidomida com rituximab e fludarabina também está a ser investigada, num ensaio clínico de fase I/II (90). Até à data os doentes incluídos neste ensaio demonstraram uma melhoria na resposta, atingindo uma remissão completa (90). O anticorpo monoclonal ofatumumab também foi combinado com a lenalidomida, em ensaios clínicos de fase I/II, demonstrando uma melhoria dos resultados com a administração concomitante de ofatumumab (91).

12.2 Terapêutica de Células T com Recetores de Antígenos Quiméricos

Os recetores de antígenos quiméricos (CAR) combinam a capacidade de reconhecimento de antígenos dos anticorpos com a capacidade de sinalização celular de uma proteína quimérica (60) e têm sido a mais recente alternativa ao TCEH alogénico (83). Os CAR consistem em células (geralmente células T) que são geneticamente modificadas, sendo-lhes adicionadas propriedades, como produção de citocinas, sinais inibitórios, entre outras (92).

A adição do domínio CD19 ao CAR das células T demonstrou resultados clínicos excelentes na LLC refratária/recidivas, induzindo remissões completas nestes doentes (93).

Assim, no futuro, a terapêutica das células T com CAR pode ser utilizada em substituição do TCEH, tendo como vantagens a diminuição do risco de recidivas e a ausência de necessidade de realizar imunossupressão a longo prazo. Sendo a idade média de diagnóstico da LLC entre os 67 e 72 anos, muitos doentes não são elegíveis para realizar um TCEH, por serem doentes de elevado risco; estes doentes, no futuro, podem ser candidatos à terapêutica com as células T com CAR (83).

12.3 Agentes Inibidores do *Checkpoint* Imunológico

Os pontos de controlo imunológico fornecem sinais estimulantes ou inibitórios, para células T ou outras células efetoras imunológicas, regulando assim o sistema imunológico. As células malignas, têm a capacidade de destruir o sistema imunológico, através da inibição das células T, surgindo a necessidade de desenvolver inibidores imunológicos para tratar a LLC (4).

A via PD-1/PD-L1 pertence à via de sinalização do *checkpoint* imunológico envolvido na supressão e ativação celular imunitária (4,94), sendo que as células da LLC expressam elevados níveis de PD-L1 (95), enquanto que as células T expressam PD-1 (94) . A ligação de PD-1 a PD-L1 ou PD-L2 resulta na ativação de cinases inibitórias, que estão envolvidas na proliferação de células T, adesão e produção de citocinas. Assim, a via de sinalização PD-1/PD-L1 limita a resposta inicial das células T, regulando negativamente a resposta às células T (4,94).

Deste modo, surge uma nova estratégia terapêutica, através de agentes inibidores, como anticorpos monoclonais, da via de sinalização PD-1/PD-L1, que restauram a atividade das células T, contra as células B malignas na LLC. Diversos ensaios clínicos decorrem para investigar a possibilidade de utilização do durvalumab e do atezolizumab (anticorpos monoclonais anti-PD-1) no tratamento de tumores hematológicos, como a LLC, tendo até agora resultados bastante satisfatórios, com um aumento da taxa de sobrevivência e sendo bastante toleráveis (94).

12.4 Inibidores da BTK de Segunda Geração

Nos inibidores da BTK de primeira geração, como o ibrutinib, as respostas completas são relativamente raras e muitos doentes desenvolvem resistências (48,96).

Deste modo, o acalabrutinib surge como um inibidor da BTK de segunda geração, mais seletivo e mais tolerável, não sendo observados sangramentos e fibrilação arterial, efeitos tóxicos característicos da terapêutica com ibrutinib (97). Um ensaio de fase I/II demonstrou a eficácia do acalabrutinib na LLC sem tratamento prévio, bem como na LLC refratária/recidivas. Mesmo em doentes de elevado risco, o novo inibidor da BTK mostra resultados satisfatórios, com uma taxa de resposta de 95% (48).

Está ainda, a ser desenvolvido outro inibidor de segunda geração da BTK, ONO/GS-20459, que induz apoptose celular em concentrações nanomolares. Até à data, este novo inibidor demonstrou uma eficácia e tolerabilidade promissoras (98).

12.5 Inibidores da BCL-2: Venetoclax

O venetoclax é um inibidor altamente seletivo da BCL-2, desenvolvido após uma alteração estrutural dos inibidores da BCL-2 da geração anterior (68,99). Um ensaio de fase I conduzido em doentes de elevado risco, com LLC refratária, obteve taxas de resposta de 79%, induzindo remissões completas, sem doença residual mínima. Estes resultados foram observados mesmo em doentes com mais de 86 anos e com características geralmente associadas a um prognóstico fraco (99).

Um dos efeitos tóxicos mais observados neste agente foi a neutropenia, desenvolvida em 41% dos doentes, durante a realização do ensaio (68,99).

A utilização desta molécula em monoterapia, na LLC, ainda está sob investigação, assim como a sua utilização em associação com o obinutuzumab (68). Até à data, o venetoclax demonstrou atividade antitumoral nos doentes com LLC refratária, incluindo aqueles com mau prognóstico, apresentando respostas completas com maior durabilidade (99).

12.6 Inibidores da PI3K de segunda geração

A PI3K é uma componente chave na via de sinalização do BCR, no entanto, diversos estudos verificaram que a terapêutica da LLC refratária com o idelalisib (em combinação com o rituximab) estava associada a alguns efeitos adversos, como hepatite, colite e pneumonia (58).

Deste modo, surgiu a necessidade de desenvolver um inibidor de segunda geração da PI3K – TGR-1202 – cuja eficácia está a ser estudada, no tratamento da LLC refratária. Até ao momento, a taxa de resposta obtida foi de 94% e com efeitos tóxicos mais leves do que os causados pelo idelalisib (58).

13 Conclusões e Perspetivas

Nos últimos anos a informação sobre a LLC sofreu grandes avanços, não só em termos de fisiopatologia, mas também em novas abordagens terapêuticas.

Numa visão geral da doença, são muitos os possíveis mecanismos fisiopatológicos da LLC. Por outro lado, a progressão da doença depende não só das alterações genéticas, mas também do balanço entre a apoptose e a proliferação celular, bem como dos sinais de sobrevivência mediados pelo BCR.

A LLC apresenta-se como uma doença bastante heterogénea, tendo um curso variável, que depende caso a caso. Muitos doentes mostram-se assintomáticos, enquanto que outros apresentam sintomas, caracterizando-se por um curso clínico mais agressivo e progressivo. Alguns sintomas apresentados pelos doentes são, muitas vezes, complicações associadas às terapêuticas instituídas, como as citopenias autoimunes, síndrome de Richter e infeções. Pelo facto de se tratar de uma doença de progressão variável, torna-se difícil determinar o momento ideal para iniciar o tratamento, pelo que é importante identificar os fatores de prognóstico. Estes ajudam não só a determinar o estadió da doença, como também ajudam na indicação de início da terapêutica.

As classificações de Binet e de Rai são sistemas de estadiamento clínico, que definem o estadió clínico da doença, bem como a terapêutica mais adequada a instituir. No entanto, e apesar de ainda hoje serem muitos utilizados na prática clínica, apresentam algumas limitações e, como tal, surgiu a necessidade de pesquisar novos marcadores de prognóstico, tais como o estado mutacional do gene *IGH*, as alterações genéticas (*del(17p13)*, *del(11q22-23)*, *del(13q14)* e trissomia 12) e a expressão de CD38, bem como de ZAP-70.

A presença de trissomia 12 ou da *del(13q14)* estão associadas a um prognóstico favorável. Por outro lado, a presença de *del(17p13)*, *del(11q22-23)*, proteína microglobulina- β 2, o gene *IGH* não mutado, bem como a expressão de CD38 ou de ZAP-70, estão relacionadas com um mau prognóstico, devendo considerar-se um início imediato de terapêutica.

Os recentes avanços na terapêutica da LLC, permitem oferecer aos doentes uma vasta opção terapêutica, com agentes terapêuticos cada vez mais específicos e que respondem às necessidades de cada doente. Atualmente, de entre os agentes mais utilizados encontram-se os agentes alquilantes, análogos de purina, regimes de combinação de quimioterapia, inibidores das cinases, bem como os anticorpos

monoclonais combinados com quimioterapia. O tratamento deverá ser individualizado e deverá ter em conta o estadió clínico, a idade e a presença de comorbilidades do doente. Doentes com LLC que se apresentem assintomáticos, ou seja que apresentem um estadió clínico inicial, devem apenas ser monitorizados, não requerendo início imediato da terapêutica. Por outro lado, doentes sintomáticos, com um mau prognóstico, devem iniciar de imediato a terapêutica

Doentes sem comorbilidades, com idade <65 anos e sem del(17p13), beneficiam de uma terapêutica com FCR. Por outro lado, doentes com del(17p13) apresentam um pior prognóstico e, por isso, a terapêutica de primeira linha passa por agentes como ibrutinib ou alemtuzumab; caso não respondam a esta terapêutica, deve ser considerado o TCEH. Muitos doentes apresentam recidivas após o fim do tratamento, nestes casos, a terapêutica passa por ibrutinib ou venetoclax e, em último caso, TCEH.

O TCEH é, atualmente, a única possibilidade de cura da LLC, no entanto a elegibilidade para o TCEH tem de ser feita com base numa avaliação risco-benefício, dada a possibilidade de rejeição do transplante.

A LLC é uma doença que afeta principalmente a população idosa, estando muitas vezes associada à presença de comorbilidades e, apesar da vasta opção terapêutica existente, a remissão completa ou a cura, não estão garantidas. Deste modo, são precisos novos agentes terapêuticos, com uma eficácia aumentada e com um perfil de toxicidade reduzido.

Novos agentes, tais como a lenalidomida, o acalabrutinib, venetoclax, novos anticorpos monoclonais, bem como outros agentes terapêuticos, estão em fase de ensaios clínicos, no entanto, apesar de serem agentes promissores no combate à LLC, ainda não são comercializados, por serem precisas mais informações relacionadas com o seu perfil de segurança.

Cada vez mais se pesquisam novos agentes, mais específicos e que atuam em novos alvos terapêuticos, abrindo assim os horizontes terapêuticos, com vista a que, no futuro, estes doentes possam atingir a remissão completa ou a cura para esta e outras neoplasias hematológicas.

14 Referências Bibliográficas

1. Scarfò L, Ferreri AJM, Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Oncol Hematol*. 2016;104:169–82.
2. Rossi D, Gaidano G. The clinical implications of gene mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer*. 2016;114(8):849–54.
3. Frenzel LP, Reinhardt HC, Pallasch CP. Concepts of chronic lymphocytic leukemia pathogenesis: DNA damage response and tumor microenvironment. *Oncol Res Treat*. 2016;39:9–16.
4. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Wierda WG, Gribben J, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3(16096):1–21.
5. Cll I. Chronic Lymphocytic Leukemia [Internet]. NORD - National Organization for Rare Disorders. 2016 [cited 2016 Apr 10]. p. 1–8. Available from: <https://rarediseases.org/rare-diseases/chronic-lymphocytic-leukemia/>
6. Morton LM, Turner JJ, Cerhan JR, Linet MS, Treseler PA, Clarke CA, et al. Proposed classification of lymphoid neoplasms for epidemiologic research from the Pathology Working Group of the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph). *Blood*. 2015;110(2):695–709.
7. Hsi ED. 2016 WHO Classification update - What's new in lymphoid neoplasms. *Int J Lab Hematol*. 2017;39(1):14–22.
8. Hematopoiesis Diagram [Internet]. DentalArticles. 2009 [cited 2017 Mar 5]. Available from: <http://www.dentalarticles.com/visual/d/hematopoiesis.php>
9. APCL - Associação Portuguesa Contra a Leucemia [Internet]. 2002 [cited 2017 Jun 2]. Available from: <http://www.apcl.pt/>
10. Rai KR, Stilgenbauer S. Pathophysiology and genetic features of chronic lymphocytic leukemia [Internet]. Up To Date. 2016 [cited 2017 Mar 4]. p. 10. Available from: <http://www.uptodate.com/contents/pathophysiology-and-genetic-features-of-chronic-lymphocytic-leukemia>
11. Ghia P, Ferreri AJM, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Hematol*. 2007;64(3):234–46.
12. Mir MA, Liu D, Patel SC, Rasool HJ. Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) [Internet]. Medscape. 2017 [cited 2017 Apr 10]. Available from:

- <http://emedicine.medscape.com/article/199313-overview>
13. Roreno. Registo Oncológico Nacional 2010 [Internet]. Porto. Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil - EPE. 2016. 144 p. Available from: http://www.roreno.com.pt/images/stories/pdfs/ro_nacional_2010.pdf
 14. Teras LR, Desantis CE, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers CR. 2016 US Lymphoid Malignancy Statistics by World Health Organization Subtypes. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(6):443–59.
 15. Rai KR, Stilgenbauer S. Clinical presentation, pathologic features, diagnosis, and differential diagnosis of chronic lymphocytic leukemia [Internet]. Up To Date. 2017 [cited 2017 Mar 27]. Available from: http://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-pathologic-features-diagnosis-and-differential-diagnosis-of-chronic-lymphocytic-leukemia?source=search_result&search=clinical+presentation+pathologic+features+diagnosis++of+chronic+lymphocytic+leukemi
 16. Law PJ, Sud A, Mitchell JS, Henrion M, Orlando G, Lenive O, et al. Genome-wide association analysis of chronic lymphocytic leukaemia , Hodgkin lymphoma and multiple myeloma identifies pleiotropic risk loci. *Sci Rep*. 2017;7:1–11.
 17. Slager SL, Benavente Y, Blair A, Vermeulen R, Cerhan JR, Costantini AS, et al. Medical History, Lifestyle, Family History, and Occupational Risk Factors for Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2014;2014(48):41–51.
 18. Slager SL, Caporaso NE, Sanjose S De, Goldin LR. Genetic Susceptibility to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Semin Hematol*. 2013;50(4):296–302.
 19. Kreuziger LMB, Tarchand G, Morrison VA. The impact of Agent Orange exposure on presentation and prognosis of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(1):63–6.
 20. Schinasi LH, Roos AJ De, Ray RM, Edlefsen KL, Parks CG, Howard B V, et al. Insecticide exposure and farm history in relation to risk of lymphomas and leukemias in the Women's health initiative observational study cohort. *Ann Epidemiol*. 2015;25(11):803–10.
 21. Radivoyevitch T, Sachs RK, Peter R, Smith MR, Hill BT. Ionizing radiation exposures in treatments of solid neoplasms are not associated with subsequent

- increased risks of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2016;43:9–12.
22. Hsu W, Preston DL, Soda M, Sugiyama H, Funamoto S, Kodama K, et al. The Incidence of Leukemia , Lymphoma and Multiple Myeloma among Atomic Bomb Survivors : 1950 – 2001. *Radiat Res.* 2013;179(3):361–82.
 23. Marcucci F, Mele A. Hepatitis viruses and non-Hodgkin lymphoma: epidemiology, mechanisms of tumorigenesis, and therapeutic opportunities. *Blood.* 2011;117(6):1792–8.
 24. Hjalgrim H, Rostgaard K, Vasan SK, Ullum H, Erikstrup C, Pedersen OB V, et al. No evidence of transmission of chronic lymphocytic leukemia through blood transfusion. *Blood.* 2015;126(17):2059–206.
 25. Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol.* 2013;34(12):592–601.
 26. Hacken E, Burger JA. Molecular Pathways : Targeting the Microenvironment in Chronic Lymphocytic Leukemia — Focus on the B-Cell Receptor. *Am Assoc Cancer Res.* 2014;20(3):548–57.
 27. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2008;371(9617):1017–29.
 28. Wiestner A. The role of B-cell receptor inhibitors in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2015;100(12):1495–507.
 29. Fabbri G, Dalla-favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(3):145–62.
 30. Nabhan C, Raca G, Wang L. Predicting Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Contemporary Era. *JAMA Oncol.* 2015;1(7):965–74.
 31. Neoplasia L, Nadeu F, Delgado J, Royo C, Baumann T, Stankovic T, et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2016;127(17):2122–31.
 32. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Bignell GR, et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature.* 2010;463(7278):191–7.
 33. Villamor N, Escaramis G, Tubi MC, Nicola P. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 2011;475(7354):101–5.
 34. Roos-weil D, Nguyen-khac F, Bernard OA. Chronic lymphocytic leukemia : Time

- to go past genomics? *Am J Hematol.* 2016;91(5):518–28.
35. Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, Greil R. Molecular and cellular mechanisms of CLL : novel therapeutic approaches. *Nat Rev | Clin Oncol Oncol.* 2009;6(7):405–18.
 36. Ponzoni M, Doglioni C, Caligaris-cappio F. Chronic lymphocytic leukemia : the pathologist's view of lymph node microenvironment. *Semin Diagn Pathol.* 2011;28(2):161–6.
 37. Küppers R. Mechanisms of B-Cell Lymphoma Pathogenesis. *Nat Rev.* 2005;5(4):251–61.
 38. Tsang M, Parikh SA. A Concise Review of Autoimmune Cytopenias in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep.* 2017;12(1):29–38.
 39. Demir C, Ömer Ekinci. Clinical and serological autoimmune complications in chronic lymphocytic leukemia. *Wiener Klin Wochenschrift - Cent Eur J Med.* 2017;129(15–16):552–7.
 40. Visco C, Barcellini W, Maura F, Neri A, Cortelezzi A, Rodeghiero F. Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol.* 2014;89(11):1055–62.
 41. Visco C, Novella E, Peotta E, Paolini R, Giaretta I, Rodeghiero F. Autoimmune hemolytic anemia in patients with chronic lymphocytic leukemia is associated with IgVH status. *Haematologica.* 2010;95(7):7–9.
 42. Molica S, Polliack A. Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) associated with chronic lymphocytic leukemia in the current era of targeted therapy. *Leuk Res.* 2016;50:31–6.
 43. Rai KR, Stilgenbauer S. Overview of the complications of chronic lymphocytic leukemia [Internet]. Up To Date. 2016 [cited 2017 Mar 27]. Available from: <http://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-complications-of-chronic-lymphocytic-leukemia>
 44. Vitale C, Ferrajoli A. Richter Syndrome in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep.* 2016;11(1):43–51.
 45. Mauro FR, Galieni P, Tedeschi A, Laurenti L, Del G, Gianluigi P, et al. Factors predicting survival in chronic lymphocytic leukemia patients developing Richter syndrome transformation into Hodgkin lymphoma. *Am J Hematol.* 2017;92(6):529–35.

46. Jamroziak K, Tadmor T, Robak T, Polliack A. Richter syndrome in chronic lymphocytic leukemia: updates on biology, clinical features and therapy. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(7):1949–58.
47. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*. 2015;90(5):446–60.
48. Eichhorst B, Robak T, Ghia P, Hillmen P, Hallek M, Buske C. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;26(5):78–84.
49. Alteri R, Kalidas M, Gadd L, Stump-Sutliff K. How Is Chronic Lymphocytic Leukemia Diagnosed? [Internet]. The American Cancer Society. 2015 [cited 2017 Apr 10]. p. 1–8. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/chronic-lymphocytic-leukemia/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html>
50. Jain P, Keating M, Thompson PA, Trinh L, Wang X, Wierda W, et al. High fluorescence in situ hybridization percentage of deletion 11q in patients with chronic lymphocytic leukemia is an independent predictor of adverse outcome. *Am J Hematol*. 2015;90(6):471–7.
51. Matutes E, Wotherspoon A, Catovsky D. Differential diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Hematol*. 2007;20(3):367–84.
52. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute – Working Group 1996 guidelines Guidelines for the diagnosis and tr. *Blood*. 2008;111(12):5446–56.
53. Cramer P, Hallek M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia - what do we need to know? *Nat Publ Gr*. 2010;8(1):38–47.
54. Kai KR, Stilgenbauer S. Staging and prognosis of chronic lymphocytic leukemia [Internet]. Up To Date. 2016 [cited 2017 Mar 27]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/staging-and-prognosis-of-chronic-lymphocytic-leukemia>
55. Parikh SA, Shanafelt TD. Prognostic Factors and Risk Stratification in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Semin Oncol*. 2016;43(2):233–40.
56. Bazargan A, Tam CS, Michael J. Predicting survival in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2012;12(3):393–403.

57. Rai KR, Stilgenbauer S. Overview of the treatment of chronic lymphocytic leukemia [Internet]. Up To Date. 2017 [cited 2017 Mar 27]. p. 1–13. Available from: http://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-treatment-of-chronic-lymphocytic-leukemia?topicKey=HEME%2F4545&elapsedTimeMs=0&source=search_result&searchTerm=Chronic+lymphocytic+leukemia&selectedTitle=2~150&view=print&displayedView=full#
58. Voorhies BN, Stephens DM. What Is Optimal Front-Line Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia in 2017? *Curr Treat Options Oncol.* 2017;18(2):1–14.
59. Mato A, Jauhari S, Schuster SJ. Management of chronic lymphocytic leukemia (CLL) in the era of B-cell receptor signal transduction inhibitors. *Am J Hematol.* 2015;90(7):657–64.
60. Hallek M, Dc W, Hallek M. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia : new frontline treatment strategies Review Article Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Blood.* 2014;122(23):3723–34.
61. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol.* 2017;92(9):946–65.
62. Resumo das Características do Medicamento - Fludara 50 mg pó para solução injectável ou para perfusão [Internet]. Infomed. 2011 [cited 2017 Aug 13]. p. 1–15. Available from: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=3531&tipo_documento=rcm
63. Resumo das Características do Medicamento - Levact 2,5 mg/ml pó para concentrado para solução para perfusão [Internet]. Infomed. 2011 [cited 2017 Aug 13]. p. 1–14. Available from: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=53605&tipo_documento=rcm
64. Hillmen P, Robak T, Janssens A, Babu KG, Kloczko J, Grosicki S, et al. Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): A randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet.* 2015;385(9980):1873–83.
65. Hallek M, Pflug N. Chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol.* 2010;21(7):154–

- 64.
66. Cartron G, Guibert S De, Dilhuydy M, 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.
67. Al-Sawaf O, Fischer K, Engelke A, Pflug N, Hallek M, Goede V. Obinutuzumab in chronic lymphocytic leukemia: Design, development and place in therapy. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:295–304.
68. Rai KR, Jain P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) - Then and now. *Am J Hematol*. 2016;91(3):330–40.
69. Resumo das Características do Medicamento - SPRYCEL comprimidos revestidos por película [Internet]. European Medicines Agency. 2009 [cited 2017 Aug 13]. p. 1–74. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000709/WC500056998.pdf
70. Resumo das Características do Medicamento - Zydelig [Internet]. European Medicines Agency. 2014 [cited 2017 Aug 13]. p. 1–69. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003843/WC500175377.pdf
71. Cheng S, Ma J, Guo A, Lu P, Leonard JP, Coleman M, et al. BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia*. 2013;28(3):649–57.
72. Burger Alessandra Ferrajoli JA, Estrov Z, Jain N, Marissa Vignali WG, Keating MJ, Yin Q, et al. Ibrutinib Therapy Increases T Cell Repertoire Diversity in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Immunol*. 2017;198(4):1740–7.
73. Resumo das Características do Medicamento - IMBRUVICA [Internet]. European Medicines Agency. 2014 [cited 2013 Aug 14]. p. 1–39. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003791/WC500177775.pdf
74. Castro JE, James DF, Sandoval-sus JD, Jain S, Bole J, Rassenti L, et al. Rituximab in Combination With High Dose Methylprednisolone for the Treatment of Chronic. *Leukemia*. 2009;23(10):1779–89.
75. Alteri R, Kalidas M, Gadd L, Stump-Sutliff K. Radiation Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia [Internet]. American Cancer Society. 2015 [cited 2017

- Aug 18]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/chronic-lymphocytic-leukemia/treating/radiation-therapy.html>
76. Richardson DB, Wing S, Schroeder J, Schmitz-Feuerhake I, Hoffmann W. Ionizing radiation and chronic lymphocytic leukemia. *Environ Health Perspect.* 2005;113(1):1–5.
 77. Zaorsky NG, Williams GR, Barta SK, Esnaola NF, Kropf PL, Hayes SB, et al. Splenic irradiation for splenomegaly: a systematic review. *Cancer Treat Rev.* 2017;53:47–52.
 78. Soldić Ž, Murgić J, Jazvić M, Radić J, Bolanča A, Stančić V, et al. Splenic irradiation in hematologic malignancies and other hematologic disorders-single institution experience. *Acta Clin Croat.* 2011;50(1):29–35.
 79. D Catovsky, S Richards, E Matutes, D Oscier, M J S Dyer, R F Bezares, A R Pettitt, T Hamblin, D W Milligan, J A Child, M S Hamilton, C E Dearden, A G Smith, A G Bosanquet, Z Davis, V Brito-Babapulle, M Else, R Wade PH. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007;370(9583):230–9.
 80. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2010;376(9747):1164–74.
 81. Nabhan C, Rosen ST. Chronic Lymphocytic Leukemia - A Clinical Review. *JAMA Oncol.* 2014;312(21):2265–76.
 82. Mauro FR, Molica S, Laurenti L, Cortelezzi A, Carella AM, Zaja F, et al. Fludarabine plus alemtuzumab (FA) front-line treatment in young patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and an adverse biologic profile. *Leuk Res.* 2014;38(2):198–203.
 83. Freeman CL, Gribben JG. Immunotherapy in Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL). *Curr Hematol Malig Rep.* 2016;11(1):29–36.
 84. Gribben JG. Stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia. *Biol blood marrow Transplant.* 2008;15(1):53–8.
 85. Negrin RS, Rai KR. Hematopoietic cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia [Internet]. *Up To Date.* 2017 [cited 2017 Mar 4]. p. 1–13. Available

- from: http://www.uptodate.com/contents/hematopoietic-cell-transplantation-in-chronic-lymphocytic-leukemia?topicKey=HEME%2F4541&elapsedTimeMs=0&source=search_result&searchTerm=Chronic+lymphocytic+leukemia&selectedTitle=8~150&view=print&displayedView=full#
86. Wierda WG, Zelenetz AD, Gordon LI, Abramson JS, Advani RH, Andreadis CB, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Leukemia, Version 1.2017: Featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Cancer Netw.* 2017;15(3):293–311.
 87. Rai K, Stilgenbauer S. Treatment of relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia [Internet]. Up To Date. 2017 [cited 2017 Mar 27]. p. 1–25. Available from: http://www.uptodate.com/contents/treatment-of-relapsed-or-refractory-chronic-lymphocytic-leukemia?source=search_result&search=Chronic+lymphocytic+leukemia&selectedTitle=7~150
 88. Thompson M, Brander D, Nabhan C, Mato A. Minimal Residual Disease in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Era of Novel Agents A Review. *JAMA Oncol.* 2017;1–7.
 89. Böttcher 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. *J Clin Oncol.* 2012;30(9):980–8.
 90. Jain PL, Orlikowski CA, Ferrajoli A. Lenalidomide in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Orphan Drugs.* 2016;4(9):971–80.
 91. Itchaki G, Brown JR. Lenalidomide in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Investig Drugs.* 2017;26(5):633–50.
 92. Gill S, June CH. Going viral: Chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies. *Immunol Rev.* 2015;263(1):68–89.
 93. Porter DL, Hwang W-T, Frey N V., Lacey SF, Shaw PA, Loren AW, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med.* 2015;7(303):303ra139.
 94. Guan J, Lim KS, Mekhail T, Chang CC. Programmed death ligand-1 (PD-L1)

- expression in the programmed death receptor-1 (PD-1)/PD-L1 blockade. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141(6):851–61.
95. Qorraj M, Bruns H, Böttcher M, Weigand L, Saul D, Mackensen A, et al. The PD-1/PD-L1 axis contributes to immune metabolic dysfunctions of monocytes in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2017;31(2):470–8.
 96. Herman SEM, Montraveta A, Niemann CU, Mora-jensen H, Gulrajani M, Krantz F, et al. The Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor acalabrutinib demonstrates potent on-target effects and efficacy in two mouse models of chronic lymphocytic leukemia.
 97. Patel V, Balakrishnan K, Bibikova E, Ayres M, Keating MJ, Wierda WG, et al. Comparison of acalabrutinib, a selective Bruton tyrosine kinase inhibitor, with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia cells. *Clin Cancer Res.* 2017;23(14):3734–43.
 98. Walter HS, Rule SA, Dyer MJS, Karlin L, Jones C, Cazin B, et al. A phase 1 clinical trial of the selective BTK inhibitor ONO/GS-4059 in relapsed and refractory mature B-cell malignancies. *Blood.* 2016;127(4):411–20.
 99. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2016;374(4):311–22.