



**M**

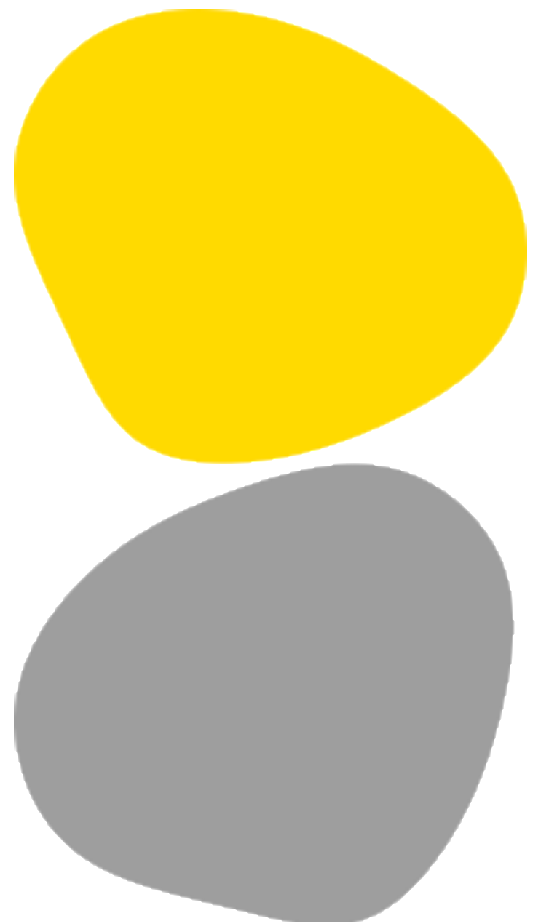
MESTRADO

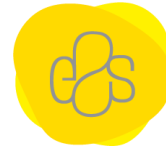
TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA

# Caracterização Citogenética de Doentes com Leucemia Linfocítica Crónica

Mariana Sofia Mesquita Pedro

09/2025





## **Caracterização Citogenética de Doentes com Leucemia Linfocítica Crónica**

### **Autor**

Mariana Sofia Mesquita Pedro

### **Orientadores**

Prof. Doutora Regina Augusta Alves Pereira da Silva,  
Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto  
Mestre Cecília Maria Gaspar Guedes de Figueiredo Correia,  
Serviço de Genética Laboratorial  
Instituto Português de Oncologia do Porto

*Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Técnicas Laboratoriais em Biopatologia** – Ramo **Patologia Molecular** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.*



## Agradecimentos

Antes de mais, gostaria de agradecer a todos que tornaram possível a concretização do meu estágio e deste trabalho, que me permitiram crescer pessoal e profissionalmente.

Gostaria de agradecer à professora Regina que, para além da coordenação do mestrado, demonstrou disponibilidade constante e esteve sempre disposta a ajudar na construção deste trabalho.

À minha supervisora no estágio, a Dr. Cecília, expresse sincera gratidão pela sua paciência e por me transmitir os seus conhecimentos, mesmo quando o seu tempo era escasso. Estendo, também, o meu agradecimento à instituição que me tão bem me acolheu, o IPO-Porto, e a todos aqueles com a qual tive a oportunidade de interagir, sempre com espírito de ajuda e disponibilidade. Entre eles, não podia deixar de destacar a Cátia, que me acompanhou no dia-a-dia laboratorial e sempre se demonstrou disposta a ensinar-me e a corrigir todos os meus erros.

Aos meus pais, Rosa e Joaquim, por sempre acreditarem em mim, pelo amor que me deram e por sempre fazerem de tudo para que eu pudesse chegar onde estou. Agradeço, também, à minha irmã por todo o apoio que me deu em todas as fases da minha vida, mas especialmente nesta fase, que é uma das mais importantes.



## Resumo

A leucemia linfocítica crónica (LLC) é uma neoplasia que apresenta uma elevada heterogeneidade genética, com anomalias citogenéticas recorrentes, como a trissomia 12, e as deleções de 11q e 13q, e 17p. Estas alterações estão relacionadas com o prognóstico do doente assim como com a escolha terapêutica a adotar.

Este estudo teve como objetivo caracterizar citogeneticamente doentes com diagnóstico de LLC, de modo a evidenciar a relevância da citogenética no diagnóstico diferencial, prognóstico e escolha terapêutica. Este estudo foi realizado utilizando um painel de 11 doentes através da combinação de técnicas de citogenética convencional e molecular.

As alterações características de LLC identificadas pelo conjunto das técnicas aplicadas incluíram del(11q) em dois casos, trissomia 12 em dois casos, del(13q) em quatro casos e del(17p) em dois casos. Cinco dos casos apresentavam cariótipos complexos, um biomarcador de mau prognóstico na LLC.

Num dos casos, os estudos citogenéticos em conjunto com os resultados obtidos pela Anatomia Patológica, permitiram identificar a progressão da LLC para um linfoma difuso de grandes células B.

Estes resultados evidenciam a relevância dos estudos citogenéticos na caracterização da LLC, tanto para um diagnóstico diferencial como para o prognóstico e orientação terapêutica.

**Palavras-chave:** Leucemia Linfocítica Crónica; alterações cromossómicas; cariótipo; FISH



## Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a neoplasm that has high genetic heterogeneity, with recurrent cytogenetic abnormalities such as trisomy 12 and deletions of 11q, 13q, and 17p. These cytogenetic abnormalities are related to the patient's prognosis as well as indications of treatment.

The aim of this study was to cytogenetically characterize patients diagnosed with CLL in order to highlight the relevance of cytogenetics in differential diagnosis, prognosis, and therapeutic choice in CLL. This study was conducted through a combination of conventional and molecular cytogenetic techniques in a panel of 11 patients.

The recurrent cytogenetic abnormalities of CLL identified included del(11q) in two cases, trisomy 12 in two cases, del(13q) in four cases, and del(17p) in two cases. Five of the cases had complex karyotypes, a biomarker of poor prognosis in CLL.

In one of the cases, the cytogenetic study, in combination with the results obtained by Pathological Anatomy, allowed the identification of CLL progression to a diffuse large B-cell lymphoma.

These results highlight the relevance of cytogenetic studies in the characterization of CLL, both for differential diagnosis and for prognosis and therapeutic guidance.

**Keywords:** Chronic lymphocytic leukemia; chromosomal abnormalities; karyotype; FISH



## Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Leucemia Linfocítica Crónica.....	1
1.1.1.	Epidemiologia.....	2
1.1.2.	Fatores de Risco.....	2
1.1.3.	Patofisiologia.....	3
1.2.	A genética da LLC.....	4
1.2.1	Alterações Citogenética.....	4
1.2.2	Alterações Génicas.....	5
1.2.3	Epigenética.....	6
1.3.	Exames de diagnóstico e estadiamento.....	6
1.4.	Estadiamento Clínico.....	7
1.5.	Fatores de prognóstico.....	9
1.5.1	Alterações genéticas e citogenéticas.....	10
1.5.2	Sistemas de Caraterização de Prognóstico.....	11
1.6.	Tratamento.....	12
2.	Objetivos.....	14
3.	Métodos.....	15
3.1.	Amostras.....	15
3.2.	Citogenética Convencional.....	16
3.3.	Citogenética Molecular.....	18
3.3.1.	Técnica de FISH.....	19
3.3.2.	Análise e interpretação dos resultados obtidos por FISH.....	20
4.	Resultados.....	24
4.1.	Citogenética Convencional – Cariótipo.....	24
4.2.	Citogenética Molecular – Técnica de FISH.....	25
4.3.	Análise de Casos.....	26
5.	Discussão.....	33
6.	Conclusão.....	40
	Referências Bibliográficas.....	41



## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Estadiamento Clínico da Leucemia Linfocítica Crónica segundo os Sistemas de Binet e Rai.....	8
Tabela 2 - Parâmetros Prognósticos e Pontuação de Risco no Índice de Prognóstico Internacional para Leucemia Linfocítica Crónica (pontuação do risco máximo: 10 pontos).....	11
Tabela 3 - Painel de sondas de FISH, utilizadas ao diagnóstico de Leucemia Linfocítica Crónica no IPO-Porto: alterações genéticas em estudo, sondas utilizadas e padrões de resultados.....	19
Tabela 4 - Classificação e descrição do cariótipo dos 11 casos clínicos analisados no estudo citogenético de pacientes com Leucemia Linfocítica Crónica.....	25
Tabela 5 - Alterações citogenéticas encontradas nos 11 casos em estudo, através da técnica de FISH utilizando o painel de sondas utilizadas no IPO-Porto, para o estudo de casos com Leucemia Linfocítica Crónica e a sonda para a fusão <i>IGH::CCND1</i> , de acordo com a fase em o doente se encontra.....	26
Tabela 6 - Alterações citogenéticas encontradas nos 11 casos em estudo, através da técnica de FISH utilizando o painel de sondas utilizadas no IPO-Porto, para o estudo de casos com Leucemia Linfocítica Crónica a sonda para a fusão <i>IGH::CCND1</i> , de acordo com o cariótipo.....	27



## Índice de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática do protocolo de cultura celular e processamento de amostras de leucemia linfocítica crónica para estudo citogenético.....	17
Figura 2 – Mapa da sonda ATM (11q22)/SE 11 [Leica Biosystems].....	20
Figura 3 – Mapa da sonda D13S319/13q34 [ZytoLight, ZytoVision GmbH].....	21
Figura 4 – Mapa da sonda IGH (14q32) Break [Leica Biosystems].....	22
Figura 5 – Mapa da sonda BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) [Leica Biosystems].....	22
Figura 6 – Mapa da sonda TP53(17q13)/SE 17 [Leica Biosystems].....	23
Figura 7 – Distribuição das amostras utilizadas no estudo citogenético de doentes com Leucemia Linfocítica Crónica.....	24
Figura 8 – Metafase (A) e Cariograma (B) normal do caso E.....	27
Figura 9 – Cariótipo do caso B com translocação envolvendo os cromossomas 13 e 14 [t(13;14)(q14;q32)].....	28
Figura 10 – Citogenética molecular do caso B.....	28
Figura 11 – Cariótipo do caso G.....	29
Figura 12 – Cariótipo do caso D.....	31
Figura 13 – Citogenética molecular do caso D.....	32
Figura 14 – Cariótipo do caso K.....	33



## 1. Introdução

O estágio realizado no Serviço de Genética Laboratorial do Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO-Porto), nomeadamente na área de citogenética, além de ter proporcionado a possibilidade de desenvolver aptidões e competências no âmbito laboratorial, permitiu a aquisição de conhecimentos e competências em patologias, principalmente da Leucemia Linfocítica Crónica (LLC), assim como estudar o papel da citogenética no diagnóstico, prognóstico e direcionamento de terapias em doentes com LLC.

### 1.1. Leucemia Linfocítica Crónica

A leucemia linfocítica crónica é uma neoplasia caracterizada pelo crescimento não controlado de pequenas células B maduras que expressam a molécula de superfície CD5 (CD5+), podendo a doença manifestar-se de forma indolente ou mais agressiva. (1–7)

O padrão morfológico característico da LLC na maioria dos doentes é caracterizado pela presença de linfócitos pequenos e maduros, com limites estreitos de citoplasma, sendo este ligeiramente basófilo, núcleos densos com um nucléolo indistinguível ou inexistente. (1,2) Noutros casos, o padrão típico é a presença de células atípicas de maiores dimensões ou até de prolinfócitos. (1,2) De referir que uma concentração de prólinfócitos no sangue periférico superior a 10% está associada a uma forma de LLC mais agressiva. (1,2)

A LLC afeta o sangue periférico, a medula óssea e outros tecidos linfóides como gânglios linfáticos, baço e amígdalas. (1,3–5) Numa fase inicial da doença, a maioria dos pacientes é assintomático aquando do diagnóstico.(1) Nesta fase da doença, a sintomatologia compreende citopenia, particularmente anemia (baixa contagem de eritrócitos) e trombocitopenia (baixa contagem de plaquetas), infeções recorrentes, hipogamaglobulinemia (baixa contagem de anticorpos), linfadenopatia e esplenomegalia. (1,3,4) Sintomas como fadiga excessiva, perda de peso não deliberada (mais de 10% da massa corporal num período de 6 meses), febre e suores noturnos sem origem determinada estão associados à progressão da LLC.(1,3) Em fases mais avançadas, a doença pode envolver também áreas extra ganglionares com massas no fígado, pele, sistema nervoso central, rim, pleura e ossos. (1,4) O crescimento assimétrico de gânglios linfáticos encontra-se também associado à progressão da doença.(1)



### 1.1.1. Epidemiologia

No período de 1990 a 2019 assistiu-se a um aumento da incidência de LLC (5), principalmente na população caucasiana e, em menor extensão, nas populações asiáticas e latino-americanas.(1,6) As taxas de incidência e prevalência da LLC em países desenvolvidos são superiores às encontradas nos países subdesenvolvidos, o que pode ser associado à dificuldade na acessibilidade ao diagnóstico, por ineficiência de recursos dos sistemas de saúde.(5,6) Portanto, esta baixa taxa de diagnóstico pode contribuir para subestimar a incidência e mortalidade da doença.(5)

A LLC tem uma maior incidência em indivíduos com idades superiores a 65 anos (5,6) e afeta maioritariamente o género masculino, (1,5,6) De referir que nos países subdesenvolvidos a incidência da LLC é maior no género feminino, opondo-se à tendência global. No entanto, as taxas de mortalidade são idênticas em ambos os géneros. (1,5)

No ano 2019, a Índia, a China e os Estados Unidos da América foram os países com maior incidência da LLC, apresentando também as maiores taxas de mortalidade. (5) Apesar de não existirem muitos estudos em Portugal, um estudo publicado em 2021, referente aos anos de 2013–2014 no sul do país, revelou que a idade média de diagnóstico da LLC é de 71 anos, onde 71% dos indivíduos apresentam uma idade superior a 65 anos, sendo mais frequente no género masculino. (7)

### 1.1.2. Fatores de Risco

Na literatura estão descritos diversos fatores de risco que podem estar envolvidos no desenvolvimento de LLC, podendo estes ser genéticos ou ambientais.

Relativamente aos fatores genéticos, o risco de desenvolver LLC é mais elevado em indivíduos com história familiar conhecida desta patologia ou mesmo em outra neoplasia. (1,8,9) Cerca de 35% das LLC apresentam uma componente genética, (8) sendo o risco 5 a 8 vezes mais elevado em indivíduos com um familiar em primeiro grau com esta patologia, (1,8) e cerca de 27 vezes maior com dois familiares. (9)

Relativamente aos fatores ambientais, alguns estudos mostram uma associação entre fatores ambientais e um risco acrescido de desenvolvimento da LLC, embora não tenha sido claramente estabelecida uma causalidade. (5,8,9) Um dos fatores de risco identificado foi o tabagismo, uma vez que o fumo do cigarro leva à libertação de derivados de benzeno, substância associada à patogénese de LLC. (5,9)



A exposição ocupacional também está associada a um risco aumentado de desenvolvimento da LLC, nomeadamente, na indústria petrolífera, pela exposição a derivados de benzeno e outros solventes (risco aumentado cerca de seis vezes), e na agricultura, pela utilização de herbicidas e pesticidas.(9)

Um estudo efetuado por Karakosta *et al* estabeleceu uma associação entre exposição ocupacional/ambiental e risco mais elevado de ocorrerem alterações citogenéticas na LLC. (9) Neste estudo, o contacto com pesticidas e inseticidas revelou um risco aumentado seis vezes para o aparecimento de deleção do braço longo do cromossoma 11. (9) A exposição ao benzeno foi também considerada promotora de anomalias cromossómicas numéricas e estruturais, nos leucócitos do sangue periférico. (9) Neste estudo foi também demonstrado que a exposição à radiação ionizante, sobretudo em pacientes submetidos a exames radiológicos repetidos, também se associa a um risco aumentado de cerca de três vezes de se desenvolver LLC. (9)

### 1.1.3. Patofisiologia

As células neoplásicas da LLC podem derivar das células B maduras (de memória) ou das células B imaturas, sendo a origem das células neoplásicas diferenciada pela presença ou ausência da hipermutação somática de IGHV (Imunoglobulina da Cadeia Pesada Variável). (3,10)

A hipermutação somática IGHV é um processo da diferenciação normal das células B que ocorre no centro germinativo e ocorre quando as células estão em proliferação. Durante este processo ocorrem rearranjo somático dos genes de imunoglobulinas, originando mutações nos segmentos génicos que codificam as regiões hipervariáveis das cadeias polipeptídicas das imunoglobulinas, fato que cria uma elevada diversidade de recetores com diferentes afinidades para um dado antigénio e capazes de identificar variados antigénios.(11)

As células neoplásicas que apresentam a hipermutação somática, são originárias de células B maduras (células B de memória) que passaram pelo centro germinativo. Pelo contrário, células neoplásicas em que não ocorreu este processo são originárias de células B imaturas, que ainda não passaram pelo centro germinativo. (3,10)

O recetor de células B (BCR), expresso à superfície das células B,(12) apresenta na sua constituição uma imunoglobulina de superfície (smlg), que é a responsável pelo reconhecimento de antigénios pelo BCR. A esta imunoglobulina de superfície está associado um heterodímero formado pelas subunidades  $Ig\alpha/Ig\beta$  (CD79A/ CD79B), que é o responsável pela transdução do sinal de ativação que ocorre após a ligação do epítipo antigénico à imunoglobulina do BCR. (10,13,14)



A ativação de BCR desencadeia a ativação de diversas vias complexas, incluindo as vias PLC- $\gamma$  2, PI3K e MAPK.(1,14,15) A via de sinalização PI3K está associada à remodelação do citoesqueleto das células B e à sua sobrevivência, enquanto a via MAPK, que conduz à fosforilação de fatores de transcrição, como o c-Myc, está envolvida no aumento da expressão de proteínas que levam à proliferação celular.(16) A via PLC- $\gamma$  2 promove não só a libertação de cálcio, mas também a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, sendo este o responsável pela ativação da expressão de genes envolvidos na proliferação e sobrevivência celular, conferindo às células neoplásicas resistência à quimioterapia. (16,17)

Na LLC, a ativação do recetor das células B é causada pela presença de antigénios existentes no microambiente tumoral, promovendo a expansão e sobrevivências de células neoplásicas.(14)

A maioria dos doentes com LLC apresentavam linfocitose monoclonal de células B (MBL), caracterizada pela ausência de linfadenopatia ou organomegalia mas com aumento de linfócitos B no sangue (permanecendo abaixo de  $5 \times 10^9/L$ ), antes de ocorrer progressão para doença. (2)

### *Microambiente do tecido linfático*

As células da LLC, quando em *ex vivo*, são muito suscetíveis à morte celular, o que sugere que o microambiente onde elas se inserem é primordial para a sua sobrevivência.(3,10,12)

Na LLC, as células neoplásicas estão presentes nos centros de proliferação ou pseudo-folículos, localizados em gânglios linfáticos ou medula óssea, onde interagem com diversas células acessórias, como as células do estroma da medula óssea (BMSC), as células nurse-like derivada de monócitos (NLC), células dendríticas foliculares (FDC), células endoteliais e as células T.(2,3,12) Estas interações, diretas ou indiretas via citocinas, fornecem proteção às células neoplásicas, permitindo que estas escapem à apoptose.(1,3,4,12,15) A interação entre as células neoplásicas e as células acessórias é mediada por um conjunto de citocinas e quimiocinas, e por moléculas de adesão. (10,12)

## **1.2. A genética da LLC**

### **1.2.1 Alterações Citogenética**

A LLC apresenta um perfil genético muito heterogéneo, não existindo uma alteração genética única que caracterize esta neoplasia.(1,15) Contudo, estão descritas alterações citogenéticas recorrentes, nomeadamente, a trissomia do cromossoma 12, (1,10,15,18) a deleção do braço longo do cromossoma 13



[del(13q)], a deleção do braço longo do cromossoma 11 [del(11q)], e a deleção do braço curto do cromossoma 17 (del(17p)). (1,10,15)

A del(11p) é habitualmente uma deleção extensa (3) e ocorre em 10 a 20% dos doentes. Esta deleção pode afetar o gene supressor tumoral, o gene *ATM* (localizado em 11q22.3) (1,3,12) e o gene *BIRC3* (localizado em 11q22.2), que pertence à família de proteínas inibidoras da apoptose e, quando presente, contribui para a regulação negativa de NF-κB. (3)

A trissomia 12 ocorre em 15 a 20% dos indivíduos com LLC, (1,3,12) estando associada a um risco mais elevado de progressão e transformação em síndrome de Richter (evolução para uma forma de linfoma mais agressiva). (3,12)

A del(13q) está descrita em cerca de 20% dos casos com alterações citogenéticas, sendo detetada por FISH (*Interphase fluorescence in situ hybridization*) em 50 a 60% das LLC. (1,3,12) Esta deleção pode englobar os genes *DLEU2* e *MIR15A* (localizados em 13q14.2), que, quando presentes, auxiliam na regulação do ciclo celular e na supressão da expressão de proteínas anti-apoptóticas.(1–3,12,15) Se a deleção for de grandes dimensões pode englobar o gene *RB1*, cuja perda está associada a uma patologia mais agressiva. (3,12,18)

A del(17p) é detetada, por FISH, em 5 a 10% dos casos. Esta deleção engloba o gene *TP53*, sendo a deleção deste gene um indicador de prognóstico desfavorável. (1,3,12)

Na LLC estão descritas outras alterações cromossómicas de menor relevância, nomeadamente, a del(6)(q21q23) e o ganho 14q, associados a um aumento na proporção de prolinfócitos no sangue periférico (18) e a t(14;18)(q32;q21), envolvendo os genes *IGH* (Locus da Imunoglobulina Pesada) e *BCL2* (3,10) A t(14;19)(q32;q13), envolvendo o gene *BCL3* e a t(2;14)(p16;q32), envolvendo o gene *BCL11A*, são também encontradas nestes doentes em menor frequência que outras alterações. (10)

A del(13q) e a trissomia 12 são frequentemente detetados ao diagnóstico, sugerindo que estes são eventos iniciais, (3,15) enquanto que a del(17p) e a del(11q) são detetados em fases mais tardias, o que sugere estarem associados à evolução clonal e progressão da doença.(15)

### 1.2.2 Alterações Génicas

O perfil mutacional da doença é bastante heterogéneo, envolvendo muitos genes, embora apenas mutações dos genes *NOTCH1*, *SF3B1*, *TP53* e *ATM* se encontrem em mais de 5% dos doentes ao diagnóstico. (10) O gene *SF3B1* é o que se encontra mutado mais frequentemente, sendo a mutação K700E a mais comum. (3,12)



As mutações recorrentes em LLC influenciam as vias de sinalização BCR, NOTCH, IL-1R, Wnt, MAPK, que controlam a reparação de DNA e o ciclo celular,(10,15) e vias que controlam o processamento e exportação de RNA. A desregulação destas vias está diretamente relacionada com a patogenicidade da doença. (3,10,12,15)

Algumas mutações génicas coexistem com alterações citogenéticas específicas, o que pode indicar uma possível associação entre ambos. Alterações nos genes *MYD88* (3p22.2) e *SF3B1* (2q33.1) associam-se frequentemente a del(13q) e del(11q), respetivamente, enquanto alterações no genes *NOTCH1* (9q34.3) e *BIRC3* (11q22.2) estão associados à trissomia 12. (3,12,15)

### 1.2.3 Epigenética

A epigenética é um ramo da biologia que estuda alterações da expressão génica sem ocorrer alteração na sequência de DNA, e envolve mecanismos como metilação do DNA e modificação de histonas.(19)

As alterações epigenéticas desempenham também um papel na patogénese da doença. (1,3) Atualmente, estão descritos 3 grupos distintos de LLC de acordo com o perfil de metilação do DNA. (1,3) O LLC tipo células B de memória apresenta um perfil de metilação típico de células B com IGHV mutado enquanto o LLC tipo células B naïve apresenta um perfil de metilação típico de células B com IGHV não mutado. O LLC intermédio de metilação de DNA é constituído por um perfil que se encontra entre as células *naïve* e de memória. (1,3,10,12)

Pacientes com LLC apresentam uma hipometilação generalizada do DNA,(3) sendo esta mais comum nos locais de ligação a fatores de transcrição (10,12) e em genes envolvidos na patogénese da LLC.(10) Doentes que apresentam trissomia 12 apresentam uma hipometilação característica, associada à acetilação de H3K27. (10)

### 1.3. Exames de diagnóstico e estadiamento

Para se estabelecer o diagnóstico de LLC é necessário efetuar um hemograma diferencial, onde a contagem de linfócitos B no sangue periférico é superior a  $5 \times 10^9/L$ , durante pelo menos 3 meses. (1,2,20)

A imunofenotipagem por citometria de fluxo dos linfócitos periféricos é um dos ensaios primordiais para o diagnóstico da LLC. As células neoplásicas de LLC apresentam expressão de marcadores de superfície das células B, como CD19, CD23 e CD20, sendo a expressão do CD20 caracteristicamente mais



baixa quando comparada a encontrada em células B normais. (1,2,20) Nestas células neoplásicas, estes marcadores encontram-se associados à expressão do antigénio CD5 e a uma fraca expressão de imunoglobulina membranar. Deste modo, o estudo do painel dos marcadores CD5, CD19, CD20, CD23 e cadeias leves de imoglobulinas  $\kappa$  e  $\lambda$  (cada clone apenas pode expressar uma) pode auxiliar no estabelecimento do diagnóstico da LLC. (1,2,20)

A imagiologia radiográfica não é geralmente recomendada em pacientes assintomáticos, todavia pode ter utilidade em algumas situações. A tomografia computadorizada (CT) pode ser utilizada, em pacientes sintomáticos, para que se possa excluir a infiltração pulmonar ou derrame pleural. A CT ou ressonância magnética de áreas como o pescoço, peito, abdómen e pélvis podem ser úteis para determinar a massa tumoral.(20)

A realização de outras análises e estudos moleculares não são cruciais para o diagnóstico de LLC, no entanto auxiliam no estabelecimento do estadiamento da patologia.

A utilização da técnica de FISH (*Interphase fluorescence in situ hybridization*) permite detetar alterações citogenéticas em cerca de 80% dos doentes com LLC.(1,10,15,18) Paralelamente, estudo cromossómico, após estimulação celular apropriada, pode também ser utilizado para caracterizar a patologia.(1,2,10)

O estudo do gene *TP53*, tanto a sua deleção, por FISH, como a existência de mutação, por técnicas de genética molecular, devem ser investigados ao diagnóstico, devido ao seu elevado valor preditivo e prognóstico no tratamento e evolução clínica da neoplasia. (1,2,20)

A realização de um mielograma e de uma biópsia medular podem ser necessárias para avaliar a extensão e padrões de infiltração medular da neoplasia, assim como para clarificar a relação de citopenias à infiltração leucémica medular. (2,20) Os gânglios linfáticos podem apresentar um aumento de volume em consequência da infiltração de células linfóides pequenas, assim como o baço, principalmente a polpa branca, e mais raramente na polpa vermelha.(1)

#### **1.4. Estadiamento Clínico**

O estadiamento da LLC tem por base dois sistemas comumente conhecidos e utilizados: Sistema Rai e Sistema de Binet (Tabela 1). Ambos os sistemas são simples e baseados apenas num exame físico e na contagem de células sanguíneas, não sendo necessário qualquer outro teste adicional. Atualmente, cada um destes sistemas apresentam três estadios distintos onde se pode enquadrar cada paciente.(1,2,21–23)



Tabela 1 – Estadiamento Clínico da Leucemia Linfocítica Crónica segundo os Sistemas de Binet e Rai

	Estadio	Definição
Binet	A	Sem anemia/trombocitopenia; <3 áreas linfoides envolvidas
	B	Sem anemia/trombocitopenia; ≥3 áreas linfoides envolvidas
	C	Com anemia/trombocitopenia Independente de áreas linfoides envolvidas
Rai	Baixo Risco	Linfocitose
	Médio Risco	Linfocitose e aumento do volume de gânglios linfáticos ou organomegalia
	Alto Risco	Linfocitose e anemia/trombocitopenia com ou sem aumento do volume de gânglios linfáticos

### *Sistema de Binet*

O estadiamento segundo o sistema de Binet é baseado em duas características: o número de áreas linfoides envolvidas (presença/ausência de gânglios linfáticos aumentados ou organomegalia) e a presença/ausência de anemia (baixa contagem de eritrócitos, Hb ≤ 10 g/dl) ou trombocitopenia (baixa contagem de plaquetas, plaquetas ≤100 x 10<sup>9</sup>/L).(1,2,21)

### *Sistema de Rai*

Inicialmente o sistema Rai apresentava 5 categorias para o estadiamento (Rai 0 a Rai IV),(2,22,23) porém foi verificado que a aplicação deste sistema a ensaios terapêuticos prospetivos era demasiado complicado.(22) Uma vez que, no estudo inicial, apenas três grupos apresentavam diferenças significativas este sistema foi modificado para que houvesse então apenas 3 grupos de prognóstico: doença de baixo risco, doença de médio risco e doença de alto risco. (2,22,23) O estadiamento baseado neste sistema considera: a presença ou ausência de linfocitose (ou seja, alta contagem de linfócitos) no sangue e/ou medula óssea; o aumento de gânglios linfáticos e/ou organomegalia (no fígado e/ou baço); e a presença de anemia e trombocitopenia. (22,23)



## 1.5. Fatores de prognóstico

Atualmente, estão descritos vários parâmetros que auxiliam no prognóstico e caracterização da LLC. A contagem de linfócitos é um parâmetro importante associado a diferenças significativas na sobrevivência de doentes. (23) Doentes com linfócitos abaixo de 50000 células por  $\text{mm}^3$  apresentam uma neoplasia indolente, enquanto doentes com valores superiores apresentam uma doença mais agressiva. (23) Do mesmo modo, os padrões de infiltração medular, assim como a sua extensão, refletem o estadiamento e massa tumoral da patologia. (1,2) Padrões nodulares e intersticiais são, normalmente, observados em fases iniciais da doença, sendo então associados a uma patologia mais indolente, enquanto um padrão difuso está associado a fases mais avançadas da doença, com falha medular e doença mais agressiva. (1,23)

Um outro indicador de prognóstico forte é o nível elevado de Beta-2 Microglobulina sérico (1,24) que influencia negativamente a resposta ao tratamento, o tempo livre de tratamento e a sobrevivência em pacientes com quimioimunoterapia de primeira linha. (24) De forma semelhante, o *status* mutacional de IGHV (ausência ou presença de hipermutação somática) reflete diferenças na proliferação celular, pelo que apresenta relevância crucial no prognóstico de LLC. (1,20) Células neoplásicas derivadas de IGHV não mutado demonstram maior instabilidade genética, estando associadas a um pior prognóstico e a baixas taxas de sobrevivência, quando comparado com as derivadas de IGHV mutado. (1,2,20)

Células da LLC que expressam CD38 apresentam elevada capacidade de proliferação e menor sensibilidade para quimioterapia, estando associadas a um pior prognóstico. (1,2,25,26) O ZAP-70 não é expresso em linfócitos B normais, mas a sua presença em células de LLC pode ser utilizado como marcador para o *status* mutacional de IGHV, (27) estando associado à expressão de IGHV não mutado e a um prognóstico desfavorável. (2,25) De forma semelhante, CD49d mostrou ser desfavorável em pacientes de LLC, uma vez que apresenta um papel crucial na ativação e sobrevivência de células B de LLC, através da sua ação no microambiente tumoral. (2,28)

É de notar que a expressão ZAP70, CD38 e CD49d está frequentemente relacionada com alterações citogenéticas desfavoráveis. (2,25) Alguns marcadores como os níveis de CD23 solúvel e a timidina cinase estão associados a um bom prognóstico e à não progressão da patologia. (2,20)



### 1.5.1 Alterações genéticas e citogenéticas

Diversas alterações genéticas e citogenéticas estão relacionadas com o prognóstico do doente, não havendo distinção no prognóstico dos doentes com LLC familiar é dos doentes com LLC esporádica. (9)

A deleção do braço longo do cromossoma 13, del(13q), como alteração isolada, está associada a um bom prognóstico e a uma doença menos agressiva.(1,24) Por outro lado, a del(11q), após quimioterapia, está relacionada com extensa linfadenopatia, progressão da patologia e menor sobrevivência.(24,25)

O gene *TP53* é um gene supressor tumoral cuja alteração representa um indicador de prognóstico desfavorável. Nos doentes com alteração, cerca de dois terços apresentam deleção do braço curto do cromossoma 17 (del(17p), e os restantes mutação na grelha de leitura do gene.(1,2,20) A del(17p) é mais frequentemente observada em doentes previamente tratados para LLC, anteriormente negativos para esta deleção, sugerindo possível evolução clonal relacionada com o tratamento. (24) As alterações *del(17p)/TP53*, após um regime de quimioterapia, estão associadas a uma taxa de sobrevivência mais baixa e a um menor intervalo de tempo entre a necessidade de realização dos tratamentos.(1,2,24,25)

Outros indicadores de prognóstico independente são alterações em genes como *ATM*, *NOTCH1*, *SF3B1* que se encontram associados a uma doença mais agressiva, deste modo estes doentes beneficiam de um início precoce do tratamento, independentemente do *status* mutacional IGHV. (24,25)

Mutações que afetem os genes *NOTCH1*, *SF3B1* e *TP53* são mais prevalentes do que outras alterações génicas, e estão associados a um prognóstico desfavorável.(2,20,29) Nos doentes com alterações génicas, a grande maioria apresenta mutações em apenas um gene, o que é suficiente para que se manifeste uma doença mais agressiva do que em doentes que não apresentam qualquer alteração genética. (29)

#### *Cariótipo Complexo*

Um cariótipo complexo é caracterizado pela presença de três ou mais alterações cromossómicas não relacionadas. (24,30)

Um cariótipo complexo pode ser classificado em três subtipos mediante o número de alterações não relacionadas. Um cariótipo de baixa complexidade caracterizado por 3 alterações cromossómicas, cariótipo de complexidade intermédia caracterizado por 4 alterações, e cariótipo de elevada complexidade caracterizado por 5 ou mais alterações cromossómicas. (24,30)

O cariótipo de elevada complexidade é um fator de prognóstico desfavorável independente do *status* mutacional IGHV e das alterações do gene *TP53*. Os de baixa complexidade ou intermédio apenas são clinicamente relevantes se ocorrerem em simultâneo com alterações do gene *TP53*. (24,30) É relevante



mencionar que cariótipos baixo/médio podem adquirir alterações adicionais e evoluir para um CC muito complexo.(30)

As trissomias 12 e/ou 19 em cariótipos complexos foram associadas a uma forma indolente da patologia. (30) O cariótipo complexo associa-se a prognósticos desfavoráveis nos pacientes tratados com *ibrutinib*. O cariótipo de elevada complexidade é de mau prognóstico após regimes à base de *venetoclax*.(24)

## 1.5.2 Sistemas de Caracterização de Prognóstico

Atualmente, existem diversos sistemas desenvolvidos que permitem entender o prognóstico do doente e o orientar a escolha do tratamento. Estes sistemas utilizam características já associadas a um pior ou melhor prognóstico, como alterações citogenéticas, *status* de IGHV, alterações em gânglios linfáticos entre outros.(24,31)

Entre os modelos atualmente descritos, o mais amplamente reconhecido e utilizado é o índice de prognóstico internacional de LLC (CLL-IPI).(20,32) Este sistema utiliza 5 parâmetros amplamente conhecidos e aplicáveis de modo a estratificar os pacientes em 4 grupos distintos consoante o nível de risco do paciente (risco baixo, médio, alto e muito alto). Este modelo combina características biológicas e genéticas da doença com fatores de risco para a mesma, de modo que seja facilmente aplicado.(31)

O 5 parâmetros foram analisados e classificados com um valor (a pontuação de risco), de modo que a soma total (valor entre 0 e 10) classificasse o paciente consoante o seu grupo de risco (Tabela 2). Os parâmetros incluem alterações em *TP53*, *status* de IGHV, idade, estadió clínico e concentração de Beta-2 Microglobulina. (31)

Tabela 2 - Parâmetros Prognósticos e Pontuação de Risco no Índice de Prognóstico Internacional para Leucemia Linfocítica Crónica (pontuação do risco máximo: 10 pontos).

Parâmetro Avaliado	Critério de risco	Pontuação de risco
Alteração em TP53	Presença de deleção/mutação	4 pontos
Status mutacional de IGHV	IGHV não mutado	2 pontos
$\beta$ 2-microglobulina sérica	>3,5 mg/L	2 pontos
Estadiamento	Binet B/C ou Rai médio/alto risco	1 ponto
Idade	Superior a 65 anos	1 ponto



## 1.6. Tratamento

Em fases iniciais da doença, diversos estudos com agentes quimioimunoterapêuticos demonstraram que estes não possuem benefícios sobre a sobrevivência de pacientes. Por este motivo, deve ser adotada uma estratégia de monitorização, através de hemogramas diferenciais a cada 3 ou 6 meses, até ser observada progressão da doença. (2,20,24,33,34)

A doença é considerada sintomática quando, pelo menos, um dos seguintes critérios está presente: desenvolvimento de anemia/trombocitopenia; esplenomegalia/linfadenopatia progressiva ou sintomática; linfocitose progressiva; complicações autoimunes; envolvimento extraganglionar sintomático; outros sintomas (como: perda de peso e fadiga significativa, febre superior a 38°C por 2 semanas e suores noturnos por 1 mês, sem que haja evidência de infecção). (32)

Quando se inicia a terapia, a escolha do tratamento deve ter em consideração marcadores como *status* de *IGHV*, mutações em genes como *NOTCH1*, *SF3B1* e *BIRC3* e alterações citogenéticas assim como a idade do doente e comorbidades de modo que se possa estabelecer a melhor estratégia terapêutica para cada paciente. Estes marcadores podem igualmente ser estudados após a terapia, para excluir a evolução da patologia. (1,32)

Em doentes sem alteração no gene *TP53*, são recomendados regimes à base de inibidores da cinase de tirosina bruton (BTKi covalentes), como *acalabrutinib* e *ibrutinib*, ou *venetoclax* (inibidor oral do linfoma de células B). (32–34)

A utilização de BTKi covalentes em associação com anticorpos monoclonais anti CD-20 nomeadamente *acalabrutinib*+*obinutuzumab*, está associada a uma melhor taxa de sobrevivência. (20,24,32,34) Do mesmo modo, a combinação de *venetoclax* com *obinutuzumab* demonstra altas taxas de sobrevivência, independentemente das comorbidades e idade dos pacientes. (20,24,32,34)

Quando o doente é jovem (menos de 65 anos), com alteração em *IGHV*, sem alteração no gene *TP53* e sem comorbidades, a quimioterapia com FCR (fludarabina, ciclofosfamida e rituximab) pode ser recomendada, embora apenas quando os restantes regimes terapêuticos são contraindicados. (20,24,32,34)

Em doentes com alterações no gene *TP53*, a quimioimunoterapia não é recomendada. (20,24,32,34) A monoterapia com *ibrutinib* é uma das terapias de preferência nestes pacientes. (20,24,33) *Venetoclax* em monoterapia, (20,33) assim como a sua combinação com *obinutuzumab* (20,24,32,34) ou *ibrutinib* (24) são também regimes de preferência nestes indivíduos. (20,24,32,34)

Após o tratamento inicial, na qual se verificou remissão, o reinício da terapia apenas é realizado se a neoplasia se tornar novamente sintomática, segundo os critérios anteriormente descritos. (2) A terapia de



2ª linha deve ter em consideração os agentes utilizados no primeiro tratamento, a duração da remissão e se ocorreu resistência. (24,32)

A quimioterapia não é, geralmente, recomendado a indivíduos que já a tenham realizado, nem a doentes com alterações no gene *TP53*. (2,34)

Em doentes previamente tratados com BTKi covalente pode optar-se por ajustar a dose a tomar ou por outro BTKi covalente. (24,34) Caso se verifique resistência a estes agentes, devido a mutações em genes como *BTK*, *PLCG2*, *BCL2*, (1) deve ser selecionado um tratamento à base de venetoclax, (24,32,34) sendo recomendada a sua utilização conjunta com rituximab (20,33,34) em todos os pacientes, incluindo aqueles com alterações no gene *TP53*. (24)

Em pacientes previamente tratados com regimes à base de venetoclax, a escolha de preferência é um BTKi covalente. (20,24,34) O reinício de venetoclax pode ser considerado se passaram mais de 2 anos até se dar o relapso. (24,34)

Antes do surgimento de novos agentes terapêuticos, o transplante alogénico de células estaminais (alo-HCT) constituía o tratamento de escolha em doentes de alto risco, que apresentassem *del(17p)/TP53* ou doença refratária após tratamento com *fludarabina*, (24,33) embora, atualmente esta opção não seja relevante.(24,33,34) Apesar disto, o alo-HCT é recomendado a pacientes de LLC refratário a, pelo menos, um dos novos agentes terapêuticos, mas que ainda respondam a inibidores do recetor de células B ou *venetoclax*. (20,24,33,34)

A terapia com células CAR-T dirigida ao marcador CD19 é uma abordagem avançada e eficaz para pacientes com risco muito alto de LLC, sendo recomendada antes de um transplante de células-tronco hematopoéticas (alo-HCT) (33,34) e indicada para aqueles que não responderam a outros tratamentos, especialmente após a progressão da doença.(20,34)



## 2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar citogeneticamente doentes com diagnóstico de Leucemia Linfocítica Crónica.

Especificamente, os objetivos deste projeto foram:

1. Identificar e descrever alterações citogenéticas em doentes de LLC
2. Correlacionar as alterações citogenéticas do doente com implicações clínicas relevantes.
3. Demonstrar a relevância do estudo citogenético no diagnóstico diferencial, prognóstico e orientação terapêutica na LLC



### 3. Métodos

#### 3.1. Amostras

Para o presente estudo foram utilizados os todos casos com suspeita de LLC e os casos para monitorização/seguimento da LLC rececionados no Serviço de Genética Laboratorial do Departamento de Medicina Laboratorial, do Instituto Português de Oncologia do Porto, no período de 16 de setembro de 2024 e 17 de janeiro de 2025.

Estas amostras foram provenientes de pacientes do IPO-Porto e de outros hospitais sem capacidade para realizar estas análises citogenéticas, sendo as amostras de diversas natureza, nomeadamente de medula óssea, sangue periférico e de gânglio linfático. Apesar do sangue periférico ser considerado o tipo de amostra preferencial para o estudo da LLC, devido à taxa de sucesso para a obtenção de resultados, (35,36) quando o tumor invade a medula óssea, esta é uma amostra alternativa para o estudo citogenético. (36)

Para o estudo de citogenética convencional, a colheita das amostras de sangue periférico e de medula óssea deve ser efetuada para tubos com heparina, uma vez que a solução anticoagulante de EDTA interfere com as concentrações de magnésio, diminuindo a capacidade de divisão celular e, conseqüentemente, compromete a proliferação adequada das células, resultando num menor número de metafases disponíveis para análise. (36,37)

Para o estudo de FISH, as amostras podem ser colhidas em tubos contendo heparina ou EDTA. Também podem ser utilizadas as suspensões celulares utilizadas para o cariótipo, uma vez que a técnica requer apenas a integridade do DNA. (38,39)

Cada amostra estava identificada com informação referente ao doente, nomeadamente nome do doente, número de registo no IPO e o número de registo da análise para citogenética (GCXXXX).

Em todas as amostras rececionadas após registo e sua identificação, foi efetuado o estudo citogenético convencional e molecular. Neste Serviço, as amostras são colocadas em cultura à segunda-feira, terça-feira ou sexta-feira, uma vez que são culturas de 72h. As amostras rececionadas nos outros dias da semana são armazenadas, à temperatura ambiente, e são colocadas em cultura à sexta-feira.



### 3.2. Citogenética Convencional

#### *Cultura Celular*

Uma vez que a proliferação espontânea de células neoplásicas de LLC *in vitro* é muito reduzida, (36) a cultura celular é suplementada com um mitogénio e o tempo de cultura é prolongado (entre 3 a 5 dias), em contraste com as culturas celulares de 24 horas que são habitualmente realizadas. (36,40)

No Serviço de Genética Laboratorial IPO-Porto é usado como meio de cultura o RPMI 1640, que apresenta uma composição enriquecida em sais minerais, o agente redutor glutathione e elevadas concentrações de vitaminas, incluindo vitamina B8. (41) A este meio é adicionado o GlutaMAX que, além de conter o aminoácido essencial L-glutamina, contém reagentes que minimizam a acumulação tóxica de amoníaco e aumentam a viabilidade e crescimento celular. (41) Este meio é, ainda, suplementado com soro fetal bovino (FBS) (concentração final de 20%), que enriquece o meio em proteínas, lípidos e fatores de crescimento, o que permite a preservação da viabilidade celular e promove o crescimento celular, (42) sendo este designado por meio completo. A este meio é ainda adicionado uma solução de penicilina/estreptomina (concentração final de 1%) para prevenir a proliferação bacteriana. (43) Como mitogénio, é adicionado ao meio completo uma mistura de IL-2 e DSP30, que é um oligonucleótido sintético capaz de ativar células do sistema imune e induzir a sua proliferação. (40)

O protocolo utilizado para a cultura celular foi o protocolo de rotina do Serviço de Genética Laboratorial do IPO-Porto (Figura 1). Assim, em cada frasco de cultura, é colocado, cerca de 8 a 10 mL do meio completo, 200 µL de DSP30 [Gibco, Thermo Fisher Scientific, New York, USA] e 1 mL de IL-2 [Gibco, Thermo Fisher Scientific, New York, USA]. Quando a amostra é de medula óssea é adicionado, aproximadamente, 0,8mL da amostra ao frasco de cultura. Quando a amostra é sangue periférico é calculado o volume de amostra que se deve adicionar, a partir do número de leucócitos registado no hemograma, de modo a se obter uma densidade celular ótima para cultura, cerca de  $2 \times 10^6$  células/mL de cultura. Quando a amostra é um ou parte de um gânglio linfático, é efetuado primeiramente uma desagregação celular mecânica (numa placa de petri com a ajuda de pinças, processo realizado numa câmara de fluxo). A suspensão celular é ressuspendida em meio de cultura e colocada em cultura durante 24 horas.

Os frascos de cultura são, posteriormente, incubados numa estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Após este tempo de incubação, é adicionado a cada frasco de cultura 200 µL de *Colcemid* [Gibco, Thermo Fisher Scientific, New York, USA], sendo colocados novamente na mesma estufa durante 20 minutos. O *Colcemid* inibe a formação do fuso mitótico, o que permite que as células em mitose fiquem em metafase, altura em que a condensação dos cromossomas é máxima. (4–6,10)

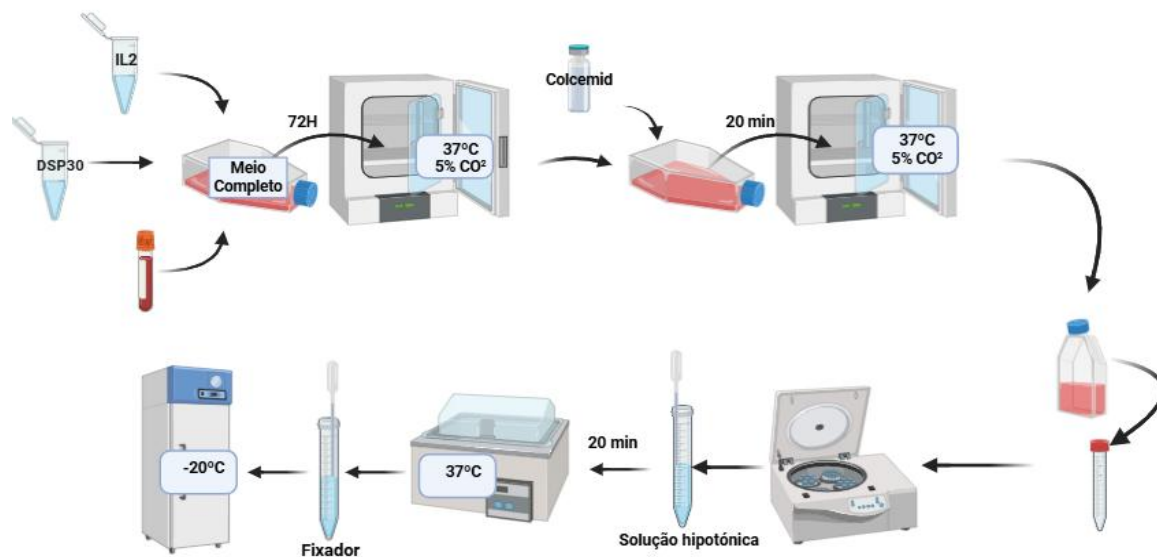


Figura 1 – Representação esquemática do protocolo de cultura celular e processamento de amostras de leucemia linfocítica crónica para estudo citogenético.

De seguida, a suspensão celular presente num frasco de cultura é transferida para um tubo cónico de 15mL, devidamente identificado, e centrifugado a 1400 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante é removido e, em seguida, é adicionada uma solução hipotónica (0.06M KCl) [Sigma-Aldrich™, Merck, KGaA, Saint Louis, MO, USA] pré-aquecida a 37°C até perfazer 14mL. Esta solução leva à criação de um gradiente de concentração entre o meio extracelular e o intracelular, promovendo a entrada de água para a célula e, conseqüentemente, as células ficam túrgidas, (39) o que permite uma melhor dispersão dos cromossomas durante a preparação das lâminas. (39,44) O pré-aquecimento da solução a 37º permite acelerar o processo de osmose e torna a membrana plasmática mais elástica. (39)

O tubo cónico é, posteriormente, colocado em banho-maria a 37º durante 20 minutos, seguido de uma nova centrifugação e remoção do sobrenadante. Numa hotte química, o tubo é agitado suavemente no vórtex para se proceder à ressuspensão celular, sendo posteriormente, adicionada, lentamente, a solução fixadora, composta por uma mistura de metanol e ácido acético numa proporção de 3 para 1, até perfazer 2 mL, podendo depois ser adicionado o restante fixador, até aos 12mL. Este processo leva à desidratação e preservação da suspensão celular, permitindo o endurecimento das membranas e da cromatina, preparando os cromossomas para a realização da técnica de bandas. (39)

Posteriormente, a suspensão é colocada a -20°C, durante, pelo menos, 15 minutos. De seguida, é realizada uma lavagem (centrifugação, remoção de sobrenadante e adição de novo fixador) e os tubos foram armazenados a -20°C até que à realização do espalhamento.



### *Espalhamento de células e técnica de bandas*

Antes de se iniciar o espalhamento, foram realizadas várias lavagens do material para eliminar restos celulares e citoplasmáticos presentes na suspensão. Após a última lavagem, os sedimentos celulares foram suspensos numa quantidade de fixador adequado para o espalhamento.

As lâminas de vidro, armazenadas em etanol a 99,6%, foram retiradas, limpas e identificadas com o número do caso. Posteriormente, foram mergulhadas em água destilada e colocadas a 0°C.

Para o espalhamento do sedimento celular, as lâminas foram colocadas num plano inclinado, tendo sido distribuídas 4 a 5 gotas da suspensão celular por lâmina, tendo sido colocadas na estufa a 65°C para secagem. Para ocorrer o processo de envelhecimento as lâminas podem ser mantidas na estufa a 65°C durante a noite ou transferidas para uma estufa a 90°C por 90 minutos.

Antes de proceder à coloração, cada lâmina foi mergulhada numa solução de 1,2% de tripsina [Sigma-Aldrich™, Merck, KGaA, Saint Louis, MO, USA] diluída em tampão Fosfato Sorensen 1:1 [Merck, KGaA, Saint Louis, MO, USA] e, posteriormente, apenas em solução de tampão fosfato para lavagem. De seguida, as lâminas foram colocadas num suporte horizontal e cobertas com corante durante 3 minutos e 30 segundos. O corante utilizado foi o corante Leishman [Merck, KGaA, Ontario, Canada], diluído em metanol absoluto (1,5g/L) e dissolvido numa solução de Gurr [Gibco, Thermo Fisher Scientific, New York, USA], que permite estabilizar o pH para a coloração, (45) numa proporção de 1 para 3. Após a coloração, as lâminas foram lavadas rapidamente em água destilada para retirar o excesso de corante.

Após a secagem, as lâminas foram colocadas no CytolInsight GSL system, que é um sistema automático de captura de imagens. Através do software CytoVision é possível realizar a análise das metafases no computador. Como definido por diversas guidelines de citogenética, (35,44) para cada caso foram analisadas, quando possível, 20 metafases.

### **3.3. Citogenética Molecular**

Na técnica de FISH, em cinco dos casos em diagnóstico foi aplicado o painel completo de sondas utilizadas no IPO-Porto para a LLC, que inclui as deleções de 11q, 13q e 17p, a trissomia 12 e translocações envolvendo o locus IGH (Tabela 3). Nos restantes dois casos em diagnóstico foi exclusivamente estudada a fusão *IGH::CCND1*. Nos casos em *follow-up* apenas foram utilizadas as sondas de deleção 13q e 17p.



Tabela 3 – Painel de sondas de FISH, utilizadas ao diagnóstico de Leucemia Linfocítica Crónica no IPO-Porto: alterações genéticas em estudo, sondas utilizadas e padrões de resultados.

Alteração em Estudo	Sondas utilizadas	Resultado sem alteração	Resultado com alteração
Del(11q)	ATM (11q22)/SE 11	2G2R	2G1R
Trissomia 12	SE 12 (D12Z3)/ SE 6	2G2R	3G2R
Del(13q)	D13S319	2G2R	2G1R
Translocações com locus IGH	IGH (14q32) Break	2F	1F1R1G
Del(17p)	TP53 (17p13)/SE 17	2G2R	2G1R

2G, dois sinais verdes independentes; 2R, dois sinais vermelhos independentes; 2F, dois sinais de fusão; 1F, um sinal de fusão; 1G, dois sinais verde; 1R, dois sinais vermelho.

### 3.3.1. Técnica de FISH

O protocolo utilizado para a técnica de FISH foi o protocolo de rotina do Serviço de Genética Laboratorial do IPO-Porto. Quando as amostras de LLC foram rececionadas, para FISH, foi realizada fixação direta, tendo sido adicionado 1mL de amostra a um tubo cónico 7mL de meio RPMI ou de soluto hipotónico a 37°C. Após centrifugação a 1400 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi removido e foi adicionada a solução hipotónica aquecida a 37°C, até perfazer 12mL. A suspensão foi colocada em banho-maria a 37°C durante 20 minutos, após os quais foi realizada a fixação da suspensão, como anteriormente descrito no ponto de *culturas celulares* do protocolo de citogenética convencional.

Posteriormente, a suspensão foi colocada a 20°C, durante, pelo menos, 15 minutos. De seguida, foi realizada a lavagem e as suspensões foram novamente armazenadas a -4°C até que se proceda à realização do restante ensaio.

As lâminas a utilizar foram identificadas com o número do paciente, assim como, com a sonda utilizada, e foi demarcada a área de hibridação. A esta área foram adicionados 8µl da suspensão de células e, posteriormente, 10µl da sonda relativa à alteração em estudo, exceto na sonda SE 12 (D12Z3)/SE 6, onde foram adicionados 2 µl de SE 12 [Leica Biosystems, Amsterdam, The Netherlands], 2 µl de SE 6 [Leica Biosystems, Amsterdam, The Netherlands] e 6µl de buffer [Leica Biosystems, Amsterdam, The Netherlands]. Após a colocação da lamela sobre a área delimitada as lâminas foram colocadas no termociclador, num programa de 8 minutos a 80°C, para ocorrer a desnaturação, e 18 horas a 37°C, para ocorrer a hibridação da sonda na sequência alvo. Posteriormente, as lamelas foram removidas das



lâminas e foram mergulhadas em 0,4xSSC/0,3% Tween [Sigma-Aldrich™, Merck, KGaA, Ontario, Canada] a 72<sup>o</sup> durante 2 minutos. De seguida, as lâminas foram transferidas para uma solução 2xSSC/0,1% Tween à temperatura ambiente durante 1 minuto, sendo protegidas da luz de forma a preservar a fluorescência.

Após o término da lavagem, foram adicionados 10µl de DAPI [VectaShield, Vector Laboratories, Newark, CA, USA]. à área delimitada. Uma nova lamela foi colocada sobre a lâmina e a humidade extra foi retirada. Até se proceder à análise, as lâminas foram mantidas protegidas da luz e a uma temperatura de -4<sup>o</sup>C.

As lâminas são analisadas com recurso a um microscópio de fluorescência, conectado a um computador onde, com recurso ao software CytoVision, é possível fotografar o que é visualizado no microscópio. Para cada caso foram analisados 100 núcleos ao diagnóstico e 200 em follow-up.

### 3.3.2. Análise e interpretação dos resultados obtidos por FISH

#### Utilização do conjunto de sondas ATM (11q22)/SE 11

O conjunto de sondas ATM (11q22)/SE 11 permite identificar os cromossomas 11 e detetar deleções na região 11q22 (Figura 2). A sonda SE 11 utiliza um oligonucleotídeo conjugado com FITC complementar a uma sequência específica do centrómero do cromossoma 11, emitindo fluorescência verde após excitação a um comprimento de onda de 495nm. A sonda ATM(11q22) utiliza um oligonucleotídeo conjugado com PE complementar a uma sequência específica do gene ATM, emitindo fluorescência vermelha após excitação a um comprimento de onda de 550nm. Assim, uma célula que apresente uma deleção 11q irá apresentar dois sinais verdes, correspondentes aos dois cromossomas 11 e um sinal vermelho corresponde apenas a um gene *ATM*.

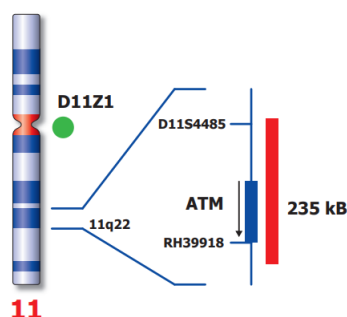


Figura 2 - Mapa da sonda ATM (11q22)/SE 11 [Leica Biosystems, Amsterdam, The Netherlands]

### Utilização do conjunto de sondas SE 12 (D12Z3)/SE 6

O conjunto de sondas SE 12 (D12Z3)/SE 6 permite identificar os cromossomas 12 e 6. A sonda SE 12 utiliza um oligonucleotídeo conjugado com FITC complementar a uma sequência específica do centrómero do cromossoma 12, emitindo fluorescência verde após excitação (495nm). A sonda SE 6 utiliza um oligonucleotídeo conjugado com PE complementar a uma sequência específica do centrómero do cromossoma 6, emitindo fluorescência vermelha após excitação (550nm). Assim, uma célula que apresente uma trissomia 12 irá apresentar três sinais verdes, correspondentes aos três cromossomas 12 e dois sinais vermelhos correspondentes aos dois cromossomas 6.

### Utilização do conjunto de sondas D13S319/13q34

O conjunto de sondas D13S319/13q34 permite identificar o cromossoma 13 e, em simultâneo, detetar deleções na região 13q34 (Figura 3). A sonda específica 13q34, utiliza um oligonucleotídeo conjugado com FITC (excitação a 503nm, emissão verde) complementar a esta região, enquanto a sonda D13S319, utiliza um oligonucleotídeo com PE (excitação a 547nm, emissão vermelha) que deteta o número de cópias deste gene na região 13q14.2. Em caso de deleção 13q, verificam-se dois sinais verdes e apenas um vermelho, indicando perda de uma cópia de *D13S319*.

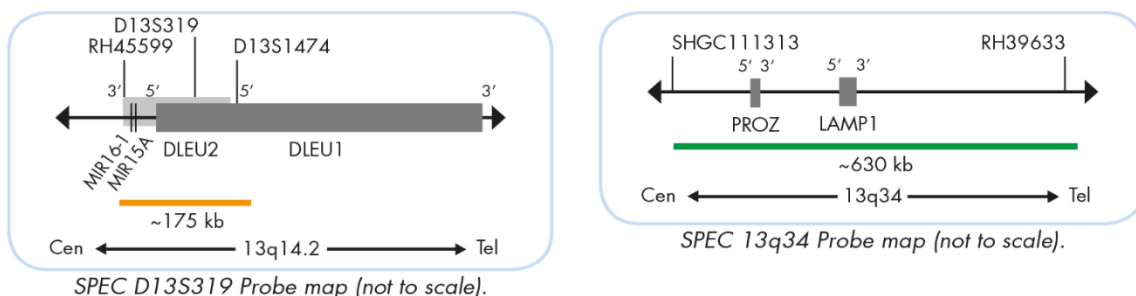


Figura 3 - Mapa da sonda D13S319/13q34 [ZytoLight, ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Alemanha]

### Utilização do conjunto de sondas IGH (14q32) Break

A sonda IGH (14q32) Break permite detetar translocações que envolvem o locus IGH, localizado na região 14q32 (Figura 4). A sonda específica para a região proximal do locus IGH, utiliza um oligonucleotídeo conjugado com PE (excitação a 550nm, emissão vermelha) que deteta o número de cópias do gene nesta região. A sonda específica para a região distal do locus IGH utiliza um oligonucleotídeo conjugado com FITC (excitação a 495nm, emissão verde) complementar a esta região. Assim, uma célula que apresente uma translocação em IGH, irá apresentar um sinal de fusão, e um sinal verde e um vermelho independentes.

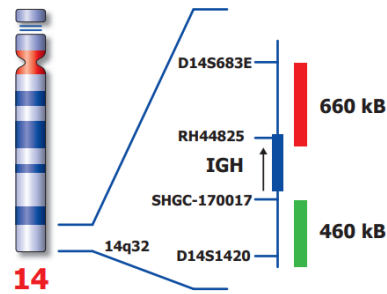


Figura 4 - Mapa da sonda IGH (14q32) Break [Leica Biosystems, , Amsterdam, The Netherlands]

#### Utilização do conjunto de sondas *BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21)*

Em casos específicos, pode ser realizado o estudo da translocação específica do locus IGH com o gene *BCL2* (Figura 5). A sonda *BCL2* (18q21), utiliza um oligonucleotídeo conjugado com FITC complementar a uma sequência específica da região 18q21, emitindo fluorescência verde após excitação (495nm). A sonda IGH (14q32) utiliza um oligonucleotídeo conjugado com PE complementar a uma sequência específica em 14q32, emitindo fluorescência vermelha após excitação (550nm). Assim, uma célula que apresente uma translocação (14;18)(q32;q21) irá apresentar dois sinais de fusão correspondente à translocação e um sinal vermelho e um sinal verde independentes.

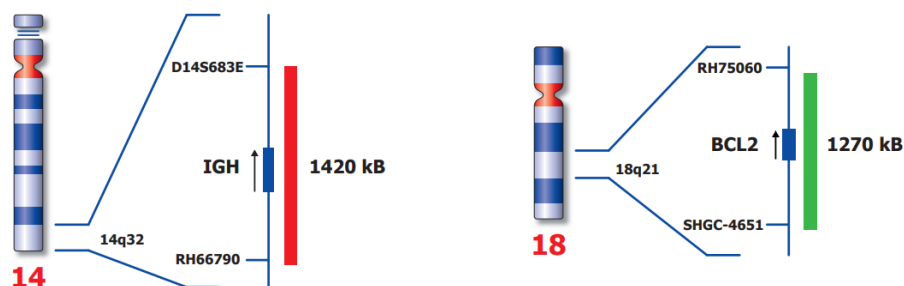


Figura 5 - Mapa da sonda *BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21)* [Leica Biosystems, , Amsterdam, The Netherlands]

#### Utilização do conjunto de sondas *TP53(17p13)/SE 17*

O conjunto de sondas *TP53(17p13)/SE 17* permite identificar o cromossoma 17 e, em simultâneo, detetar deleções na região 17p13 (Figura 6). A sonda específica SE 17, utiliza um oligonucleotídeo conjugado com FITC (excitação a 495nm, emissão verde) complementar a uma sequência do centrómero do cromossoma 17, enquanto a sonda *TP53*, utiliza um oligonucleotídeo com PE (excitação a 550nm, emissão vermelha) que deteta o número de cópias deste gene na região 17p13. Assim, uma célula que apresente uma deleção 17p irá apresentar dois sinais verdes, correspondentes aos dois cromossomas 17 e um sinal vermelho corresponde apenas a um gene *TP53*.

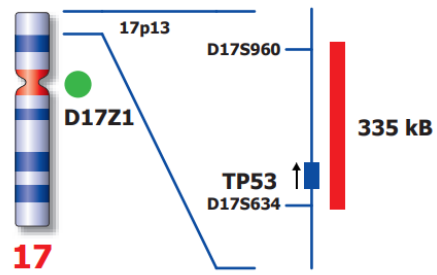


Figura 6- Mapa da sonda TP53(17q13)/SE 17 [Leica Biosystems, , Amsterdam, The Netherlands]

## 4. Resultados

Durante os quatro meses de estágio, foram rececionadas no Laboratório de Citogenética do IPO – Porto 11 casos de LLC, sendo sete (63,6%) do género feminino e quatro (36,4%) do género masculino. O intervalo de idade dos doentes foi entre os 55 e os 83 anos, sendo a mediana de 75 anos e a média de aproximadamente 73 anos. Dos 11 casos, sete doentes (63,6%) encontravam-se em fase de diagnóstico e quatro doentes (36,4%) em seguimento (*follow-up*) para averiguar a eficácia do tratamento, a evolução/progressão da patologia ou a possibilidade de participar num dado ensaio clínico. O tipo de amostras analisadas foram medula óssea (cinco), sangue periférico (cinco) e gânglio linfático (uma) (Figura 7).

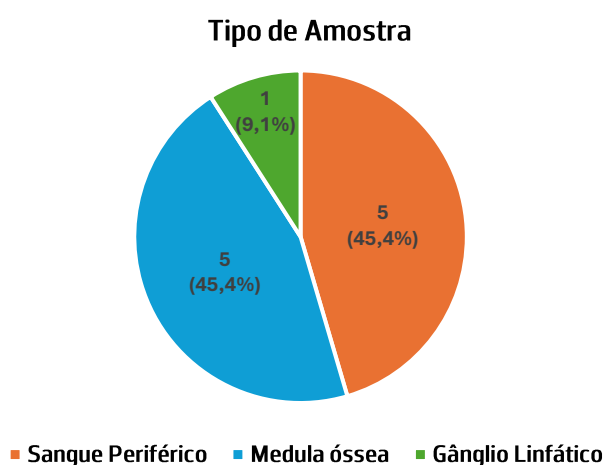


Figura 7- Distribuição das amostras utilizadas no estudo citogenético de doentes com Leucemia Linfocítica Crónica

### 4.1. Citogenética Convencional – Cariótipo

Dos 11 casos estudados, três apresentaram um cariótipo normal, três um cariótipo simples, com apenas uma ou duas alterações citogenéticas e cinco casos apresentaram cariótipos complexos, com três ou mais alterações cromossómicas (Tabela 4). De entre os cinco casos com cariótipos complexos, dois são de elevada complexidade (40%), com mais de quatro alterações citogenéticas, enquanto três são de baixa complexidade (60%), com três ou quatro alterações cromossómicas (Tabela 4).

Através da análise do cariótipo por citogenética convencional, foi detetada num caso de elevada complexidade (caso K) uma deleção do braço longo do cromossoma 11 e num caso simples (caso D) foi detetada uma trissomia do cromossoma 12 (Tabela 4). No estudo por citogenética convencional não foi detetada del(13q) nem a del(17p) em todos os casos em estudo.



Tabela 4 – Classificação e descrição do cariótipo dos 11 casos clínicos analisados no estudo citogenético de pacientes com Leucemia Linfocítica Crónica.

Classificação do cariótipo	Caso	Cariótipo	N (%)
Normal	E	46,XX[20]	3 (27,3)
	F	46,XY[20]	
	H	46,XX[20]	
Simples	A	46,XX,add(15)(q22)[20]	3 (27,3)
	B	46,XY,t(13;14)(q14;q32)[18]/46,XY[2]	
	G	46,XX,t(11;14)(q13;q32)[2]/45,X,-X,t(11;14)(q13;q32)[12]/ 46,XX,t(11;14)(q13;q32),der(18)t(8,18)[5]/46,XX[1]	
Complexo	C**	46,XY,add(1)(q31),del(3)(p21),add(6)(q25),-9,add(9)(p12),+mar,inc[18]/ 46,XY[2]	5 (45,4)
	D*	47,XY,+12,del(14)(q24)[8]/47,idem,t(14;18)(q32;q21)[12]	
	I*	46,XX,t(8;22;18)(p23;q11.2;q21)[10]/46,idem,del(11)(q21q23)[6]/ 46,idem,t(1;12;4)(p13;q12;p14),del(9)(q22q34)[4]	
	J*	46,XX,add(1)(q41),add(13)(q13),der(9)t(9;13)(p22;q14)[9]/ 46,idem,add(10)(q22)[3]/46,XX[8]	
	K**	45,X,t(X;9)(q13;p21),der(7)t(7;8)(q31;q21),del(11)(q14q23),der(17;20)(q10;q10), inc[cp18]/46,XX[20]	
<b>Total</b>			11 (100)

\* Cariótipo de baixa complexidade; \*\* Cariótipo de elevada complexidade.

## 4.2. Citogenética Molecular – Técnica de FISH

Os onze casos em estudo foram analisados pela técnica de FISH. Para cinco dos casos em fase de diagnóstico foi realizado o painel completo de sondas para LLC, nomeadamente as das deleções em 11q, 13q e 17p, a trissomia 12 e para o *IGH*. Nos restantes dois casos de diagnóstico (F e G) foi, apenas, estudada a presença da fusão *IGH::CCND1*, resultante da *t(11;14)(q13;q32)*, com a sonda *CCND1/IGH t(11;14) Fusion* que não está incluída no painel habitual de LLC. Relativamente aos quatro casos em *follow-up* foram investigadas apenas alterações citogenéticas específicas do painel (*del(17p)* e/ou *del(13q)*) (Tabela 5).



Nos cinco casos de diagnóstico onde o painel completo de sondas para LLC foi estudado, a deleção do braço longo do cromossoma 11 foi detetada em apenas em um caso (9,1%) e a trissomia 12 foi observada em dois casos (18,2%). De entre estes diagnósticos, foi também observada a deleção do braço curto do cromossoma 17 em dois casos (18,2%) e a fusão *IGH::BCL2* em um dos casos. Relativamente aos dois casos de diagnóstico onde foi estudada a fusão *IGH::CCND1*, esta apenas foi observada num dos casos.

A deleção do braço longo do cromossoma 13 foi a alteração mais frequente, estando presente em quatro casos (36,4%), dois deles em fase de diagnóstico e dois deles em fase de *follow-up*.

Tabela 5 – Alterações citogenéticas encontradas nos 11 casos em estudo, através da técnica de FISH utilizando o painel de sondas utilizadas no IPO-Porto, para o estudo de casos com Leucemia Linfocítica Crónica, e a sonda para a fusão *IGH::CCND1*, de acordo com a fase em que o doente se encontra

Fase	Caso	FISH					
		Del(11q)	Trissomia 12	Del(13q)	IGH (14q32)	Del(17p)	<i>IGH::CCND1</i>
Diagnóstico	<b>B</b>	-	-	+	-	-	NR
	<b>D</b>	-	+	-	+	+	NR
	<b>E</b>	-	+	-	-	-	NR
	<b>F</b>	NR	NR	NR	NR	NR	-
	<b>G</b>	NR	NR	NR	NR	NR	+
	<b>J</b>	-	-	+	-	-	NR
	<b>K**</b>	+	-	-	-	+	NR
<i>Follow-up</i>	<b>A</b>	NR	NR	NR	NR	-	NR
	<b>C**</b>	NR	NR	NR	NR	-	NR
	<b>H</b>	NR	NR	+	NR	-	NR
	<b>I</b>	NR	NR	+	NR	-	NR

NR-estudo não realizado para esta alteração genética; (-)-resultado negativo para a alteração citogenética em estudo; (+)-resultado positivo para a alteração citogenética em estudo; \*\* Cariótipo de elevada complexidade.

### 4.3. Análise de Casos

Relativamente aos casos que foram classificados com cariótipo normal, segundo o estudo efetuado por citogenética convencional (casos E, F e H) foram detetadas anomalias cromossómicas pela Técnica de FISH através do uso de painel de sondas utilizadas no IPO-Porto, em dois dos casos com Leucemia Linfocítica Crónica. Assim, através da técnica de FISH foi possível identificar uma trissomia 12 em 6% das células analisadas do caso E (Figura 8), não tendo sido identificadas outras alterações genéticas em estudo (Tabela 6). No caso H, onde apenas foram estudadas as deleções de 17p e 13q, a anomalia del(13q) foi detetada em 74% das células analisadas, não tendo sido detetada qualquer

alteração em 17p. No caso F, a fusão *IGH::CCND1* não foi detetada, tendo esta sido a única alteração estudada (Tabela 6).

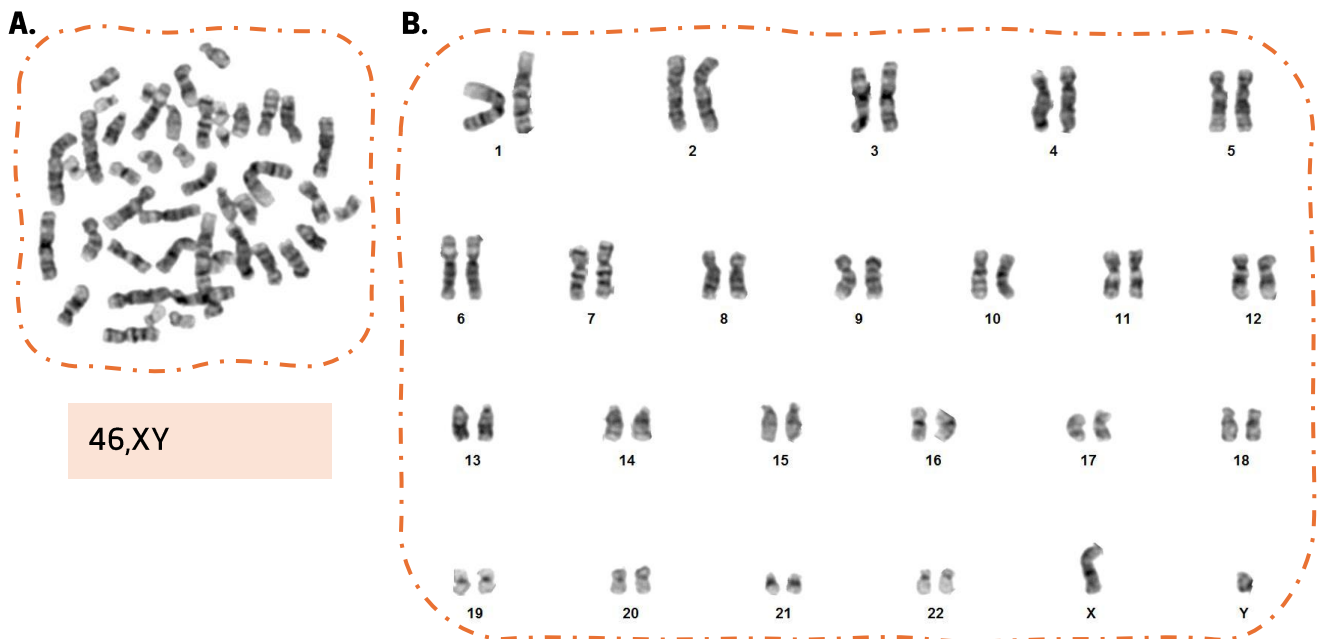


Figura 8 – Metafase (A) e Cariograma (B) normal do caso E.

Tabela 6 – Alterações citogenéticas encontradas nos 11 casos em estudo, através da técnica de FISH, utilizando o painel de sondas utilizadas no IPO-Porto, para o estudo de casos com Leucemia Linfocítica Crónica, e a sonda para a fusão *IGH::CCND1*, de acordo com o cariótipo.

Caso	Classificação do cariótipo	FISH					
		Del(11q)	Trissomia 12	Del(13q)	IGH (14q32)	Del(17p)	<i>IGH::CCND1</i>
E	Normal	-	+	-	-	-	NR
F		NR	NR	NR	NR	NR	-
H		NR	NR	+	NR	-	NR
A	Simples	NR	NR	NR	NR	-	NR
B		-	-	+	-	-	NR
G		NR	NR	NR	NR	NR	+
C**	Complexo	NR	NR	NR	NR	-	NR
D		-	+	-	+	+	NR
I		NR	NR	+	NR	-	NR
J		-	-	+	-	-	NR
K**		+	-	-	-	+	NR

NR-estudo não realizado para esta alteração genética; (-)-resultado negativo para a alteração citogenética em estudo; (+)-resultado positivo para a alteração citogenética em estudo; \*\* Cariótipo de elevada complexidade.

Nos casos classificados com cariótipo simples, segundo o estudo efetuado por citogenética convencional (Tabela 6) foram detetadas anomalias cromossómicas pela Técnica de FISH em 2 dos casos com Leucemia Linfocítica Crónica. Assim, no caso A, que apresentava uma alteração estrutural no



cromossoma 15 nas 20 metafases analisadas por citogenética convencional, não foi observada a deleção de 17p pela técnica de FISH. De referir que esta foi a única alteração estudada por FISH (Tabela 6). O caso B, que por citogenética convencional, mostrou um cariótipo com uma translocação envolvendo os cromossomas 13 e 14, em 18 das 20 metafases analisadas (Figura 9), por FISH (Figura 10), apenas foi observada/detetada a deleção de 13q em 76% das células analisadas (Figura 10C). No restante painel de sondas para LLC, não foram detetadas alterações (Figura 10A, 10B e 10D)(Tabela 6).

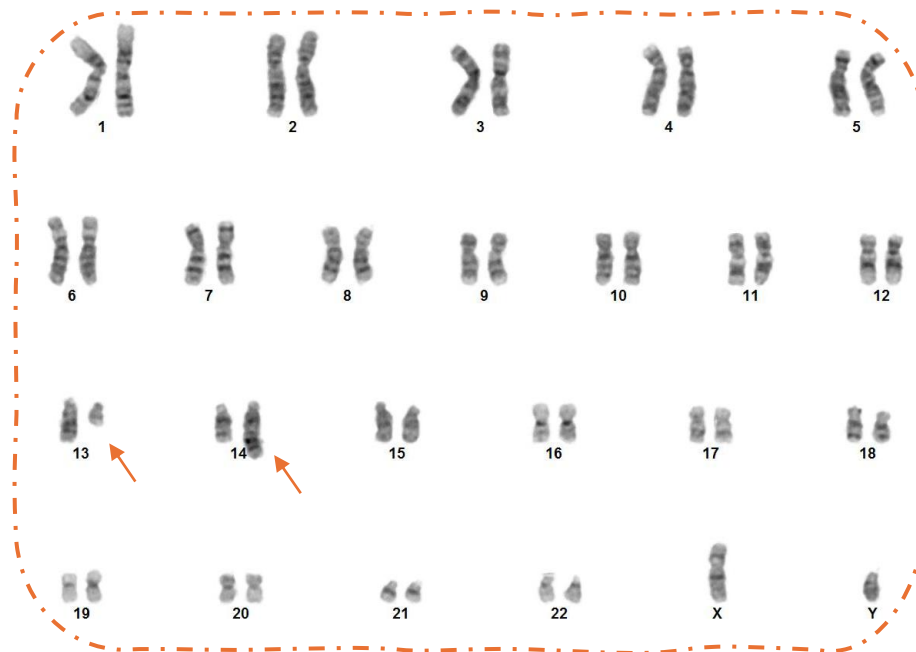


Figura 9 - Cariótipo do caso B com translocação envolvendo os cromossomas 13 e 14 [t(13;14)(q14;q32)].

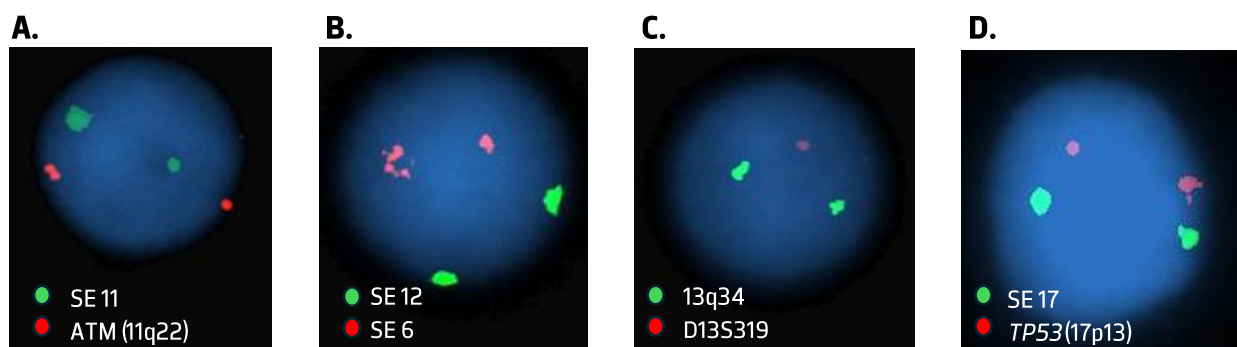


Figura 10 - Citogenética molecular do caso B: A. Padrão de sinal da sonda ATM (11q22)/SE 11 [Leica Biosystems]. A presença de dois sinais vermelhos e dois sinais verdes independentes demonstra um padrão normal (ausência da deleção de 11q); B. Padrão de sinal das sondas SE 12 (D12Z3)/SE 6 [Leica Biosystems]. A presença de dois sinais vermelhos e dois sinais verdes independentes demonstra um padrão normal (ausência de trissomia 12); C. Padrão de sinal das sondas D13S319/13q34 [Zytolight, ZytoVision GmbH]. A existência de dois sinais verdes (13q34) e apenas um sinal vermelho (13q14.2) revela deleção intersticial de 13q; D. Padrão de sinal da sonda TP53(17p13)/SE 17 [Leica Biosystems]. A presença de dois sinais vermelhos e dois sinais verdes independentes demonstra um padrão normal (ausência da deleção de 17p).

No caso G, que por citogenética convencional apresentava um clone inicial com uma translocação entre os cromossomas 11 e 14, e dois subclones com alterações adicionais independentes (Figura 11), através da técnica de FISH foi detetada a  $t(11;14)(q13;q32)$ , que resulta da fusão  $IGH::CCND1$  em 76% das células analisadas, tendo esta a única alteração estudada através da Técnica de FISH (Tabela 6).

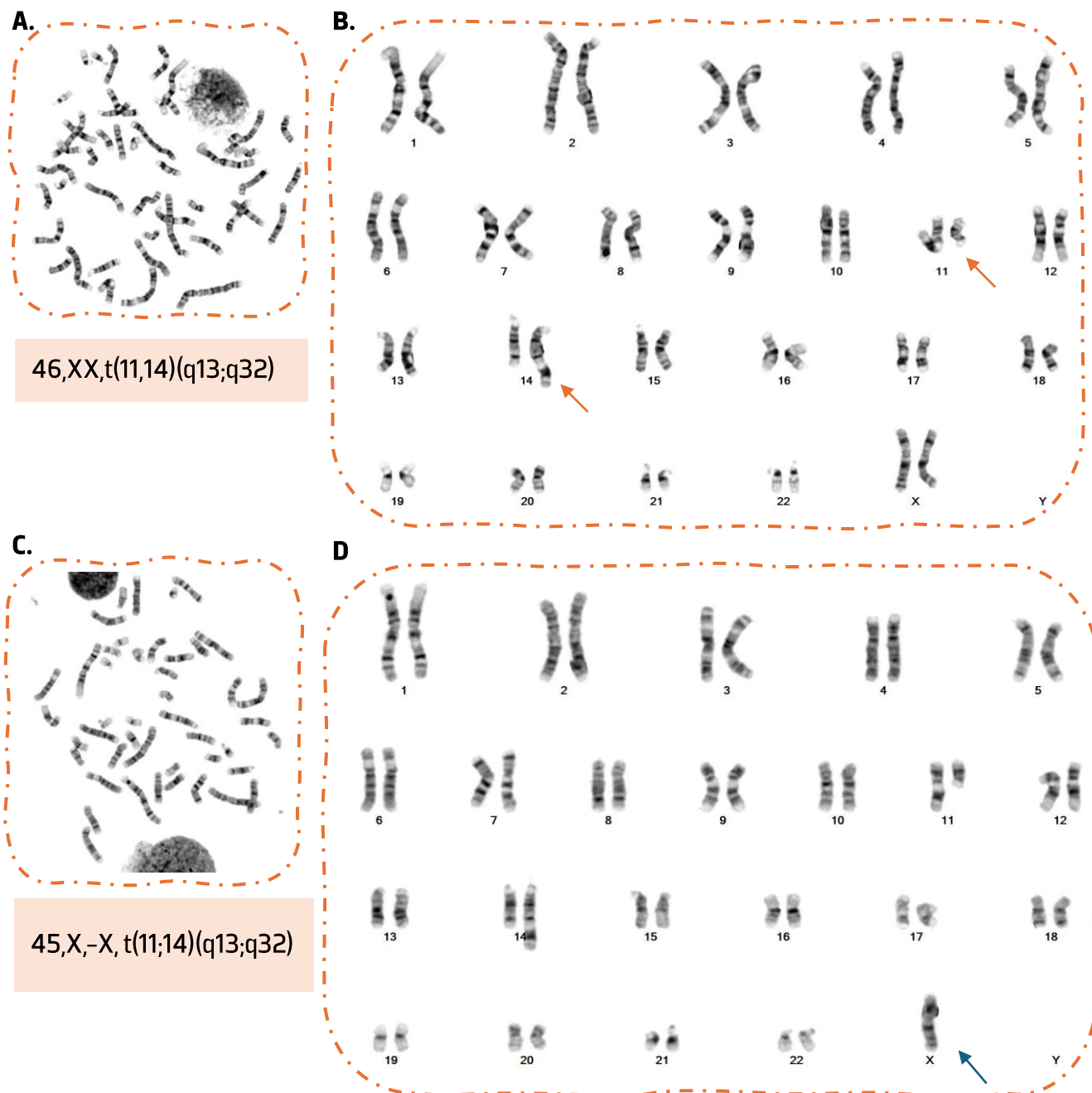


Figura 11 - Cariótipo do caso G: A. e B. representam a metafase e cariograma, respetivamente, do clone inicial com uma translocação envolvendo o cromossoma 11 e 14 [ $t(11,14)(q13;q32)$ ], demonstrado pelas setas laranja; C. e D. representam, respetivamente, a metafase e cariograma do subclone com a translocação do clone inicial e com a alteração adicional -X (seta azul).

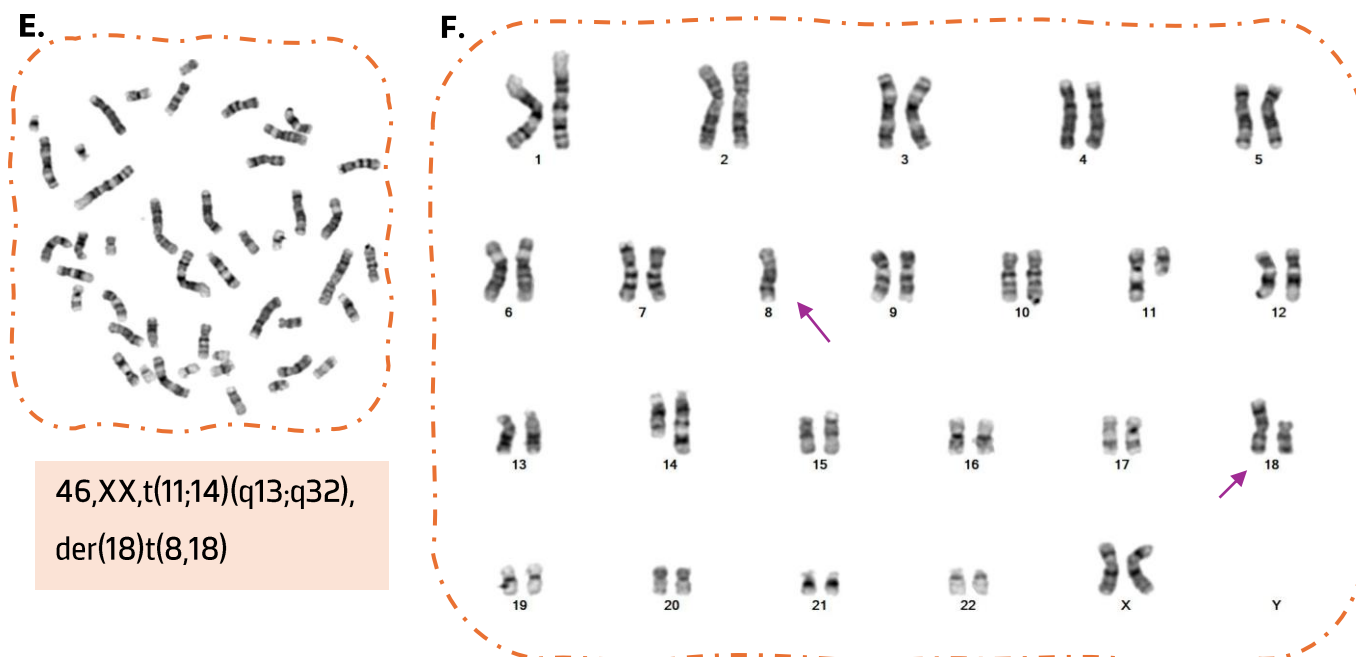


Figura 11 (continuação) – E. e F. representam, respetivamente, a metafase e cariograma do subclone com a translocação do clone inicial e a alteração adicional der(18)t(8,18) (setas roxas).

Relativamente aos casos que foram classificados com cariótipo de baixa complexidade, através do estudo de citogenética convencional (casos D, I e J), foram detetadas anomalias cromossómicas pela Técnica de FISH através do uso de painel de sondas utilizadas no IPO-Porto, em três dos casos com Leucemia Linfocítica Crónica (Tabela 6). O caso D, que por citogenética convencional, apresentava trissomia 12 e uma deleção no cromossoma 14 nas 20 metafases analisadas (Figuras 12A e 12B), através da técnica de FISH demonstrou-se, em 42% das células analisadas, trissomia do cromossoma 12 (Figura 13A). Neste caso, por citogenética convencional, também se observou a translocação envolvendo os cromossomas 14 e 18 em 12 das metafases analisadas (Figuras 12C e 12D), foi ainda identificada, através da técnica de FISH a fusão *IGH::BCL2*, associada à t(14;18)(q32;q21), em 35% das células analisadas (Figura 13B), e, em 21% das células, deleção do gene *TP53* (17p13) (Figura 13C). No caso I, que no cariótipo demonstrou uma translocação entre os cromossomas 8, 22 e 18 nas 20 metafases analisadas, assim como um subclone com uma deleção de 11p adicional, a técnica de FISH demonstrou del(13p) em 59% das células analisadas. No caso J, a técnica de FISH demonstra del(13p) em 21% das células analisadas.

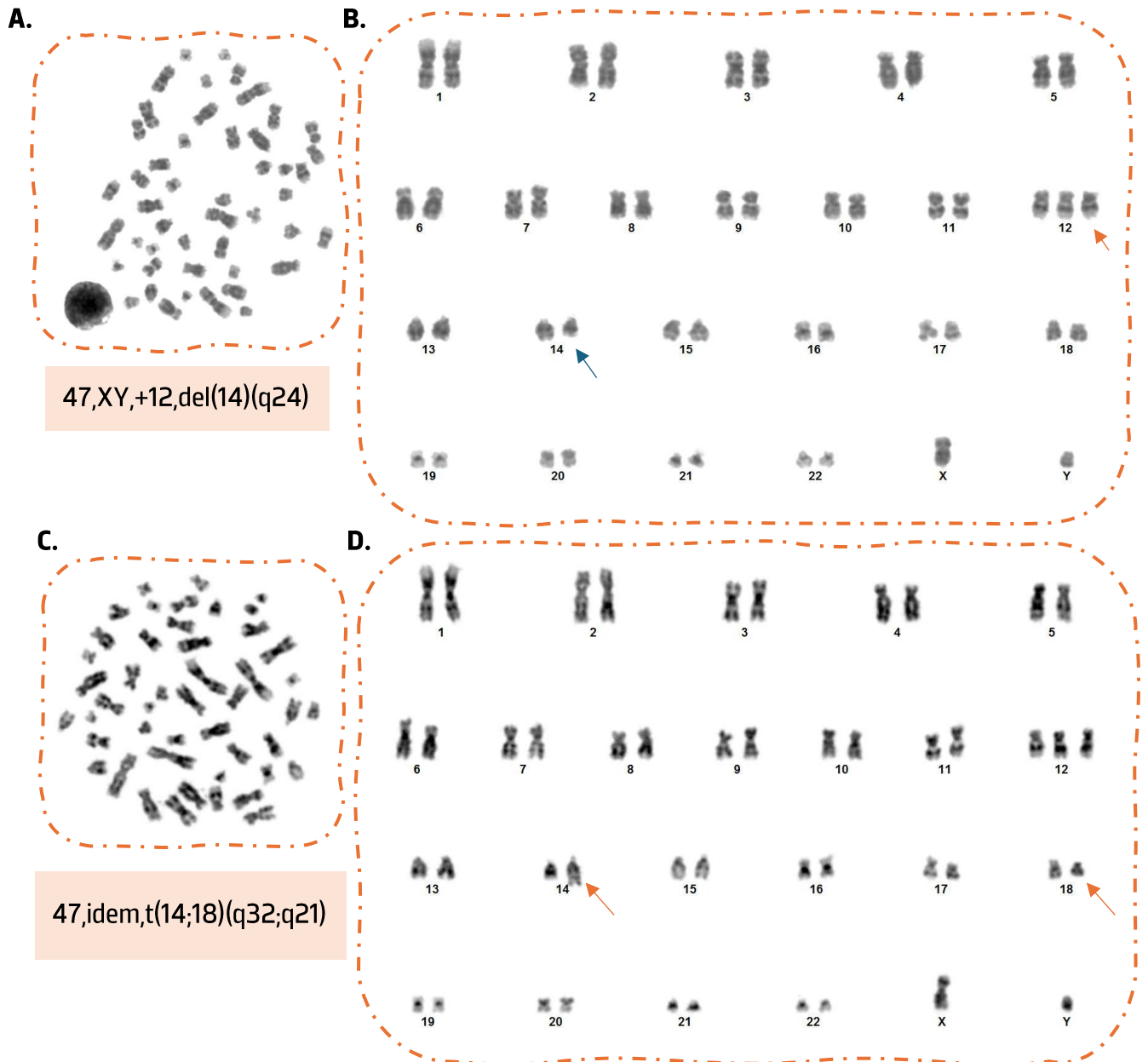


Figura 12 - Cariótipo do caso D: A e B mostram, respectivamente, a metafase e o cariograma do clone inicial, que apresenta trissomia do cromossomo 12 e deleção no cromossomo 14; C e D ilustram a metafase e o cariograma do subclone, que, para além das alterações descritas anteriormente, exibe a translocação adicional envolvendo os cromossomos 14 e 18 [t(14;18)(q32;q21)].

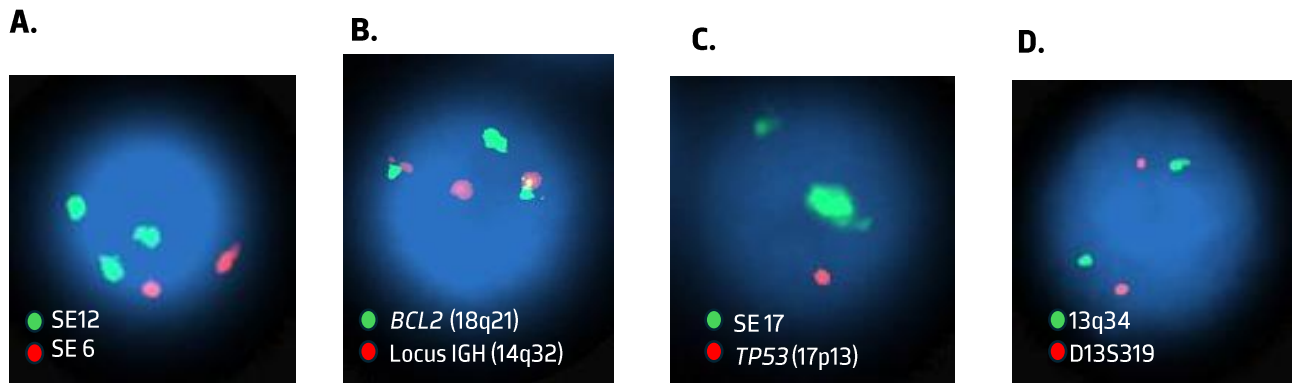
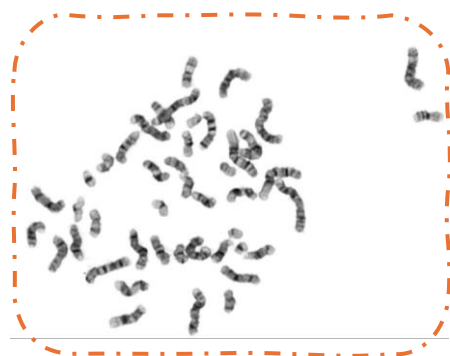


Figura 13 – Citogenética molecular do caso D: A. Padrão de sinal da sonda SE 12 (D12Z3)/SE 6 [Leica Biosystems]. A presença de dois sinais vermelhos e três sinais verdes confirmam a presença de trissomia 12; B. Padrão de sinal da sonda BCL2 (18q21)/IGH t(14;18)(q32;q21) [Leica Biosystems]. A presença de dois sinais de fusão e um sinal verde e um sinal vermelho independentes indica a fusão IGH::BCL2 associado a t(14;18)(q32;q21); C. Padrão de sinal da sonda TP53(17p13)/SE 17 [Leica Biosystems]. A presença de dois sinais verdes e apenas um sinal vermelho revela a deleção de 17p; D Padrão de sinal da sonda D13S319/13q34 [Zytolight, ZytoVision GmbH]. A presença de dois sinais vermelhos e dois sinais verdes independentes demonstra um padrão normal (ausência da deleção de 13q).

Nos casos que foram classificados com cariótipo de elevada complexidade, segundo o estudo efetuado por citogenética convencional (casos C e K), foram detetadas anomalias cromossómicas pela Técnica de FISH, através do uso de painel de sondas utilizadas no IPO–Porto, em apenas 1 dos casos com Leucemia Linfocítica Crónica (Tabela 6). No caso C, a técnica de FISH específica para o cromossoma 17, não mostrou a deleção de 17p, tendo sido esta a única alteração estudada (Tabela 6). No caso K, que por citogenética convencional, mostrou um cariótipo complexo, incluindo deleção do braço longo do cromossoma 11 (Figura 14), por FISH, foi observada/detetada a deleção de 11q em 19% das células analisadas.



A.



45,X,t(X;9)(q13;p21),  
der(7)t(7;8)(q31;q21),del(11)(q14q23),  
der(17;20)(q10;q10),inc[cp18]

B.

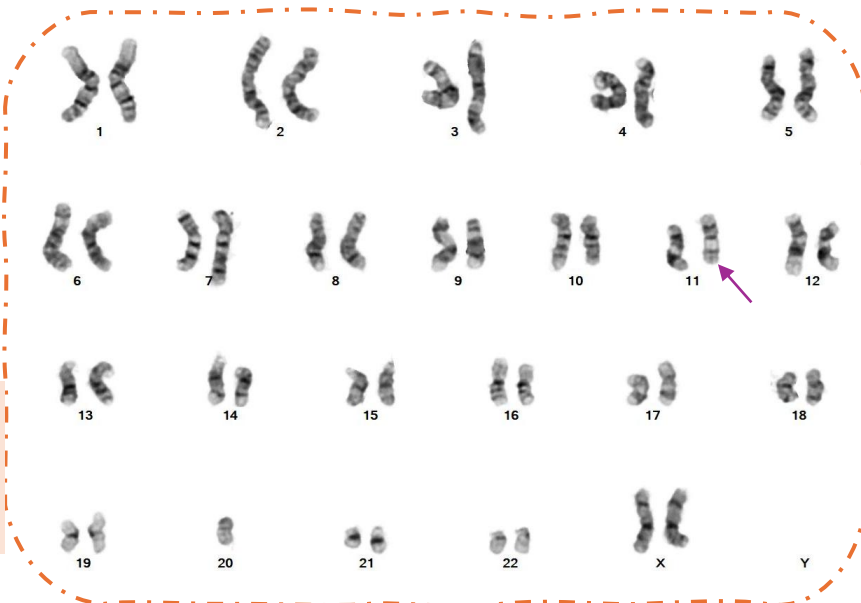


Figura 14 – Cariótipo do caso K: A. e B. ilustram, respetivamente, a metafase e cariograma do cariótipo complexo, sendo que a seta roxa demonstra a deleção de 11q.



## 5. Discussão

A leucemia linfocítica crónica é uma neoplasia caracterizada pela proliferação desmedida de pequenas células B maduras, que expressam CD5+. (15,18) Esta neoplasia afeta o sangue periférico, medula óssea e outros tecidos linfoides, sendo a maioria dos doentes assintomático aquando do diagnóstico. (1,3)

A LLC apresenta uma idade média ao diagnóstico de 70 anos, sendo mais frequentemente observada em indivíduos com idades superiores a 65 anos. (5,6) No presente estudo, a idade dos doentes variou entre os 55 e 83 anos, com uma média de 73 anos e mediana de 75 anos, o que está de acordo com o descrito na literatura. (5,6) Embora esta neoplasia apresente maior incidência em indivíduos do sexo masculino, (1,5,6) na nossa série não se verificou esta tendência, uma vez que dos 11 casos apenas 4 pertenciam ao género masculino, fato que pode ser explicado pelo tamanho da amostra em estudo, que é muito reduzido.

As células neoplásicas na LLC apresentam uma atividade mitótica reduzida, o que limita a eficácia das técnicas de bandas. Os primeiros estudos citogenéticos relativos a esta neoplasia, revelaram que apenas cerca de 40 a 50% dos casos apresentavam metafases adequadas para análise, e, entre esses, aproximadamente 40 a 50% revelavam alterações cromossómicas clonais. (25,46) Com o recurso à técnica de FISH, foi verificado que a incidência real de alterações cromossómicas clonais em LLC era significativamente superior (entre 70% e 80%). (25,47) Atualmente, com a introdução de mitogénios como o DSP30, é possível obter metafases em cerca de 90% dos casos e, conseqüentemente, a taxa de deteção de alterações cromossómicas clonais é superior. (46) Nos 11 casos analisados neste estudo, todos obtiveram metafases adequado à realização do estudo citogenético. Neste estudo, tanto na citogenética convencional como na molecular em aproximadamente 73% dos casos foram detetadas alterações citogenéticas.

A citogenética convencional, ao contrário da técnica de FISH, não é uma análise obrigatória na avaliação da leucemia linfocítica crónica, embora seja fortemente recomendada (35,36,46), por permitir a deteção de anomalias cromossómicas numéricas e estruturais que não estão incluídas nos painéis específicos de FISH para LLC, mas que possuem relevância clínica, como translocações e cariótipos complexos. (46,48) Por sua vez, a técnica de FISH oferece uma resolução e sensibilidade superior, permitindo identificar alterações submicroscópicas que não são detetáveis por citogenética convencional, contudo, fornece apenas informação relativamente às sondas incluídas no painel. (46,48) A realização paralela do cariótipo e de FISH permite obter uma melhor caracterização citogenética, devido à natureza complementar de ambas as técnicas. (36,46,48)



Na literatura está descrito que em mais de 80% dos casos de leucemia linfocítica crónica, utilizando a combinação das técnicas (cariótipo e FISH), identifica-se a presença de, pelo menos, uma das quatro alterações genéticas recorrentes associadas a esta neoplasia, sendo estas a deleção de 11q, de 13q e de 17p e a trissomia 12. (1)

Neste estudo, a utilização combinada de ambas as técnicas permitiu a obtenção uma caracterização citogenética mais ampla dos doentes, sendo que em aproximadamente 64% dos casos foi detetada uma alteração citogenética recorrente de LLC. Diversas alterações citogenéticas observadas no cariótipo, nomeadamente nos cariótipos complexos, não foram observadas por FISH, uma vez que não são alterações recorrentes de LLC e, portanto, não são pesquisadas por esta técnica. Por outro lado, duas alterações citogenéticas recorrentes de LLC, a del(13q) (em 4 dos 11 casos) e a del(17p) (em 2 dos 11 casos), foram apenas detetadas através da técnica de FISH.

#### Deleção de 11q

A deleção de 11q foi detetada em dois dos casos em estudo classificados por citogenética convencional como tendo um cariótipo complexo. A alteração encontrada é intersticial, sendo detetada por FISH em 10 a 20% dos casos de LLC (1,25,49) e resulta predominantemente na perda do gene *ATM*, um gene supressor tumoral, e está associado a um prognóstico adverso. (7,13–15)

No caso I, a deleção de 11q foi detetada em *follow-up*, após o aparecimento de sintomas clínicos associados à LLC, o que evidencia uma progressão da neoplasia, facto que está de acordo com o descrito em literatura, nomeadamente que a deleção 11q está fortemente associada à progressão da doença. (7,13–15)

No caso K, a deleção de 11q foi detetada na fase de diagnóstico, o que, em conjunto com o cariótipo de elevada complexidade encontrado, aponta para um diagnóstico realizado numa fase mais tardia da neoplasia que, na literatura, se encontra correlacionada com extensa linfadenopatia e a um menor tempo de sobrevivência. (24,25)

#### Trissomia 12

A trissomia 12 foi detetada em dois dos casos em estudo. Esta alteração é a mais frequentemente encontrada em LLC no estudo do cariótipo, estando presente em aproximadamente um terço dos casos com alterações cromossómicas. (25) No entanto, através da técnica de FISH, esta alteração é detetada em apenas 15% dos casos. (25) Apesar de ser considerada uma alteração de risco intermédio, a presença de trissomia 12 está associada um risco mais elevado de transformação de Richter e de desenvolvimento de neoplasias secundárias. (3,12,50)



Neste estudo, a trissomia 12 foi detetada por FISH em dois casos, o caso E e o caso D, no entanto a citogenética convencional apenas detetou esta alteração no caso D. No caso E, onde o cariótipo foi classificado como normal, a técnica de FISH revelou a presença de trissomia 12 em 6% das células. É de notar que esta percentagem é muito baixa (próxima do limiar de resolução da técnica de FISH), sendo provável que o clone com esta alteração não tenha conseguido proliferar eficazmente em cultura.

A trissomia 12 e as alterações na banda 14q32 estão frequentemente associadas uma à outra. (25,51) Apesar de as translocações cromossómicas serem incomuns na LLC, ocorrendo em menos de 5% dos casos, a translocação  $t(14;18)(q32;q21)$ , envolvendo os cromossomas 14 e 18, é a mais frequentemente observada. (25,52) Embora o papel prognóstico específico da  $t(14;18)$  na LLC ainda não esteja bem esclarecida, a presença de translocações cromossómicas, de forma geral, tem sido associada a um prognóstico menos favorável. (25,52)

O caso D apresenta, em conjunto com a trissomia 12, uma deleção  $del(14)(q24q32)$  e uma translocação  $t(14;18)(q32;q21)$ , que resulta da recombinação entre o *locus* IGH e o gene BCL2.

#### Deleção de 13q

A deleção do braço longo do cromossoma 13 é observada pela técnica de FISH em aproximadamente 50% dos casos. (1,25,48)

Neste estudo, nos quatro casos em que esta alteração foi identificada, foi detetada apenas pela técnica FISH, dado que a maioria das deleções de 13q são submicroscópicas (25,48) e, como tal, não observadas no cariótipo. A técnica de bandas, devido à sua resolução, apenas apresenta capacidade de detetar esta alteração em, aproximadamente, 10% dos casos. (25,48) Quando presente como alteração isolada, como acontece no caso H, onde não foram detetadas outras alterações pela técnica FISH ou pelo estudo do cariótipo, a deleção de 13q tem sido consistentemente associada a um prognóstico favorável. (25,48,53)

#### Deleção 17p

A deleção do braço curto do cromossoma 17 é detetada entre 5 e 10% dos casos citogeneticamente anormais de LLC, estando, na maioria das vezes, associada à perda do gene *TP53*. (25,53,54) Esta alteração está fortemente associada a um prognóstico desfavorável, constituindo um marcador de resistência ou de uma má resposta à terapêutica, particularmente por serem detetadas em estádios avançados da neoplasia. (25,53,54)

Nos quatro casos de follow-up (Caso A, C, H e I) esta foi uma das únicas alterações em estudo na técnica de FISH, uma vez que a deleção de 17p é mais frequentemente observada em doentes previamente



tratados para LLC. (24,25) Apesar disto, no casos H e I, uma vez que a deleção de 13q tinha sido identificada aquando do diagnóstico, esta alteração foi também incluída no painel deste estudo.

Os doentes D e K demonstraram a presença de del(17p). Estes casos encontravam-se em fase de diagnóstico, no entanto, encontravam-se em estadios avançados da doença, classificados como Rai de médio risco e Binet C, em concordância com o descrito na literatura. (25,53,54)

### Cariótipo complexo

Um cariótipo complexo (CC) é definido pela presença de três ou mais alterações citogenéticas, sejam estas estruturais ou numéricas. (8,21–23) Na LLC, os CC são identificados em aproximadamente 14 a 35% dos casos e representam um grupo heterogéneo, com comportamento clínico variável. (8,21–23)

A presença de CC revela uma elevada instabilidade genómica, evidenciada pela acumulação de múltiplas alterações cromossómicas, frequentemente abrangendo regiões além das típicas da LLC. (30,55) Neste estudo, 5 dos 11 casos apresentavam cariótipo complexo, apresentando diversas alterações cromossómicas estruturais e numéricas, como translocações, deleções e perda de cromossomas. Embora os CC sejam biomarcadores preditivos de mau prognóstico, associados a respostas terapêuticas desfavoráveis, nem todas as alterações citogenéticas contribuem igualmente para a agressividade da neoplasia. A trissomia do cromossoma 12, como a detetada no caso D, e a trissomia 19 têm sido associadas a uma evolução clínica mais indolente. (30,46) Os cariótipos de elevada complexidade (com mais de cinco alterações cromossómicas), como os casos C e K, estão fortemente associados a uma evolução agressiva da doença, independentemente do estado mutacional de *TP53* ou da mutação de IGHV. (8,21–23)

Embora os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de CC não estejam totalmente compreendidos, já foi estabelecida uma associação com alterações no gene *TP53*, eventualmente promovendo instabilidade cromossómica e facilitando a acumulação de anomalias genéticas. (24,25,30,46) No entanto, é importante destacar que até 20% dos casos de CC ocorrem na ausência de alterações em *TP53*. (46) Neste estudo, a deleção de 17p é apenas observada em dois dos cinco casos com CC, estando ambos associados a alterações comuns em LLC, no caso D à trissomia 12, e no caso K à deleção de 11q.

### Progressão da LLC

A transformação de Richter (TR) corresponde à progressão da LLC, convertendo-a para uma neoplasia de células B mais agressiva, sendo, na maioria dos casos, um linfoma não-Hodgkin difuso de células B. (23–25) Esta transformação ocorre em aproximadamente 2 a 10% dos doentes com LLC e está associada a um prognóstico desfavorável, sendo a média de tempo de sobrevivência após o seu diagnóstico inferior a 1 ano. (23–25) O diagnóstico de TR é realizado por biópsia de gânglio linfático e baseia-se na identificação de alterações biológicas e histológicas. A TR apresenta elevada complexidade genética e biológica.



(1,47,56,57) Embora ainda não tenham sido definidos marcadores genéticos exclusivos desta transformação, alterações em genes como *TP53* (17p13.1), *CDKN2A* (9p21.3) e *MYC* (8q24.21) são frequentemente observadas. (3,23–26)

O doente C foi originalmente diagnosticado com LLC em estadio RAI de médio risco em 2021. A primeira análise citogenética revelou, através de FISH, um rearranjo do locus IGH em 89% das células com perda de 5', não tendo sido possível estabelecer o cariótipo devido à falta de metafases. Deste modo, o paciente iniciou um tratamento de 2 anos com base em *Rituximab* e *Venetoclax*, após o qual a resposta foi completa. Em 2024, foi identificada a presença de uma adenopatia no diafragma e na região cervical, pelo que foi efetuada uma nova análise citogenética. No novo estudo citogenético deste doente, incluído na presente série, mostrou um cariótipo com diversas alterações numéricas e estruturais, incluindo a perda de um cromossoma 9, onde o gene *CDKN2A* se localiza. Os resultados de Anatomia Patológica (em biópsia do gânglio linfático da mesma data do estudo genético), revelou um quadro clínico compatível com transformação de LLC em linfoma não-Hodgkin difuso de células B.

#### LLC e o linfoma do manto

A LLC e o linfoma do manto são, na sua generalidade, neoplasias clínica e biologicamente distintas, podendo ser caracterizadas através de um estudo imunohistoquímico. (58,59) No entanto, alguns casos podem partilhar características clínicas e morfológicas, que dificultam o diagnóstico, (58,59) podendo, nestes casos, a análise citogenética pode auxiliar no diagnóstico. A t(11;14)(q13;q32) envolve os genes *CCND1* e *IGH*, levando à expressão anormalmente elevada de Ciclina D1. (10,24–26) Esta alteração não é específica de LLC, (1) sendo muito raros os casos de LLC com esta translocação. (25,58) Em contraste, esta alteração é considerada um dos *hallmarks* do linfoma do manto, sendo observada entre 95 e 97% dos casos. (23–25)

Em 2021, a doente do caso G foi diagnosticada com LLC assintomática. Em 2024, a doente mostrou indícios de progressão da doença, pelo que foi efetuada uma análise citogenética da paciente. A translocação entre os cromossomas 11 e 14, predominantemente encontrada no linfoma do manto, foi detetada através da citogenética convencional e molecular, o que em conjunto com outros estudos pode, eventualmente, levar a um novo diagnóstico do doente.

#### Ensaio clínico

Três dos casos em análise (A, D e G) foram propostos para inclusão para o mesmo ensaio clínico (BELLWAVE-011). Este ensaio clínico tem como objetivo comparar a eficácia de *nemtabrutinib* com a de *ibrutinib* e *acalabrutinib* no tratamento da LLC. (60)



Um dos principais critérios de inclusão neste ensaio é um diagnóstico confirmado de LLC em fase ativa, com indicação clínica para início de tratamento. (60) A doente A apresentava sinais de progressão da doença, como o agravamento da trombocitopenia e da leucocitose. O doente G, diagnosticado previamente com LLC assintomática, apresentava sinais de evolução, com o desenvolvimento de sintomas, apesar disto, os resultados citogenéticos revelaram uma alteração característica do linfoma do manto, o que poderá levar à não inclusão deste doente no estudo. O caso D, por sua vez, encontrava-se em fase de diagnóstico, tendo o resultado obtido sido diagnóstico de LLC em estadio intermédio de acordo com o sistema RAI e em estadio C.

O outro fator relevante citogeneticamente para o estudo é a presença de transformação de Richter, que constitui um dos principais critérios de exclusão. Nos casos A e D, a análise citogenética excluiu a presença desta transformação, permitindo, assim, a elegibilidade destes doentes para participação. (60)

A utilização da citogenética como critério de inclusão ou de exclusão, permite demonstrar a importância que, tanto o cariótipo como a técnica de FISH, têm sobre a patologia, sendo esta essencial na escolha de tratamento e da eficácia do mesmo. (1,15)



## 6. Conclusão

Durante os quatro meses de estágio, foram analisados 11 casos de Leucemia Linfocítica Crónica, dos quais apenas um revelou não apresentar qualquer alteração citogenética. Apesar de a amostra ser de dimensão reduzida, foi possível detetar todas as alterações citogenéticas recorrentes associadas à LLC, sendo a mais frequente a deleção do braço longo do cromossoma 13, detetada apenas através da técnica de FISH. Em dois dos casos, as análises citogenéticas permitiram identificar alterações com implicações clínicas relevantes: uma translocação típica do linfoma do manto, detetada por ambas as técnicas; e uma transformação de Richter, detetada por citogenética convencional, em conjunto com a anatomia patológica.

Em conclusão, o presente estudo permitiu evidenciar a relevância dos estudos citogenéticos (cariótipo e FISH) na caracterização da LLC, tanto para um diagnóstico diferencial como para a definição de prognóstico e orientação terapêutica.



## Referências Bibliográficas

1. The WHO Classification of Tumours Editorial Board, editor. Haematolymphoid Tumours: Who Classification of Tumours. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2024. 1 p.
2. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 21 de junho de 2018;131(25):2745–60.
3. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. março de 2016;16(3):145–62.
4. Montserrat E, Rozman C. Chronic lymphocytic leukemia: Present status. *Ann Oncol*. 1 de março de 1995;6(3):219–35.
5. Yao Y, Lin X, Li F, Jin J, Wang H. The global burden and attributable risk factors of chronic lymphocytic leukemia in 204 countries and territories from 1990 to 2019: analysis based on the global burden of disease study 2019. *Biomed Eng OnLine*. dezembro de 2022;21(1):4.
6. Miranda-Filho A, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau A, Bray F. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol*. janeiro de 2018;5(1):e14–24.
7. Cardoso Borges F, Ramos A, Lourenço A, Gomes Da Silva M, Miranda A, on behalf of the ROR-Sul network. Detailing the epidemiological and clinical characteristics of chronic lymphocytic leukaemia in Portugal—Results from a population-based cancer registry cohort study. Nakamura T, editor. *PLOS ONE*. 8 de outubro de 2021;16(10):e0258423.
8. Brown JR. Clinical Risks for Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Natl Compr Canc Netw*. abril de 2024;22(3):e247020.
9. Karakosta M, Delicha EM, Kouraklis G, Manola KN. Association of various risk factors with chronic lymphocytic leukemia and its cytogenetic characteristics. *Arch Environ Occup Health*. novembro de 2016;71(6):317–29.
10. Julio Delgado, Ferran Nadeu, Dolors Colomer, Elias Campo. Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Haematologica*. 3 de julho de 2020;105(9):2205–17.
11. Petrova-Drus K, Syed M, Yu W, Hutt K, Zlotnicki AM, Huang Y, et al. Clonal Characterization and Somatic Hypermutation Assessment by Next-Generation Sequencing in Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma: A Detailed Description of the Technical Performance, Clinical Utility, and Platform Comparison. *J Mol Diagn*. 1 de junho de 2023;25(6):352–66.
12. Kikushige Y. Pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia and the development of novel therapeutic strategies. *J Clin Exp Hematop*. 2020;60(4):146–58.
13. Dighiero G, Hamblin T. Chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet*. março de 2008;371(9617):1017–29.



14. Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol.* dezembro de 2013;34(12):592–601.
15. Chiorazzi N, Chen SS, Rai KR. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* fevereiro de 2021;11(2):a035220.
16. Wen Y, Jing Y, Yang L, Kang D, Jiang P, Li N, et al. The regulators of BCR signaling during B cell activation. *Blood Sci.* 21 de outubro de 2019;1(2):119–29.
17. Carrà G, Torti D, Crivellaro S, Panuzzo C, Taulli R, Cilloni D, et al. The BCR-ABL/NF- $\kappa$ B signal transduction network: a long lasting relationship in Philadelphia positive Leukemias. *Oncotarget.* 22 de agosto de 2016;7(40):66287–98.
18. Montserrat E, Bosch F, Rozman C. B-cell chronic lymphocytic leukemia: Recent progress in biology, diagnosis, and therapy. *Ann Oncol.* 1997;8:S93–101.
19. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Semin Reprod Med.* 26 de agosto de 2009;27(5):351.
20. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Niemann CU, Kater AP, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* janeiro de 2021;32(1):23–33.
21. Binet J -L., Catovsky D, Chandra P, Dighiero G, Montserrat E, Rai KR, et al. Chronic Lymphocytic Leukaemia: Proposals for a Revised Prognostic Staging System: *Br J Haematol.* julho de 1981;48(3):365–7.
22. Rai K, Sawitsky A, Cronkite E, Chanana A, Levy R, Pasternack B. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1 de agosto de 1975;46(2):219–34.
23. Rai KR, Han T. Prognostic Factors and Clinical Staging in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* abril de 1990;4(2):447–56.
24. Wierda WG, Brown J, Abramson JS, Awan F, Bilgrami SF, Bociek G, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 2.2024. *J Natl Compr Canc Netw.* abril de 2024;22(3):175–204.
25. Siebert R, Aukema SM. Mature B- and T-cell neoplasms and Hodgkin lymphoma. Em: Heim S, Mitelman F, editores. *Cancer Cytogenetics [Internet].* 1.ª ed. Wiley; 2015 [citado 15 de dezembro de 2024]. p. 252–331. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118795569.ch11>
26. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Bergui L, D’Arena G, Bonello L, et al. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood.* 1 de dezembro de 2007;110(12):4012–21.
27. Hus I, Podhorecka M, Bojarska-Junak A, Roliński J, Schmitt M, Sieklucka M, et al. The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol.* 1 de abril de 2006;17(4):683–90.



28. Putowski M, Skórka K, Włodarczyk M, Tomczak W, Subocz E, Hałka J, et al. The prognostic impact of CD49d protein and mRNA expression in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Arch Med Sci* [Internet]. 3 de março de 2021 [citado 7 de agosto de 2025]; Disponível em: <https://www.archivesofmedicalsecience.com/The-prognostic-impact-of-CD49d-protein-and-mRNA-nexpression-in-patients-with-chronic,130646,0,2.html>
29. Mansouri L, Thorvaldsdottir B, Sutton LA, Karakatsoulis G, Meggendorfer M, Parker H, et al. Different prognostic impact of recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia depending on IGHV gene somatic hypermutation status: a study by ERIC in HARMONY. *Leukemia*. fevereiro de 2023;37(2):339–47.
30. Baliakas P, Jeromin S, Iskas M, Puiggros A, Plevova K, Nguyen-Khac F, et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood*. 14 de março de 2019;133(11):1205–16.
31. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. junho de 2016;17(6):779–90.
32. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*. novembro de 2019;94(11):1266–87.
33. Yeung CCS, Shadman M. How to Choose the Best Treatment and Testing for Chronic Lymphocytic Leukemia in the Tsunami of New Treatment Options. *Curr Oncol Rep*. agosto de 2019;21(8):74.
34. Hampel PJ, Parikh SA. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm 2022. *Blood Cancer J*. 29 de novembro de 2022;12(11):161.
35. Hastings R, Howell R, Betts D, Porter S, Haferlach C, Dastugue N, et al. A common European framework for quality assessment for banded chromosome studies and molecular cytogenetic investigations of acquired abnormalities. E.C.A. Permanent Working Group for Cytogenetics and Society. 2013;(31).
36. Rack KA, Van Den Berg E, Haferlach C, Beverloo HB, Costa D, Espinet B, et al. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia*. agosto de 2019;33(8):1851–67.
37. Kotikalapudi R, Patel RK. Comparative Study of The Influence of EDTA and Sodium Heparin on Long Term Storage of Cattle DNA. *Cell J Yakhteh*. 2015;17(1):181–6.
38. Gisselsson D. Cytogenetic methods. Em: Heim S, Mitelman F, editores. *Cancer Cytogenetics* [Internet]. 4th ed. Wiley; 2015 [citado 23 de abril de 2025]. p. 11–8. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118795569.ch2>
39. Lawce HJ, Sanford JS. Fluorescence in situ hybridization (FISH). Em: Arsham MS, Barch MJ, Lawce HJ, editores. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* [Internet]. 1.ª ed. Wiley; 2017 [citado 29 de abril de 2025]. p. 717–831. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119061199.ch16>



40. Dun KA, Riley LA, Diano G, Adams LB, Chiu E, Sharma A. DSP30 and interleukin-2 as a mitotic stimulant in B-cell disorders including those with a low disease burden. *Genes Chromosomes Cancer*. maio de 2018;57(5):260–7.
41. RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement 500 mL | Buy Online | Gibco™ | thermofisher.com [Internet]. [citado 22 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/61870036>
42. Fetal Bovine Serum, qualified, United States 50 mL | Request for Quote | Gibco™ [Internet]. [citado 22 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A3160501>
43. Penicillin–Streptomycin (10,000 U/mL) 100 mL | Buy Online | Gibco™ | thermofisher.com [Internet]. [citado 22 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15140122>
44. Hastings R, Howell R, Bricarelli FD, Kristoffersson U, Cavani S. A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations. *E.C.A. Permanent Working Group for Cytogenetics and Society*. 2012;(29).
45. Gurr Buffer Tablets 50 TabLets | Buy Online | Gibco™ | thermofisher.com [Internet]. [citado 22 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10582013>
46. Baliakas P, Espinet B, Mellink C, Jarosova M, Athanasiadou A, Ghia P, et al. Cytogenetics in Chronic Lymphocytic Leukemia: ERIC Perspectives and Recommendations. *HemaSphere*. abril de 2022;6(4):e707.
47. Heerema NA. Cytogenetic analysis of hematologic malignant diseases. Em: Arsham MS, Barch MJ, Lawce HJ, editores. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* [Internet]. 1.ª ed. Wiley; 2017 [citado 22 de abril de 2025]. p. 499–575. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119061199.ch11>
48. Xia C, Liu G, Liu J, Ronaghy A, Tadros S, Wang W, et al. The Heterogeneity of 13q Deletions in Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnostic Challenges and Clinical Implications. *Genes*. março de 2025;16(3):252.
49. Thorvaldsdottir B, Mansouri L, Sutton LA, Nadeu F, Meggendorfer M, Parker H, et al. ATM aberrations in chronic lymphocytic leukemia: del(11q) rather than ATM mutations is an adverse–prognostic biomarker. *Leukemia*. 24 de abril de 2025;1–11.
50. Scarfò L, Ferreri AJM, Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. agosto de 2016;104:169–82.
51. Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemia: Where We Are and Where We Go. *BioMed Res Int*. 2014;2014:435983.
52. Tang G, Banks HE, Sargent RL, Medeiros LJ, Abruzzo LV. Chronic lymphocytic leukemia with t(14;18)(q32;q21). *Hum Pathol*. abril de 2013;44(4):598–605.



53. Lauren M. Wainman PHD, Wahab A. Khan PHD, Prabhjot Kaur MD. Chronic Lymphocytic Leukemia: Current Knowledge and Future Advances in Cytogenomic Testing: Exon Publ. 8 de fevereiro de 2023;93–106.
54. Campo E, Cymbalista F, Ghia P, Jäger U, Pospisilova S, Rosenquist R, et al. TP53 aberrations in chronic lymphocytic leukemia: an overview of the clinical implications of improved diagnostics. *Haematologica*. dezembro de 2018;103(12):1956–68.
55. Visentin A, Bonaldi L, Rigolin GM, Mauro FR, Martines A, Frezzato F, et al. The complex karyotype landscape in chronic lymphocytic leukemia allows the refinement of the risk of Richter syndrome transformation. *Haematologica*. 3 de junho de 2021;107(4):868–76.
56. Woroniecka R, Rymkiewicz G, Bystydziński Z, Pienkowska-Grela B, Rygier J, Malawska N, et al. Cytogenomic features of Richter transformation. *Mol Cytogenet*. 8 de novembro de 2023;16:31.
57. Woroniecka R, Rymkiewicz G, Grygalewicz B, Błachnio K, Rygier J, Jarmuż-Szymczak M, et al. Cytogenetic and Flow Cytometry Evaluation of Richter Syndrome Reveals MYC, CDKN2A, IGH Alterations With Loss of CD52, CD62L and Increase of CD71 Antigen Expression as the Most Frequent Recurrent Abnormalities. *Am J Clin Pathol*. 1 de janeiro de 2015;143(1):25–35.
58. Robak T, Krawczyńska A, Cebula-Obrzut B, Urbaniak M, Iskierka-Jażdżewska E, Robak P. Atypical Chronic Lymphocytic Leukemia—The Current Status. *Cancers*. 5 de setembro de 2023;15(18):4427.
59. Perdigão J, Alaiz H, Lúcio P, Gameiro P, Sebastião M, Neto L, et al. Mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: report of a rare disease association and review of the literature. *J Hematop*. 1 de outubro de 2010;3(2):91–9.
60. Clinical Trials in the European Union – EMA [Internet]. [citado 2 de maio de 2025]. Disponível em: <https://euclinicaltrials.eu/ctis-public/view/2022-501697-19-01?lang=en>

**P.PORTO**

ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE



**M**

**MESTRADO**

TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA