

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS**

ALINE LÚCIA MENEZES FERRÃO

**MICROPARTÍCULAS CIRCULANTES E GERAÇÃO DE TROMBINA EM
PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA**

Belo Horizonte

2016

ALINE LÚCIA MENEZES FERRÃO

**MICROPARTÍCULAS CIRCULANTES E GERAÇÃO DE TROMBINA EM
PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Prof. Adriano de Paula Sabino.
Co-orientadora: Profa. Maria das Graças Carvalho.

Belo Horizonte

2016

F372m Ferrão, Aline Lúcia Menezes.
Micropartículas circulantes e geração de trombina em pacientes com leucemia linfocítica crônica / Aline Lúcia Menezes Ferrão. – 2016. 73 f. : il.

Orientador: Adriano de Paula Sabino.
Coorientadora: Maria das Graças Carvalho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Leucemia linfóide – Prognóstico – Teses. 2. Leucemia linfocítica crônica – Teses. 3. Linfócitos – Teses. 4. Micropartículas – Teses. 5. Trombina – Teses. I. Sabino, Adriano de Paula. II. Carvalho, Maria das Graças. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.99419

AGRADECIMENTOS

Em especial à Deus por me permitir ir tão longe, por me proporcionar tantas vitórias e por sempre me amparar nos momentos mais difíceis.

Aos meus queridos pais Aridalto e Oneide, por serem minha força e meu exemplo, e ao meu esposo Antônio Ferrão, por toda a compreensão e amor.

Aos meus orientadores, Adriano de Paula Sabino e Maria das Graças Carvalho, pelo acolhimento, aprendizado e apoio.

À todos da Faculdade de Farmácia pela acolhida, e principalmente, aos colegas do Laboratório de Hematologia.

À todos que contribuíram e ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, especialmente a doutoranda Fernanda Gontijo, por toda ajuda e amizade, e à Rita Duarte e Fernanda Freire, pelas colaborações.

Aos pacientes e indivíduos do grupo controle, aos médicos e funcionários do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais que possibilitaram a realização desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório do Hospital João XXIII, especialmente à Maria Augusta, por todo incentivo e apoio.

À Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, pela oportunidade e pelas tantas portas abertas.

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro em várias oportunidades.

A todos os amigos e familiares que estiveram presentes de alguma forma durante essa fase da minha vida, o meu obrigado.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento. É o seu bem mais precioso. Explore; viaje; descubra; conheça.”

Albert Einstein

RESUMO

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é uma doença de maior prevalência no idoso, caracterizada pelo acúmulo de linfócitos B no organismo. A sobrevida dos pacientes é aproximadamente 10 anos, mas o prognóstico é variável e alguns evoluem com curta sobrevida. É importante identificar precocemente os indivíduos que apresentarão doença de rápida evolução e que podem se beneficiar de protocolos de tratamento mais adequados. Estudos enfocando o papel das micropartículas (MPs) de diferentes origens na patogênese de muitas doenças têm sido realizados. Essas MPs consistem de fragmentos de membrana celular ou de citoplasma de suas células de origem. O número de MPs derivado principalmente de plaquetas está elevado em distúrbios tromboembólicos. Sabendo-se que existe uma clara associação entre o câncer e a coagulação, o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil hemostático de pacientes com LLC por meio da quantificação plasmática de MPs circulantes e do potencial de geração de trombina (GT), e sua correlação com a progressão da doença. Foram avaliados 35 indivíduos diagnosticados com LLC selecionados no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. As mesmas análises foram realizadas em 35 indivíduos aparentemente saudáveis (grupo controle). A análise de MPs derivadas de células endoteliais (MPE), de linfócitos B (MPL) e de plaquetas (MPP) foi realizada por citometria de fluxo e a avaliação do perfil hemostático foi realizada através da Geração de Trombina (GT) pelo método Calibrated Automated Thrombogram[®] (CAT[®]). Foram observados níveis significativamente aumentados (em MPs/ μ L) de MPEs no grupo de pacientes com LLC, [132,1(78,6-199,1)] quando comparados ao grupo controle [81,6(53,1-121,0), $p=0,002$]. O mesmo foi observado para MPLs [142,1(93,7-203,1)] em relação aos controles [85,2(63,4-115,9), $p<0,001$] e para MPPs [134,8(85,7-183,1)], grupo controle=[81,2(52,8-118,9), $p=0,003$]. Quando os pacientes foram estratificados de acordo com o estadiamento da doença segundo Binet, foram observadas diferenças significativas ($p<0,05$) apenas entre os grupos Binet A *versus* controles para as MPEs[149,8(75,3-212,5)], MPLs [145,2(91,9-235,6)] e MPPs [148,1(82,2-202,1)]. Por outro lado, o potencial de GT foi menor nos casos de LLC [1453,00(1176,33-1602,57)] em relação aos controles [1577,38(1326,20-1816,95), $p=0,031$], principalmente nos casos mais graves classificados como Binet B+C [1216,54(1130,47-1540,15), $p=0,009$]. O número aumentado de MPs na LLC

indica que a microvesiculação pode ser resultante da patogênese da doença em si, e não necessariamente relacionada à progressão da doença. Por outro lado, o potencial de GT diminuído na LLC em relação aos controles, principalmente nos casos mais graves, remete ao fato de que a doença pode afetar não apenas o número de plaquetas, mas também outros fatores de importância hemostática, tornando o paciente mais predisposto a fenômenos hemorrágicos do que trombóticos.

Palavras-chave: Leucemia linfocítica crônica, prognóstico, micropartículas, geração de trombina.

ABSTRACT

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a disease with higher prevalence in the elderly, characterized by B lymphocytes accumulation in the body. The survival of patients is about 10 years, but the prognosis is variable and some patients have short survival. Therefore, it is important to identify early individuals who will present rapidly disease progression and that can benefit from the most appropriate treatment protocols. Researches emphasizing on the role of the microparticles (MPs), from different cell sources, in the pathogenesis of many diseases have been conducted. These MPs consist of cell membrane fragments or cytoplasm of their cells of origin. MPs primarily derived platelets is elevated in thromboembolic disorders and there is a clear association between cancer and coagulation. The aim of this study was to evaluate the hemostatic profile of patients with CLL by quantifying plasma circulating MPs and the thrombin generation potential (TG) and its correlation with disease progression. Thirty five patients diagnosed with CLL, selected in the Hematology Service of the Clinical Hospital, Federal University of Minas Gerais were included in this study. The same analyzes were performed on 35 apparently and clinically healthy subjects (control group). The MPs derived from endothelial cells (MPEs), MPs of B lymphocytes (MPLs) and platelet MPs (MPPs) -analysis was performed by flow cytometry and the evaluation of hemostatic profile was performed using Thrombin Generation test (TG) by the CAT method. It was observed significantly increased levels of MPEs [132.1 (78.6 to 199.1)] when compared patients and controls [81.6 (53.1 to 121.0) $p = 0.002$], respectively. The same was observed for MPLs [142.1 (93.7 to 203.1)] compared to controls [85.2 (63.4 to 115.9), $p < 0.001$] and MPPs [134.8 (85.7 to 183.1)], control group = [81.2 (52.8 to 118.9), $p = 0.003$]. When the patients were stratified according to the Binet staging of the disease significant differences were observed ($p < 0.05$): Binet A versus controls for MPEs [149.8 (75.3 to 212.5)], MPLs [145.2 (91.9 to 235.6)] and MPPs [148.1 (82.2 to 202.1)]. On the other hand, the potential of thrombin generation was lower in CLL [1453.00 (1176.33 to 1602.57)] compared to the controls [1577.38 (1326.20 to 1816.95), $p = 0.031$], especially in moderate and severe cases classified as Binet B + C [1216.54 (1130.47 to 1540.15), $p = 0.009$]. The increased number of MPs in CLL indicates that microparticulation may result in the pathogenesis of the disease itself, and not necessarily related to disease progression. On the other hand, the TG

potential decreased in CLL compared to controls, especially in moderate and severe cases, and this data suggest that the disease might affect not only the number of platelets, but also other factors of importance in hemostatic system, making the patient predisposed to hemorrhages events than thrombotic.

Key words: Chronic Lymphocytic Leukemia, prognosis, microparticles, thrombin generation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Filme sanguíneo de paciente com LLC, no qual podem ser visualizados vários linfócitos maduros	17
Figura 2: Expressão de antígenos de superfície na célula B.....	18
Figura 3: Vesículas extracelulares.....	20
Figura 4: Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares.....	26
Figura 5: Curva de Geração de Trombina.....	29
Figura 6: Fluxograma de pacientes e controles.....	39
Figura 7: Identificação de MPs no plasma de indivíduos com LLC. (A) MPs isoladas do plasma foram selecionadas de acordo com seu tamanho (SSC) e granulosidade (FSC). Microesferas fluorescentes de tamanho definido (0,7-0,9 µm) foram utilizadas para delimitar a região das MPs. (B) O controle de isotipo IgG-FITC de camundongo foi utilizado para a delimitação correta da região de MPs. (C) Imunofenotipagem das MPs no plasma de indivíduos controle. Os eventos presentes na região delimitada em (A) foram selecionados pela marcação positiva com Anexina V-FITC. Pode-se visualizar os anticorpos monoclonais marcadores de plaquetas (CD41), de linfócitos B (CD19) e de célula endotelial (CD51/61) marcados com os fluorocromos PE-Cy5 (CD41) e PE (CD19 e CD51/61). (D) Imunofenotipagem das MPs nos indivíduos com LLC.....	42
Figura 8: Análise de micropartículas circulantes derivadas de células endoteliais (A), linfócitos B (B) e plaquetas (C) em amostras de plasma de pacientes com LLC e de controles (Eixo X). As mesmas micropartículas foram analisadas de acordo com o estadiamento da doença segundo Binet, e estão representadas das figuras D, E e F, respectivamente. O eixo Y representa a quantidade de MPs/µL.....	48

Figura 9: Curvas de Geração de Trombina em amostras de plasma de pacientes com LLC e de controles (A). Em B, os pacientes foram estratificados de acordo com o estadiamento da doença segundo Binet, 1981. O eixo Y representa a concentração de trombina em nM, e o eixo X representa o tempo em minutos..... 49

Figura 10: Potencial de Geração de Trombina (ETP) em amostras de plasma de pacientes com LLC e de controles (A). Em B, os pacientes foram estratificados de acordo com o estadiamento da doença segundo Binet, 1981. O eixo Y corresponde ao ETP..... 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sistemas de estadiamento de Rai (1975) e Binet (1981).....	19
Tabela 2: Variáveis para controles e pacientes obtidos de amostras de plasma de pacientes com LLC e de controles.....	45
Tabela 3: Valores de mediana e intervalo interquartilico para micropartículas circulantes em amostras de plasma de pacientes com LLC e de controles.....	47

LISTA DE ABREVIações

μm - Micrômetro

CAT[®] - *Calibrated Automated Thrombogram*[®]

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

EP – Embolia Pulmonar

ETP - *Endogenous Thrombin Potential* (Potencial de Trombina Endógeno)

FVII – Fator Sete

FVIIa – Fator Sete Ativado

FX - Fator Dez

FXa - Fator Dez Ativado

GT – Geração de Trombina

HBNSA – Tampão de Hepes/NaCl/BSA

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LLC – Leucemia Linfocítica Crônica

MPs – Micropartículas

MPEs – Micropartículas derivadas de endotélio

MPLs – Micropartículas derivadas de linfócitos B

MPPs – Micropartículas derivadas de plaquetas

mRNA – RNA mensageiro

ncRNA – RNAs não codificantes

nm - Nanômetro

nM – Nanomolar

OMS – Organização Mundial de Saúde

PLP – Plasma Livre de Plaquetas

PPP - Plasma Pobre em Plaquetas

RNA – Ácido Ribonucleico

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGT – Teste de Geração de Trombina

TVP – Trombose Venosa Profunda

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
	2.1 Leucemia Linfocítica Crônica	16
	2.2 Micropartículas circulantes	20
	2.3 Micropartículas circulantes e LLC	23
	2.4 Alterações hemostáticas e câncer	23
	2.5 Geração de Trombina	27
3	JUSTIFICATIVA	31
4	OBJETIVOS	32
	4.1 Objetivo geral	32
	4.2 Objetivos específicos	32
5	ARTIGO TÉCNICO CIENTÍFICO	33
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
7	PERSPECTIVAS	60
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
	ANEXO I: Resultados de Geração de Trombina	67
	ANEXO II: Parecer do Comitê de Ética	68
	ANEXO III: Ementa Aprovada pelo Comitê de Ética	69
	ANEXO IV: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	70
	ANEXO V: Ficha Clínica	71
	ANEXO VI: Critérios para diagnóstico de LLC com base no sistema de pontuação proposto por Matutes et al (1994)	73

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As leucemias são neoplasias originadas de células precursoras hematopoiéticas, na qual ocorre a substituição difusa da medula óssea por células neoplásicas imaturas com alta taxa de proliferação. Essas células, na maioria dos casos, extravasam para o sangue, onde são observadas em grande quantidade (FRIZZO et al, 2016). É considerada uma doença resultante da mutação em uma célula progenitora, cuja prole forma um clone de células leucêmicas. A célula na qual ocorre a transformação leucêmica pode ser uma precursora de células linfóides, uma precursora de células mielóides ou ainda uma célula-tronco pluripotente, com capacidade para diferenciar-se tanto em células mielóides quanto em células linfóides. Dessa forma, as leucemias podem ser classificadas como mielóides ou linfóides, de acordo com o tipo de célula que prolifera e, ainda, em agudas ou crônicas, de acordo com a evolução clínica (BAIN, 2003).

Segundo a publicação “Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil” do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), de 2015, são esperados mais de 10.000 novos casos de leucemia no Brasil no biênio 2016-2017. Estimam-se 5.540 casos novos de leucemia em homens e 4.530 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,63 casos novos a cada 100 mil homens e 4,38 a cada 100 mil mulheres, para o mesmo período (BRASIL, 2015).

Os achados clínicos mais relevantes nas leucemias são a perda de peso, cansaço e infecções bacterianas que levam principalmente a pneumonias. Em casos mais avançados, anemia grave e sangramentos em decorrência da plaquetopenia também podem ocorrer. O tromboembolismo venoso também é uma complicação frequente em pacientes com diversos tipos de câncer, inclusive leucemias, e sabe-se que isso contribui significativamente para os altos índices de morbidade e mortalidade (MARCHETTI et al., 2012).

Nos últimos anos, muitos investigadores têm realizado estudos enfocando o papel das micropartículas (MPs) de diferentes origens na patogênese de muitas doenças (HUGEL et al., 2005, YUANA et al., 2013, HELBING et al., 2014).

Conforme revisado por Helbing et al., 2014, MPs consistem de fragmentos provenientes de membrana celular que podem ser originadas de diferentes tipos de células, tais como células endoteliais, leucócitos, plaquetas, eritrócitos e neurônios, podendo estar em número aumentado em condições associadas à inflamação e

ativação da coagulação. A estrutura das MPs é geralmente descrita como fragmentos de 0,1-1µm com membrana que expõe a fosfatidilserina (um fosfolípido aniônico) e antígenos que são representativos da sua origem celular (LACROIX et al, 2012, GONGD et al, 2012). A fosfatidilserina pode ser detectada através da ligação com anexina V. Além disso, por fusão com outras células, as MPs são capazes de transferir componentes celulares de suas células de origem para as células alvo, o que frequentemente resulta em função alterada de tais células (CAMPOS, 2010).

À luz do conhecimento de que o número de MPs derivadas principalmente de plaquetas está elevado em distúrbios tromboembólicos e sabendo-se que as doenças malignas cursam com um grau de hipercoagulabilidade variável de acordo com o tipo de tumor, acredita-se que seja possível que as MPs tenham algum papel na patogênese das leucemias, predispondo a eventos trombóticos.

Um fator que torna o estudo das MPs atraente é a possibilidade de as mesmas serem detectadas por citometria de fluxo, uma vez que essas vesículas expressam antígenos na sua superfície que podem ser reconhecidos por anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos. Esse aspecto faz com que as MPs sejam potenciais biomarcadores precoces de diversos processos patológicos (CAMPOS, 2010).

A trombina, uma enzima multifuncional formada em consequência da ativação da cascata de coagulação, parece estar envolvida no agravamento do câncer, uma vez que células tumorais podem ativar as proteases da coagulação do sangue por meio da expressão de atividade procoagulante (MARCHETTI et al, 2012). Todavia, mais estudos tem-se tornado necessários para compreender melhor os mecanismos de geração de trombina em tecidos acometidos por diferentes tipos de tumores e suas consequências no processo da doença.

Quanto mais se conhece sobre a fisiopatologia das leucemias e quanto mais cedo se faz o diagnóstico e se inicia o tratamento, maiores as chances de sobrevivência e de cura. Por isso, estudos enfocando os mais diversos aspectos da doença, diagnóstico, evolução e tratamento são muito pertinentes, considerando a necessidade de obter maiores conhecimentos visando a melhoria do manejo destes pacientes.

O presente estudo abordou a leucemia linfocítica crônica (LLC), com foco em alterações hemostáticas, que frequentemente contribuem para complicar a evolução de doenças malignas.

Nossa hipótese de estudo é que o estadió mais avançado desta doença estaria associado a um maior número de MPs circulantes e/ou maior potencial de geração de trombina, ambos biomarcadores de importância nos distúrbios hemostáticos. Dessa forma, acredita-se que o desenvolvimento do presente estudo possa agregar algum conhecimento aos pré-existentes acerca da fisiopatologia da LLC, e nos ajude a responder a seguinte pergunta: qual a importância das micropartículas e do potencial de geração de trombina como biomarcadores de prognóstico na LLC?

Além do mais, a procura constante por novos biomarcadores para a identificação precoce dos pacientes recém diagnosticados que evoluirão rápida e desfavoravelmente é de suma importância, considerando a possível adoção de condutas terapêuticas mais adequadas e eficazes em tais pacientes.

Cumpré ressaltar que não é do nosso conhecimento estudos avaliando o potencial de geração de trombina em pacientes com LLC, o que torna esse trabalho inédito. Com relação às MPs, foram encontrados na literatura poucos trabalhos que as relacionem com o processo de hipercoagulabilidade na LLC.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leucemia Linfocítica Crônica

A leucemia linfocítica crônica (LLC) de células B é caracterizada pelo acúmulo de linfócitos B no sangue periférico, medula óssea e órgãos linfóides sólidos. A doença deriva de uma população de células B CD5+, sendo que estas células possuem grande longevidade, na maioria dos casos determinada pela inibição da apoptose (FALCÃO & REGO, 2001; DIGHIRO, 2005).

A LLC é uma das doenças onco-hematológicas mais prevalentes resultantes de perturbações na proliferação e diferenciação de células B. É também uma doença de maior prevalência no idoso, com média de idade entre 64-70 anos (GONÇALVES et al., 2009). A sobrevida dos pacientes com LLC é de aproximadamente 10 anos. No entanto, o prognóstico e a evolução da doença são bastante variáveis e alguns evoluem com curta sobrevida (FARIA et al., 2000; HALLEK et al., 2008). Essa sobrevida pode variar de alguns meses até algumas décadas. Cerca de 70% dos pacientes apresentam-se assintomáticos ao diagnóstico, e mais da metade destes não irá apresentar qualquer evento secundário à doença (DIGHIRO, 2005). Dessa forma, torna-se de extrema importância identificar precocemente os indivíduos que apresentarão doença de rápida evolução e que podem se beneficiar de protocolos de tratamento mais agressivos.

A etiologia da LLC é desconhecida. A existência de casos familiares sugere uma predisposição genética pelo menos em alguns pacientes. Fatores ambientais, como a exposição a agentes químicos e derivados do petróleo, estão associados ao aumento do risco para desenvolvimento de LLC (FALCÃO & REGO, 2001).

Nos pacientes sintomáticos, os achados mais comuns são a linfadenopatia generalizada, perda de peso, cansaço e infecções bacterianas, geralmente pneumonias. A hepatomegalia é detectada em metade dos pacientes, e a esplenomegalia geralmente não é volumosa. A infiltração leucêmica pode ocorrer em todas as partes do corpo, incluindo as tonsilas, meninges e pele. Com a progressão da doença, o paciente pode desenvolver anemia grave e sangramentos em decorrência da plaquetopenia, além do aumento progressivo de prolinfócitos, piora da esplenomegalia, enfartamento ganglionar e resistência ao tratamento

(FALCÃO & REGO, 2001; DIGHIERO, 2005). Durante a evolução da doença, em 3 a 15% dos casos ocorre a Síndrome de Richter caracterizada por um linfoma difuso de grandes células, cujo prognóstico é muito ruim, com sobrevida mediana de seis meses. Em menos de 1% dos casos de LLC ocorre o aparecimento de leucemias agudas, mielóides ou linfóides, que podem estar associados ao tratamento (FALCÃO & REGO, 2001).

A presença maciça de linfócitos maduros no sangue periférico pode ser facilmente visualizada em filmes sanguíneos (Figura 1).

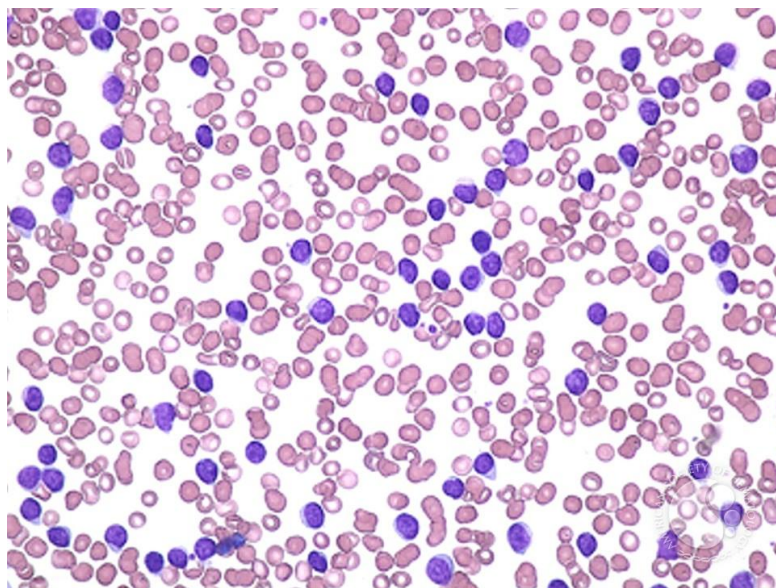


Figura 1: Filme sanguíneo de paciente com LLC, no qual podem ser visualizados vários linfócitos maduros. Fonte: ASH Image Bank, American Society of Hematology. Disponível em <http://imagebank.hematology.org/>. Acesso em 14 de janeiro de 2015, 14:30h.

Na avaliação da morfologia é comum a presença de linfócitos maduros, geralmente pequenos e sem nucléolo aparente, cromatina condensada e com as chamadas manchas de *Gumprecht* originadas do rompimento dos linfócitos e restos nucleares (FOERSTER, 1993). O diagnóstico diferencial da LLC envolve análises morfológicas, imunofenotipagem e técnicas citogenéticas para detecção de alterações cromossômicas que a difere de outras doenças linfoproliferativas (MATUTES, 1994).

O tipo imunomorfológico do tumor pode ser estimado pela avaliação quantitativa de antígenos expressos nas células B tumorais, através da imunofenotipagem (Figura 2). Estudos recentes mostraram que estes antígenos não

estão associados apenas com a células B em si, mas também estão presentes em micropartículas secretadas por tais linfócitos (DOMNIKOVA et al, 2013).

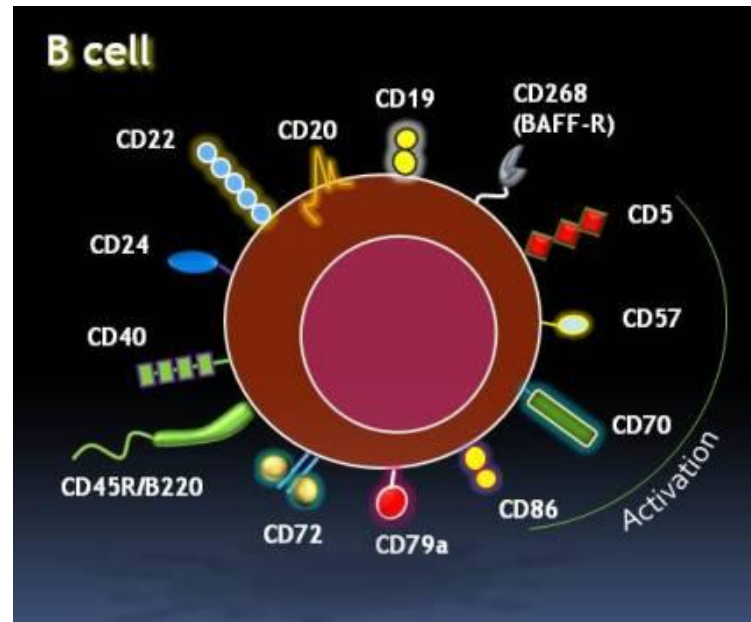


Figura 2: Expressão de antígenos de superfície na célula B.

Disponível em <http://myelomacinderella.net/2013/07/tat-series-ii-phenotypes-as-targets-for-immunotherapy/>. Acesso em 05/07/2016 às 22h.

O CD38 é um importante marcador da ativação celular. A alta expressão de CD38 em linfócitos B é aceita como um fator associado ao pior prognóstico na LLC (DAMLE, 1999).

Além da expressão do CD38, existem outros antígenos de superfície associados a LLC, como por exemplo o CD23, CD25, CD27, CD69, CD71 e alta densidade de HLA-DR. Outros marcadores como CD19, CD20, CD22 também podem estar expressos nas células leucêmicas. O CD20 é de baixa densidade e CD22 aparece fracamente ou negativo. Essas células também apresentam na superfície imunoglobulinas como Kappa ou Lambda de cadeia leve e antígenos da imunoglobulina de cadeia pesada IgM, IgD e também marcadores da célula T como CD5. A expressão de CD10 é negativa enquanto CD11c e CD25 é variável. FMC7 é raramente encontrado (GRANZIERO, 2001).

O diagnóstico e a classificação da LLC podem ser complexos, segundo os critérios adotados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (HARRIS et al., 1999). O diagnóstico muitas vezes é feito em decorrência da investigação de linfocitose de causa indeterminada presente no hemograma. No entanto, o

diagnóstico definitivo geralmente requer biópsia por aspiração da medula óssea, cujas células são analisadas através da microscopia ótica e da citometria de fluxo, para diagnosticar a leucemia e diferenciar seus subtipos (DIGHIERO, 2005; VASCONCELOS, 2005).

Os sistemas clássicos de estadiamento da doença, Rai e Binet, desenvolvidos nos anos de 1975 e 1981, respectivamente, usados até os dias atuais, são baseados em características clínicas e hematológicas. Estes sistemas definem estágios precoce (Rai 0, Binet A), intermediário (Rai I/II, Binet B) e avançado (Rai III/IV, Binet C), com sobrevida, respectivamente: >10 anos, 5-7 anos e 1-3 anos (GONÇALVES et al., 2009). Os estadiamentos podem ser melhor evidenciados na Tabela 1, descrita abaixo:

Tabela 1: Sistemas de estadiamento de Rai (1975) e Binet (1981)

	Estadiamento de Binet	Estadiamento de Rai	Sobrevivência média
Baixo Risco	A: Hb* > 10g/dL, plaquetas $\geq 100 \times 10^3/\mu\text{L}$, ≤ 2 área envolvidas**	0: Linfocitose no sangue e na medula óssea	>10 anos
Risco Intermediário	B: Hb* > 10g/dL, plaquetas $\geq 100 \times 10^3/\mu\text{L}$, ≥ 3 área envolvidas**	I: Linfocitose + linfadenopatia II: Linfocitose + esplenomegalia e/ou hepatomegalia	5-7 anos
Alto Risco	C: Hb* < 10g/dL ou plaquetas $< 100 \times 10^3/\mu\text{L}$.	III: Linfocitose + Hb* < 11g/dL IV: Linfocitose + plaquetas $< 100 \times 10^3/\mu\text{L}$	<3-4 anos

*Hb=hemoglobina. ** áreas envolvidas são fígado, baço e gânglios linfáticos (unilateral ou bilateral) nas regiões inguinal, axilar e cervical.

Fonte: Adaptado de Moreno, C. e Montserrat, E., 2008

A decisão de tratar o paciente é orientada pelo estadiamento clínico, pela presença de sintomas e pelos sinais de atividade da doença. O tratamento da LLC abrange desde a observação periódica do paciente sem medicação específica, até uma variedade de opções terapêuticas que inclui corticosteróides, agentes

alquilantes, análogos de purina, quimioterapia combinada, anticorpos monoclonais e transplante. Em pacientes assintomáticos, o tratamento pode ser adiado até que o paciente se torne sintomático ou apresente sinais de alta atividade da LLC (tempo de duplicação de linfócitos menor que seis meses ou rápido crescimento de linfonodos), sendo necessário um seguimento frequente e cuidadoso para monitorar a evolução clínica (CHIATTONE, 2005).

2.2 Micropartículas circulantes

Em estudos recentes, um grande número de publicações tem estabelecido que células são capazes de produzir vesículas extracelulares, que são importantes mediadores de processos fisiológicos como crescimento celular, ativação, proliferação e apoptose, em células normais e patológicas. Essas vesículas normalmente incluem três populações, que são distinguidas pelo tamanho, composição e biogênese: exossomas (50 a 100 nm de diâmetro), micropartículas (MPs - 0,1 a 1 μm) e corpos apoptóticos (1 μm a 4 μm) (CROMPOT et al, 2015).

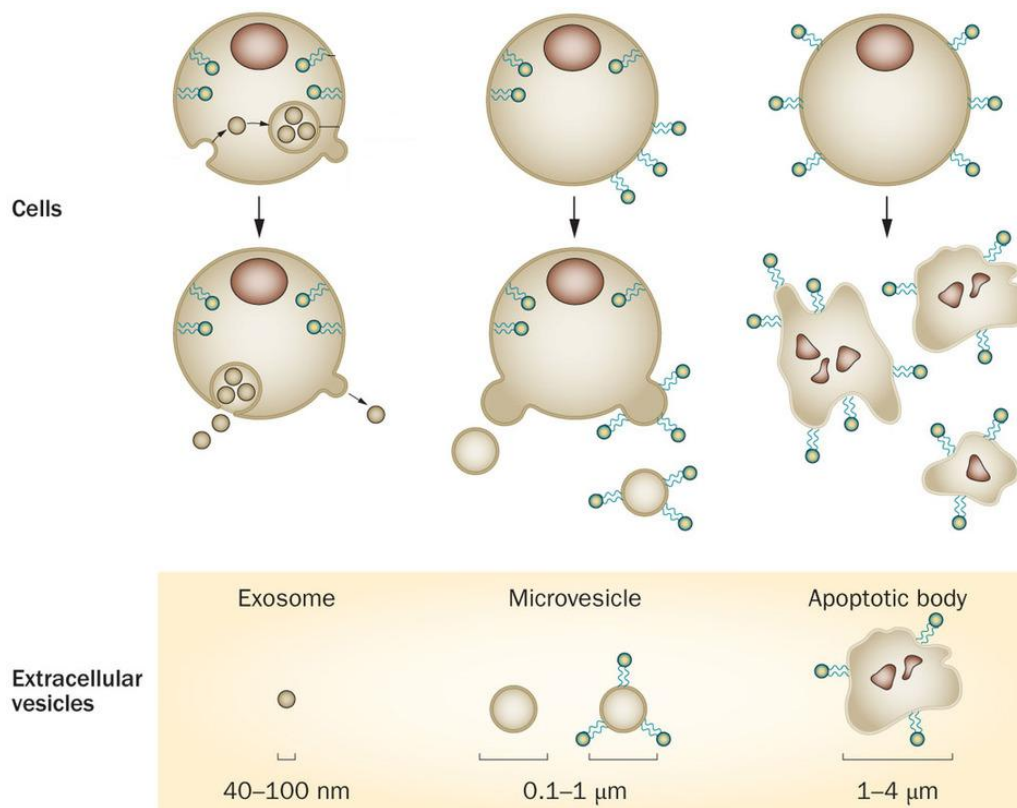


Figura 3: Vesículas extracelulares.

Fonte: LEMOINNE, 2014.

As MPs são fragmentos da superfície de células normais ou malignas que contêm componentes da membrana e conteúdo citoplasmático de sua célula de origem. São constituídas por diversas substâncias que podem incluir proteínas de membrana e proteínas citoplasmáticas, ácidos nucleicos, mRNAs, microRNAs, RNAs não codificantes (ncRNAs), e DNA (CROMPOT et al, 2015). Dessa forma, as MPs contêm numerosas proteínas e lipídeos semelhantes àqueles da célula de origem e isto facilita sua integração com as células que encontram na circulação, sendo que o conteúdo da MP e seu impacto na função biológica são dependentes de sua célula de origem (GHOSH et al. 2010). . As MPs se fundem com sua célula alvo, transferindo a esta o conteúdo do citoplasma e marcadores de superfície provenientes da célula de origem. Esse fenômeno está associado com a mudança de fenótipo e função das células alvo. Portanto, as MPs são consideradas um vetor de modulação remota das células alvo a partir de características provenientes do local onde se originaram (HELBING et al, 2014).

As MPs podem interagir com células alvo através de receptores de membrana e levar à ativação de cascatas de sinalização intracelular. Além disso, células alvo podem ser reprogramadas através de transferência de moléculas de RNA e proteínas. No desenvolvimento do câncer, as MPs derivadas de células cancerígenas são importantes mediadoras do crescimento do tumor, da evasão imune e das metástases. Já foi demonstrado que as MPs são ferramentas adequadas de células malignas para induzir a promoção do microambiente adequado à sobrevivência e ao desenvolvimento de tumores, inclusive da LLC (TRAPPENBURG et al, 2009).

A maioria das MPs presentes em indivíduos saudáveis é de origem plaquetária (mais de 90%), enquanto menos de 10% são originadas de células granulocíticas e menos de 5% são originadas de células endoteliais, eritrócitos e monócitos (TRAPPENBURG et al, 2009). Sabe-se que as MPs derivadas de plaquetas promovem progressão tumoral e metástase de células de câncer pulmonar (GHOSH et al. 2010).

A biologia das MPs ainda não é completamente compreendida, mas é evidente que as mesmas têm muito mais funções além da ativação de células inflamatórias e da cascata de coagulação. Levantando a hipótese de que as MPs não apenas influenciam o fenótipo das células alvo como também o seu transcriptoma (conjunto de componentes envolvidos na transcrição do material

genético, que inclui RNAs e microRNAs), Hunter et al em 2008 avaliaram se MPs derivadas de células monocleares contém microRNAs. Nesse estudo inovador foi verificado que as MPs contém um amplo espectro de diferentes microRNAs que podem ser transferidos à célula alvo e dessa forma regular a síntese de proteínas nessas células.

A área de estudos sobre MPs têm se expandido rapidamente. Tem sido demonstrado que as MPs em fluidos corporais podem ser usados como marcadores de prognóstico em diversas patologias que incluem doenças cardiovasculares, inflamações, sepse, lúpus, HIV e diversos cânceres. Além disso, estudos sobre MPs apresentam diversas aplicações clínicas, especialmente em câncer de cérebro, no qual são usadas como veículo de transporte para diversas moléculas terapêuticas (CROMPOT et al, 2015).

Sabe-se que a maioria das células, inclusive células sanguíneas, produz essas MPs não somente após ativação, mas também em processos que levam a hipercoagulabilidade, pois um número aumentado de MPs é visualizado em pacientes com doenças tromboembólicas. À luz deste conhecimento, acredita-se que as MPs também desempenhem um importante papel no desenvolvimento de um estado de hipercoagulabilidade e, conseqüentemente, na patogênese da trombose. Segundo Trappenburg et al., 2009, a quantidade e as características das MPs circulantes estão associadas com um risco aumentado de trombose arterial e venosa em diversas doenças, inclusive diversos tipos de câncer e sepse. Elevadas quantidades de MPs derivadas de células endoteliais têm sido encontrados em pacientes com tromboembolismo venoso (TRAPPENBURG et al, 2009).

Os primeiros relatos de MPs como agentes pró-trombóticos foram apresentados por Mesri e Altieri em 1999. O estudo revelou que a presença de MPs derivadas de leucócitos e a ativação de vias de sinalização endoteliais levou a um aumento da atividade de fator tissular. Além disso, foi demonstrado que as MPs derivadas de monócitos regulam a expressão de fator tissular pelo endotélio, bem como o de fator de von Willebrand. Em leucemias agudas, existem relatos de efeitos das MPs sobre a gênese de eventos trombóticos (GUZMÁN-URIBE et al, 2015).

Em resumo, as MPs representam uma nova forma de comunicação intercelular, e isso parece muito relevante em diversas condições patológicas (HELBING et al, 2014).

A caracterização das MPs é mais frequentemente realizada por citometria de fluxo, que é considerado o método padrão ouro e é usado em mais de 75% das publicações (CROMPOT et al, 2015).

2.3 Micropartículas circulantes e LLC

A patogênese da LLC, caracterizada pela expansão clonal de uma célula B, está associada a defeitos na apoptose de células B, causada não somente por defeitos intrínsecos, mas também por fatores extrínsecos que influenciam seu comportamento no microambiente tecidual (GHOSH et al., 2010).

A causa da heterogeneidade da doença e grande variação na progressão da mesma ainda não estão totalmente esclarecidas. Um importante fator associado com a progressão da doença seria a resistência à apoptose, uma característica de prognóstico desfavorável que pode estar relacionada à habilidade do clone de manipular o microambiente a seu favor. Em estudo recente, Ghosh et al, 2010, demonstraram a importância da comunicação de células tumorais e seu microambiente através das micropartículas, que podem se fundir com células próximas em suas vias circulatórias.

Já se sabe que as MPs são importantes no estabelecimento de um microambiente pró-sobrevivência na LLC. O aumento do número de MPs foi detectado no plasma sanguíneo de doentes com LLC com estágio avançado da doença e uma estimulação ao desenvolvimento da doença mediada por essas partículas tem sido demonstrada (HADERK et al, 2013).

2.4 Alterações hemostáticas e câncer

A relação entre eventos trombóticos e o câncer foi descrita pela primeira vez em 1823, por Jean-Baptiste Bouillaud (GARDINER, 2015). Em 1865 Armand Trousseau também descreveu a associação clínica entre a trombose e o câncer, sendo o seu primeiro relato sobre a trombose venosa em pacientes com câncer gástrico. O termo “Síndrome de Trousseau” é usado até os dias atuais para descrever qualquer tipo de manifestação tromboembólica que possa ocorrer no câncer (FALANGA et al, 2013).

Atualmente, uma clara associação entre o câncer e a hipercoagulabilidade é reconhecida. Estatísticas afirmam que 10-15% dos pacientes oncológicos irão desenvolver um evento trombótico durante toda a sua doença. Em comparação com a população em geral, o risco de desenvolvimento de um evento trombótico venoso é até sete vezes maior em pacientes com câncer, e essa é a segunda causa de morte mais frequente nesse grupo de pacientes. A trombose venosa profunda (TVP) e a embolia pulmonar (EP) são duas das manifestações trombóticas mais frequentes em pacientes com tumores sólidos e linfomas (GUZMÁN-URIBE et al, 2015).

As complicações tromboembólicas e os diversos outros distúrbios da hemostasia contribuem significativamente para o aumento de índices de morbidade e mortalidade de pacientes com diversos tipos de câncer, inclusive leucemias (MARCHETTI et al., 2012). A TVP frequentemente conduz o paciente ao óbito, e a EP é responsável por 14% das mortes de pacientes com câncer em hospitais (GARDINER, 2015).

Anteriormente, acreditava-se que o risco de complicações trombóticas em pacientes com leucemia era menor do que em pacientes com neoplasias sólidas. No entanto, resultados recentes demonstraram que o risco de tromboembolismo venoso em neoplasias hematológicas é semelhante e em alguns casos maior do que em tumores sólidos (GUZMÁN-URIBE et al, 2015).

Apesar de se constituir um fenômeno bastante conhecido, a ativação da coagulação em pacientes com câncer ainda não está completamente entendido. Essa ativação é um evento complexo e multifatorial, e recentemente têm se valorizado o papel desenvolvido pelas células tumorais em expressar fatores que promovem estados de hipercoagulabilidade. Essa propriedade da célula tumoral leva a ativação da cascata de coagulação, com a geração de trombina e fibrina. Ocorre também a ativação de plaquetas, leucócitos e células endoteliais que expõem seus fatores procoagulantes (FALANGA et al, 2013).

A célula tumoral pode ativar o sistema hemostático através do aumento da expressão de proteínas e lipídeos procoagulantes, citocinas inflamatórias e micropartículas, além de moléculas de adesão (FALANGA et al, 2013).

O fator tissular é considerado o fator procoagulante mais importante (VAN DEN BERG et al, 2012). De acordo com os clássicos conceitos de coagulação sanguínea, a lesão do endotélio leva à liberação de fator tissular para a corrente sanguínea. Esse fator tissular liga-se a seu ligante natural (fator VII) ativando o

mesmo (FVIIa). O complexo ativado converte o fator X em fator X ativado (FXa), que posteriormente converte a protrombina em trombina (VAN DEN BERG et al, 2012). A ativação da coagulação sanguínea leva por fim à geração de trombina, que é a enzima final efetora da cascata de coagulação, e à formação de fibrina (MARCHETTI et al., 2012).

A partir dos anos 2000, um novo modelo para a coagulação baseado em superfícies celulares foi proposto. Nesse modelo, a hemostasia requer substâncias procoagulantes ativadas que permaneçam localizadas no sítio da lesão para a formação de tampão plaquetário e de fibrina neste local. Assim, o processo de coagulação sanguínea é iniciado pela exposição de FT na corrente sanguínea. O FT não é expresso constitutivamente nas células endoteliais, mas está presente nas membranas das células ao redor do leito vascular (FERREIRA et al, 2010).

O entendimento atual do processo hemostático considera que existe uma estreita relação entre os processos físicos, celulares e bioquímicos que atuam em uma série de estágios ou fases, e não em duas vias (intrínseca e extrínseca) conforme propunha o modelo tradicional. As fases de iniciação, amplificação, propagação e finalização, mostradas na Figura 4 ilustram o complexo processo que garante a circulação do sangue na forma líquida, restrita ao leito vascular (FERREIRA et al, 2010).

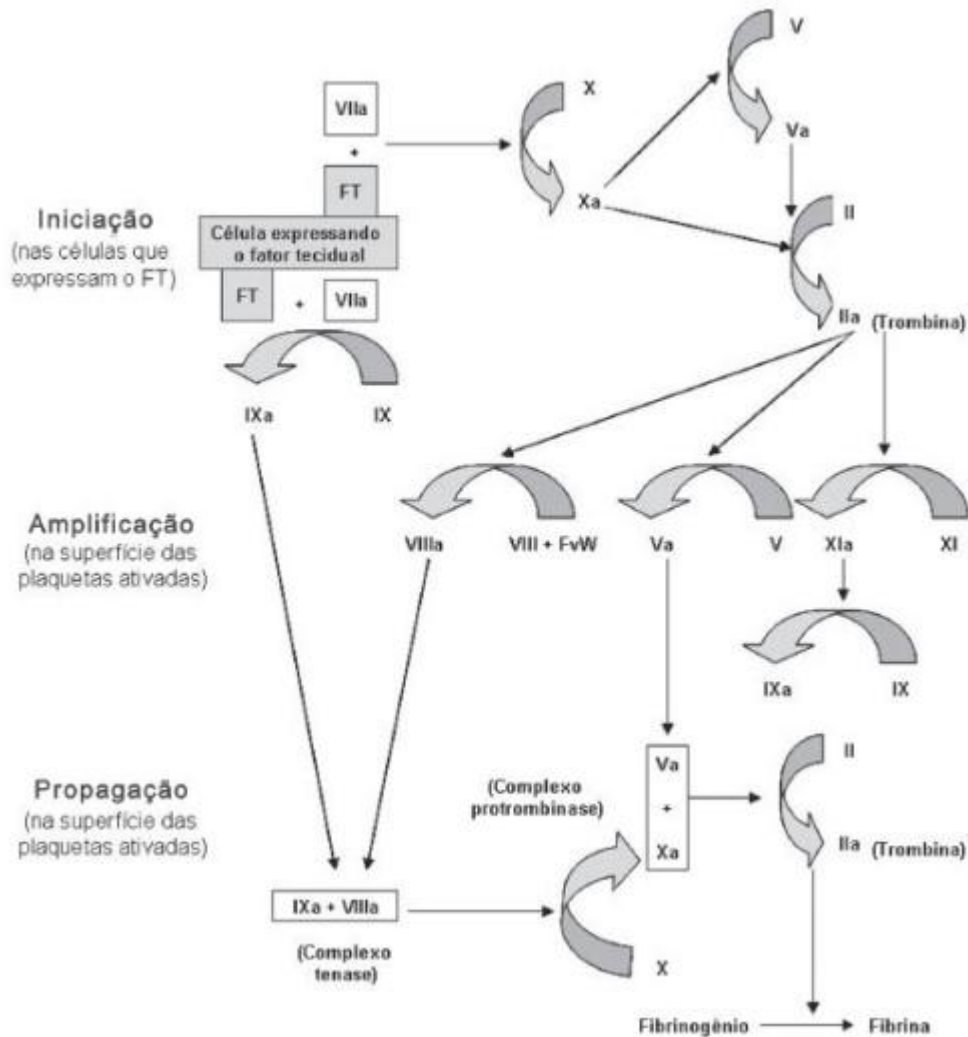


Figura 4: Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares.

Fonte: FERREIRA et al, 2010.

Dessa forma, níveis aumentados de fator tissular e de outros fatores de coagulação têm sido aventados para explicar o estado de hipercoagulabilidade frequente em pacientes oncológicos. Todavia, alterações nas vias de anticoagulação natural têm também sido propostas, conforme descrito por Nijziel et al., 2003.

Especificamente na LLC, poucos são os estudos com foco em hipercoagulabilidade. Em um estudo de coorte conduzido por SIMKOVIC et al em 2015 demonstrou que a TVP foi observada em 37% dos pacientes em tratamento da LLC. Porém, a maioria dos pacientes estava em tratamento com doses elevadas de glicocorticoides, que é um fator de risco conhecido para TVP devido principalmente ao aumento de fatores de coagulação.

Ainda segundo o mesmo autor, há outros fatores de risco específicos em pacientes com LLC que poderiam desempenhar um papel no desenvolvimento de

eventos trombóticos, como por exemplo a hiperleucocitose (global de leucócitos acima de $100.000/\text{mm}^3$) que leva à leucostase. Além disso, o avanço da idade também está associada a maior incidência de eventos trombóticos. (SIMKOVIC et al, 2015).

Com relação à hipocoagulabilidade, não foram encontrados estudos relacionando esse tipo de alteração hemostática com a LLC.

2.5 Geração de Trombina

Atualmente, os testes mais utilizados na prática clínica para avaliação da hemostasia secundária são os testes de Tempo de Protrombina, Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado, Dímero D e dosagem de fatores específicos. Esses testes utilizam a formação de fibrina como ponto final (*endpoint*) na avaliação da coagulação sanguínea, e isso se deve à sua facilidade de mensuração. No entanto, tais testes falham na estimativa do potencial de trombina uma vez que apenas 5% da trombina a ser formada já é suficiente para transformar o fibrinogênio em fibrina, levando então ao ponto final da reação. Em função desta propriedade, os níveis de trombina são subestimados por esses exames de triagem. A partir do ano 2000 novos modelos para a hemostasia foram propostos, inclusive o novo modelo celular, e atualmente, assume-se que a trombina é o principal regulador da hemostasia (ZAGO et al., 2013).

A partir disso, críticas têm sido destinadas aos testes utilizados atualmente na triagem de distúrbios de hipo e hipercoagulação e a utilização de novos testes tem sido proposta.

Segundo Marchetti et al., 2012, o potencial de geração de trombina de diferentes células tumorais pode ser quantificado e caracterizado pelo método de CAT[®] (Calibrated Automated Thrombogram[®]), o qual pode ser uma ferramenta útil para entender a biologia dos diferentes tumores acerca do seu potencial de hipercoagulabilidade. O grau de ativação da cascata de coagulação poderá ter implicação na conduta terapêutica para prevenção de eventos tromboembólicos em alguns casos de câncer nos quais houver anormalidades hemostáticas predisponentes à hipercoagulabilidade. Particularmente na LLC, poucos são os estudos com foco em hemostasia.

O Teste de Geração de Trombina (TGT) é um teste que vem sendo extensamente investigado, e consiste na avaliação contínua da geração de trombina no plasma após adição de ativadores, em tempo real. Há uma tendência ao uso de fator tissular como ativador e o uso de baixas concentrações desse componente, em presença de cálcio, permite um processo lento da geração de trombina. Isso permite a avaliação dos processos de iniciação, amplificação e propagação do modelo celular de hemostasia. O resultado final é uma curva, chamada de trombograma, cuja área deve refletir o potencial endógeno de trombina do indivíduo.

Para obtenção dessa curva, mensura-se a fluorescência em função da formação ou inibição da trombina em tempo real, em plasma adicionado de fator tissular, fosfolípidos e cloreto de cálcio (MARCHETTI, 2008). O substrato é consumido durante o experimento e então a velocidade de formação do produto diminui em função da diminuição da concentração do substrato enzimático. Portanto, a intensidade de fluorescência não é linear em relação à concentração do fluoróforo, e o resultado é uma curva não linear (HEMKER et al, 2013).

A curva de geração de trombina pode ser descrita com quatro parâmetros principais, que são ETP (*Endogenous Thrombin Potential*), *lag-time*, *peak* e *time to peak*. O potencial de trombina endógeno (ETP) pode ser representado como a área sobre a curva, o *peak* é o pico máximo de fluorescência, o *time to peak* é o tempo para se atingir o pico e o *lag-time* é o tempo necessário para o início da detecção da fluorescência (MARCHETTI et al, 2012). Um exemplo de curva de geração de trombina pode ser visualizado na Figura 2:

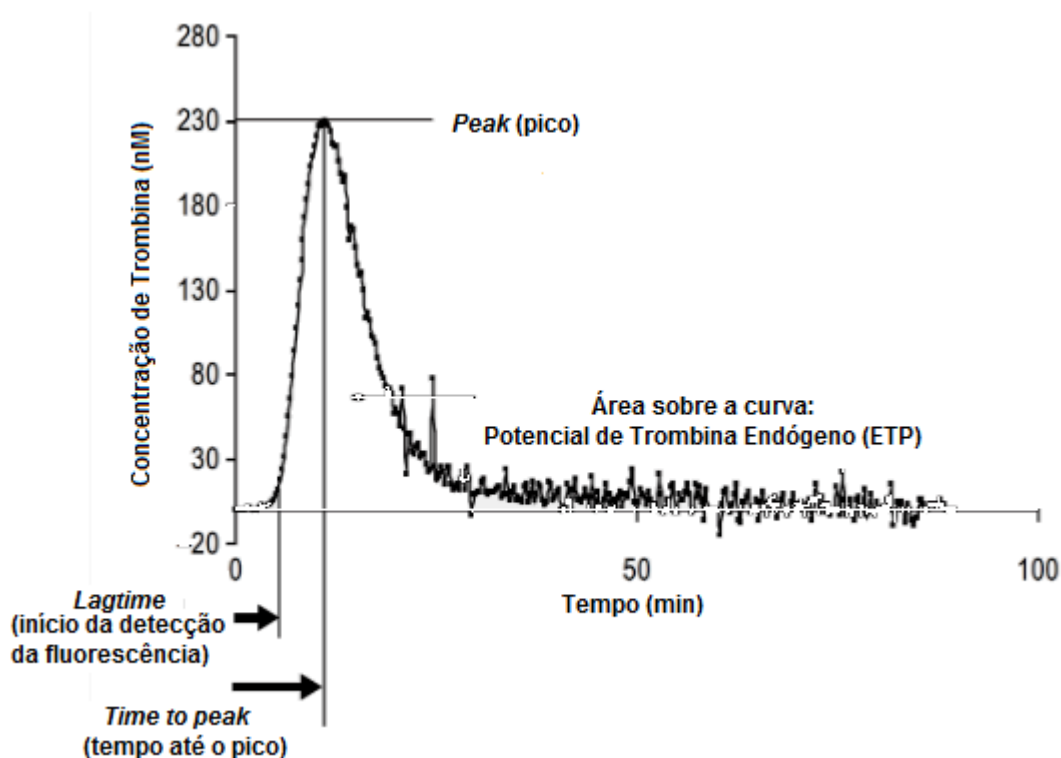


Figura 5: Curva de Geração de Trombina

Fonte: Baglin, 2011.

Todos esses parâmetros nos fornecem informações importantes a respeito da hiper ou hipocoagulabilidade dos pacientes.

O equipamento utilizado normalmente é acoplado a um *software*, que recebe todas as informações e converte em dados que levam à formação da curva de geração de trombina.

A sensibilidade desse teste permite a detecção de estados tanto de hipo quanto de hipercoagulabilidade. O TGT vem sendo usado na avaliação da hemostasia em várias situações tais como cirrose, sepse, câncer, doença falciforme, doença arterial oclusiva, hemofilias, entre outros (ZAGO et al., 2013). No entanto, seu uso se limita ainda à pesquisa uma vez que o teste ainda requer padronização para utilização em laboratórios clínicos.

O TGT é um teste que pode ser usado como uma nova ferramenta para a investigação *in vivo* dos aspectos hemostáticos em função da evolução do tumor, e pode ser útil também na investigação de novos alvos terapêuticos para a prevenção de eventos tromboembólicos (MARCHETTI et al., 2012).

Além disso, o TGT é capaz de refletir muitas, se não todas, as funções globais do sistema de coagulação sanguínea. Em plasma livre de plaquetas (PLP),

evidencia todas as deficiências de fatores da coagulação (com exceção do fator XIII), e é sensível à ação de anticoagulantes orais, todos os tipos de heparina, inibidores diretos da trombina e à todas as drogas anticoagulantes testadas. Hiperprotrombinemia e deficiência de antitrombina, proteína S ou proteína C, bem como a resistência à ativação da proteína C aumentam a geração de trombina (HEMKER et al, 2003).

3 JUSTIFICATIVA

A importância deste estudo consistiu em investigar o possível aumento no número de micropartículas circulantes e sua correlação com o estadiamento da LLC, com os dados clínicos e demográficos dos pacientes avaliados. Uma segunda parte do estudo consistiu em mensurar os níveis plasmáticos de geração de trombina dos pacientes, bem como avaliar sua relação com a quantidade de MPs e os outros parâmetros obtidos. Sabendo-se da importância do Teste de Geração de Trombina como uma potencial ferramenta útil na prevenção de eventos trombóticos (MARCHETTI et al., 2012), já que o mesmo pode informar sobre o potencial de trombina formada (potencial trombótico) e conduzir à adoção de medidas profiláticas, pode-se inferir que a avaliação hemostática por meio deste método agregou valor ao presente estudo. Não é do nosso conhecimento o uso do método de CAT (de referência) para avaliar o potencial de geração de trombina, com seus vários parâmetros em nosso país, cujos experimentos pioneiros em LLC abrirão perspectivas para aplicação desta promissora técnica em uma gama de outras doenças e/ou condições.

Pretende-se com os objetivos traçados neste projeto, contribuir para a melhoria no entendimento da fisiopatologia e prognóstico na LLC. Tal estudo se torna relevante quando se leva em consideração a alta morbimortalidade desta doença e outras relacionadas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil hemostático de pacientes com LLC por meio da quantificação plasmática de micropartículas circulantes e do potencial de geração de trombina, e sua correlação com o estadiamento da doença, dados clínicos e demográficos dos pacientes avaliados.

4.2 Objetivos específicos

- Quantificar as micropartículas circulantes derivadas de plaquetas (CD41), de linfócitos B (CD19) e de células endoteliais (CD51/61) em pacientes com LLC por análise quantitativa em Citometria de Fluxo;
- Determinar o potencial de Geração de Trombina em pacientes com LLC, mediante obtenção dos parâmetros *Lag Time*, ETP (*Endogen Thrombin Potential*), *Peak* e *Time to Peak*.
- Correlacionar os parâmetros hemostáticos com os dados clínicos dos pacientes com LLC.

5 ARTIGO TÉCNICO CIENTÍFICO

MICROPARTÍCULAS CIRCULANTES E GERAÇÃO DE TROMBINA EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA

AUTORES: Aline Lúcia Menezes Ferrão; Fernanda Cristina Gontijo Evangelista; Rita Carolina Figueiredo Duarte; Fernanda Freire Campos Nunes; Tatiane Vieira Braga; Marie Gabriele Santiago; Maria das Graças Carvalho, Adriano de Paula Sabino.

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

RESUMO

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é uma doença de maior prevalência no idoso, caracterizada pelo acúmulo de linfócitos B no organismo. A sobrevida dos pacientes é aproximadamente 10 anos, mas o prognóstico é variável e alguns evoluem com curta sobrevida. É importante identificar precocemente os indivíduos que apresentarão doença de rápida evolução e que podem se beneficiar de protocolos de tratamento mais adequados. Estudos enfocando o papel das micropartículas (MPs) de diferentes origens na patogênese de muitas doenças têm sido realizados. Essas MPs consistem de fragmentos de membrana celular ou de citoplasma de suas células de origem. O número de MPs derivado principalmente de plaquetas está elevado em distúrbios tromboembólicos. Sabendo-se que existe uma clara associação entre o câncer e a coagulação, o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil hemostático de pacientes com LLC por meio da quantificação plasmática de MPs circulantes e do potencial de geração de trombina (GT), e sua correlação com a progressão da doença. Foram avaliados 35 indivíduos diagnosticados com LLC selecionados no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. As mesmas análises foram realizadas em 35 indivíduos aparentemente saudáveis (grupo controle). A análise de MPs derivadas de células endoteliais (MPE), de linfócitos B (MPL) e de plaquetas (MPP) foi realizada por citometria de fluxo e a avaliação do perfil hemostático foi realizada através da Geração de Trombina (GT) pelo método Calibrated Automated Thrombogram®

(CAT[®]). Foram observados níveis significativamente aumentados (em MPs/ μ L) de MPEs no grupo de pacientes com LLC, [132,1(78,6-199,1)] quando comparados ao grupo controle [81,6(53,1-121,0), $p=0,002$]. O mesmo foi observado para MPLs [142,1(93,7-203,1)] em relação aos controles [85,2(63,4-115,9), $p<0,001$] e para MPPs [134,8(85,7-183,1)], grupo controle=[81,2(52,8-118,9), $p=0,003$]. Quando os pacientes foram estratificados de acordo com o estadiamento da doença segundo Binet, foram observadas diferenças significativas ($p<0,05$) apenas entre os grupos Binet A *versus* controles para as MPEs[149,8(75,3-212,5)], MPLs [145,2(91,9-235,6)] e MPPs [148,1(82,2-202,1)]. Por outro lado, o potencial de GT foi menor nos casos de LLC [1453,00(1176,33-1602,57)] em relação aos controles [1577,38(1326,20-1816,95), $p=0,031$], principalmente nos casos mais graves classificados como Binet B+C [1216,54(1130,47-1540,15), $p=0,009$]. O número aumentado de MPs na LLC indica que a microvesiculação pode ser resultante da patogênese da doença em si, e não necessariamente relacionada à progressão da doença. Por outro lado, o potencial de GT diminuído na LLC em relação aos controles, principalmente nos casos mais graves, remete ao fato de que a doença pode afetar não apenas o número de plaquetas, mas também outros fatores de importância hemostática, tornando o paciente mais predisposto a fenômenos hemorrágicos do que trombóticos.

Palavras-chave: Leucemia linfocítica crônica, prognóstico, micropartículas, geração de trombina.

INTRODUÇÃO

A leucemia linfocítica crônica (LLC), caracterizada pelo acúmulo de linfócitos B no organismo, é uma doença de maior prevalência no idoso, com média de idade entre 64-70 (GONÇALVES et al., 2009). A LLC deriva de uma população de células B CD5+, sendo que estas células possuem grande longevidade, na maioria dos casos determinada pela inibição da apoptose (FALCÃO & REGO, 2001; DIGHIRO, 2005). A sobrevida dos pacientes com LLC é de aproximadamente 10 anos. No entanto, o prognóstico é bastante variável e alguns evoluem com curta sobrevida (FARIA et al., 2000; HALLEK et al., 2008). Dessa forma, torna-se de importante identificar precocemente os indivíduos que apresentarão doença de rápida evolução e que podem se beneficiar de protocolos de tratamento mais agressivos.

Nos pacientes sintomáticos, os achados mais comuns são a linfadenopatia generalizada, perda de peso, cansaço e infecções bacterianas, geralmente pneumonias. Com a progressão da doença, o paciente pode desenvolver anemia grave e sangramentos em decorrência da plaquetopenia, além de outras manifestações. (FALCÃO & REGO, 2001; DIGHIRO, 2005).

Os sistemas clássicos de estadiamento da doença, Rai e Binet, de 1975 e 1981, respectivamente, são baseados em características clínicas e hematológicas. Estes sistemas definem estágios precoce (Rai 0, Binet A), intermediário (Rai I/II, Binet B) e avançado (Rai III/IV, Binet C), com sobrevida, respectivamente: > 10 anos, 5-7 anos e 1-3 anos (GONÇALVES et al., 2009).

Nos últimos anos, muitos investigadores tem realizado estudos enfocando o papel das micropartículas (MPs) de diferentes origens na patogênese de muitas doenças (HUGEL et al., 2005; YUANA et al., 2013; HELBING et al., 2014;). Conforme revisado por Helbing et al., 2014, MPs consistem de fragmentos provenientes de membrana celular ou de citoplasma de suas células de origem, e são capazes de transferir componentes celulares dessas células para as células alvo, o que frequentemente resulta em função alterada de tais células.

O número de MPs derivado principalmente de plaquetas está elevado em distúrbios tromboembólicos. Sabendo-se que as doenças malignas cursam com um grau de hipercoagulabilidade variável de acordo com o tipo de tumor, é possível que as MPs tenham algum papel na patogênese das leucemias predispondo a eventos trombóticos.

A ativação da coagulação é um evento complexo e multifatorial, e recentemente têm se valorizado o papel desenvolvido pelas células tumorais em expressar fatores que promovem estados de hipercoagulabilidade. Essa propriedade da célula tumoral leva a ativação da cascata de coagulação, com a geração de trombina e fibrina. Ocorre também a ativação de plaquetas, leucócitos e células endoteliais que expõem seus fatores procoagulantes (FALANGA et al, 2013).

Níveis aumentados de fator tissular e de outros fatores de coagulação têm sido aventados para explicar o estado de hipercoagulabilidade frequente em tais pacientes. Todavia, alterações nas vias de anticoagulação natural têm também sido propostas conforme descrito por Nijziel et al., 2003.

Especificamente na LLC, poucos são os estudos com foco em hipercoagulabilidade. Em um estudo de coorte conduzido por SIMKOVIC et al em 2015 demonstrou que a TVP foi observada em 37% dos pacientes em tratamento da LLC. Porém, a maioria dos pacientes estava em tratamento com doses elevadas de glicocorticoides, que é um fator de risco conhecido para TVP devido principalmente ao aumento de fatores de coagulação. Além disso, há outros fatores de risco específicos em pacientes com LLC que poderiam desempenhar um papel no desenvolvimento de eventos trombóticos, como por exemplo a hiperleucocitose (global de leucócitos acima de $100.000/\text{mm}^3$) que leva à leucostase. O avanço da idade também está associado a maior incidência de eventos trombóticos. (SIMKOVIC et al, 2015).

Com relação à hipocoagulabilidade, não foram encontrados na literatura estudos relacionando esse tipo de alteração hemostática com a LLC.

Quanto mais se conhece sobre a fisiopatologia das leucemias e quanto mais cedo se faz o diagnóstico e se inicia o tratamento, maiores as chances de sobrevivência e de cura. Por isso, estudos enfocando os mais diversos aspectos da doença, diagnóstico, evolução e tratamento são muito pertinentes, considerando a necessidade de obter maiores conhecimentos visando a melhoria do manejo destes pacientes.

O objetivo desse estudo consiste em avaliar o perfil hemostático de pacientes com LLC por meio da quantificação plasmática de micropartículas circulantes e do potencial de geração de trombina, e sua correlação com a progressão da doença, dados clínicos e demográficos dos pacientes avaliados. Acredita-se que o desenvolvimento do presente estudo possa agregar algum conhecimento aos pré-

existentes acerca da fisiopatologia da LLC, e nos ajude a responder a seguinte pergunta: qual a importância das micropartículas e do potencial de geração de trombina como biomarcadores de prognóstico na LLC?

PACIENTES E MÉTODOS

Casuística

Os pacientes participantes do estudo foram selecionados pelos médicos hematologistas do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, que se localiza no Ambulatório Borges da Costa, para a coleta de amostra biológica. Essa coleta foi realizada no período de agosto de 2014 a janeiro de 2015.

O critério diagnóstico utilizado pelos médicos hematologistas é baseado no método proposto por Matutes et al, em 1994, no qual um sistema de pontuação é proposto a partir de análise imunofenotípica de células patológicas. Os anticorpos avaliados são CD5, CD23 e FMC7 e são considerados pacientes com LLC os pacientes com scores 3, 4 ou 5. Outras doenças linfoproliferativas não LLC normalmente apresentam escores 0 a 2, conforme tabela contida no Anexo VI.

O tamanho amostral foi calculado considerando-se as variáveis estudadas, grupos avaliados, tratamentos aplicados, poder de teste de 0.8 e alfa 0.05, usando-se o software sigma stat versão 2.03. Foi calculado um n amostral de 28 indivíduos para cada grupo estudado.

Foi preenchida uma ficha clínica para cada paciente, após os mesmos terem sido esclarecidos acerca dos objetivos do estudo e após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). A ficha clínica foi preenchida a partir de análise de prontuário para o grupo de pacientes, e a partir de auto-relato, no grupo controle. O presente estudo se caracteriza como transversal e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP), conforme parecer 34778, ementa E2/2015.

Os pacientes foram classificados de acordo com critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), Estadiamento da Leucemia Linfocítica Crônica (K.R. Rai et al, 1975) e Classificação do Grupo de Trabalho Internacional (J.L. Binet et al.,1981). Esses critérios permitem que o médico classifique o paciente como sendo de baixo risco, médio risco ou alto risco, e essa informação é registrada no prontuário a cada consulta.

Foram avaliados três grupos.

Grupo 1: constituído por 18 indivíduos com diagnóstico de leucemia linfocítica crônica (LLC) de baixo risco (Binet A),

Grupo 2: constituído por 17 indivíduos com diagnóstico de leucemia linfocítica crônica (LLC) de alto risco (Binet B+C),

Grupo 3: constituído por 35 indivíduos aparentemente saudáveis, que consistiu no grupo controle.

O fluxograma abaixo apresenta o número total de participantes do estudo, distribuídos em dois grupos: indivíduos controles e pacientes. Devido a limitações do estudo de ordens diversas, foram analisados 35 amostras de indivíduos com diagnóstico de LLC e 35 amostras de indivíduos do grupo controle.

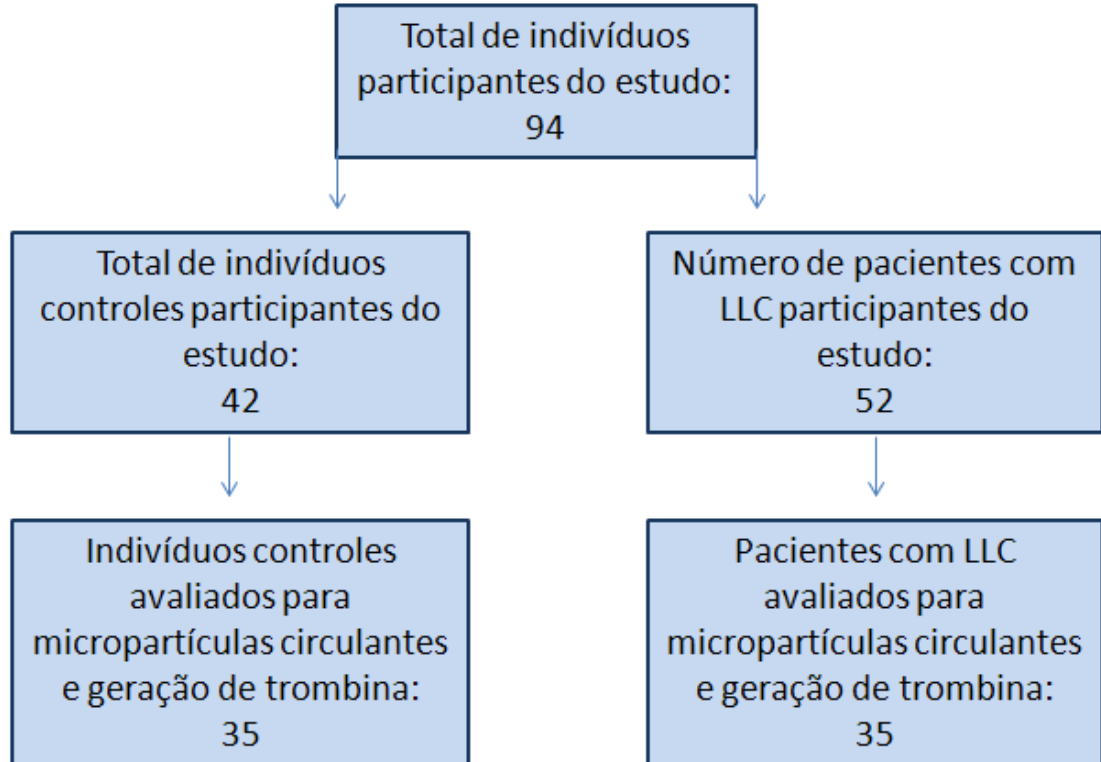


Figura 6: Fluxograma de pacientes e controles.

Critérios de inclusão

Foram incluídos homens e mulheres com idade maior ou igual a 55 anos, de ambos os sexos. Para o grupo controle foram incluídos indivíduos sem diagnóstico e história de neoplasias hematológicas e/ou doenças tromboembólicas, clínica e laboratorialmente saudáveis, que foram selecionados em uma academia pública denominada Academia da Cidade, pertencente à Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, localizada no bairro Santa Rosa, em Belo Horizonte. A confirmação laboratorial foi feita através dos exames hemograma TGO, TGP, gama GT, creatinina, proteína C reativa, colesterol total, colesterol HDL e triglicérides.

Para o grupo de pacientes, foram incluídos pacientes com diagnóstico confirmado de LLC pelo critério de Matutes, 1994, selecionados sequencialmente por médicos hematologistas do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da UFMG e atendidos no Ambulatório Borges da Costa (anexo do Hospital das Clínicas da UFMG).

Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes com diagnóstico de outros distúrbios linfoproliferativos como leucemia prolinfocítica, leucemia de células pilosas, linfoma esplênico com linfócitos pilosos, leucemia plasmocítica além dos linfomas Hodgkin e não-Hodgkin. Foram excluídos indivíduos que fazem uso de reposição hormonal ou que tenham história pessoal ou familiar de fatores genéticos predisponentes à hipercoagulabilidade ou outro distúrbio hemostático. Aqueles que fazem uso de medicamentos que interferem na hemostasia foram também excluídos, bem como aqueles com doenças hepáticas, renais ou autoimunes. Também foram excluídos os pacientes que sofreram previamente infarto agudo do miocárdio. Estes dados foram obtidos a partir de análise de prontuário dos pacientes e de uma ficha clínica para cada indivíduo do grupo controle, baseada em auto-relato.

Amostra biológica

Foram coletados 5,0 mL de sangue total em tubos com anticoagulante citrato de sódio (*BD Vacutainer*). As amostras foram processadas para a obtenção de plasma livre de plaquetas (PPP), através da dupla centrifugação a 3500 rpm por 15 minutos em centrífuga Excelsa, Mod 206BL (*Fanem*). Após a segunda centrifugação,

foram retirados os dois terços superiores do plasma, referente à porção livre de plaquetas. O plasma obtido foi armazenado à temperatura de -80°C.

Análise das micropartículas circulantes

A análise de micropartículas circulantes foi realizada de acordo com Campos et al., 2010 por Citometria de Fluxo. Os anticorpos utilizados nessa reação foram os anticorpos marcadores de plaquetas (CD41), de linfócitos B (CD19) e de célula endotelial (CD51/61). Esses anticorpos são marcados com os fluorocromos PE-Cy5 (CD41) e PE (CD19 e CD51/61). Além disso foi utilizado a Anexina V-FITC, um marcador clássico de MPs, direcionado contra a fosfatidilserina encontrada na superfície das mesmas.

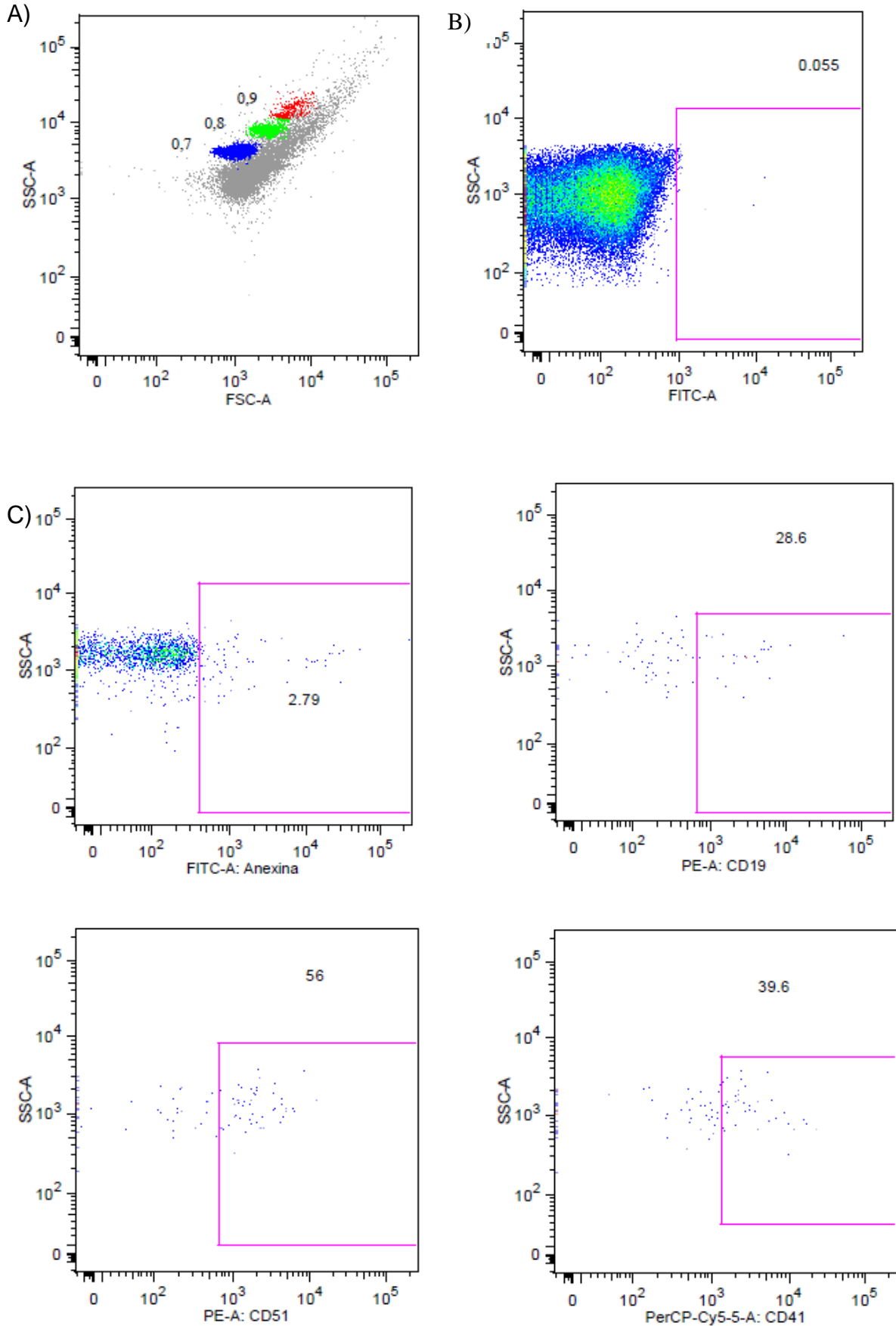
Após a obtenção do PPP, foram pipetados 100 µL e colocados em um tubo contendo 300 µL de solução de citrato-heparina (diluição 1:3). A amostra diluída foi centrifugada a 15000xg por 90 min a 15°C em centrífuga Laborzentrifugen 2K15 (*Sigma*). Cuidadosamente foi removido o sobrenadante e o *pellet* de MPs foi ressuspensão em 100 µL de tampão de anexina 1X (binding buffer).

Separadamente, em tubos próprios para a leitura no citômetro, foram adicionados 5 µl de cada um dos anticorpos (CD51/61, CD19 e CD 41) e 2,5 µl de FITC Annexin V. A esses tubos foram adicionados 100 µL da amostra ressuspensa em tampão de anexina 1X, obtida anteriormente. Essas concentrações foram baseadas em um experimento feito previamente para titulação dos anticorpos.

Os tubos foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente (25°C), no escuro. Ao material incubado, foram adicionados 300 µl de tampão de anexina e a análise foi realizada no citômetro. A estratégia de análise está descrita na Figura 7.

As MPs foram quantificadas por citometria de fluxo através da calibração com *microbeads* fluorescentes (*Spherotech Inc. Libertyville, Illinois, US*) de tamanho definido (0,7 a 0,9 µm). Dez microlitros das *beads* foram adicionadas à 100 µL de PBS 1X estéril. O citômetro foi ajustado para realizar a leitura das amostras a uma alta velocidade (60 µl/segundo) para cada amostra. O número de MPs/µl de plasma foi calculado como descrito por Campos et al, 2010: $MPs/\mu l = (N \times 400)/(60 \times 100)$, onde N é o número de eventos adquiridos na região das MPs, 400 é o volume total em cada tubo antes da análise, 60 é o volume de amostra analisada e 100 é o volume original da suspensão de MPs.

O citômetro utilizado na quantificação das MPs foi o BD LSR Fortessa, e as análises foram realizadas por meio do programa *FlowJo*, versão 8.7 (Tree Star).



D)

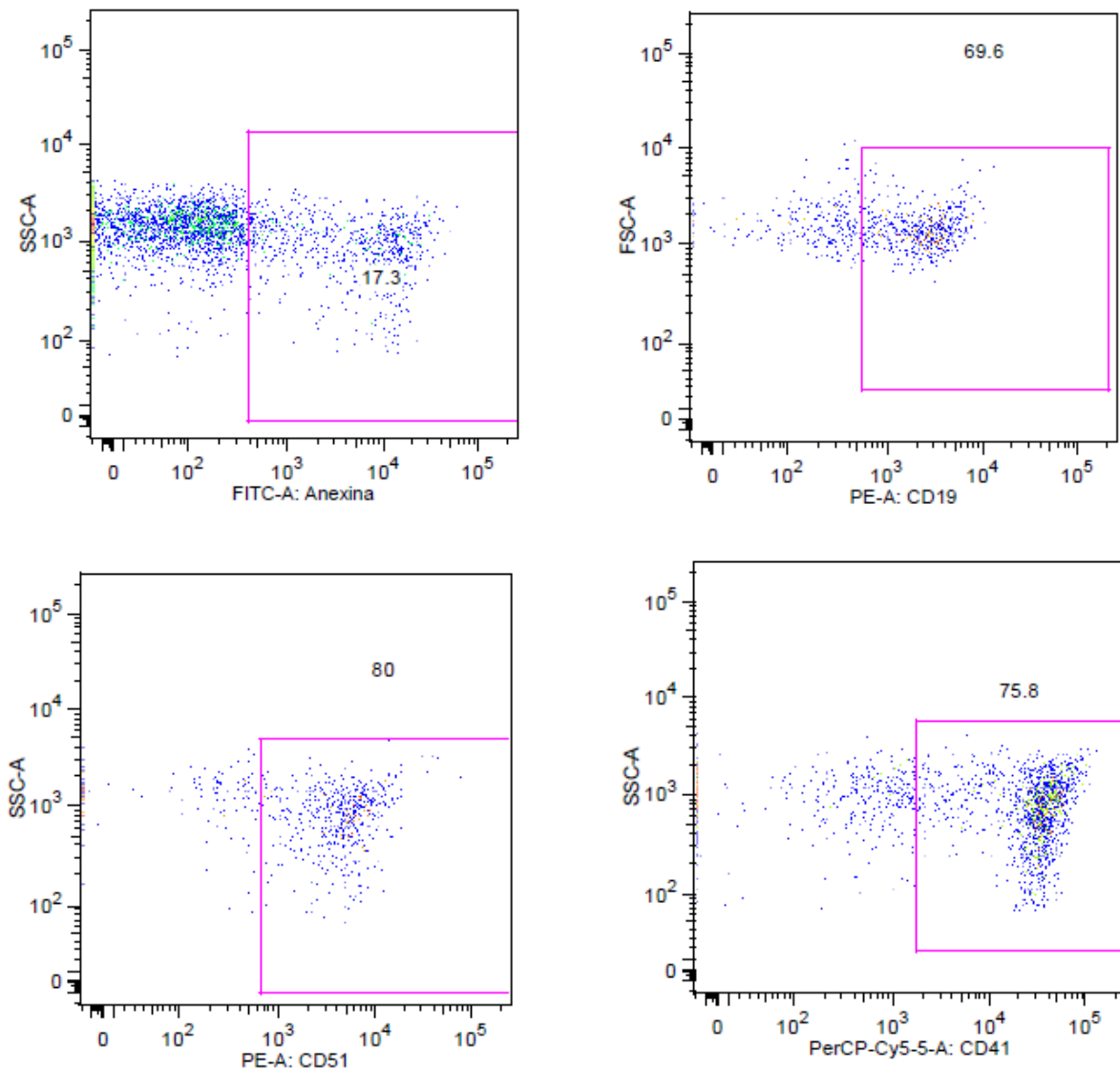


Figura 7: Identificação de MPs no plasma de indivíduos com LLC. **(A)** MPs isoladas do plasma foram selecionadas de acordo com seu tamanho (SSC) e granulosidade (FSC). Microesferas fluorescentes de tamanho definido (0,7-0,9 μm) foram utilizadas para delimitar a região das MPs. **(B)** O controle de isótipo IgG-FITC de camundongo foi utilizado para a delimitação correta da região de MPs. **(C)** Imunofenotipagem das MPs no plasma de indivíduos controle. Os eventos presentes na região delimitada em (A) foram selecionados pela marcação positiva com Anexina V-FITC. Pode-se visualizar os anticorpos monoclonais marcadores de plaquetas (CD41), de linfócitos B (CD19) e de célula endotelial (CD51/61) marcados com os fluorocromos PECy5 (CD41) e PE (CD19 e CD51/61). **(D)** Imunofenotipagem das MPs nos indivíduos com LLC.

Geração de trombina

A geração de trombina foi determinada segundo Hemker et al., 2003 e Castoldi et al, 2010 em plasma pobre em plaquetas (PPP) utilizando o método de

CAT (Thrombinoscope BV). Em uma placa de 96 *wells* foram adicionados 80 μL de PPP das amostras a serem testadas e 5 μL de tampão HNBSA (*Hepes/NaCl/BSA*) e, para cada amostra, foi adicionado um *well* para o calibrador, constituído de 80 μL de PPP, 5 μL de tampão HNBSA e 20 μL do reagente *Thrombin Calibrator (STAGO)*. Uma vez preenchida a placa com as amostras de plasma a serem testadas e seus respectivos calibradores, a placa foi colocada no fluorímetro (*Fluoroskan Ascent, Thermo Laboratories*) para incubação a 37° C por 10 minutos. Após a incubação foram adicionados, somente nos *wells* com as amostras de PPP a serem testadas, 20 μL de fator tissular em alta concentração: *PPP-Reagent High (STAGO)*. Em seguida, 20 μL do substrato fluorescente (*Fluca-Kit – STAGO*) foi dispensado em todos os *Wells*, procedendo-se à leitura da placa por 60 minutos. O *software Thrombinoscope* foi utilizado para construção da curva de tempo (min) *versus* concentração de trombina (nM) e para o cálculo dos parâmetros de GT. A formação dessa curva pôde ser observada cineticamente na tela do computador. A curva de geração de trombina pode ser descrita com os quatro parâmetros principais: ETP (*Endogenous Thrombin Potential*), *lag-time*, *peak* e *time to peak*.

Análises estatísticas

Os resultados foram analisados utilizando-se o programa “Sigma Stat” versão 2.03 e apresentados como média e desvio padrão no caso de distribuição normal, enquanto os resultados que não seguiram distribuição normal foram apresentados como mediana e intervalo interquartil. Para as variáveis com distribuição normal foi empregada a análise de variância (ANOVA) seguido de teste de comparação múltipla de Tukey para comparação de três grupos, e para as situações de comparação de dois grupos, foi realizado o teste t de Student. Para aquelas variáveis que não apresentaram distribuição normal, foi empregado o método não paramétrico de Mann Whitney para comparação de dois grupos, e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn’s para comparação de mais de dois grupos. A investigação da correlação entre os parâmetros estudados foi realizada pela correlação de Pearson para variáveis quantitativas e Spearman para variáveis qualitativas. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Não foram observadas diferenças significativas quando se comparou a idade dos pacientes *versus* grupo controle ($p = 0,267$). Quando se avaliou a distribuição do sexo entre o grupo com LLC e o grupo controle, também não foram observadas diferenças significativas ($p = 0,090$).

Pacientes e controles também foram comparados quanto aos níveis de hemoglobina, contagem total de leucócitos e contagem de plaquetas. Para esses três parâmetros do hemograma, foram observadas diferenças significativas com $p < 0,05$ entre o grupo com LLC e o grupo controle. Os valores de contagem de plaquetas e dosagem de hemoglobina foram menores no grupo de doentes do que no grupo controle. Já a contagem de leucócitos se mostrou mais alta nos pacientes do que nos controles (Tabela 2).

Tabela 2: Variáveis para controles e pacientes obtidos de amostras de plasma de pacientes com LLC e de controles

Variáveis	Controles n=35	LLC n=35	p
M/F	11/24	19/16	$p = 0,090$
Idade* (anos)	69,5 (66,0-76,0)	66,2 (55,0-80,1)	$p = 0,267$
Hemoglobina* (g/dL)	13,5 (13,1-14,6)	12,3 (10,9-14,2)	$p = 0,004$
Leucócitos* ($10^3/\text{mm}^3$)	5,7 (4,3 - 6,5)	17,9 (6,2-41,8)	$p < 0,001$
Plaquetas* ($10^3/\text{mm}^3$)	202,0 (176,3 - 239,0)	136,0 (106,0-182,0)	$p < 0,001$
Binet A	na	18	
Binet B	na	7	
Binet C	na	10	

M: masculino; F: feminino; na: não se aplica; LLC=Leucemia Linfocítica Crônica. *Mediana e intervalo interquartilico

Quando os pacientes foram analisados de acordo com o estadiamento da doença segundo Binet, foram observadas diferenças significativas entre a contagem de plaquetas dos grupos Binet A (164,889 +/- 42,397) *versus* Binet B+C (111,294 +/- 50,575) ($p=0,002$). Também foram observadas diferenças significativas entre a contagem de plaquetas entre grupos Binet A *versus* controle [202,00 (176,25-239,00)] ($p=0,004$) e entre os grupos Binet B+C *versus* controle ($p<0,001$), sendo que os resultados mais baixos foram os do grupo Binet B+C, seguidos do grupo Binet A e os mais altos fazem parte do grupo controle.

A comparação da contagem global de leucócitos mostrou diferença significativa entre o grupo Binet A [16,350 (5,875-42,700)] e o grupo controle [5,650 (4,300-6,450)] ($p<0,001$) e entre o grupo Binet B+C [18,600 (7,750-45,200)] e o grupo controle ($p<0,001$). Porém, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Binet A *versus* grupo Binet B+C ($p=0,704$).

Também não foram observadas diferenças significativas entre a contagem de linfócitos para os grupos Binet A [10,47 (3,11-35,8)] *versus* Binet B+C [16,51 (5,10-36,37)] ($p=0,656$), apesar da mediana dos valores absolutos de linfócitos estarem mais aumentados no estadiamento mais avançado da doença.

Nas análises de micropartículas circulantes foram observadas diferenças significativas entre o grupo de pacientes e o grupo controle para as três micropartículas analisadas: MPs derivadas de células endoteliais ($p=0,002$, figura 3A), MPs derivadas de linfócitos B ($p<0,001$, figura 3B) e MPs derivadas de plaquetas ($p = 0,003$, figura 3C). Em todos os casos, os valores MPs foram maiores para o grupo de pacientes com LLC.

Quando os pacientes foram analisados de acordo com o estadiamento da doença segundo Binet, também foram encontradas diferenças significativas ($p<0,05$) para o grupo de pacientes Binet A *versus* grupo controle para as três micropartículas analisadas, sendo os valores de MPs mais altos no grupo Binet A.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Binet A *versus* Binet B+C, apesar dos resultados terem se mostrado mais altos para o grupo Binet A. Também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos Binet B+C *versus* controle para nenhuma das três micropartículas analisadas (figuras 3D, 3E e 3F).

Os valores de mediana e intervalo interquartilico da análise de MPs se encontram na tabela 3.

Tabela 3: Valores de mediana e intervalo interquartilico para micropartículas circulantes em amostras de plasma de pacientes com LLC e de controles.

Micropartículas	Controles ¹ n=35	LLC ² n=35	Binet A n=18	Binet B+C n=17	p**
Células Endoteliais* (MPs/μL)	81,6 (53,1-121,0)	132,1 (78,6-199,1)	149,8 (75,3-212,5)	132,1 (70,4-187,8)	0,002
Linfócitos B* (MPs/μL)	85,2 (63,4-115,9)	142,1 (93,7-203,1)	145,2 (91,9-235,6)	142,33 (83,1-169,3)	<0,001
Plaquetas* (MPs/μL)	81,2 (52,8-118,9)	134,8 (85,7-183,1)	148,1 (82,2-202,1)	134,8 (73,1-173,0)	0,003

LLC=Leucemia Linfocítica Crônica. *Mediana e intervalo interquartilico. **Os valores de p são referentes a comparação entre LLC (2) e controles (1).

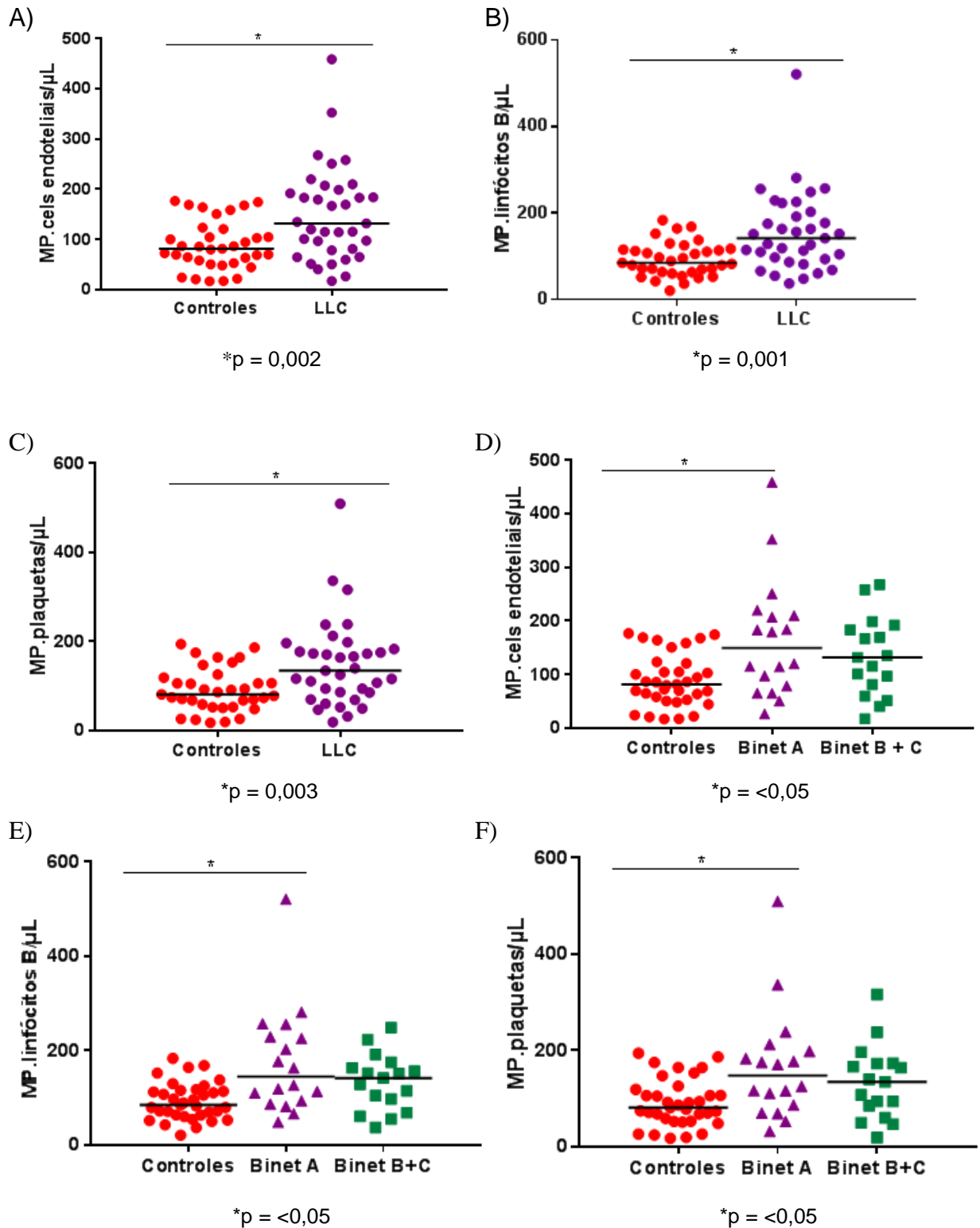
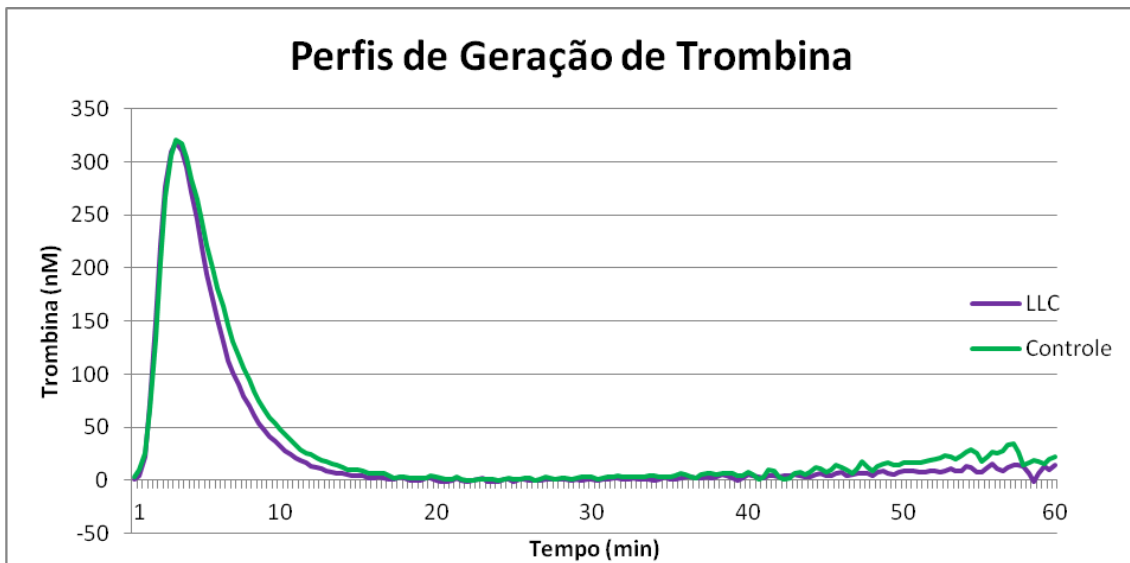


Figura 8: Análise de micropartículas circulantes derivadas de células endoteliais (A), linfócitos B (B) e plaquetas (C) em amostras de plasma de pacientes com LLC e de controles (Eixo X). As mesmas micropartículas foram analisadas de acordo com o estadiamento da doença segundo Binet, e estão representadas das figuras D, E e F, respectivamente. O eixo Y representa a quantidade de MPs/ μ L.

Durante os testes de geração de trombina, foram avaliados os quatro parâmetros principais da curva de GT: ETP (*Endogenous Thrombin Potential*), *lag-time*, *peak* e *time to peak*. A figura 4A mostra as curvas de geração de trombina para os pacientes e os controles. A figura 4B mostra as curvas de geração de trombina para os controles e para os pacientes distribuídos nos grupos Binet A e Binet B+C. Para obtenção dessa curva, foi feita uma média da concentração de trombina de todos os pacientes a cada minuto, em um total de 60 minutos.

A)



B)

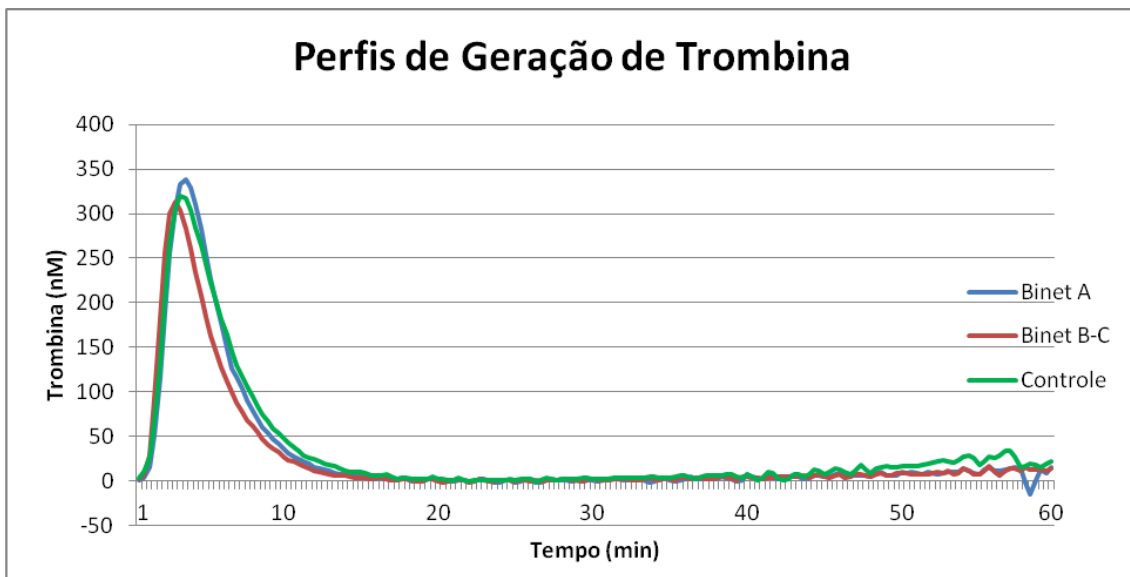


Figura 9: Curvas de Geração de Trombina em amostras de plasma de pacientes com LLC e de controles (A). Em B, os pacientes foram estratificados de acordo com o estadiamento da doença segundo Binet, 1981. O eixo Y representa a concentração de trombina em nM, e o eixo X representa o tempo em minutos.

Foram observadas diferenças significativas apenas para o parâmetro ETP quando se comparou o grupo de pacientes [1453,00 (1176,33-1602,57)] *versus* grupo controle [1577,38 (1326,20-1816,95)] ($p=0,031$), sendo que o grupo de pacientes apresentou valores de mediana e intervalo interquartilico diminuídos em relação ao grupo controle (figura 5A).

Quando os resultados foram analisados de acordo com o estadiamento da doença segundo Binet, foi observada diferença significativa entre os resultados de ETP do grupo controle [1577,38 (1326,20-1816,95)] *versus* grupo Binet B+C [1216,54 (1130,47-1540,15)] ($p=0,009$), também com o grupo de pacientes apresentando valores diminuídos em relação ao grupo controle.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e Binet A [1511,60 (1393,66-1706,26)], e entre os grupos Binet A *versus* Binet B+C ($p>0,05$, figura 5B). Os valores obtidos para todos os parâmetros do teste de GT se encontram no Anexo I.

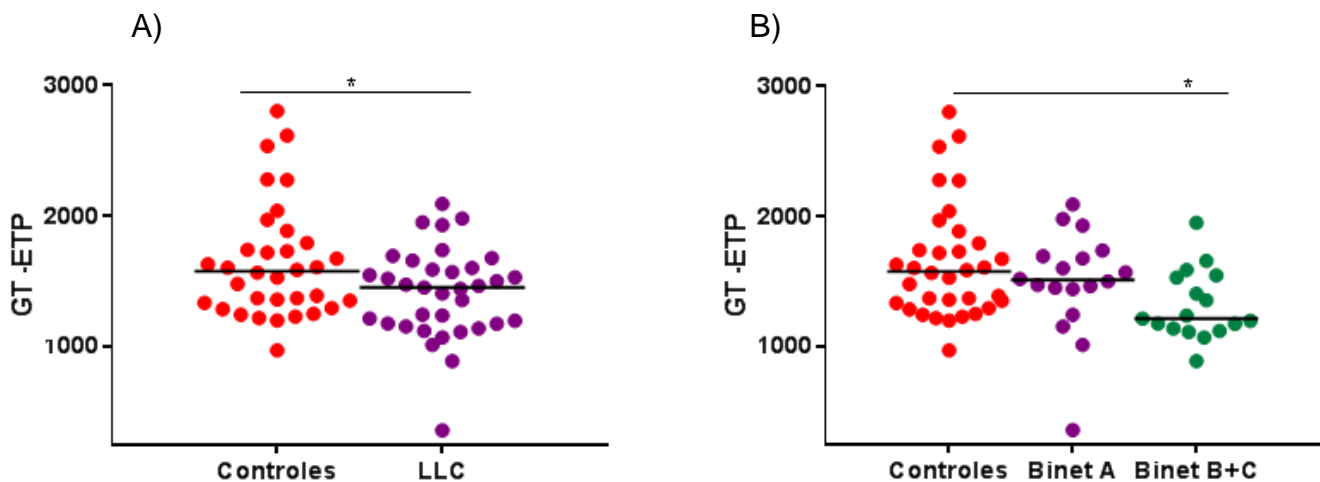


Figura 10: Potencial de Geração de Trombina (ETP) em amostras de plasma de pacientes com LLC e de controles (A). Em B, os pacientes foram estratificados de acordo com o estadiamento da doença segundo Binet, 1981. O eixo Y corresponde ao ETP.

Não foi possível observar qualquer correlação entre os valores de MPs ou de GT com os parâmetros global de leucócitos, hemoglobina, linfócitos B e contagem de plaquetas. Também não foi possível observar qualquer correlação entre os valores de MPs e os resultados de GT.

DISCUSSÃO

Sabe-se que a LLC é uma doença de maior prevalência em idosos, com média de idade entre 64-70 anos, podendo, no entanto, acometer jovens e adultos excepcionalmente (GONÇALVES et al., 2009). Além disso, a LLC é conhecida por afetar mais o sexo masculino do que o feminino. Conforme esperado, neste presente estudo obteve-se o predomínio de homens no grupo de pacientes.

A doença em si é caracterizada por anemia e/ou trombocitopenia. Isso também pôde ser constatado em nosso estudo, no qual foi observada uma queda significativa nos valores de hemoglobina e de contagem de plaquetas nos pacientes em relação ao grupo controle. Além disso, os valores de plaquetas foram significativamente mais baixos no grupo Binet B+C do que no grupo Binet A, o que corrobora com o fato de que nos estágios mais avançados da doença a trombocitopenia pode ser mais acentuada, levando inclusive a eventos hemorrágicos (FALCÃO & REGO, 2001; DIGHIRO, 2005).

Como a LLC é uma doença caracterizada pelo acúmulo de pequenos linfócitos B monoclonais no sangue, medula óssea e tecido linfóide (GONÇALVES et al., 2009), ocorre frequentemente linfocitose absoluta e relativa, e isso leva a uma leucocitose. Isso também foi constatado em nosso estudo, onde o grupo de pacientes apresentou aumento significativo no número de leucócitos ($17,9 \times 10^3/\text{mm}^3$) em relação ao grupo controle ($5,7 \times 10^3/\text{mm}^3$).

Era esperado que essa leucocitose fosse maior em estágios avançados da doença. Porém, em nosso estudo, não foi possível observar diferença significativa quando se avaliou os grupos Binet A ($16,35 \times 10^9/\text{L}$) e Binet B+C ($18,60 \times 10^9/\text{L}$), apesar da contagem global de leucócitos estar discretamente aumentada no grupo Binet B+C.

Quando se avaliou a presença de micropartículas circulantes no plasma dos pacientes e controles, observou-se diferença significativa entre esses dois grupos para todas as MPs avaliadas. O aumento de MPs derivadas de células endoteliais, de plaquetas e de linfócitos B em nosso estudo confirma resultados anteriores de Ghosh et al, 2010, e sugere que o processo maligno tenha como característica o aumento dessas MPS, possivelmente associada à patogênese da doença e à proliferação tumoral.

Segundo Ghosh et al, 2010, a angiogênese desempenha um importante papel na patogênese da LLC, especialmente na proliferação tumoral, e um dos mecanismos propostos é o aumento da neovascularização na medula óssea e de tecidos extramedulares. Já foi demonstrado que as MPs de células tumorais, de plaquetas e de células endoteliais expressam moléculas de adesão, fatores de crescimento e metaloproteinases de matriz, que são essenciais para a angiogênese local e sistêmica (VOLOSHIN, 2014). Considerando o papel da angiogênese na LLC e a importância das MPs nesse processo, é possível que o aumento das MPs, comprovada em nosso estudo, esteja diretamente relacionada ao processo de angiogênese nessa doença.

Em nosso estudo, não foi possível comprovar a relação entre o aumento de MPs de linfócitos B e de células endoteliais e o estadiamento da doença, já que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Binet A e Binet B+C para essas duas MPs analisadas.

Pode-se sugerir então que a doença em si causa microvesiculação de linfócitos e de células endoteliais, e que isso não está necessariamente relacionado ao estadiamento da doença.

Cabe ressaltar o uso de quimioterápicos por alguns pacientes do grupo Binet B+C, já que essa classe de medicamentos tem como objetivo a diminuição da proliferação celular e conseqüentemente, da progressão da doença.

Em relação às MPs derivadas de plaquetas, é interessante observar que houve diferença significativa entre as contagens de plaquetas dos grupos Binet A *versus* Binet B+C, Binet A *versus* grupo controle e Binet B+C *versus* controle, sendo que a contagem de plaquetas do grupo Binet B+C foi consideravelmente inferior à contagem do grupo Binet A e ambos os grupos apresentaram contagem inferior ao grupo controle.

Apesar do grupo Binet B+C apresentar valores diminuídos de contagem de plaquetas em relação ao grupo Binet A, os resultados de MPs derivadas de plaquetas não apresentaram diferenças significativas para os dois grupos, o que sugere que para o estágio mais avançado da doença as poucas plaquetas existentes estão microvesiculando mais do que no grupo de pacientes Binet A. Portanto, em nosso estudo pôde-se sugerir que a microvesiculação de plaquetas está relacionada ao estadiamento da doença, assim como a trombocitopenia.

Em relação ao teste de geração de trombina, foi possível observar diferença significativa entre os indivíduos do grupo controle e os pacientes (figura 5A) para o parâmetro ETP. Quando o grupo com LLC foi estratificado em função da classificação de Binet, observou-se diferença significativa apenas entre o grupo controle e o grupo Binet B+C (figura 5B). Uma análise desses resultados remete a ideia de que no estágio mais avançado da doença (Binet B+C), o potencial de geração de trombina (ETP) estaria discretamente reduzido em relação ao grupo Binet A e ao grupo controle.

Uma busca pela literatura não revelou qualquer relato similar em relação à aplicação do teste de GT em pacientes com LLC que envolvesse a avaliação de eventos de hiper ou hipocoagulabilidade. No entanto, nossos achados sugerem um desequilíbrio no sistema hemostático desses pacientes com tendência à hipocoagulabilidade.

Sabendo-se que o ETP, representado pela área sob a curva (figura 4), caracteriza o potencial de geração de trombina em função do equilíbrio entre a coagulação e a anticoagulação natural, pode-se sugerir a ocorrência de deficiência qualitativa ou quantitativa de fatores de coagulação, bem como um aumento dos níveis plasmáticos dos anticoagulantes naturais.

Segundo SIMKOVIC et al, em um estudo de coorte realizado em 2015, eventos trombóticos foram observados em 37% dos pacientes em tratamento da LLC. Porém, a maioria desses pacientes estava em tratamento com doses elevadas de glicocorticoides, que é um fator de risco conhecido para trombose venosa profunda devido principalmente ao aumento de fatores de coagulação. Ainda segundo o mesmo autor, há outros fatores de risco específicos em pacientes com LLC que poderiam desempenhar um papel no desenvolvimento de eventos trombóticos, como por exemplo a hiperleucocitose (global de leucócitos acima de $100.000/\text{mm}^3$) que leva à leucostase. (SIMKOVIC et al, 2015).

Segundo relatos dos médicos do Hospital das Clínicas da UFMG, a maioria dos pacientes avaliados não faz uso de glicocorticoides. Também não foi observada leucocitose intensa ($>100.000/\text{mm}^3$) em nenhum dos pacientes avaliados, o que pode contribuir para a não tendência trombótica observada em nossos pacientes.

Quanto à hipocoagulabilidade, não há relatos na literatura que expliquem os mecanismos envolvidos nos eventos hemorrágicos nesses pacientes, quando eles

existem. Normalmente, esses eventos são relacionados à trombocitopenia severa, frequentemente observada nesse grupo de indivíduos.

O uso de quimioterápicos também é um fator importante que deve ser considerado como interferente para justificar os resultados encontrados no grupo Binet B+C, tanto para micropartículas quanto para a geração de trombina.

O tratamento da LLC tem passado por extensas mudanças nas últimas décadas. Desde que os agentes alquilantes como o clorambucil e os glicocorticoides foram inseridos no tratamento de pacientes com LLC na década de 50, muito se evoluiu no tratamento dessa leucemia e observou-se um aumento significativo na sobrevida dos pacientes acometidos por ela. Na década de 80, os análogos de purina foram introduzidos ao tratamento, e entre eles, pode-se citar cladribina, fludarabina e pentastatina (DANILOV, 2013).

Segundo relatos dos médicos hematologistas do Hospital das Clínicas da UFMG, até os dias atuais o uso de protocolos que incluem o clorambucil, a ciclofosfamida e a fludarabina são os mais frequentes. No entanto, sabe-se que esses medicamentos apresentam diversos efeitos colaterais.

Segundo Lukenbill, 2013, a mielossupressão severa, que leva a leucopenias, anemias e trombocitopenias graves, e conseqüentemente, a eventos hemorrágicos frequentes, estão entre as conseqüências mais devastadoras da toxicidade da fludarabina. Esse medicamento atua inibindo a síntese de DNA e de proteínas, levando à apoptose da célula leucêmica. Porém, essa ação é pouco específica, e o fármaco acaba por atingir células normais. Da mesma forma, a ciclofosfamida e o clorambucil agem inibindo a síntese de DNA e apresentam efeitos de citotoxicidade e mielossupressão (WANNMACHER, 2000). Dessa forma, é provável que os efeitos citotóxicos desses quimioterápicos possam interferir na microvesiculação das células, diminuindo a quantidade de MPs no grupo de pacientes tratados (Binet B+C) em relação ao grupo Binet A, ao contrário do que se esperava. Da mesma forma, a ação desses medicamentos podem interferir na hemostasia, predispondo esses pacientes a eventos hemorrágicos e diminuindo o potencial de geração de trombina nos mesmos.

Quanto à falta de correlação entre o número de MPs de qualquer origem e os resultados dos testes de geração de trombina, e considerando que as MPs contêm numerosas proteínas e lipídeos derivados das células de origem, é possível que o conteúdo das mesmas não tenha tido considerável impacto sobre a função biológica

da hemostasia. Nesse contexto, Trappenburg et al., 2009, relata que não só a quantidade, como também as características das MPs circulantes, estão associadas com um risco aumentado de trombose arterial e venosa em diversas doenças, inclusive diversos tipos de câncer.

Nitidamente foi observado aumento considerável de micropartículas circulantes no pacientes com LLC bem como alteração em um parâmetro da Geração de Trombina. Considerando o caráter multifatorial envolvido nas alterações hemostáticas, mais estudos que avaliem os fatores prognósticos em um grupo maior de pacientes com LLC são necessários, a fim de corroborar os resultados encontrados pela técnica de GT e esclarecer melhor os mecanismos envolvidos no sistema hemostático desses pacientes. Além disso, é importante esclarecer os mecanismos envolvidos na microvesiculação associada à patogênese e progressão da doença.

Limitações do estudo

- Tamanho amostral
- Prontuários incompletos

Auxílio financeiro

Esse estudo foi financiado pela FAPEMIG e pelo CNPq/Brasil.

REFERÊNCIAS

BINET JL, CATOVSKY D, CHANDRA B *et al.* **Proposals for a revised staging system.** *Br J Haematol*;48:365-7. 1981.

CAMPOS F. M. F. *et al.*; **Augmented plasma microparticles during acute Plasmodium vivax infection.** *Malaria Journal (Online)*, v. 9, p. 327, 2010.

CASTOLDI, E.; ROSING, J. **Thrombin generation tests.** *Thrombosis research*, v. 127, p. S21-S25, 2010.

DIGHIERO, G. **Chronic lymphocytic leukemia biology and prognosis.** *Hematology* 278- 284. 2005.

DOMNIKOVA N.P. *et al.* **Blood microvesicles during chronic lymphoproliferative diseases.** *Bull Exp Biol Med.* 2013.

FALCÃO, R.P. & REGO, E.M., ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PAQUINI, R. **Hematologia- Fundamentos e prática- Atheneu.** 1081p, cap51: 569-76. 2001.

FARIA, J.R.; OLIVEIRA, J.S.; DELBONE DE FARIA, R.M. ET AL. **Prognosis related to staging systems for chronic lymphocytic leukemia.** *Med J* 118(4): 83-88. 2000.

FRANCIS, J.L., BIGGERSTAFF, J. & AMIRKHOSRAVI, A. **Hemostasis and malignancy.** *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 24, 93–109. 1998.

GHOSH A.K. *et al.* **Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression.** *Blood.* 4;115(9):1755-64. 2010.

GONÇALVES, R.P. *et al.* **Evaluation of the hematologic profile of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL-B) at a state hemocenter.** *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 31(4): 228-234. 2009.

GUZMÁN-URIBE, P.; VARGAS-RUÍZ, A. G. **Thrombosis in Leukemia: Incidence, Causes, and Practical Management.** *Current Oncology Reports*, v. 17, n. 5, p. 1-8, 2015.

HALLEK, M. **Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia.** *Annals of Oncology* 19: p.51–53. 2008.

HELBING, T., OLIVIER, C., BODE, C., MOSER, M., DIEHL, P. **Role of microparticles in endothelial dysfunction and arterial hypertension.** *World J Cardiol*; 6(11): 1135-1139. 2014.

HEMKER H.C. *et al.* **Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma.** *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* [33(1):4-15] 2003.

HUGEL B., MARTÍNEZ M.C., KUNZELMANN C., FREYSSINET J.M. **Membrane microparticles: two sides of the coin.** *Physiology (Bethesda)*; 20: 22-27. 2005.

LUKENBILL, J.; KALAYCIO, M. **Fludarabine: a review of the clear benefits and potential harms.** *Leukemia research*, v. 37, n. 9, p. 986-994, 2013.

MARCHETTI, M.; DIANI, E., TEN CATE, H., FALANGA, A. **Characterization of the thrombin generation potential of leukemic and solid tumor cells by calibrated automated thrombography.** *Haematologica.* ;97(8):1173-80. 2012.

MATUTES, E. **BCL2 translocations in leukemias of mature B cells.** *Blood*, v. 83, n. 12, p. 3682-8. 1994.

NIJZIEL, M. R. *et al.* **Acquired resistance to activated protein C in breast cancer patients.** *British Journal of Haematology*, 120: 117–122. 2003.

RAI, K.R *et al.*; **Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia.** *Blood*, 46, pp. 219–234. 1975.

SIMKOVIC, M. et al. **Venous thromboembolism in patients with chronic lymphocytic leukemia.** *Thrombosis Research*, v. 136, n. 6, p. 1082-1086, 2015.

TRAPPENBURG MC, VAN SCHILFGAARDE M, MARCHETTI M, ET AL. **Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia.** *Haematologica* ; 94(7):911-918. 2009.

VOLOSHIN, T.; FREMDER, E.; SHAKED, Y. **Small but mighty: microparticles as mediators of tumor progression.** *Cancer Microenvironment*, v. 7, n. 1-2, p. 11-21, 2014.

WANNMACHER, Lenita et al. Fármacos utilizados em neoplasia. Evidências Farmacológico-Clínicas. Disponível em www.anvisa.gov.br/divulga/public/livro_eletronico/neoplasia.html. Acesso em 07/07/2016 às 11:00h.

YUANA Y., STURK A., NIEUWLAND R. **Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions.** *Blood Rev*; 27: 31-39. 2013.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; RICARDO PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia.** 1ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2013, v. 1, 899p.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com nossos dados, de modo geral, o número de MPs derivadas de células endoteliais, de linfócitos e de plaquetas foi significativamente maior nos pacientes com LLC *versus* controles, o que indica que a microvesiculação da membrana destas células pode ser resultante da patogênese da doença em si.

Quando houve estatificação em estágios Binet A e Binet B+C, curiosamente não foi observada diferença significativa entre estes estágios para as MPs de células endoteliais e leucócitos, o que vem reforçar a idéia de que a patogênese em si já seria decisiva na formação de um maior número dessas MPs, mas que isso não está necessariamente relacionado ao agravamento da doença.

Em relação às MPs derivadas de plaquetas, também não houve diferença significativa entre os grupos Binet A e Binet B+C. Porém, a contagem de plaquetas do grupo Binet B+C foi consideravelmente inferior à contagem do grupo Binet A, o que sugere que para o estadio mais avançado da doença as poucas plaquetas existentes estão mais ativadas do que no grupo de pacientes Binet A. Portanto, estes dados sugerem que a ativação plaquetária e a microvesiculação de plaquetas estão relacionadas ao estadiamento da doença, assim como a trombocitopenia, confirmando a hipótese de estudo.

Por outro lado, o potencial de geração de trombina (GT) foi menor nos casos de LLC em relação aos controles, principalmente nos casos mais graves, provavelmente porque a doença afeta não apenas o número de plaquetas, mas também outros fatores de importância hemostática tais como os fatores de coagulação, tornando o paciente mais predisposto a fenômenos hemorrágicos do que trombóticos. Deve-se considerar também o uso de quimioterápicos no grupo de pacientes Binet B+C, que pode interferir tanto na microvesiculação quanto na hemostasia de tais pacientes.

Nesse estudo inovador, valendo-se de uma técnica (GT) ainda pouco utilizada para avaliação da hemostasia em nosso meio e, particularmente, na LLC, pode-se admitir que nossa hipótese de estudo se confirmou parcialmente, pois o avanço no estadiamento desta doença não mostrou associação com um maior potencial de geração de trombina.

7 PERSPECTIVAS

1. O estudo de fatores procoagulantes e anticoagulantes naturais, como por exemplo a dosagem de fatores da coagulação, fator tissular, proteína C e proteína S, podem se fazer importantes a fim de se esclarecer melhor os mecanismos envolvidos no sistema hemostático desses pacientes.
2. O estudo de fatores angiogênicos também se faz importante para se elucidar os mecanismos envolvidos na microvesiculação associada à patogênese e progressão da doença.
3. Estudo in vitro para avaliação da interferência dos quimioterápicos nos processos de microvesiculação e parâmetros hemostáticos.

REFERÊNCIAS

ASH Image Bank. American Society of Hematology. Disponível em <http://imagebank.hematology.org/>. Acesso em 14 de janeiro de 2015, 14:30h.

BAGLIN, T. **Using the laboratory to predict recurrent venous thrombosis.** *International Journal of Laboratory Hematology*. 33: 333–342. 2011.

BAIN, B.J. **Diagnóstico em Leucemias.** *Revinter* 2ºed. 2003.

BINET JL, CATOVSKY D, CHANDRA B *et al.* **Proposals for a revised staging system.** *Br J Haematol*;48:365-7. 1981.

BRASIL. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil** . Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

CAMPOS F. M. F. *et al.*; **Augmented plasma microparticles during acute Plasmodium vivax infection.** *Malaria Journal (Online)*, v. 9, p. 327, 2010.

CASTOLDI, E.; ROSING, J. **Thrombin generation tests.** *Thrombosis research*, v. 127, p. S21-S25, 2010.

CHIATTONE, C. S. **Indicações para início de tratamento na leucemia linfóide crônica.** *Rev. bras. hematol. hemoter.* 27(4):272-275. 2005.

CROMPOT E., VAN DAMME M., DUVILLIER H., *et al.* **Avoiding False Positive Antigen Detection by Flow Cytometry on Blood Cell Derived Microparticles: The Importance of an Appropriate Negative Control.** Haziot A, ed. *PLoS ONE*. 2015.

DAMLE R.N. *et al.* **Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia.** *Blood*, v. 94, n. 6, p. 1840–1847, 1999.

DANILOV, A. V. **Targeted therapy in chronic lymphocytic leukemia: past, present, and future.** *Clinical therapeutics*, 35(9), 1258-1270, 2013.

DIGHIERO, G. **Chronic lymphocytic leukemia biology and prognosis.** *Hematology* 278- 284. 2005.

DOMNIKOVA N.P. *et al.* **Blood microvesicles during chronic lymphoproliferative diseases.** *Bull Exp Biol Med.* 2013.

Expressão de antígenos de superfície na célula B. Disponível em <http://myelomacinderella.net/2013/07/tat-series-ii-phenotypes-as-targets-for-immunotherapy/>. Acesso em 05/07/2016 às 22h.

FALANGA, A., MARCHETTI, M. and VIGNOLI, A., **Coagulation and cancer: biological and clinical aspects.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11: 223–233. 2013.

FALCÃO, R.P. & REGO, E.M., ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PAQUINI, R. **Hematologia- Fundamentos e prática-** *Atheneu*, 2001, 1081p, cap51: 569-76. 2001.

FARIA, J.R.; OLIVEIRA, J.S.; DELBONE DE FARIA, R.M. ET AL. **Prognosis related to staging systems for chronic lymphocytic leukemia.** *Med J* 118(4): 83-88. 2000.

FERREIRA, C.N. *et al.* **O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações.** *Revis. Bras. Hematol Hemoter*, v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.

FOERSTER, J. *et al.* **Elderly high NK responders are characterized by intensive proliferative response to PHA and Con A and optimal health status.** *Arch Gerontol Geriatr.*, v. 16, n. 3, p. 199-205. Maio/Jun. 1993.

FRANCIS, J.L., BIGGERSTAFF, J. & AMIRKHOSRAVI, A. **Hemostasis and malignancy**. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 24, 93–109. 1998.

FRIZZO, M. N.; DA SILVA, F. C.T; DA SILVA ARAÚJO, L. **Neoplasias Hematológicas no Idoso: uma Revisão**. *Revista Saúde Integrada*, v. 8, n. 15-16, 2016.

GARDINER C, HARRISON P, BELTING M, et al. **Extracellular vesicles, tissue factor, cancer and thrombosis – discussion themes of the ISEV 2014 Educational Day**. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015;

GHOSH A.K. et al. **Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression**. *Blood*. 4;115(9):1755-64. 2010.

GONÇALVES, R.P. et al. **Evaluation of the hematologic profile of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL-B) at a state hemocenter**. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*.31(4): 228-234. 2009.

GONGD J. et al. **Microparticles and their emerging role in cancer multidrug resistance**. *Cancer Treatment Reviews*. V: 38 , I: 3 , 226 – 234. 2012.

GRANZIERO, L. et al. **Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia**. *Blood*, v. 97, n. 9, p. 2777–2783, 2001.

GUZMÁN-URIBE, P.; VARGAS-RUIZ, A. G. **Thrombosis in Leukemia: Incidence, Causes, and Practical Management**. *Current Oncology Reports*, v. 17, n. 5, p. 1-8, 2015.

HADERK, F. et al. **Extracellular vesicles in chronic lymphocytic leukemia**. *Leukemia & Lymphoma*. V. 54, I. 8, 2013.

HALLEK, M. **Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia.** *Annals of Oncology* 19: p.51–53. 2008.

HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; DIEBOLD. J. **World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia.** *J. Clin. Oncol.* 17(12): 3835-49. 1999.

HELBING, T., OLIVIER, C., BODE, C., MOSER, M., DIEHL, P. **Role of microparticles in endothelial dysfunction and arterial hypertension.** *World J Cardiol*; 6(11): 1135-1139. 2014.

HEMKER H.C. *et al.* **Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma.** *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* [33(1):4-15] 2003.

HEMKER, H. C. *et al.* **Data management in Thrombin Generation.** *Thrombosis Research* , Vol 131 , Issue 1 , 3 – 11. 2013.

HUGEL B., MARTÍNEZ M.C., KUNZELMANN C., FREYSSINET J.M. **Membrane microparticles: two sides of the coin.** *Physiology (Bethesda)*; 20: 22-27. 2005.

HUNTER M.P. *et al.* **Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles.** *PLoS One* 2008.

LACROIX, R. *et al.* **Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 10, n. 3, p. 437–446, 2012.

LEMOINNE, S. *et al.* The emerging roles of microvesicles in liver diseases. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 6, p. 350-361, 2014.

LUKENBILL, J.; KALAYCIO, M. **Fludarabine: a review of the clear benefits and potential harms.** *Leukemia research*, v. 37, n. 9, p. 986-994, 2013.

MARCHETTI, M. *et al.* **Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera.** *Blood*, 112(10):4061-4068. 2008

MARCHETTI, M.; DIANI, E., TEN CATE, H., FALANGA, A. **Characterization of the thrombin generation potential of leukemic and solid tumor cells by calibrated automated thrombography.** *Haematologica*. ;97(8):1173-80. 2012.

MATUTES, E. **BCL2 translocations in leukemias of mature B cells.** *Blood*, v. 83, n. 12, p. 3682-8. 1994.

MORENO C., MONTSERRAT E. **New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia.** *Blood Rev.* Jul;22(4):211. 2008.

NIJZIEL, M. R. *et al.* **Acquired resistance to activated protein C in breast cancer patients.** *British Journal of Haematology*, 120: 117–122. 2003.

RAI, K.R *et al.*; **Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia.** *Blood*, 46, pp. 219–234. 1975.

SIMKOVIC, M. *et al.* **Venous thromboembolism in patients with chronic lymphocytic leukemia.** *Thrombosis Research*, v. 136, n. 6, p. 1082-1086, 2015.

TRAPPENBURG MC, VAN SCHILFGAARDE M, MARCHETTI M, ET AL. **Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia.** *Haematologica* ; 94(7):911-918. 2009.

VAN DEN BERG, Y. W., OSANTO, S., REITSMA, P. H., & VERSTEEG, H. H. **The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside.** *Blood*, 119 (4), 924-932. 2012.

VASCONCELOS, Y. **Marcadores de prognóstico na leucemia linfocítica crônica.** *Rev Bras Hematol Hemoter* 27(4): 253-56. 2005.

VOLOSHIN, T.; FREMDER, E.; SHAKED, Y. **Small but mighty: microparticles as mediators of tumor progression.** *Cancer Microenvironment*, v. 7, n. 1-2, p. 11-21, 2014.

WANNMACHER, Lenita *et al.* Fármacos utilizados em neoplasia. Evidências Farmacológico-Clínicas. Disponível em www.anvisa.gov.br/divulga/public/livro_eletronico/neoplasia.html. Acesso em 07/07/2016 às 11:00h.

YUANA Y., STURK A., NIEUWLAND R. **Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions.** *Blood Rev*, 27: 31-39. 2013.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; RICARDO PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia.** 1ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2013, v. 1, 899p.

ANEXO I
Resultados de Geração de Trombina

Parâmetro	Controles	LLC	p
<i>Lagtime (min)*</i>	1,670 (1,33-2,00)	1,670 (1,59-2,00)	0,465
<i>Peak (nM)**</i>	368,15 (105,93)	354,88 (103,74)	0,601
<i>ETP*</i> (nM.min)	1577,38 (1326,20-1816,95)	1453,62 (1176,33-1602,57)	0,031
<i>Time to peak</i> (min)*	3,93 (3,33-4,68)	4,00 (3,33-4,33)	0,805

LLC=Leucemia Linfocítica Crônica. *Mediana e intervalo interquartilico. **Média e desvio-padrão.

ANEXO II
Parecer do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 02177612.0.0000.5149

Interessado(a): Prof. Adriano de Paula Sabino
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 13 de junho de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do mecanismo apoptótico e da expressão da Proteína-Tirosina Quinase Zap 70 e de micro-RNAs na LeucemiaLinfocítica Crônica(LLC)" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO III

Ementa Aprovada pelo Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 02177612.0.0000.5149

Interessado(a): Prof. Adriano de Paula Sabino
Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 22 de abril de 2015, a emenda ao projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do mecanismo apoptótico e da expressão da Proteína-Tirosina Quinase Zap 70 e de micro-RNAs na LeucemiaLinfocítica Crônica(LLC)" com as alterações:

- Inclusão de pacientes com Síndrome Mielodisplásica e Leucemias Mielóides e Linfóides;
- Substituir o título corrente por: "Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias mielóides, linfóides e mielodisplasia";
- Substituir: "estudar in vitro o efeito de diferentes quimioterápicos" por estudar in vitro o efeito de biomoléculas, uma vez que quimioterápicos são usados para comparação de feito de novas biomoléculas pelo grupo de estudo;
- Alteração do tempo de execução do projeto, com extensão do prazo para 2020.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo IV

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias mielóides, linfóides e mielodisplasia”

Subprojeto: Micropartículas Circulantes e Geração de Trombina em pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica

Prezado (a) Senhor (a),

O Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais está realizando um estudo de interesse para o diagnóstico e controle das Neoplasias Mielóides, Linfóides e Mielodisplasias. Se você quiser participar desse estudo, solicitamos que autorize a coleta de apenas 10 mL de seu sangue e 5 mL de sangue da medula (se houver solicitação médica) para realizarmos exames laboratoriais que incluirão dosagens de proteínas, exames genéticos e testes com biomoléculas, importantes parâmetros para o diagnóstico, avaliação de prognóstico e descoberta de novas drogas para tratamento destas doenças. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma (roxo) e leve dor localizada. Entretanto, a coleta será feita por profissional capacitado e com grande experiência. Será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos a vácuo), visando o êxito da coleta. Em caso de punção de medula, este procedimento será realizado pelo seu médico hematologista. Toda informação obtida nessa pesquisa é considerada confidencial. Sua participação é totalmente voluntária e caso você não queira participar não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento. O (a) Sr(a) não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação. O participante e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com o participante e a outra com o pesquisador.

Qualquer outra informação que desejar poderá ser obtida com o Professor Adriano de Paula Sabino da Faculdade de Farmácia/UFMG, através do telefone 3409-6882. Informações sobre os aspectos éticos da pesquisa poderão ser obtidas com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG/COEP, pelo telefone 3409-4592, localizado à Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, Campus Pampulha, Belo Horizonte - MG. Desde já agradeço sua colaboração.

Prof. Adriano de Paula Sabino (Coordenador do projeto, Professor de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG)

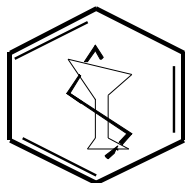
Nome: _____

Documento de identificação: _____

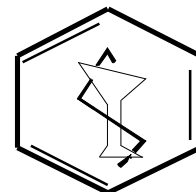
Assinatura: _____ **Data:** ____/____/____

ANEXO V

Ficha Clínica



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



FICHA CLÍNICA

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Faixa etária: > 18 anos. Idade: ----- anos
- Não apresentar histórico de fibrilação atrial
- Não apresentar histórico de trombose
- Não apresentar histórico de câncer

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

CLÍNICOS	MEDICAMENTOSOS
<ul style="list-style-type: none"> - Distúrbios hemorrágicos adquiridos ou hereditários; - Doenças hepáticas, malignas, auto-imunes, tireoidianas e infecciosas; - Insuficiência renal grave (<i>Clearance</i> de creatinina inferior a 30 mL/min); - Gravidez; - Doenças inflamatórias 	<ul style="list-style-type: none"> - Varfarina - Rivaroxaban - Dabigatran - Heparina - Fondaparinux - Antiplaquetários e fibrinolíticos - Amiodarona - Verapamil - Quinidina - Cetoconazol - Ritonavir - Corticóides - Antiinflamatórios - Terapia de reposição hormonal - Anticoncepcional

I – IDENTIFICAÇÃO:

- 1.Nome: _____
- 2.Data de nascimento: ____/____/____
- 3.Endereço: _____
- 4.Telefone: _____ 5. CEP: _____
- 6.Data da entrevista/coleta de sangue: ____/____/____ 7.Jejum: _____

II – DADOS DEMOGRÁFICOS:

- 1.Sexo: () M () F
- 2.Estado Civil: () solteiro () casado () viúvo () separado () divorciado
- 3.Tabagista: () Não () Sim Quantos cigarros por dia, em média: _____
- 4.Ex-tabagista: () Não () Sim Parou há quanto tempo? _____
- 5.Etilista: () Não () Sim Qual bebida: _____ Quantidade/dia: _____
- 6.Ex-etilista: () Não () Sim Parou há quanto tempo? _____
- 7.Doenças:
- () Hipertensão arterial () Insuficiência cardíaca
- () Doença coronariana () Asma, enfisema () Doença renal
- () Doença hepática () Doença hemorrágica () Diabetes mellitus
- () Síndrome do Anticorpo Antifosfolípideo () Neoplasias
- () Doença da tireóide () Outras: _____
- 8.Cirurgias prévias: _____
- 9.Atividade física regular? () Não () Sim : Qual modalidade: _____
- Frequência semanal: _____ Duração dos exercícios: _____
- 10.Diagnóstico de dislipidemia prévia: () Não () Sim Qual: _____
- Tempo de diagnóstico: _____ Medicamentos em uso e dose: _____
11. Medicamentos em uso e dose:
- _____
12. Grau de escolaridade: () Fundamental incompleto () Fundamental completo
- () Médio incompleto () Médio completo () Graduação () Pós-Graduação

III – HISTÓRIA FAMILIAR:

- 1.Seu pai tem/tinha alguma doença? () Não () Sim (Qual? _____)
- 2.Sua mãe tem/tinha alguma doença? () Não () Sim (Qual? _____)
- 3.Algum filho seu tem alguma doença? () Não () Sim () Não se aplica
- (Qual? _____)
- 4.Existe alguma doença presente em mais de uma pessoa de sua família (incluindo tios, tias, primos, avós, sobrinhos)? () Não () Sim
- Quais membros afetados? _____

médico responsável (carimbo e assinatura)

ANEXO VI

Anexo VI - Critérios para diagnóstico de LLC com base no sistema de pontuação proposto por Matutes et al (1994).

Marcador	Pontos	
	1	0
CD5	Positivo	Negativo
CD23	Positivo	Negativo
CD79b/CD22	Negativo/positivo	Moderado/forte
FMC7	Negativo	Positivo
sIg	Fraco	Moderado/Forte
Pontuação	3 - 4 - 5	0 - 2
Diagnóstico	LLC	Outras DLPC

Negativo/fraco: negatividade ou baixa expressão antigênica

Moderado/forte: expressão antigênica moderada ou forte.

DLPC: Doenças linfoproliferativas crônicas