

Artigo / Article

Citogenética e biologia molecular em leucemia linfocítica crônica

Cytogenetics and molecular biology in chronic lymphocytic leukemia

Maria de Lourdes L. F. Chauffaille

O estudo das alterações cromossômicas em LLC é importante no auxílio ao diagnóstico, quando da identificação de doença clonal e no diagnóstico diferencial com outras linfoproliferações; no acompanhamento evolutivo ao permitir a detecção de alterações adicionais; na escolha terapêutica, como, por exemplo, na presença de del(17p) que confere resistência à terapia; no monitoramento do tratamento, ao permitir a avaliação de doença residual ou no diagnóstico da transformação (Síndrome de Richter). A citogenética oferece evidências de significado prognóstico, assim como o melhor entendimento da doença. O estudo pode ser feito por cariótipo, que detecta alteração em um terço dos casos, ou por FISH, que aumenta substancialmente esta porcentagem. FISH associada a outros critérios prognósticos (estado de mutação, ZAP-70, CD 38, etc) tem permitido a melhor identificação de pacientes com pior prognóstico. As anomalias mais comuns são: trissomia 12, que confere mediana de sobrevida de 9 anos; translocação ou deleção do braço longo do 13 (t/del(13q)), que confere prognóstico favorável e sobrevida de 11 anos; alterações envolvendo braço longo do 11, na banda q22-23 (11q22-23), com sobrevida de 6,6 anos; deleção do braço curto do 17 (del(17p)), com sobrevida de 2,5 anos; deleção do braço longo do 6 (del(6q)), e translocação envolvendo braço longo do cromossomo 14 (t(14q)), perfazendo cerca de 60% das alterações. Dada à importância da citogenética e informações prognósticas, é recomendável que todos os pacientes com LLC sejam submetidos a estudo por FISH e cariótipo por banda G, nas diferentes fases da doença. Rev. bras. hematol. hemoter. 2005;27(4):247-252.

Palavras-chave: LLC; alterações cromossômicas; citogenética; FISH; trissomia 12; del(13q); del(11q); del(17p).

Introdução

A citogenética ocupa importante papel na leucemia linfocítica crônica de célula B (LLC) seja no auxílio ao diagnóstico, no acompanhamento evolutivo, na escolha terapêutica, no monitoramento do tratamento ou na transformação (Síndrome de Richter), pois oferece evidências de significado prognóstico, assim como a possibilidade de entender melhor a doença. Recomenda-se a realização de estudo citogenético em todos os casos de LLC e nas diferentes fases evolutivas, desde o diagnóstico.

A LLC apresenta um curso clínico altamente variável, ou seja, alguns pacientes sobrevivem mais de 30 anos com comprometimento clínico relativamente pequeno, ao passo que outros evoluem em poucos meses graças à alta agressividade da doença. Os estadiamentos clínicos, como Rai e Binet, permitem a avaliação do tamanho da massa tumoral sem, entretanto, auxiliar na previsão da evolução ou na identificação de quem necessitará de tratamento precoce. Para este tipo de distinção, a citogenética clássica e, em especial, a molecular ocupam papel de destaque na medida em que auxiliam na detecção de alterações genômicas

Professora adjunta livre-docente da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia, Unifesp/EPM.
Assessora médico, Fleury – Centro de Medicina Diagnóstica.

Correspondência para: Maria de Lourdes L. F. Chauffaille
Rua Botucatu, 740, 3º andar – Disciplina de Hematologia
04023-900 – São Paulo-SP – Brasil
Tel.: 11 5579-1550 – Fax.: 11 5571-8806
E-mail: chauffaill@hemato.epm.br

da célula maligna, identificando os indivíduos com parâmetros prognósticos desfavoráveis, diferenciando quem deverá receber maior atenção e planejamento terapêutico cuidadoso.

Citogenética

A citogenética é a parte da genética que estuda os cromossomos, sua função, estrutura, comportamento biológico e patológico. Está dividida em citogenética clássica e molecular. A citogenética clássica baseia-se na análise dos cromossomos da célula em divisão, em particular, na metáfase da mitose, que é a fase em que os cromossomos estão mais condensados. Após a interrupção da mitose, seguem-se procedimentos técnicos, como hipotonia e fixação, preparo do espalhamento cromossômico, coloração por banda G, pareamento e montagem do cariótipo.

Já a citogenética molecular independe de divisão celular, pois se estriba na análise do DNA. A citogenética molecular compreende as técnicas de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), hibridação genômica comparativa (CGH) e cariotipagem espectral (SKY), dentre outras.

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

Talvez a LLC seja uma das doenças em que mais se aufram benefícios com o uso de FISH pelo fato de a análise cromossômica convencional ser pouco eficaz face à dificuldade em se obter metáfase da célula maligna pelo seu precário crescimento *in vitro*, tendo-se, muitas vezes, mitoses não representativas do clone anormal. Com efeito, anormalidades cromossômicas têm sido observadas em 40%-50% das LLC pelo cariótipo convencional,¹ enquanto por FISH em cerca de 80%.^{2,3}

Alterações cromossômicas em LLC

As anomalias mais comuns são: trissomia do cromossomo 12 (+12), translocação ou deleção do braço longo do 13 (*t/del*(13q)), deleção do braço longo do 6 (*del*(6q)), alterações envolvendo braço longo do 11, na banda q22-23 (11q22-23), translocação do braço longo do 14 (*t*(14q)) e deleção do braço curto do 17 (*del*(17p)), perfazendo cerca de 60% das alterações.^{1,3}

Em estudos realizados em pacientes com LLC tanto na Unifesp como no Fleury-Centro de Medicina Diagnóstica, observamos entre 39% e 43% de anormalidades cromossômicas pela citogenética clássica.^{4,5} Dentre estes, a anormalidade mais freqüente foi a trissomia 12 (16,5%),

sendo isolada em 5,5% dos casos e associada e outras anormalidades em 11%. Seguiu-se a *del*(13q) em 5,5% e outras aberrações em 21% dos casos.

Em relação à avaliação de prognóstico, embora não esteja claro se tal importância é independente do estágio da doença,⁶ pacientes com anormalidades cromossômicas têm sobrevida menor que aqueles com cariótipo normal. Pacientes com cariótipo normal respondem significativamente melhor à quimioterapia.⁷ Aqueles com anomalias complexas (mais de três anormalidades)^{8,9} têm pior sobrevida e apresentam doença mais agressiva. Indivíduos com alta porcentagem de células anormais também têm pior sobrevida. A trissomia 12 confere prognóstico desfavorável em relação ao cariótipo normal. Porém, *del*(13q), que ocorre em 10% dos casos, é indicativa de sobrevida mais longa.³

A *del*(11p) geralmente é intersticial e está relacionada a doença mais avançada, extensa linfonodomegalia e menor sobrevida, enquanto a deleção do braço curto do 17 (*del*(17p)) relaciona-se a sobrevida mais curta² e ausência de resposta a alquilantes, análogos de purina e rituximab.^{10,11}

Embora o envolvimento da região 14q32 fosse freqüente em estudos de cariótipo de LLC na década passada, atualmente considera-se que a *t*(11;14)(q13;q32) com o rearranjo dos genes *BCL1* ou *CCND1* e *IGH* é marcadora de linfoma de zona do manto.^{12,13} A semelhança desta situação há outras translocações que envolvem 14q32, tais como a *t*(14;19)(q32;q13), hoje considerada como indicativa de linfoma leucemizado, e a *t*(14;18), linfoma folicular. Entretanto, quando presente em LLC, o rearranjo da região 14q32 confere prognóstico favorável. A *t*(2;14)(p13;q32) é extremamente rara, assim como outras englobando esta região. A *del*(6q), +8q24, +3 e +18 são igualmente observadas em LLC, mas em menor número de casos.

Novas alterações cromossômicas podem surgir ao longo da evolução da doença, levando ao conceito de "evolução clonal". Evolução de cariótipo ocorre em cerca de 20% dos casos de LLC e o desenvolvimento da Síndrome de Richter se acompanha de alterações cromossômicas adicionais^{14,15,16} geralmente, a *del*(17p).

Este fenômeno de evolução clonal implica na presença de subclones que podem ter vantagem proliferativa resultando em doença mais agressiva.

FISH

A utilização de citogenética molecular, em particular a FISH, tem aumentado substancialmente a capacidade de detecção de anormalidades cromossômicas, de modo que a incidência e o número de anomalias recorrentes têm sido estabelecidos mais precisamente à luz desta metodologia. A razão para isto é que a FISH permite a detecção de anormalidades específicas, ou seja, no alvo predeterminado e suplantando o empecilho maior da citogenética clássica, que

é o fato dos linfócitos B malignos permanecerem fora da fase de divisão (Go/G1). Talvez um dos avanços mais notáveis na biblioteca de sondas disponíveis tenha sido o conjunto designado para as linfoproliferações de célula B maligna, tal como a associação de vários *loci*, a saber: centrômero do cromossomo 12 (12p11.1-q11.1(D12Z1)), duas regiões do cromossomo 13, 13q14.3 (D13S319) e 13q34 (*LAMP*), gene *ATM* no 11, 11q22.3 (*ATM*) e gene *P53* no 17, 17p13.1 (*P53*).

Anomalias cromossômicas foram detectadas, por Dohner et al,² em 82% de 825 dos pacientes com LLC, sendo 55% com 13q-, 18% com 11q-, 16% com +12, 7% com 17p- e 29% com mais de uma anormalidade detectável. Um modelo hierárquico construído após a análise de regressão identificou diferenças na sobrevida dos pacientes conforme os resultados da FISH, a saber: del(17p)= 2,5 anos; del(11q)= 6,6 anos; +12 = 9 anos; cariótipo normal = 9 anos e del(13q) = 11 anos.

Em trabalho avaliando especificamente a +12 por FISH em pacientes com LLC acompanhados na Unifesp que apresentavam cariótipo normal ou sem resultado, detectou-se esta alteração em 30,7% dos casos, e tais pacientes apresentavam idade mediana de 64 anos.¹⁷ De fato, enquanto esta anormalidade é detectada em 10% a 18% dos casos pela citogenética clássica, tem sido observada, por FISH, em número substancialmente maior de pacientes, e não necessariamente em todas as interfases, ou seja, podendo ser enumerada em uma minoria delas, indicando tratar-se de evento secundário ou subclone, e apontando para doença mais avançada.

Foi sugerida associação entre +12 e morfologia atípica de linfócitos, com núcleo clivado, características linfoplasmáticas ou aumento do número de prolinfócitos,¹⁸ porém sem correlação com o estágio da doença.^{19,20,21,22}

O mecanismo molecular pelo qual a +12 contribui com a leucemogênese é desconhecido. Há a hipótese de existir neste cromossomo um proto-oncogene dominante ou co-dominante que se torna ativado pela presença em triplicata ou um gene interferindo no ciclo celular, em especial, em relação à evolução.^{19,20,21,22}

Análises feitas a partir de fragmento de polimorfismo de restrição (RFLP) demonstraram que o cromossomo 12 extranumerário deriva da duplicação de um cromossomo 12 com retenção do outro homólogo ao invés de três cópias de um homólogo. Casos com duplicação parcial do braço longo do 12 foram estudados por FISH e uma região mínima duplicada pode ser definida como o segmento 12q13-12q15.²³

A del(13q), observada em cerca de 15% dos casos ao cariótipo, tem sido detectada em 45% a 50% por métodos moleculares como FISH, Southern blot ou perda de heterosigose. A deleção pode ser isolada ou associada a outras anomalias recorrentes, como +12, del(11q), del(6q) ou del(17p).

Há diferentes pontos de quebra no braço longo do cromossomo 13, sendo mais freqüente 13q14, onde se localiza o gene *RBI* (retinoblastoma); porém, em apenas 30% dos casos este gene está efetivamente deletado. De fato, deleções 13q14 geralmente não levam à inativação do gene *RBI* e estão associadas à presença de um gene *RBI* intacto no cromossomo homólogo, implicando a função de um locus adjacente que pode acomodar importante gene supressor tumoral. A região habitualmente deletada em doenças linfoproliferativas malignas de célula B foi denominada de DBM (*deleted B malignancy*) porque aparece em linfoma não-Hodgkin, leucemia linfóide aguda pré-B e em mieloma múltiplo, no qual confere prognóstico adverso.^{18,19,24} A região DBM é telomérica ao RB1 e inclui os marcadores D13S319 e D13S25. A idéia de que a DBM envolve possível gene supressor tumoral ainda não foi comprovada, pois permanece desconhecido qual é o gene e qual a sua função. De qualquer forma, os pacientes que apresentam esta anomalia cromossômica têm morfologia típica e prognóstico favorável.^{18,19,24}

A del(11q) aparece em 10%-20% dos casos de LLC ao cariótipo, mas, igualmente às demais anomalias, pode ser detectada em maior número de casos pela FISH. Geralmente são indivíduos jovens, com estágio clínico avançado, extensa linfonomegalia e com conseqüente menor sobrevida.^{25,26} O gene *ATM* localizado no 11q22.3~q23.1 pode funcionar como supressor tumoral. Normalmente o *ATM* age como protetor da integridade do genoma controlando o ciclo celular e ativando caminhos de reparo de DNA.

Por ocasião da deleção do braço curto do cromossomo 17 há a perda do gene supressor tumoral *P53* localizado no 17p13.1. A del(17p) aparece em menos de 10% dos cariótipos de LLC e em até 17% dos casos por FISH, mas a função anormal do *P53* pode ser detectada em cerca de 26% dos pacientes por métodos moleculares. A avaliação imunohistoquímica da expressão da proteína também pode ser de significado prognóstico. Na síndrome de Richter, a del(17p) pode ser observada em cerca de 60% dos casos. A expressão aumentada de *P53* ocorre em resposta a dano no DNA e induz alteração na divisão celular, levando a célula ao ponto de checagem G1 ou desencadeando a apoptose.²⁷ Tais pacientes apresentam sobrevida curta, doença avançada, resposta desfavorável ou resistência a agentes alquilantes, análogos da purina e rituximab (anti-CD20).^{11,28-32} Há relatos de pacientes com del(17p) com resposta a alemtuzumab (anti-CD52).¹¹

Em relação à freqüência de anormalidades detectadas por FISH, Nascimento³³ observou, dentre os pacientes em acompanhamento na Unifesp, que 52% apresentavam anormalidades das quais 34% eram del(13q), 18% del(17p), 14% +12 e 44% mais de uma anomalia simultânea, como, del(13q)/del(17p), del(13q)/del(11q) ou +12/del(13q).

Tabela 1

Anomalias cromossômicas, porcentagem de pacientes, mediana de intervalo livre de tratamento e mediana de sobrevida³⁴

Categoria	% de pacientes	Mediana de intervalo livre de TTO (M)	Mediana de SBV (M)
17p-	7	9	32
11q-sem 17p-	17	13	79
+12 sem 11q- ou 17p-	14	33	114
Normal	18	49	111
13q- isolada	36	92	133
outras	8	-	-

Depreende-se, por conseguinte, que a FISH permite a detecção de subgrupos com características peculiares e com diferenças de sobrevida³⁴ conforme apontado na tabela 1.

De acordo com o inicialmente exposto, nem todas as anomalias serão detectadas por FISH, pois passarão despercebidas aquelas fora das regiões alvo. Assim, alguns grupos têm usado conjunto de sondas que também contemplam outros *loci*, como 6q e 14q. Porém, cariótipos complexos permanecem sendo descritos pela citogenética clássica.³⁵

É preciso ainda salientar a importância da FISH no diagnóstico diferencial de LLC, em particular, com o linfoma do manto, graças ao uso da sonda *CCDN1/IGH*, que identifica o rearranjo t(11;14) com sensibilidade superior à citogenética clássica e, portanto, extremamente útil em dadas situações clínico-laboratoriais limítrofes.¹³

No tocante a fatores prognósticos, além dos aspectos genéticos amplamente discutidos, há que se apontar as mutações do gene *IgVh*, que são observadas em 50% a 75% das células de LLC-B. Estudos clínicos mostraram que a presença de gene *IgVh* mutado correlaciona-se a mediana de sobrevida mais longa.³⁶ Estudos da expressão diferencial de genes permitiram identificar grupos restritos de genes que podem discriminar entre clones com *IgVh* mutado ou não mutado em LLC. Um destes genes é a *zeta associated protein-70* (*ZAP-70*), que pode prever corretamente o estado de mutação em 78 a 90% dos casos. Em relato de pacientes com estágio inicial da doença com *ZAP-70* positiva, a mediana de sobrevida estimada é de noventa meses, significativamente inferior àqueles expressão negativa.^{10,34,36} Outro marcador é o CD38, uma glicoproteína de superfície celular, que, entretanto, pode sofrer alterações ao longo do tempo em alguns

pacientes.³⁶ Células de LLC-B com expressão de CD38 e *ZAP-70* provavelmente portam anormalidades citogenéticas, como +12, del(11q) e del(17p).³⁶

Correlacionando as informações fornecidas pela citogenética com a *ZAP-70* tivemos a oportunidade de verificar que 69% de 19 casos de LLC (idade mediana de 63 anos), estudados nos últimos meses no Fleury-Centro de Medicina Diagnóstica (tabela 2), apresentavam algum critério desfavorável, seja FISH ou *ZAP-70*. A *ZAP-70* estava anormal em 47% dos casos. Foi detectada alteração desfavorável pela FISH em 42% dos pacientes, 50% dos quais tinham também *ZAP-70* alterada, permitindo melhor discriminação de casos com pior evolução. Entretanto, desta casuística, talvez a informação mais valiosa seja aquela referente aos indivíduos jovens, como um caso que não demonstrava marcadores desfavoráveis, em contraposição a outro que apresentava del(17p), merecedor de monitoração amíde. Os três pacientes com deleção 13q14 isolada, que confere prognóstico favorável, não apresentaram *ZAP-70* aumentada.³⁷ Estes dados apontam que a correlação de critérios prognósticos é uma forma de aumentar a capacidade de identificação de pacientes com maior risco, os quais podem se beneficiar de estratégias terapêuticas individualizadas. Assim, à luz do conhecimento vi-

Tabela 2

Dados de sexo, idade, resultado de FISH para centrômero do cromossomo 12 (+12), deleção 17p (*P53*), deleção RB1 (13q14), deleção 13q (13S319), deleção 11q (*ATM*) e resultado *ZAP-70* de 19 pacientes com LLC.³⁷

caso	sexo	idade	+12	p53	13q14	13S319	ATM	ZAP
1	M	54	n	n	n	n	n	46%
2	M	65	n	n	n	90%x1	84%x1	12%
3	F	63	n	n	43x1	n	n	5%
4	F	60	n	n	n	n	n	55%
5	M	65	72%x3	n	n	72%x1	n	30%
6	M	61	n	n	n	n	n	66%
7	F	66	n	n	n	n	n	54%
8	M	71	79%x3	n	34%x1	n	n	35%
9	M	60	60%x3	n	n	n	n	2%
10	F	67	n	n	n	n	n	1,7%
11	F	70	n	13%x1	n	12%x1	n	11%
12	M	43	n	10%x1	n	n	n	1%
13	F	61	58%x3	n	n	n	n	39%
14	F	58	n	n	n	n	n	60%
15	M	74	n	n	35%x1	n	n	20%
16	M	59	n	n	49%x1	n	n	5%
17	M	63	n	n	n	n	n	17%
18	M	40	n	n	n	n	n	7%
19	F	64	63%x3	n	n	n	n	80%

gente e pela facilidade de realização, temos sugerido, em adição à avaliação tradicional (sintomas clínicos, sinais físicos e testes laboratoriais) a aplicação de FISH e ZAP-70.

Nessa mesma linha, estudos mais recentes indicam que o estado de mutação e alterações cromossômicas, ainda que parâmetros distintos de relevância prognóstica, parecem estar correlacionados. Alterações desfavoráveis como del(17p) e del(11q) ocorrem mais freqüentemente em tumores não mutados, enquanto anomalias favoráveis (del13q isolada) ocorrem no subgrupo com mutação.¹¹ Em relação à sobrevida livre de progressão, entre os pacientes não tratados, aqueles que apresentavam IgVh não mutado, +12, del(11q) e del(17p) tiveram progressão mais rápida da doença.¹¹

Do ponto de vista da patogênese molecular, deleções afetando cromossomos 11q22-23 e 17p13 levam à expressão reduzida de genes nas regiões correspondentes, como *ATM* e *P53*, ao passo que na trissomia 12 há hiper-regulação dos genes mapeados naquele cromossomo.¹¹ Em última análise, as alterações genômicas consistem de perdas clonais mono ou bialélicas assim como ganhos à custa de duplicações, ampliações ou trissomias. Entretanto, o mecanismo que leva às alterações é desconhecido.

Outra alteração das células de LLC-B que merece ser destacada é o encurtamento de telômero. Encurtamento significativo pode levar a disfunção telomérica, que induz instabilidade genômica. Ainda que rearranjos cromossômicos não recíprocos resultem de disfunção telomérica, perdas cromossômicas, ampliações e deleções ocorrem devido ao encurtamento do telômero.³⁶ Pacientes com características desfavoráveis, tais como IgVh não mutado e expressão de CD 38, apresentam encurtamento de telômero, alterações cromossômicas e disfunção de *P53*, sugerindo correlação entre disfunção telomérica e anomalias genômicas.³⁶

Em relação ao monitoramento da doença, uma vez estabelecida a alteração inicial pela FISH, com dados prognósticos, a avaliação clínica e laboratorial periódica para a detecção de evolução clonal é razoável e disponível na prática clínica.³⁴

Como conclusão, dada à importância da citogenética e das informações prognósticas que ela fornece, nossa recomendação é que todos os pacientes com LLC, em particular ao diagnóstico, devem ser submetidos a estudo de FISH e cariótipo convencional por banda G.

Abstract

The analysis of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia is important at diagnosis, since it allows the identification of a malignant clone as well as helping in the differentiation of other lymphoproliferative disorders; at follow up, in order to permit the detection of additional abnormalities; in the therapeutic decision, since the presence of del(17p) means

resistance to treatment; in treatment monitoring as it allows the detection of residual disease or the diagnosis of transformation (Richter's transformation). Cytogenetics offers prognostic information and a better understanding of the disease. The analysis can be made by conventional G banding karyotyping, which detects around one third of abnormal cases or by FISH, which increases the rate of abnormality detection to 82%. FISH together with other prognostic criteria (mutation status, ZAP-70, etc) has allowed a better prognostication. The most frequent abnormalities are: trisomy 12 (+12), with a median survival of 9 years; translocation or deletion of 13q (t/del(13q)) with favorable prognosis and median survival of 11 years; deletion or translocation of 11q22-23, with 6.6 years of median survival; deletion of short arm of chromosome 17, del(17p), with median survival of 2.5 years; and deletion of 6q, translocation of 14q, giving a total of around 60% of the total abnormalities. Considering the importance of cytogenetics and prognostic information, every chronic lymphocytic leukemia patient should undergo FISH and karyotype evaluations, at diagnosis and during the follow up. Rev. bras. hematol. hemoter. 2005;27(4):247-252.

Key words: *Chronic lymphocytic leukemia; cytogenetics; chromosomal abnormalities; FISH; trisomy 12; del(13q); del(11q); del(17p).*

Referências Bibliográficas

- Hallek M, Kuhn-Hallek I, Emmerich B. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1997 11(suppl 2):S4-13.
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in CLL. *The New Engl J Med* 2000 343:1.910-6.
- Juliussen G, Merup M. Cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Sem in Oncol* 1998;25(1):19-26.
- Chauffaille MLLF, Vieira S, Martins SLR. Importância do cariótipo em LLC: relato de 18 casos. *Jornal Bras Patol Clin/Med Lab* 2004; 46:75-78.
- Catelani ALPM, Vieira S, Chauffaille ML. Cariótipo em LLC: avaliação de 20 casos. XII Encontro Científico Fleury, 2002, pg 19, São Paulo.
- Zwiebel JA, Cheson B. Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. *Sem in Oncol* 1998;25(1):42-59.
- Han T, Sadamori N, Black AMW et al. Cytogenetic studies in CLL. *Nouv Rev Franç d'Hematol* 1988;30:393-395.
- Escudier SM, Leahy JMP, Drach JW et al. Fluorescent in situ hybridization and cytogenetic studies of trisomy 12 in CLL. *Blood* 1993; 81:2.702-7.
- Xue TH, Marco JG, Ellis J et al. Trisomy 12 in CLL detected by FISH. *Blood* 1993;82:571-5.
- Shanafelt TD, Call TG. Current approach to diagnosis and management of CLL. *Mayo Clin Proc* 2004;79:388-98.
- Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2004;163-83. Review.
- Resnitzky, Matutes E, Hedges M et al. The ultrastructure of mantle cell lymphoma and other B-cell disorders with translocation t(11;14) (q13;q32). *Br J Haematol* 1996;94(2):352-61.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds): WHO classification of tumors. Pathology and Genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon, 2001.
- Tsujimoto Y, Jaffe E, Cossman J et al. Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature* 1985;315:340-3.

15. Robert KH, Gahrton G, Friberg K et al. Extra chromosome 12 and prognosis in CLL. *Scand J Haematol* 1982;28:163-6.
16. Giles FJ, O'Brien SM, Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia (Richter's) transformation. *Semin Oncol* 1998;25(1):117-125.
17. Chauffaille MLLF, Marques EA, Oliveira JSR et al. Detection of trisomy 12 by FISH in CLL. *Genetics and Mol Biol* 2000;23(3):531-3.
18. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco D et al. Trisomy 12 defines a group of chronic lymphocytic leukemia with atypical morphology: correlation of cytogenetics, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol* 1996;92:382-8.
19. Mould S, Gardiner A, Corcoran M et al. Trisomy 12 and structural abnormalities of 13q14 occurring in the same clone in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1996;92(2):389-92.
20. Bigoni R, Cuneo A, Roberti MG et al. Chromosome aberrations in atypical chronic lymphocytic leukemia: a cytogenetic and interphase cytogenetic study. *Leukemia*. 1997;11(11):1.933-40.
21. Reed JC. Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 1998;25(1):11-18.
22. Hjalmar V, Kimby E, Matutes E et al. Atypical lymphocytes in B-cell chronic lymphocytic leukemia and trisomy 12 studied by conventional staining combined with fluorescence in situ hybridization. *Leuk Lymphoma* 2000;37(5-6):571-6.
23. Dierlamm J, Wlodarska I, Michaux L et al. FISH Identifies different types of duplications with 12q13-15 as the commonly involved segment in B-cell lymphoproliferative malignancies characterized by partial trisomy 12. *Genes, Chromosomes, Cancer* 1997;20:155-166.
24. Hammarsund M, Corcoran MM, Wilson W et al. Characterization of a novel B-CLL candidate gene--DLEU7--located in the 13q14 tumor suppressor locus. *FEBS Lett* 2004;556(1-3):75-80.
25. Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM et al. Late appearance of the 11q22.3-23.1 deletion involving the ATM locus in B-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders. *Clinico-biological significance. Haematologica* 2002;87(1):44-51.
26. Eclache V, Caulet-Maugendre S, Poirel HA et al. Cryptic deletion involving the ATM locus at 11q22.3 approximately q23.1 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;152(1):72-6.
27. Cerretini R, Chena C, Giere I et al. Structural aberrations of chromosomes 17 and 12 in chronic B-cell disorders. *Eur J Haematol* 2003;71(6):433-8.
28. Rai KR, Dohner H, Keating MJ et al. Chronic lymphocytic leukemia: case-based session. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2001; 140-56. Review.
29. Amiel A, Arbov L, Manor Y et al. Monoallelic p53 deletion in chronic lymphocytic leukemia detected by interphase cytogenetics *Cancer Genet Cytogenet* 1997;97(2):97-100.
30. Chena C, Cerretini R, Noriega MF et al. Cytogenetic, FISH, and molecular studies in a case of B-cell chronic lymphocytic leukemia with karyotypic evolution. *Eur J Haematol* 2002;69(5-6):309-14.
31. Wiktor A, Van Dyke DL. Combined cytogenetic testing and fluorescence in situ hybridization analysis in the study of chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;153(1):73-6.
32. Stilgenbauer S, Dohner H. Molecular genetics and its clinical relevance. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004;18(4):827-48, viii.
33. Nascimento MC. Estudo das alterações citogenético-moleculares (FISH) em pacientes com LLC. Relação com idade, sexo, estágio clínico de Binet, expressão de CD38 e ZAP-70. Tese de Mestrado. Unifesp/EPM, 2004.
34. Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 2004;103:1.202- 1.210.
35. Glassmann Hayes Glassman AB, Hayes KJ. The value of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;158(1):88-91.
36. Keating MJ, Chiorazzi N, Messmer B et al, *Biology of CLL. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2003;153-175. Review.
37. Alonso C, Chauffaille, ML, Martins SLR et al: FISH e ZAP-70 em leucemia linfocítica crônica: o destacado papel destes dois marcadores prognósticos. XV Encontro Científico Fleury, 2005, São Paulo.

Avaliação: Carlos Sergio Chiattonne

(publicado após acordo do Editor)

Conflito de interesse: Artigo derivado do II Encontro Brasileiro de Consenso da LLC

Recebido: 30/10/2005

Aceito: 15/11/2005