



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
Departamento de Patologia e Medicina

JESAMAR CORREIA MATOS

**ANÁLISE COMPARATIVA DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA
DE CD10 E DE CD19 EM BLASTOS LEUCÊMICOS E
HEMATOGÔNIAS.**

Fortaleza-Ce
2005

JESAMAR CORREIA MATOS

**ANÁLISE COMPARATIVA DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DE CD10 E
DE CD19 EM BLASTOS LEUCÊMICOS E HEMATOLOGÍAS.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Ájax Nogueira Queiroz

Fortaleza-Ce

2005

M381a	<p>Matos, Jesamar Correia Análise comparativa de intensidade de fluorescência de CD10 e de CD19 em blastos leucêmicos e hematogônias/ Jesamar Correia Matos. – Fortaleza, 2005. 99 : il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. José Ájax Nogueira Queiroz. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Departamento de Patologia e Medicina Legal.</p> <p>1. Hematogônia. 2. Citometria de fluxo. 3. Leucemia. I. Título.</p> <p>CDD 616.15</p>
-------	--

JESAMAR CORREIA MATOS

ANÁLISE COMPARATIVA DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DE CD10 E DE CD19 EM BLASTOS LEUCÊMICOS E HEMATOGÔNIAS.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em:17/06/2005.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr . José Ájax Nogueira Queiroz
Orientador
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof^a. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Silva
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof^a. Dr^a. Selma Lessa de Castro
Universidade Estadual do Ceará-UECE

“Para se chegar a verdade,
duvide de tudo, mesmo que
pareça absolutamente verdadeiro”

René Descartes
(1596-1650)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Matos de Oliveira (*in memoriam*) pela vontade e esforços despendidos no sentido de nos dar uma vida melhor e Kedma Correia Matos que com muito amor e luta possibilitou tornar tudo possível com um exemplo de garra, força e coragem.

À minha esposa, Luciene Carvalho Vieira Matos, companheira eterna que sempre pôs meus interesses como prioridade tornando minha vida junto à sua, uma só.

Aos meus filhos Loraine, Jéssica e Jesamar Filho, que são meus motivos para que eu faça o melhor que tenho dentro de mim.

Aos meus irmãos, Karine, Júnior e Joabe pela unidade que representam na minha vida e ao cunhado Leidelson pela amizade dentro de sua simplicidade e exemplo de coragem na vida.

A todos os pacientes portadores de câncer que mesmo frente a uma condição de desespero, emprestam suas vidas na busca de obtermos maiores conhecimentos não mais para si mas para outros que possam vir a padecer de enfermidade semelhante.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Ájax Nogueira Queiroz, orientador deste trabalho pela sua contribuição e pela sua simplicidade que o torna diferenciado como ser humano.

Aos colegas de trabalho, Vonete, Hélio, Josiane, Júnior, Gervásia e Valdelise, do Centro de Referência em diagnóstico do Câncer da Criança e do Adolescente Dr. Murilo Martins, pela contribuição indireta da extensão de seus trabalhos.

Aos colegas de trabalho Dra. Ideleide, Dra. Selma, Dra. Sara Duarte, Dra. Márcia, Dra. Nadja, Dr. Daniel e Dr. Hélder que juntos representam a competente equipe do estado do Ceará no combate ao câncer infantil.

Ao Hospital Albert Sabin que possibilitou a realização deste trabalho.

A amiga e colega Dra. Luciana Capputo, exemplo de competência e garra na área da oncologia pediátrica e espelho de profissional e referência de suporte para discussão dos casos.

A Satiko, responsável por grande parte dos meus conhecimentos na área de imunopatologia sempre atenta e disposta ao ensino.

A Dra. Anamaria Cavalcante responsável direta pelo meu retorno às atividades na área de oncohematologia.

Ao Projeto Criança e Vida que fez nascer o espírito da pesquisa na área médica com a doação dos laboratórios a oito centros de referência no diagnóstico do câncer infantil.

Ao professor George pelas orientações em estatística.

A Dra. Alana, professora do curso de especialização em hematologia, pelo ensino e o suporte nas dúvidas em citologia.

RESUMO

Hematogônias são células jovens normais da medula óssea responsáveis pela produção das células de linhagem B do sistema imunológico. A leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B representa um dos tipos de transformação neoplásica das hematogônias. Devido a alta similaridade do ponto de vista citológico dos dois tipos celulares, é possível haver erros de interpretação na análise citológica, fazendo-se necessário em algumas circunstâncias o uso de técnicas complementares diagnósticas para diferenciar as células benignas das malignas. O uso de marcadores imunológicos através de anticorpos monoclonais marcados com fluorescência tem grande aplicabilidade nos laboratórios especializados como rotina no estudo das leucemias. Os antígenos CD10 e CD19 estão expressos em ambos os tipos celulares de forma que se faz necessária uma extensão no uso de outros marcadores para caracterização da natureza benigna ou maligna das células. Testou-se possíveis diferenças nas curvas de expressão de CD10 e CD19 dos dois tipos celulares. Foram colhidas 36 amostras de medula óssea de pacientes pediátricos não neoplásicos como grupo controle. A idade variou de 24 dias de vida a 15 anos com uma média de 5 anos. Foram colhidas também 39 amostras de pacientes portadores de LLA de linhagem B por ocasião do diagnóstico. A idade variou de 4 meses a 14 anos com uma média de 6,6 anos. Analisou-se as diferenças nas distribuições quanto a intensidade de fluorescência pelas médias, desvios-padrão, coeficientes de variação, coeficientes de inclinação e coeficiente de curtose para os dois marcadores CD10 e CD19 nos dois grupos. Os valores individuais de cada amostra foram comparados com os intervalos gerados pelos valores do grupo controle com os seguintes respectivos resultados de sensibilidade e especificidade: 89,7% e 75% para um *cut-off* de média \pm 2DP; 79,5% e 100% para média \pm 2,5DP; e 71,8% e 100% para média \pm 3DP. Conclusão: A expressão de CD10 e CD19 em blastos e hematogônias é diferente podendo ser de utilidade prática na distinção entre os dois tipos celulares.

Palavras-chave: Hematogonia; antígenos CD10 e CD19; leucemia linfoblástica aguda.

ABSTRACT

Hematogones are normal immature cells from bone marrow that are responsible for the production of the immune system's B cell lineage. The acute lymphoblastic leukemia (ALL) of precursors B cells represents one type of neoplastic transformation of hematogones. Due to their high similarity there are risks of erroneous interpretation consequently making it necessary use to complementary diagnostic techniques. The CD10 and CD19 antigens are expressed on both types of cells so, it is necessary use other monoclonal antibodies to identify malign or benign nature. In attempt to avoid the use of different antibodies we investigate possible differences in the expression of CD10 and CD19 in both cell types. We collected 36 samples of bone marrow from non-neoplastic patients as a control group. The age ranged from 0 to 15 years with an average of 5 years. It was also collected 39 samples from patients with ALL of B cells. The age ranged from 0 to 14 years with an average of 6.6 years. We analyzed the differences between the fluorescence intensity concerning average, standard deviation, variation, inclination and kurtosis coefficients for the two markers. The individual values of each sample were compared with the intervals generated by the values of the control group: $ME \pm 2SD$; $ME \pm 2.5SD$ and $ME \pm 3SD$. It was possible to distinguish the groups with 89.7% and 75%; 79.5% and 100% and 71.8% e 100% of sensibility and specificity, respectively for the intervals. In conclusion, the expression of CD10 and CD19 antigens on blasts and hematogones is significantly different and may be useful in the differentiation of both cell types.

Keys- words: Hematogones; CD10 and CD19 antigens; Acute lymphoblastic leukemia (ALL)

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CALLA	Antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda
CD	<i>Cluster designation</i>
DP	Desvio-padrão
DRM	Doença residual mínima
EGIL	European group for immunological classification of leukemias
FAB	Franco-americana-britânica
FL-2	Canal de fluorescência da segunda cor
FL-3	Canal de fluorescência da terceira cor
FSC	Forward scatter
HSPG	Sulfato proteoglicano de heparanan
L1	Subtipo L1 da leucemia linfoblástica aguda
L2	Subtipo L2 da leucemia linfoblástica aguda
L3	Subtipo L3 da leucemia linfoblástica aguda
LANL	Leucemia aguda não linfoblástica
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
MIC	Morfológico-imunológico-citogenético
NK	<i>Natural killer</i>
PA	Parâmetro de avaliação
PAS	Ácido periódico de Schiff
R1	Região 1
R2	Região 2
R3	Região 3
SSC	Side scatter
TdT	Terminal-deoxinucleotidil-transferase

LISTA DE TABELAS

Tabela	Descrição	Pág.
Tabela 1	Análise estatística da distribuição dos pacientes com LLA pela classificação FAB.....	55
Tabela 2	Análise estatística da distribuição dos pacientes com LLA pela classificação definida pelo grupo EGIL.....	55
Tabela 3	Valores dos parâmetros de avaliação da intensidade de fluorescência de CD10 e de CD19 em hematogônias.....	59
Tabela 4	Valores dos parâmetros de avaliação da intensidade de fluorescência de CD10 e de CD19 em blastos.....	61
Tabela 5	Análise comparativa das médias dos parâmetros de avaliação entre hematogônias e blastos pelo teste-t de student.....	62
Tabela 6	Definição dos valores dos <i>cut-off</i> com base na média e desvio-padrão dos parâmetros de avaliação de CD10 das hematogônias.....	63
Tabela 7	Definição dos valores dos <i>cut-off</i> com base na média e desvio-padrão dos parâmetros de avaliação de CD19 das hematogônias.....	63
Tabela 8	Análise comparativa da sensibilidade e especificidade na detecção da doença com base nos três níveis de <i>cut-off</i> aplicados a todos os parâmetros de avaliação.....	74
Tabela 9	Análise comparativa das sensibilidades individuais de cada parâmetro de avaliação para o <i>cut-off</i> de média $\pm 2,5DP$	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico	Descrição	Pag.
Gráfico 1	Variação dos valores das médias de intensidade de fluorescência de CD10 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.....	69
Gráfico 2	Variação dos valores dos desvios-padrão de intensidade de fluorescência de CD10 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.....	69
Gráfico 3	Variação dos valores dos coeficientes de variação de intensidade de fluorescência de CD10 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.....	70
Gráfico 4	Variação dos valores dos coeficientes de inclinação de intensidade de fluorescência de CD10 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.....	70
Gráfico 5	Variação dos valores dos coeficientes de curtose de intensidade de fluorescência de CD10 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.....	71
Gráfico 6	Variação dos valores das médias de intensidade de fluorescência de CD19 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.....	71
Gráfico 7	Variação dos valores dos desvios-padrão de intensidade de fluorescência de CD19 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.....	72
Gráfico 8	Variação dos valores dos coeficientes de variação de intensidade de fluorescência de CD19 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.	72
Gráfico 9	Variação dos valores dos coeficientes de inclinação de intensidade de fluorescência de CD19 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.....	73
Gráfico 10	Variação dos valores dos coeficientes de curtose de intensidade de fluorescência de CD19 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descrição	Pág.
Figura 1	Comparação da morfologia de hematogônias e linfoblastos neoplásicos em esfregaços de medula óssea. (A) Hematogônias em medulla óssea de uma criança de 3 anos de idade com doença imune. (B) Leucemia linfoblástica aguda.....	19
Figura 2	Moléculas derivadas de células do estroma da medula óssea responsáveis pela sobrevivência, crescimento e diferenciação dos precursores de células B.....	23
Figura 3	Características imunológicas da diferenciação linfóide humana.	25
Figura 4	Desenho representativo dos elementos que compõem o citômetro de fluxo.....	39
Figura 5	Desenho representativo do funcionamento interno do sistema de fluxo para leitura individual das células.....	39
Figura 6	Foto do citômetro de fluxo FACSCalibur da Becton Dickinson®..	46
Figura 7	Histogramas representativos da região R1 definindo células de pequeno tamanho e com baixa complexidade.....	46
Figura 8	Histogramas representativos da região R2 definindo células com expressão dupla de CD10 e CD19.....	46
Figura 9	Representação em histogramas da dupla expressão de CD10 e CD19 em hematogônias.....	48
Figura 10	Representação em histogramas da expressão de CD10 em hematogônias por número de eventos.....	48
Figura 11	Representação em histogramas da expressão de CD19 em hematogônias por número de eventos.....	49
Figura 12	Representação em histogramas da dupla expressão de CD10 e CD19 em blastos leucêmicos.	49
Figura 13	Representação em histogramas da expressão de CD10 em blastos leucêmicos por número de eventos.....	50
Figura 14	Representação em histogramas da expressão de CD19 em blastos leucêmicos por número de eventos.....	50

LISTA DE QUADROS

Quadro	Descrição	Pág.
Quadro 1	Análise comparativa de cada parâmetro de avaliação de cada amostra das hematogônias dentro da distribuição de freqüência dos respectivos parâmetros de avaliação do grupo controle tendo com base no <i>cut-off</i> , média \pm 2DP.....	46
Quadro 2	Análise comparativa de cada parâmetro de avaliação de cada amostra das hematogônias dentro da distribuição de freqüência dos respectivos parâmetros de avaliação do grupo controle tendo com base no <i>cut-off</i> , média \pm 2,5 e 3,0DP.....	47
Quadro 3	Análise comparativa de cada parâmetro de avaliação de cada amostra dos pacientes com leucemia dentro da distribuição de freqüência dos respectivos parâmetros de avaliação do grupo controle com base no <i>cut-off</i> , média \pm 2DP.....	48
Quadro 4	Análise comparativa de cada parâmetro de avaliação de cada amostra dos pacientes com leucemia dentro da distribuição de freqüência dos respectivos parâmetros de avaliação do grupo controle com base no <i>cut-off</i> , média \pm 2,5DP.....	49
Quadro 5	Análise comparativa de cada parâmetro de avaliação de cada amostra dos pacientes com leucemia dentro da distribuição de freqüência dos respectivos parâmetros de avaliação do grupo controle com base no <i>cut-off</i> , média \pm 3DP.....	50

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	
LISTA DE TABELAS.....	
LISTA DE GRÁFICOS.....	
LISTA DE FIGURAS.....	
LISTA DE QUADROS.....	
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Objetivos.....	20
1.1.1 Objetivo geral.....	20
1.1.2 Objetivo específico.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 Ontogenia dos linfócitos B.....	22
2.2 Fenótipo das células linfóides de linhagem B.....	24
2.3 Leucemia linfoblástica aguda.....	28
2.4 Hematogônia.....	33
2.5 Diferenças imunofenotípicas entre blastos leucêmicos e hematogônias.....	35
2.6 Doença residual mínima.....	35
2.7 Citometria de fluxo.....	36
3 MÉTODOS.....	41
3.1 Desenho de estudo.....	41
3.2 População.....	41
3.3 Local da pesquisa.....	41
3.4 Período do estudo.....	41
3.5 Aspectos éticos.....	42

3.6 Coleta de material, acondicionamento e transporte.....	42
3.7 Estudo citológico.....	42
3.8 Estudo imunofenotípico das leucemias linfoblásticas agudas.....	43
3.9 Estudo de viabilidade.....	43
3.10 Processamento.....	44
3.11 Aquisição.....	45
3.12 Análise.....	47
3.12.1 Extração dos valores de canais de fluorescência de cada evento...	47
3.12.2 Elaboração dos histogramas.....	47
3.12.3 Cálculo dos parâmetros de avaliação.....	50
3.12.4 Análise estatística.....	52
4 RESULTADOS.....	54
5 DISCUSSÃO.....	76
6 CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXOS	91

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Células precursoras linfóides de linhagem B, também conhecidas como hematogônias, presentes na medula óssea em condições normais, apresentam características morfológicas e imunofenotípicas semelhantes aos blastos leucêmicos na leucemia linfoblástica aguda (LLA), podendo haver dificuldades na diferenciação morfológica laboratorial dos dois tipos celulares sendo por vezes necessária uma extensão do estudo destas para melhor caracterização (RIMSZA et al, 2004).

As hematogônias pelas técnicas de coloração convencionais com o azul de metileno, segundo Romanovsky, parecem muito com os blastos da leucemia linfoblástica subtipo L1 da classificação franco-americana-britânica (FAB). (Figura 1) A diferenciação se faz necessária visto que os precursores normais da medula óssea podem, em situações outras que não a leucemia, estar aumentados e conduzir a um erro de interpretação. Pacientes portadores de leucemia linfoblástica aguda também podem ter um aumento de células jovens linfóides na medula óssea com características blásticas após tratamento quimioterápico ou transplante de medula óssea, como consequência de um estado regenerativo deste órgão, sem que necessariamente represente uma falha terapêutica ou recidiva da doença. O mesmo pode acontecer na reavaliação citológica no vigésimo nono dia dos protocolos terapêuticos para LLA onde de rotina se realiza um mielograma (MCKENNA et al, 2001).

As células normais podem ser diferenciadas morfológicamente das patológicas, entretanto, não é incomum a dúvida diagnóstica, e o suporte das técnicas avançadas de diagnóstico imunológico para melhor caracterização da natureza das células se faz necessário. A citometria de fluxo com o uso de uma grande variedade de anticorpos monoclonais permite a identificação precisa das células quanto a sua linhagem, nível de maturação e natureza destas quanto a benignidade ou malignidade. Isto requer o uso de um painel amplo de monoclonais tornam um procedimento de custo elevado.

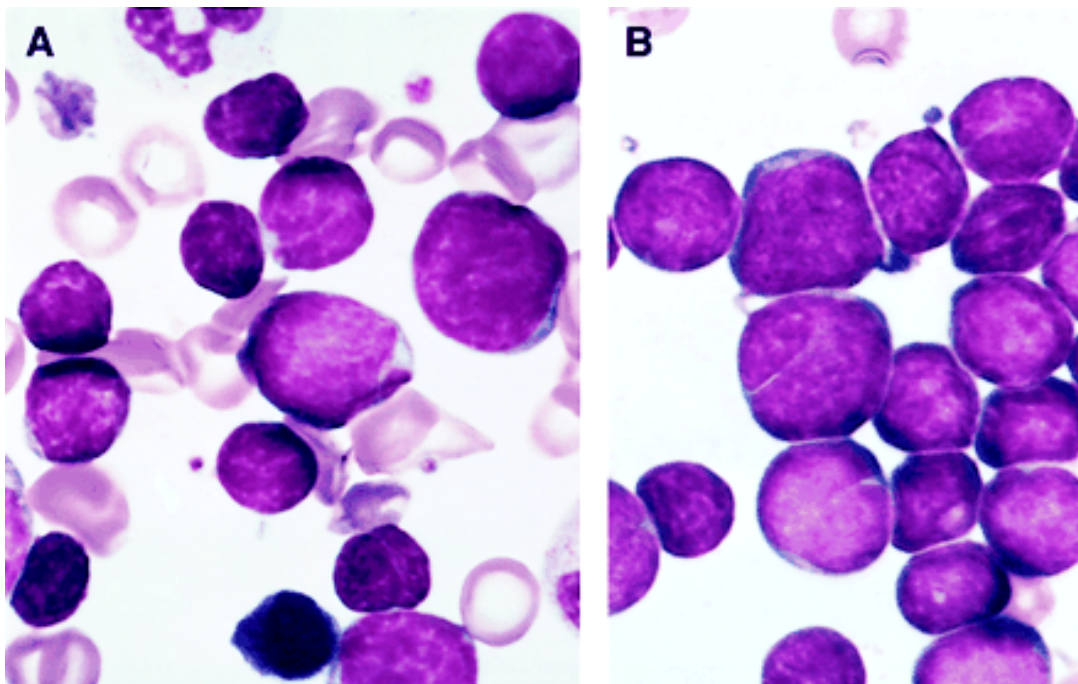
O uso de CD19 e CD10 é referido na literatura na distinção de blastos leucêmicos dos precursores linfóides normais da medula por técnicas quantitativas

de citometria de fluxo pela análise diferencial da intensidade de expressão destes marcadores (BAIN et al, 2002).

A imunofenotipagem multiparamétrica é uma ferramenta poderosa para se obter uma clara diferenciação entre células normais e doentes (BASSO, 2001).

As células precursoras normais e leucêmicas caracterizam-se pela dupla expressão de CD10 e CD19 que quando analisadas em gráficos distribuem-se de forma semelhante. O estudo das características gráficas pode ser de utilidade na elaboração de um indicador diagnóstico que sirva de critério de julgamento na triagem para análise de amostras de medulas, e esclarecimento da natureza das células quanto a benignidade ou malignidade e, assim, dispensando o uso de outros monoclonais ao tratar-se de um quadro benigno, reduzindo assim os custos quando num procedimento de triagem.

Figura 1 - Comparação da morfologia de hematogônias e linfoblastos neoplásicos pela coloração de *Leishman* aumento de 1.000x em esfregaços de medula óssea. (A) Hematogônias em medula óssea de uma criança de 3 anos de idade com doença imune. (B) Leucemia linfoblástica aguda.



Fonte: MCKENNA et al, 2001

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral.

- Diferenciar células precursoras linfóides B normais de células neoplásicas da mesma linhagem usando apenas a expressão de dois marcadores: CD10 e CD19.

1.1.2 Objetivos específicos

- Encontrar diferenças significativas na expressão dos marcadores CD10 e de CD19 entre blastos leucêmicos e hematogônias que possam ser de utilidade prática para diferenciação laboratorial dos dois tipos celulares.
- Comparar as características das curvas de expressão de CD10 e CD19 em blastos leucêmicos e em hematogônias quanto aos parâmetros: média, desvio-padrão, coeficiente de variação, coeficiente de inclinação e coeficiente de curtose.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ontogenia dos linfócitos B

A célula tronco hematopoética é uma célula progenitora que gera uma outra célula progenitora específica da linhagem linfóide e que tem a propriedade amadurecer e diferenciar-se em linfócitos T, B e *natural killer* (NK) (JIMÉNEZ et al, 2002). A ontogenia da linhagem linfóide tem como base de seu conhecimento os estudos realizados em células de pacientes com leucemia linfoblástica aguda, onde estas representam um acúmulo de células num dado estágio maturativo, semelhante a uma parada de maturação num determinado nível de diferenciação das células linfóides normais (UCKUN et al, 1988).

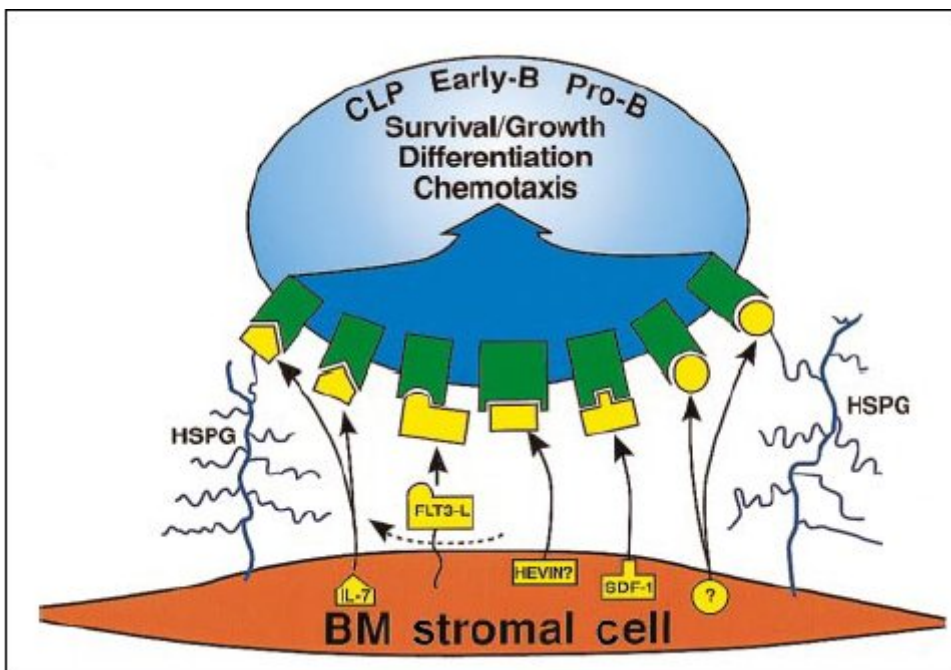
Na espécie humana, durante o desenvolvimento fetal, outros órgãos, que não a medula óssea, tem papel relevante na hematopoese como o fígado e os linfonodos gerando células produtoras de imunoglobulinas durante este período da vida (BOFILL et al, 2002). Posteriormente a medula óssea assume esta função tornando-se o órgão primário da produção e diferenciação de células linfóides da linhagem B produtoras de imunoglobulinas (LOKEN et al, 1987). Experimentos demonstram ser a medula óssea este órgão sendo possível induzir-se uma tolerância imunológica a determinados antígenos pela exposição destes aos precursores linfóides (METCALF, 1976) (MICKLEM et al, 1979). Nem todos os animais produzem suas células sanguíneas na medula óssea. Os pássaros, diferente dos mamíferos, possuem um órgão mais bem definido onde contém células precursoras que amadurecem e geram as células linfóides de linhagem B. (MICKLEM et al, 1979).

Por ocasião do nascimento, a medula óssea apresenta uma quantidade elevada de hematogônias aumentando consistentemente entre primeira semana e o primeiro mês de vida, seja em recém-natos a termos ou pré-terms (RIMSZA et al, 2004). A hematopoese é um sistema altamente organizado responsável pela produção das células do sangue e o controle, de proliferação, diferenciação e maturação, é realizado por uma complexa interação de moléculas presentes nas células e no meio medular no qual estão imersas. As citocinas são moléculas de

glicoproteínas que controlam a atividade mitótica e a diferenciação celular (ANJOS, 2000).

Uma série de moléculas presentes no estroma da medula óssea (Figura 2) participam dos mecanismos biológicos que garantem o nascimento, crescimento, diferenciação e sobrevivência das células precursoras B (LEBIEN, 2000).

Figura 2 - Moléculas derivadas de células do estroma da medula óssea responsáveis pela sobrevivência, crescimento e diferenciação dos precursores de células B.



Fonte: LeBien, 2000

O conhecimento da origem e desenvolvimento do tecido linfóide, a partir de células-troco pluripotentes, ainda é insuficiente e os estudos estão voltados na pesquisa da interatividade de um microambiente propício com uma célula progenitora comum que gera as diversas linhagens linfóides B, T e NK (POMBO-DE-OLIVEIRA, 1998). Acredita-se que o gene *Ikarus* seja responsável pela existência do tecido linfóide e sua integridade estrutural é necessária não só pela sua origem como pela manutenção deste. A expressão do *Ikarus* gera sinais gênicos que coordenam a dinâmica das células indiferenciadas a gerarem células linfóides. A

ausência deste sinal, numa forma de sinalização negativa, induz a maturação das células indiferenciadas para as outras linhagens hematopoéticas (GEORGOPOULOS, 1994).

Antes que atinjam a maturidade terminal, as células progenitoras linfóides de linhagem B, os linfócitos B e formas intermediárias sofrem uma série de alterações estruturais e funcionais até que adquirirem completa maturidade. Isto envolve desde suas características intrínsecas próprias até sua interatividade com o microambiente dos órgãos nos quais estão presentes (LEDOUARIN et al, 1984).

O rearranjo do gene de imunoglobulina constitui o marco inicial numa série de pontos de checagem que caracterizam a progressão do desenvolvimento e maturação das células linfóides B (LEBIEN et al, 2000). O estroma e suas células acessórias, através de fatores de crescimento e hormônios, controlam esta atividade. (MCGINNES et al,1991) Nele encontram-se os precursores linfóide que representam apenas um pequeno percentual de todas as células da medula óssea dos pacientes não leucêmicos, sendo mais proeminente em crianças e medulas regenerativas (GREAVES et al,1983) representando cerca de 8 a 11% dos elementos nucleados hematopoéticos deste órgão (CLARK et al, 1986).

A expressão de proteínas, marcadores imunológicos, sobre a membrana das células e no interior do citoplasma ou do núcleo, muda no decorrer da maturação desde as formas progenitoras mais imaturas até os linfócitos mais maduros. Neste processo há perdas e ganhos de novos marcadores (MCGINNES et al, 1991). O estudo dos rearranjos gênicos das cadeias de imunoglobulinas e a expressão de marcadores imunológicos das células são de uso prático na identificação de diferentes estágios maturativos das células linfóides (UCKUN et al, 1988).

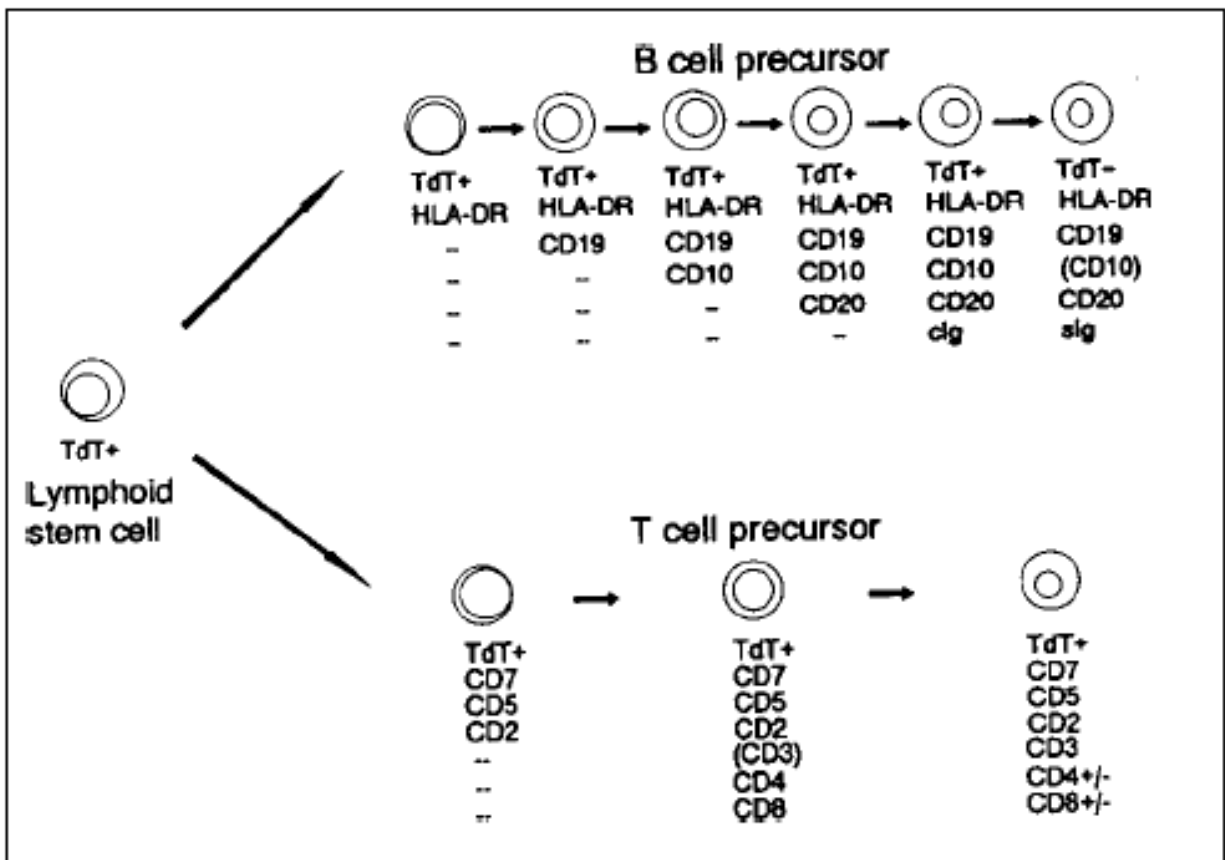
2.2 Fenótipo das células linfóides de linhagem B

Células progenitoras e precursoras expressam em sua membrana, citoplasma e núcleo um conjunto de marcadores (Figura 3) que possibilitam a

identificação não só da linhagem celular como do seu estágio maturativo (HENRIQUE, 1999).

A análise imunofenotípica e o estudo da expressão dos genes responsáveis pela codificação das imunoglobulinas nas células linfóides de linhagem B indicam seu estágio maturativo e seu estado funcional. Linfócitos B originam-se de precursores linfóides da medula óssea com expressão de deoxi-nucleotidil-terminal transferase (TdT) com perda posterior desta e após maturação adquirem imunoglobulinas da classe M (IgM) inicialmente intra-citoplasmática na sua forma monomérica (UCKUN et al, 1997). A TdT é uma DNA polimerase responsável pelo rearranjo gênico de regiões de nucleotídeos codificantes dos receptores de antígenos presente em células linfóides B e T (BACAL, 2003).

Figura 3: Características imunológicas da diferenciação linfóide humana.



Fonte: Escalon, 1999

Os dois marcadores mais característicos que identificam células linfóides de linhagem B são o CD19 e o CD22 (CAMPANA et al, 1988). O CD19 é um co-receptor presente nas células de linhagem B que está envolvido provavelmente na regulação da ativação dos canais de cálcio (BENE et al, 1995). O CD19, também designado de B4 (Coulter) e Leu12 (BD), está associado com células dendríticas foliculares em centros germinativos do tecido linfóide e, segundo Bacal, em 2003, ele é o primeiro identificador de linhagem a se expressar na membrana das células linfóides B estando presente em mais de 95% delas (BACAL, 2003). Atualmente se sabe que o CD22 nos progenitores linfóides B, precede a expressão de CD19 e CD10 (VIDRIALES, 2002). CD22 é uma molécula de adesão que está presente em aproximadamente todas as células linfóides de linhagem B mas, em membrana, encontra-se restrita às que expressam imunoglobulinas (PEZZUTTO et al, 1987). Também chamado de B3, MoAbs HD39, SHCL-1 e T015, está presente em 80% das células linfóides precursoras de linhagem B com expressão de TdT (BACAL, 2003). O CD19 é apontado como o melhor marcador para todo o espectro de maturação das células B, estando presente desde as formas precursoras mais imaturas até as mais maduras em sua diferenciação terminal como células produtoras e secretoras de imunoglobulinas (LOKEN et al, 1987).

O CD10, também conhecidos por J5 e CALLA (antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda), está ausente em precursores granulocíticos, eritróides e em linfócitos B e T maduros normais (BACAL, 2003). É um marcador que se expressa em precursores linfóides B, entretanto não é exclusivo desta linhagem, estando presente também em polimorfonucleados, precursores linfóides de linhagem T e até nas células do estroma medular. É uma endopeptidase neutra e sua maior aplicação prática é no diagnóstico das leucemias linfoblásticas agudas de linhagem B e em doenças linfoproliferativas crônicas de origem centro folicular (BENE et al, 1995). Em 1987, LOKEN et al, não encontraram evidências da expressão de CD10 anteceder ou não o CD19, entretanto, dez anos depois, em 1997, Ukun et al afirmou que CD10 antecede CD19.

O HLA-DR do complexo maior de histocompatibilidade está expresso em todas as células linfóides de linhagem B que apresentam dupla positividade para os marcadores CD10 e CD19 sendo sua expressão inversamente proporcional à intensidade de CD10 (LOKEN et al, 1987). O amadurecimento delas resulta no

aumento da expressão de HLA-DR e na perda progressiva da intensidade de expressão de CD10 (CAMPANA et al, 1985). O HLA-DR está expresso nos estágios mais precoces do desenvolvimento da célula hematolinfóide e através da ontogênese até o estágio de células plasmáticas onde é perdido (BACAL, 2003).

O CD20 está expresso tardiamente na membrana das células precursoras linfóides de linhagem B (LOKEN et al, 1987) e a imunoglobulina da classe M de membrana (mIgM) de membrana surge aparentemente na mesma ocasião, podendo haver co-expressão de IgD de membrana que está expresso em apenas um pequeno percentual de células (CAMPANA et al, 1985). Assim as células B maduras adquirem a expressão de CD20 e IgM de membrana e perdem CD10 (MCGINNIS et al, 1991) e TdT (CAMPANA et al, 1985).

As células linfóides positivas para TdT são compostas por um grupo heterogêneo quanto a expressão de outros marcadores. A maioria destas células apresentam dupla expressão de CD19 e TdT entretanto algumas são CD19 negativas mas com baixa expressão de CD10 (DWORZAK, 1988). Mais de 80% das células linfóides com positividade para TdT na medula óssea expressam IgM citoplasmática.(CAMPANA et al, 1985). O CD34 é um marcador de células progenitoras hematopoéticas e está presente nos precursores linfóides B (MCGINNIS et al, 1991) e tem sido utilizado como diferenciador entre neoplasias maduras e imaturas, (BASSO, 2001) podendo também ser encontrados no sangue periférico em número bastante reduzido mas quantificável pela técnicas de citometria de fluxo (MENÉNDEZ, 2001). O CD 34, também conhecido por My10, BI-3C5, HPCA-2(BD) e QBEnd10 (Immunotec), está expresso em 1 a 2% de todas as células da medula óssea normal, presentes nas CFU-C, BFU-C, CFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM, BFU-MK e CFU-MK. Também está expresso em todas as células da medula óssea que são positivas para TdT (BACAL, 2003).

Os conhecimentos dos mecanismos de controles da maturação B vem de estudos em murinos (RYAN et al, 1986), culturas de células de fígado fetal e amostras de medula óssea fetal após emprego de técnicas de imortalização usando Epstein-Barr vírus e estudos em amostras de pacientes com leucemia linfóide aguda. A diferenciação terminal em células plasmáticas secretoras de imunoglobulinas ocorre com perda da expressão da maioria dos antígenos das

células B e ganho da expressão do marcador PCA-1. Quando linfócitos B maduros são ativados, uma série de antígenos é expressa, incluindo o CD23 (MCGINNIS et al, 1991). Linfócitos maduros expressam antígenos classe II do complexo maior de histocompatibilidade como o HLA-DR, HLA-DP e o HLA-DQ. Os estágios mais maduros das células B são identificados pela expressão de CD20, CD21, CD22, IgM e IgD de membrana. HLA-DQ e HLA-DP se expressam principalmente em células com menor expressão de CD10 sendo negativos na sub-população com mais alta intensidade para CD10 (LOKEN et al, 1987).

Medulas ósseas normais de adultos e crianças com doenças malignas não-hematológicas, leucemias linfoblásticas agudas em remissão continuada e citopenias imunes foram estudadas por citometria de fluxo com imunofluorescência de duas cores para caracterização de células linfóides medulares positivas para o antígeno CD10 (CALLA-positivas). Uma proporção maior de células CALLA-positivas foi encontrada em medulas pediátricas ($33,7\% \pm 6,3\%$) quando comparados com medulas de adultos ($4,5\% \pm 1,6\%$). Duas sub-populações de células de morfologia linfóide CALLA-positivas foram encontradas em ambas medulas, de adultos e crianças. Uma pequena compreendendo 12,3% do total de células CALLA-positivas com alta intensidade de expressão de CD10 e o restante com baixa intensidade de expressão deste antígeno. Diferentes níveis de maturação ocorrem entre as células CALLA-positivas linfóides da medula óssea. (RYAN et al,1986) Mudanças importantes na linfopoese B no homem ocorre precocemente e mais conhecimentos são necessários para se construir uma provável seqüência de diferenciação das células antes mesmo da aquisição de CD10 (ROSSI et al. ,2003).

2.3 Leucemia linfoblástica aguda

Leucemias agudas são doenças biologicamente diversas em termo de fenótipo celular e características moleculares resultando em diferentes subtipos (EMERENCIANO et al, 2004). Representam 97% de todas as leucemias da infância correspondendo de 25 a 30% dos cânceres pediátricos (ESCALON, 1999). Leucemia linfoblástica aguda é o câncer mais comum em crianças, mas, também é visto em adultos representando 20% das leucemias agudas. O pico de incidência é

em torno dos 5 anos de idade com uma queda subsequente até os 60 anos onde um segundo pico surge (O'DONNELL, 2004).

Células leucêmicas não exibem alterações morfológicas anormais na mesma dimensão que os outros tumores (BENE et al, 1995). Leucemias e linfomas humanos têm sido reconhecidos há muito como doenças heterogêneas pelas suas aparências morfológicas, apresentações clínicas e respostas à quimioterapia (ANDERSON et al, 1984). A neoplasia que mais se assemelha imunofenotipicamente com células jovens de linhagem B é a LLA que surge na maior parte das vezes na medula óssea expressando tanto marcadores desta linhagem como outros de definição de nível de maturação (GREAVES et al, 1983).

Leucemias representam proliferações anormais das células hematopoéticas que estão fixas num determinado estágio de maturação. São classificadas em formas agudas e crônicas baseado em uma constelação de achados clínicos e laboratoriais. As leucemias agudas são classificadas em dois tipos: os linfoblásticos (LLA) e os não-linfoblásticos (LANL), baseados na morfologia, citoquímica e características imunofenotípicas (KHALIL et al, 2004). Cada tipo é ainda subdividido em outros subtipos do ponto de vista prognóstico e terapêutico relevantes baseados em características adicionais imunológicas, citogenéticas e moleculares (BENE et al, 1995).

Nos processos neoplásicos malignos há uma desorganização relativa dos componentes da medula óssea modificando a relação e interatividade entre as células hematopoéticas, vasos e o estroma medular conduzindo a um novo comportamento biológico (ANJOS, 2000).

O diagnóstico definitivo de leucemia ou outra neoplasia hematológica pode ser feito apenas pela observação do desvio da distribuição de maturidade de uma população de células (BENE et al, 1995). Há aproximadamente três décadas, o grupo FAB reconheceu a presença do aumento de precursores hematopoéticos nas leucemias agudas.

Em 1976, este grupo publicou uma nova classificação que revolucionou a citologia hematológica e que tem sido um guia indiscutível para os hematologistas desde então (FRANCÉS et al, 2003). A diferença dos linfoblastos de acordo com o

tamanho, relação núcleo-citoplasmática, irregularidade e tamanho do núcleo, presença ou não de nucléolos, grau de basofilia e vacuolização do citoplasma, tem permitido a classificação das leucemias linfóide em três subgrupos: L1, L2 e L3 (FRANCÉS et al, 2003). A presença de LLA-L3 é freqüentemente associada com translocações relacionadas a linfomas tipo não-Burkitt e, a presença de t(8;14) pode indicar que, em alguns casos, doença linfoproliferativa clinicamente não aparente, como um linfoma folicular de baixo grau, transformou para uma forma mais agressiva e, assim apresenta-se como uma leucemia de novo (VELANGI et al, 1988).

O estudo morfológico tem sido invariavelmente unido ao citoquímico, e no contexto do estudo das LLA, a reação de peroxidase é de grande interesse, já que é sua negatividade (até 3% de expressão) o que se considera o primeiro passo na diferenciação com as leucemias mielóides agudas. A reação de PAS é geralmente positiva nas L1 e L2 e constantemente negativa nas L3. Os linfoblastos podem reagir com as esterase inespecíficas dando um ponteadado multifocal que pode ser inibido de forma variável com o fluoreto de sódio (FRANCÉS et al, 2003; REILLY et al, 1996).

Em 1986, o grupo cooperativo MIC elabora uma nova classificação em que pela primeira vez juntou conhecimentos imunológicos, citogenéticos e morfológicos. É uma classificação aberta ao surgimento de novas entidades e transtornos citogenéticos e, desde então se aplica no diagnóstico rotineiro das leucemias linfóides agudas, já que muito dos critérios considerados tem caráter prognóstico (VAN EYS et al, 1986). Em 1995, o grupo europeu EGIL estabelece em sua publicação as diretrizes para uma classificação das leucemias agudas com base na expressão de marcadores (BENE et al, 1995). Assim as leucemias linfóides ficaram divididas em dois grandes grupos, B e T, que por sua vez se dividem em outros subgrupos de acordo com o seu grau de maturação imunológica (FRANCÉS et al, 2003).

O estudo imunofenotípico nas leucemias linfoblásticas agudas são de grande utilidade, não só porque contribuem para determinação da origem das células neoplásicas, mas também porque permite definir grupos de risco. (VIDRIALES et al, 1988; BOROWITZ et al, 1997; KALEEM et al, 2003). Esta ferramenta é de utilidade na prática clínica para caracterização das células

leucêmicas, acompanhamento dos pacientes e detecção de doença residual mínima. (MORILLA, 1999). O estudo completo da doença em todos aspectos tem permitido o uso de protocolos mais efetivos obtendo-se assim um índice de cura de mais de 80% da doença (PUI et al, 2004).

A imunofenotipagem moderna das doenças hematológicas pela citometria de fluxo é realizada por uma vasta quantidade de anticorpos monoclonais conjugados a diversos fluorocromos e por técnicas para permeabilização de membrana. A determinação simultânea de marcadores de superfície e intra-celulares no diagnóstico reduz o número de células requerido, ajuda a identificação da célula maligna e determina o grau de heterogeneidade da população de células malignas. (CAMPANA et al, 2000).

Leucemias linfoblásticas agudas são amplamente classificadas em de linhagem T e B. Leucemia de linhagem B é definida pela expressão de no mínimo dois dos seguintes três marcadores: CD19, CD79a e o CD22. O CD79a é uma macromolécula que faz parte do complexo multimérico do receptor de antígeno da célula B dando sustentação à molécula de imunoglobulina (FRATER et al, 2003; BACAL, 2003). Nas células de linhagem B, independente do nível de maturação, está expresso no citoplasma, enquanto que, o CD22 é expresso cedo no citoplasma e mais tarde na membrana.

Quanto a análise fenotípica as leucemias linfoblásticas agudas de origem B se classificam em função do estágio maturativo das células proliferantes. Quatro categorias de leucemias linfoblásticas agudas de linhagem B, designadas de B-I até B-IV foram estabelecidas de acordo com o grau de diferenciação dos blastos. É considerado que a forma mais madura de LLA de linhagem B (B-IV) pode ser definida ou pela expressão de imunoglobulina de superfície da classe M (SmIg) ou expressão citoplasmática de uma das cadeias leves de imunoglobulinas. A maioria das leucemias linfoblásticas agudas de linhagem B é deoxi-nucleotidil terminal transferase positiva. A expressão de TdT é importante para distinguir de neoplasias linfóides maduras, contudo não contribui para propósito de classificação. LLA de linhagem T é definida pela expressão de CD3 de membrana ou citoplasmática (VELANGI et al, 1988; RILEY et al, 2002).

O antígeno associado a células progenitoras, CD34, está presente em algumas leucemias linfoblásticas, mas não em linfócitos B periféricos. (LOKEN et al, 1987) Noventa e cinco por cento das leucemias linfóides não-T expressam CD19, bem como 80% destas expressam CD10 (HOKLAND et al, 1985) e pode estar presente em 33% dos linfomas (ANDERSON et al, 1984). A maior parte das leucemias linfóides agudas com prognóstico favorável em adultos e crianças expressam CD10 associados à expressão de TdT e HLA-DR (GREAVES et al, 1983).

Raras sub-populações de células linfóides normais de linhagem B da medula óssea podem ser identificadas pela imunofenotipagem em meio a blastos nas leucemias linfoblásticas agudas (HURWITZ et al, 1992). Cuidados devem ser tomados na investigação de recaídas desta doença, porque estas células imaturas normais parecem com blastos leucêmicos (CALDWELL et al, 1991). A definição operacional de recaída dos protocolos clínicos e de pesquisa baseia-se nos critérios morfológicos de mais de 5% de blastos presentes no aspirado de medula óssea (WELLS et al, 1998).

De paciente para paciente com leucemia linfoblástica aguda comum, as células expressam marcadores CD34, CD45, CD10 e cadeias leves de maneira coordenada e similar às células da medula óssea normal, mas, demonstram diferenças na expressão de TdT e CD20 (RYAN et al, 1987).

As células blásticas da leucemia aguda podem expressar marcadores de mais de uma linhagem definindo esta como leucemia de linhagem ambígua, também chamada de bifenotípica quando uma única população de blastos expressam marcadores de duas ou mais linhagens e bilínea quando existem duas ou mais populações de blastos com perfil imunofenotípico distintos (JAFFE et al, 2001). Estas leucemias tem prognóstico mais reservado e devem ter protocolos de tratamento distintos (KILLICK et al, 1999).

2.4 Hematogônia

Hematogônia foi o termo aplicado por Nordenson's e de acordo com Maximow são as células misteriosas da medula óssea. As hematogônias são células indiferenciadas primordiais também chamadas de hemocitoblastos (VOGEL et al, 1937) correspondem aos precursores linfóides de linhagem B naquele sítio. (DAVIS et al, 1993). Estas células são menores que os linfócitos e tem um núcleo denso composto de densa massa de cromatina com pequena faixa citoplasmática distinta na qual nem mitocôndrias, grânulos ou vacúolos são encontrados (VOGEL et al, 1937). A cromatina pode ser uma característica de distinção das hematogônias (RIMSZA et al, 1998). Elas são encontradas regularmente em medulas ósseas de pacientes com leucemia linfoblástica aguda após terapia daí chamadas de células linfóides pós-terapêutica (STEKHOVEN et al, 1986). Estão presentes nestes pacientes em remissão completa contínua após término da terapia e mais em pacientes na idade pré-escolar do que na idade escolar (FUKUSHIMA et al, 1998). As hematogônias também podem ser encontradas em sangue periférico até do adulto, entretando, em número bastante reduzido (KROFT et al, 2004).

Inicialmente, a maioria dos conhecimentos sobre o fenótipo dos precursores linfóides se baseia nos estudos realizados sobre as células tumorais das leucemias linfoblásticas. Graças aos avanços tecnológicos produzidos nos últimos anos, os estudos imunofenotípicos sobre precursores linfóides tem sido centrados na medula óssea normal, sendo possível analisar um elevado número de células muito pouco representadas na medula óssea. (VIDRIALES et al, 1988). Raramente são encontradas no sangue periférico em número minúsculo principalmente em neonatos e sangue do cordão (MCKENNA et al, 2001).

Atualmente se sabe que a seqüência de maturação dos linfócitos B na medula óssea normal difere ligeiramente do modelo clássico já que a expressão de CD22 nos progenitores linfóides precede a expressão de CD19 e CD10. As células precursoras B, que já expressam CD19 na medula óssea normal, podem diferenciar-se claramente em três estágios maturativos maiores cujas proporções e números absolutos variam com a idade. A população de CD19+ mais imatura (CD34+, TdT+, CD10+ e intenso, CD22+ de baixa intensidade, fraca expressão de CD45, CD38⁺ e intenso e CD20 negativo) representam 0,7 e 0,15% das células nucleadas da

medula óssea normal de crianças e adultos respectivamente. A população CD19 intermediária (CD34-, TdT-, CD10+, CD22+ de baixa intensidade, CD45+, CD38+ intenso e CD20 negativo) representam 6,5 e 0,8% das células de crianças e adultos respectivamente. A população CD19+ mais madura (CD34-, TdT-, CD10-, CD38+ fraco, CD22, CD20 e CD45 positivos intensamente) representam 2,5 das células de crianças e adultos igualmente. Portanto a medula óssea de criança é muito rica em células B imaturas ao passo que, em adultos, predominam as células B maduras (VIDRIALES et al, 1988).

O conhecimento da maturação linfóide e das sub-populações linfocitárias, normalmente presentes na medula óssea de indivíduos saudáveis, permite a identificação inequívoca de células com padrões fenotípicos que não se enquadram com a normalidade, o que corresponderiam a células blásticas (VIDRIALES et al, 1988). Não há diferenças significativas, na expressão de qualquer marcador, relacionadas com a idade, seja em hematogônias na medula óssea normal ou leucemias linfóides (REGO et al, 2001).

Hematogônias podem causar problemas no diagnóstico por causa da similaridade morfológica e imunofenotípica com os linfoblastos neoplásicos. Podem ser proeminentes em fases regenerativas seguindo ao tratamento quimioterápico, transplante de medula óssea, citopenias congênitas e auto-imunes, neoplasias e na síndrome de deficiências imunológica adquirida. Em algumas circunstâncias constituem de 5% a mais de 50% das células da medula óssea podendo flutuar com o estado da doença, em algumas situações clínicas ou mesmo elevações persistentes podem ser observadas. Observou-se persistentes elevações de precursores B na medula óssea por 2 anos seguindo o final da quimioterapia para LLA, e encontro-se elevações por mais de um ano após transplante de medula óssea (MCKENNA et al, 2001).

Após o término do tratamento anti leucêmico, o número de células pré-B de todos os pacientes eleva-se (PAOLUCCI et al, 1979). Um aumento das células linfóides acima de 40% em crianças na qual a quimioterapia foi interrompida não indica uma recaída da doença, mas pode ser uma manifestação de uma recuperação imunológica, e o aumento dos títulos de anticorpos pode refletir um

rebote imunológico a um antígeno já presente anteriormente no organismo e não necessariamente um processo infeccioso ativo (BORELLA et al, 1972).

2.5 Diferenças imunofenotípicas entre blastos leucêmicos e hematogônias.

A distinção entre linfoproliferações benignas normais, com elevação da quantidade de hematogônias na medula óssea, e leucemia linfoblástica aguda é fundamental para a correta conduta do paciente quanto ao tratamento. Hematogônias são constituídas por uma população heterogênea de diferentes níveis de maturação enquanto que na leucemia linfoblástica há um acúmulo em um único estágio maturativo. Hematogônias são constituídas predominantemente por uma população com positividade para CD10 e CD19 com IgM citoplasmática, seguido de outra com a mesma dupla positividade, entretanto, com expressão de IgM de membrana, e por fim uma população menor com expressão de CD34 e TdT (RIMSZA et al, 2000).

A população mais imatura das hematogônias apresenta alta intensidade de CD10, fraca expressão de CD22, baixa intensidade de fluorescência de CD45, positividade para CD34 e TdT e negatividade para CD20. A população com maturação intermediária apresenta moderada intensidade de CD10, fraca expressão de CD22, moderada intensidade de fluorescência de CD45, negatividade para CD34 e TdT e baixa expressão de CD20. A População mais madura apresenta baixa intensidade de CD10, positividade para CD22, alta intensidade de fluorescência para CD45, negatividade para CD34 e TdT e positividade para CD20 (VIDRIALES, 2002).

2.6 Doença Residual Mínima

Doença residual mínima (DRM) é definida pela presença de células neoplásicas na medula óssea ou em outros tecidos após induzida a remissão pelo tratamento quimioterápico não detectadas pelos critérios de análise citológica (FARAHAT *et al.*, 1995; CAMPANA; BEHM, 2000).

Após tratamento quimioterápico, a recaída da doença é uma realidade presente em aproximadamente 20% destes pacientes portadores de leucemia

linfoblástica aguda (COUNSTAN-SMITH *et al.*, 2000). A presença de precursores linfóides na medula pelas técnicas citológicas de contagem de blastos na medula, não detecta doença quando células doentes estão presentes em menos de 5% (FARAHAT *et al.*, 1995; RIMSZA *et al.*, 1998).

A detecção de doença residual mínima nas leucemias linfoblásticas de linhagem B requer conhecimento do perfil imunofenotípico dos blastos leucêmicos e dos precursores hematopoéticos normais que estão presentes na medula em pequeno número, (FARAHAT *et al.*, 1995) entretanto é possível a diferenciação dos dois tipos celulares pela presença de antígenos anormais nas células neoplásicas referidos como antígenos aberrantes pertencente a linhagens outras que não a linfóide-B (FARAHAT *et al.*, 1995; DWORZAK *et al.*, 2002; RILEY *et al.*, 2002).

A citometria de fluxo, no estudo de doença residual, é de execução simples rápida e sensível, identificando uma única célula doente entre 10.000 outras normais (COUNSTAN-SMITH *et al.*, 2000; DWORZAK *et al.*, 2002; RILEY *et al.*, 2002).

2.7 Citometria de fluxo

Um citômetro de fluxo (Figura 4) é um sistema constituído por cinco elementos: fontes de radiação por uma lâmpada de mercúrio ou laser, uma câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos para seleção de intervalos de comprimentos de ondas específicos a partir de uma gama espectral mais vasta, fotodiodos ou fotomultiplicadores para detecção sensível e processamento dos sinais com interesse e uma unidade computadorizada que processa os dados (SILVA *et al.*, 2004).

A suspensão celular é injetada e atravessa a câmara onde se dá a passagem célula a célula através do feixe de radiação, perpendicular ao fluxo. A passagem individual das células é obtida através da focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra, sendo esta injetada no seio de uma solução salina que também atravessa a câmara. (Figura 5) A diferença de velocidades entre os dois fluidos faz com que o fluxo se processe em regime laminar. A velocidade de escoamento da

solução isotônica é superior à da amostra, e ajustável, o que permite reduzir e controlar a espessura da solução da amostra de forma a que possa passar uma célula de cada vez. Desta forma, podem detectar-se até 10.000 células ou eventos por segundo (SILVA et al, 2004).

O feixe de radiação de excitação ao interceptar a partícula (célula) na câmara, sofre dispersão quer na direção frontal (forward scattering), quer lateral (side scattering). A radiação frontal dispersa é detectada diretamente por fotodiodos, e a desviada em 90° por lentes, espelhos dicróicos e filtros ópticos, e focada em fotomultiplicadores. A combinação destes tipos de radiação dispersa revela informações importantes tais como a dimensão celular, a granulosidade e complexidade, correlacionado com morfologia. Os citômetros atuais mais sofisticados podem possuir até 16 detectores simultaneamente entre radiações dispersas e fluorescentes, o que permitir analisar múltiplas possibilidades de características celulares e/ou componentes celulares de um elevado número de células de forma individual (Rieseberg et al., 2001; SILVA et al, 2004).

Citometria de fluxo é uma ferramenta poderosa para análise detalhada de populações complexas em um curto período de tempo. Citometria de fluxo afere as propriedades ópticas e de fluorescência de uma única célula ou muitas outras partículas, incluindo, núcleo, microorganismos, preparados de cromossomos e partículas de látex. Ela mede múltiplas características individuais das partículas que fluem através de uma agulha. A dispersão de luz em diferentes ângulos pode distinguir diferenças de tamanho e complexidade interna, enquanto que luz emitida de anticorpos marcados com fluorescência pode identificar uma vasta quantidade de antígenos de membrana e citoplasmáticos (BROWN et al, 2000).

Dentro do citômetro, células em suspensão são dirigidas sob um fluxo laminar de líquido isotônico permitindo as células passarem individualmente em um dado ponto. Neste o laser incide sobre a célula coberta por monoclonais fluorescentes sendo transmitida a luminosidade a uma série de filtros e espelhos dicróicos que isolam determinado comprimento de onda. Os sinais luminosos são detectados por tubos fotomultiplicadores e digitalizados posteriormente para um computador (BROWN et al, 2000).

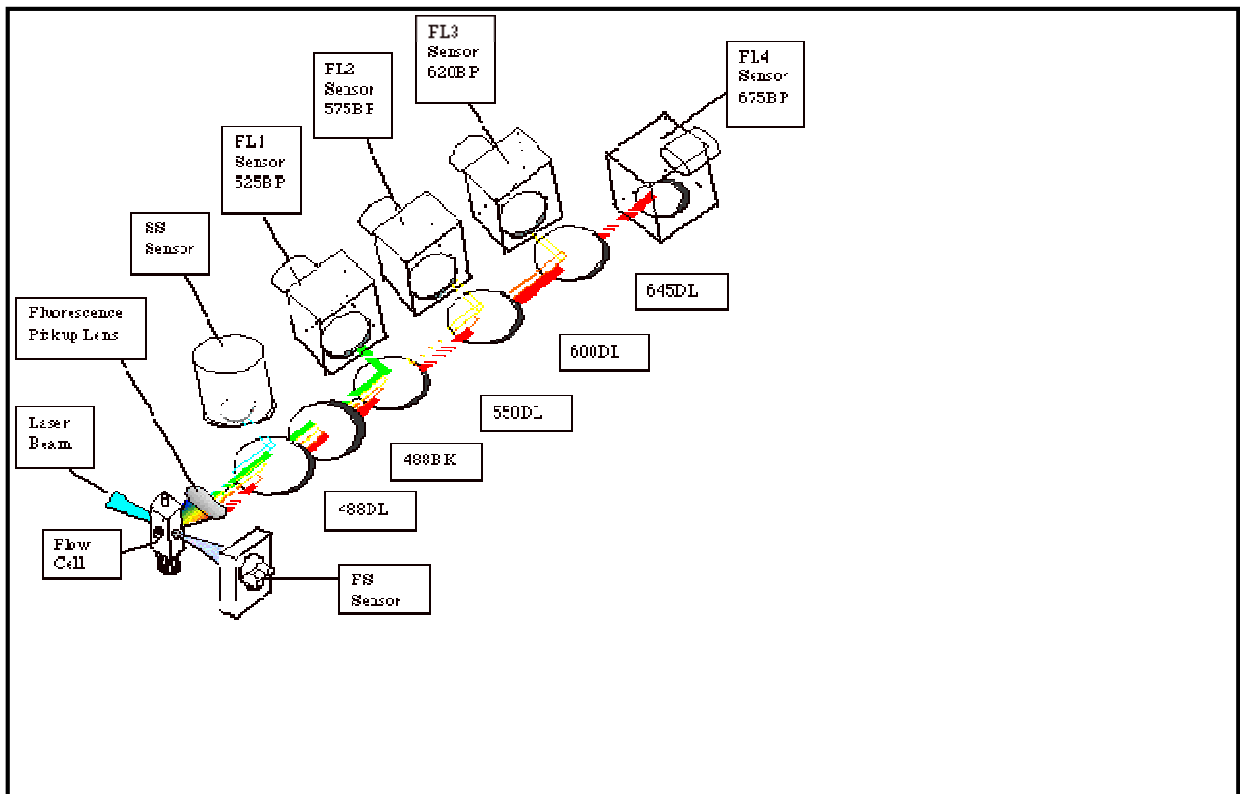
Anticorpos conjugados a estruturas fluorescentes (fluorocromos) podem ligar-se a proteínas específicas sobre as membranas ou dentro das células. Quando células marcadas passam através de um feixe de luz polarizada, as moléculas fluorescentes são excitadas para um estado de energia maior e emitem luz em diferentes comprimentos de onda permitindo análise de múltiplas propriedades da célula (BROWN et al, 2000).

Muitas proteínas de superfície e glicoproteínas sobre eritrócitos, leucócitos e plaquetas tem sido estudadas detalhadamente. A disponibilidade de monoclonais dirigidos contra estas proteínas permite a análise destes elementos celulares por citometria de fluxo (BROWN et al, 2000).

A distinção entre precursores linfóides B normais e leucêmicos é essencial para o diagnóstico e tratamento da leucemia linfoblástica aguda (REGO et al, 2001; ORFAO et al, 1999; BOROWITZ et al, 1997) bem como para o acompanhamento do tratamento quimioterápico desta neoplasia (VECCHIO et al, 2004). O uso da citometria de fluxo em laboratórios de aplicação clínica cresceu substancialmente na década de 90. Isto é atribuído em parte ao desenvolvimento de instrumentos menores, práticos e mais baratos (BROWN et al, 2000). O desenvolvimento subsequente da citometria de fluxo forneceu aos pesquisadores uma ferramenta poderosa que rapidamente levou a avanços no conhecimento da biologia das leucemias agudas. O citômetro de fluxo é uma ferramenta ideal para utilizar anticorpos monoclonais ao estudo de doenças humanas (BENE et al, 1995).

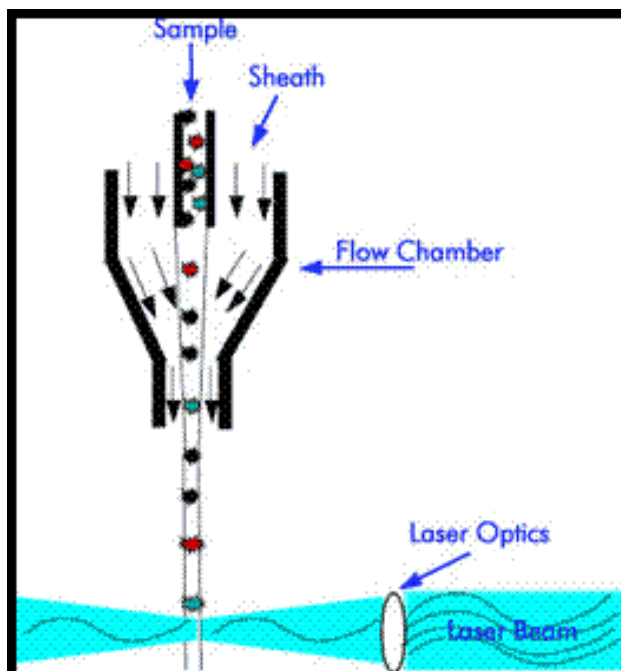
Os citômetros de fluxo tornaram-se disponíveis comercialmente no final da década de 70. Com o avanço tecnológico e surgimento de novos fluorocromos na década seguinte, novas aplicações surgiram de utilidade na área diagnóstica (BACAL, 2003) ..

Figura 4 - Desenho representativo dos elementos que compõem o citômetro de fluxo.



Fonte: Disponível em http://biology.berkeley.edu/crl/flow_cytometry_basic.html

Figura 5 - Desenho representativo do funcionamento interno do sistema de fluxo para leitura individual das células.



Fonte: Disponível em http://biology.berkeley.edu/crl/flow_cytometry_basic.html

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo: Prospectivo transversal

3.2 População

Foram analisadas amostras de medulas ósseas de pacientes pediátricos com idade inferior a 18 anos. Estes pacientes se distribuíram em dois grupos: um constituído de medulas de pacientes não neoplásicos que realizaram mielogramas na investigação diagnóstica de sua doença para estudo das células precursoras B de natureza benigna, e que, tiveram estas células identificadas pela microscopia óptica tendo sido descartada a possibilidade de leucemia; e um segundo grupo de pacientes que teve o diagnóstico firmado de leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B. Para o segundo grupo, foram excluídos todos os pacientes com este diagnóstico que pertenciam ao grupo de recaída ou como segunda neoplasia.

3.3 Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Centro de Referência em Diagnóstico do Câncer da Criança e do Adolescente Dr. Murilo Martins do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS) pertencente à rede de saúde pública do Estado do Ceará. O referido centro é responsável pelo diagnóstico laboratorial do câncer infantil e está estruturado para o estudo citológico, imunológico, citogenético, anátomo-patológico e molecular das doenças neoplásicas. O HIAS é atualmente o hospital que atende o maior número de novos casos por ano de câncer infantil no Brasil.

3.4 Período do estudo

A coleta de material foi realizada durante todo o ano de 2004 tendo sido iniciado em janeiro e estendeu-se até dezembro do referido ano.

3.5 Aspectos éticos

O estudo foi iniciado após apreciação e aprovação por escrito do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – U.F.C. bem como do Hospital Infantil Albert Sabin e após consentimento livre e esclarecido dos responsáveis pelo menor.

3.6 Coleta de material, acondicionamento e transporte.

A coleta de medula óssea foi realizada na crista ilíaca ou esterno dos pacientes, sendo acondicionada em tubos Vacutainer[®] contendo E.D.T.A., após realizada a confecção de 10 extensões medulares em lâminas 26 x 76mm. O material foi identificado acompanhado de ficha catalográfica contendo nome do paciente, idade, dados clínicos, data e hora da coleta, sendo enviadas ao laboratório em temperatura ambiente para imediato processamento.

3.7 Estudo citológico.

As extensões de medula foram coradas com o azul de metileno, segundo Leishman (Wong et al, 1994) para a análise citológica por dois citopatologistas. As medulas ósseas dos pacientes não neoplásicos do grupo controle não foram submetidas ao estudo citoquímico, exceto pela coloração de Perls (azul da Prússia) para detecção de ferro medular, quando por solicitação médica na investigação de anemias carenciais. Foi realizada uma contagem global de 500 elementos nucleados da medula óssea. Adotou-se o critério de 30% de blastos sobre o total dos elementos nucleados da medula para o diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (JAFFE et al, 2001).

As medulas ósseas dos pacientes portadores de leucemia linfoblástica aguda foram submetidas ao estudo citoquímico complementar para melhor caracterização inicial da doença. As reações citoquímicas empregadas foram: Ácido Periódico de Schiff (PAS); Preto de Sudan B (SBB); Peroxidase; Fosfatase Ácida; e as esterases não específicas, Butirato-esterase e Acetato-esterase. Considerou-se

positiva para a reação de PAS nas leucemias linfoblásticas agudas, a repetição de blastos com blocos grosseiros únicos ou múltiplos no interior do citoplasma. A Peroxidase e o Preto de Sudan foram considerados positivos quando reagiram em 3% ou mais dos blastos. As outras reações citoquímicas foram consideradas positivas para qualquer tipo de reação intra-citoplasmática.

3.8 Estudo imunofenotípico das leucemias linfoblásticas agudas.

As medulas ósseas dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda foram estudadas pela citometria de fluxo para confirmação da natureza linfóide da doença, determinação de sua linhagem; e definição do seu estágio maturativo. Este procedimento seguiu à rotina do próprio laboratório sendo utilizados anticorpos monoclonais dirigidos contra os seguintes marcadores: CD19, CD22, CD79a, CD10, CD45, CD34, TdT, HLA-DR, CD3, CD7, CD13, CD33 e MPO. Considerou-se positividade, a expressão de no mínimo 20% das células para cada marcador, com exceção de CD34 e CD3 que adotou-se o limite de 10%.

Definiu-se leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B, quando estas expressaram no mínimo dois marcadores específicos de linhagem B entre CD19, CD22 e CD79a de acordo com o grupo EGIL. (BENE et al,1995) Os estágios maturativos também seguiram às recomendações deste grupo. Foram excluídas do estudo as leucemias de linhagem T e as leucemias mieloblásticas agudas.

3.9 Viabilidade celular

Dispensou-se o estudo da viabilidade celular pelo iodeto de propidium ou Try-Pan_Blue por se ter trabalhado apenas com amostras frescas recém-colhidas.

3.10 Processamento

Após o recebimento e cadastro das amostras, estas foram imediatamente analisadas no contador eletrônico (Cell-Dym[®]) para determinação da leucometria, e as extensões medulares em lâminas coradas pelo Leishman para análise citológica. As medulas dos pacientes com diagnóstico de leucemia foram submetidas à rotina de coloração citoquímicas e processadas devidamente para o diagnóstico imunológico.

As medulas dos pacientes dos dois grupos foram processadas de imediato, de acordo com as recomendações do protocolo de consenso para imunofenotipagem por citometria de fluxo para neoplasias hematológicas (ROTHER, 1996) e o *General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology* (BAIN et al, 2002). Inicialmente lavado com a solução tampão isotônica de lavagem PBS-Azida-BSA (Anexo H) e, após centrifugação a 350xG por 2 minutos com descarte do sobrenadante, depois foi ajustada a concentração para 10.000 células/mm³ com a mesma solução tampão. Todas as centrifugações subsequentes obedeceram ao mesmo padrão.

Aproximadamente 1.000.000 células de cada amostra foram aliqüotadas em dois tubos FACS de poliestireno para incubação com os monoclonais. O primeiro tubo recebeu o controle isotípico para duas cores de fluorescências, Cy-Chrome[™] Pharmingen[®] e phycoerythrin Coulter[®], e o segundo tubo recebeu os anticorpos monoclonais CD19- Cy5-PE Pharmingen[®] e CD10-PE Coulter[®]. Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente e em câmara escura, o material foi tratado com solução de lise (Anexo F) para hemácias por 10 minutos, também em temperatura ambiente e protegido da luz. Após centrifugação, o material foi lavado duas vezes com a solução tampão de lavagem (Anexo G) e suspenso em paraformaldeído 1% (Anexo I) para leitura imediata. A solução de lise, o tampão fosfato e o paraformaldeído foram preparados no próprio laboratório.

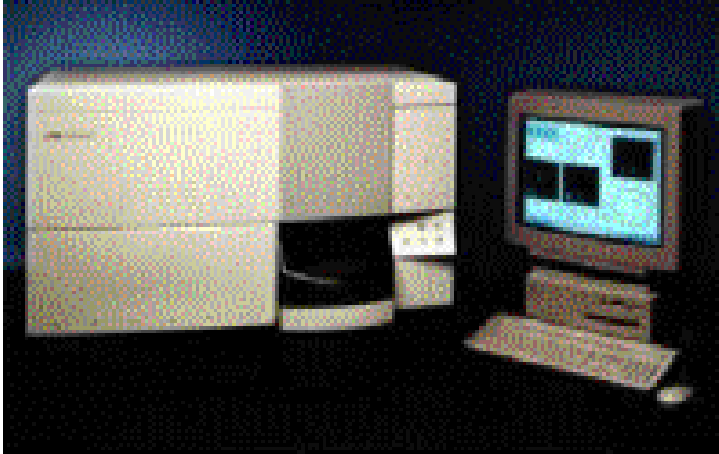
3.11 Aquisição

Entende-se por: aquisição, a passagem da suspensão celular no citômetro com seleção prévia da população de interesse ao estudo, seguida de registro das informações da leitura óptica; evento, toda partícula sólida que seja registrada ao passar pelo feixe de luz *laser*; e compensação, o ajuste dos componentes ópticos para a captação dos comprimentos de ondas emitidos pelos fluorocromos exclusivamente pelo seu detector específico.

A aquisição foi realizada com o software CellQuest da Becton-Dickinson®, após calibração e compensação do equipamento, FACSCalibur, (Figura 6) e checagem da linearidade e sensibilidade com as partículas de calibração do próprio equipamento. Como controle de qualidade, utilizou-se amostras de sangue periférico marcadas com os anticorpos monoclonais anti-CD45 marcados com os fluorocromos nas duas cores para a compensação das regiões com alta expressão deste marcador, equivalente a região de linfócitos.

Na aquisição das amostras do experimento, visou-se o registro apenas das células linfóides com expressão dupla de CD19 e CD10. Para isso definiu-se inicialmente uma região (R1) no histograma com as coordenadas FSC x SSC com o objetivo de separar as células linfóide pelas características de tamanho celular e complexidade interna destas. (Figura 7) Em seguida outra região (R2) foi definida no histograma composto pelas intensidades de fluorescências para as cores dos fluorocromos Cy5-PE e PE na área referente a dupla positividade para CD19 e CD10 respectivamente. (Figura 8) Uma terceira região (R3) foi definida para a interseção das duas primeiras regiões, contendo os eventos que satisfizessem as exigências das duas outras regiões, definidas pela equação: $R3 = R1 \cap R2$. Foram gravados 10.000 eventos em R3.

Figura 6 – Foto do citômetro de fluxo FACSCalibur da Becton Dickinson®.



Fonte: http://www.biosyst.com.ar/bd_cal.htm

Figura 7 - Histogramas representativos da região R1 definindo células de pequeno tamanho e com baixa complexidade.

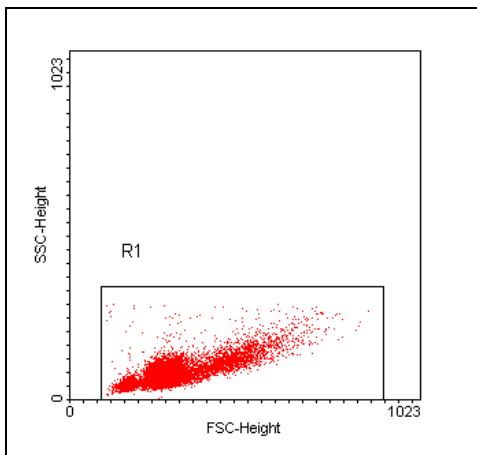
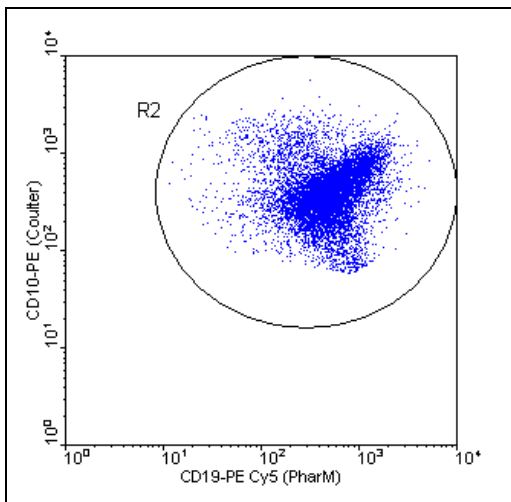


Figura 8 - Histogramas representativos da região R2 definindo células com expressão dupla de CD10 e CD19.



3.12 Análise

3.12.1 Extração dos valores de canais de fluorescência de cada evento

Todas as aquisições, do grupo controle e dos pacientes com leucemia, foram analisadas pela planilha gráfica ReadFCS em Excel[®] para extração dos valores individuais da intensidade de fluorescência de cada evento para posterior cálculo dos parâmetros de avaliação: A planilha extrai os valores dos quatro parâmetros registrados durante a aquisição, ou seja: tamanho (FSC), complexidade interna (SSC), intensidade de fluorescência no canal de detecção do comprimento de onda da cor laranja (FI-2) referente à intensidade de fluorescência de CD10 e intensidade de fluorescência no canal de detecção do comprimento de onda da cor vermelha (FI-3) referente à intensidade de fluorescência de CD19. Os valores de interesse para análise e cálculo dos parâmetros de avaliação compreendem os dois últimos, FI-2 e FI-3.

3.12.2 Elaboração dos histogramas

Utilizou-se o software WinMDI para a elaboração dos histogramas CD10 *versus* CD19 em hematogônias (Figura 9), CD10 *versus* número de eventos em hematogônias (Figura 10) e CD19 *versus* número de eventos em hematogônias, (Figura 11) CD10 *versus* CD19 em blastos (Figura 12), CD10 *versus* número de eventos em blastos (Figura 13) e CD19 *versus* número de eventos em blastos, (Figura 14).

Figura 9 - Representação em histogramas da dupla expressão de CD10 e CD19 em hematogônias.

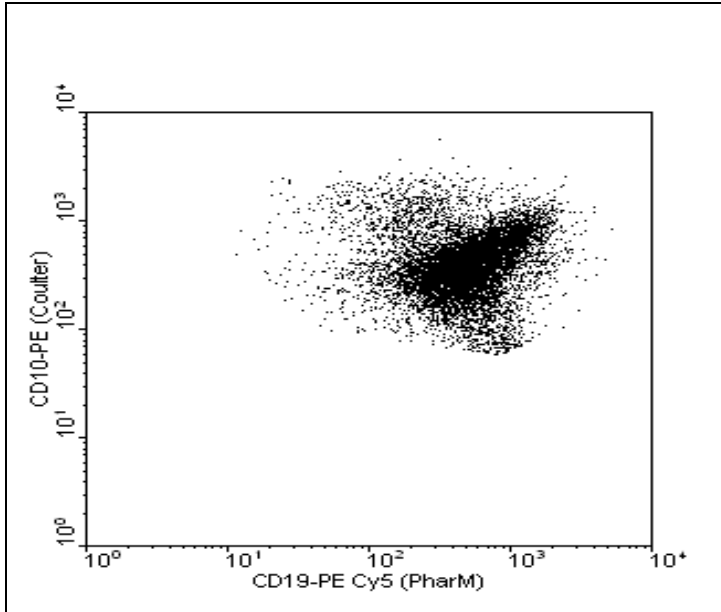


Figura 10 - Representação em histogramas da expressão de CD10 em hematogônias por número de eventos.

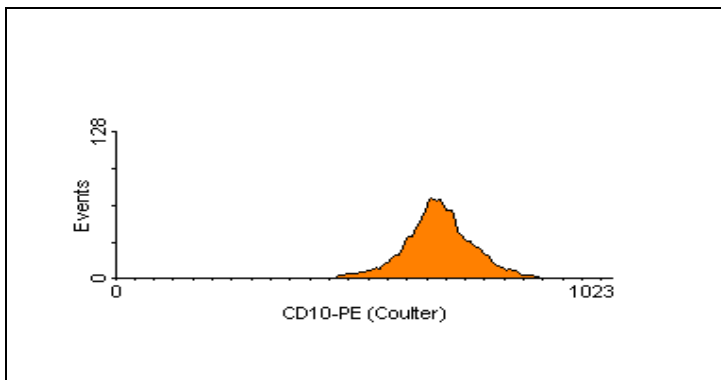


Figura 11 - Representação em histogramas da expressão de CD19 em hematogônias.

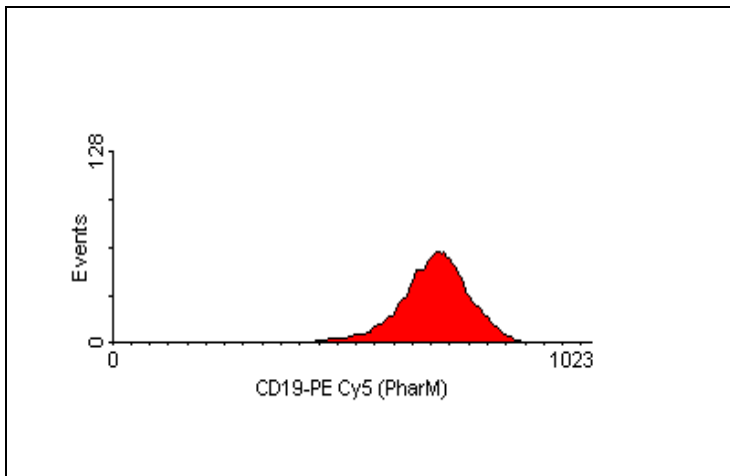


Figura 12 - Representação em histogramas da dupla expressão de CD10 e CD19 em blastos.

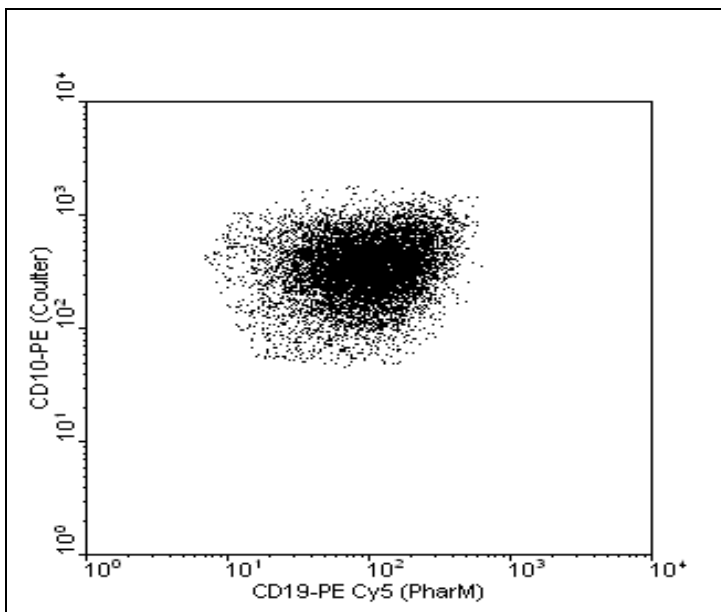


Figura 13 - Representação em histogramas da expressão de CD10 em blastos.

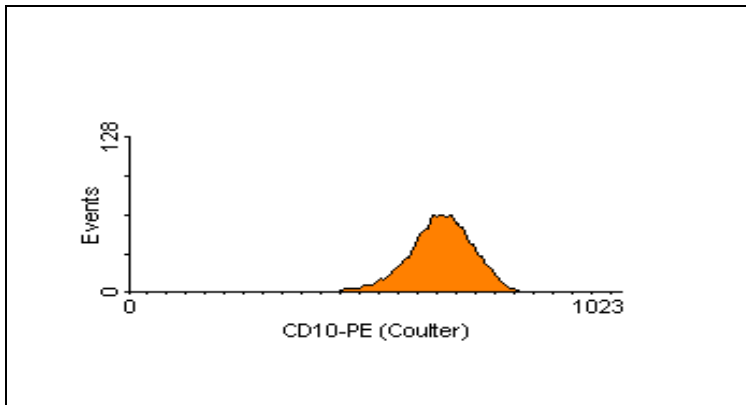
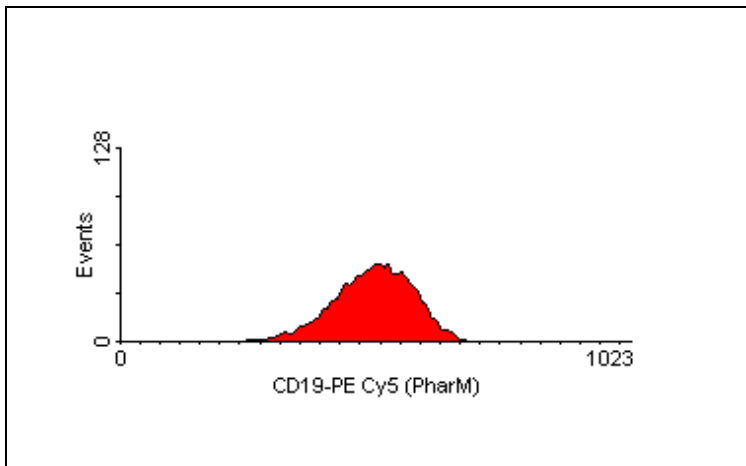


Figura 14 - Representação em histogramas da expressão de CD19 em blastos.



3.12.3 Cálculo dos parâmetros de avaliação

Utilizou-se a planilha em Excel (ReadFCS) provida de um macro de reconhecimento do documento de aquisição criado pelo sistema de citometria de fluxo contendo as suas informações. Os valores individuais da intensidade de fluorescência de cada evento num total de 10.000 eventos ao todo por amostra, para CD10 e CD19, de cada amostra para os dois grupos em estudo foram dispostos em coluna, possibilitando assim o cálculo dos seguintes parâmetros de avaliação:

- PA1: Média de intensidade de fluorescência de CD10 em hematogônias.
- PA2: Desvio-padrão de intensidade de fluorescência de CD10 em hematogônias.

- PA3: Coeficiente de variação de intensidade de fluorescência de CD10 em hematogônias.
- PA4: Coeficiente de inclinação de intensidade de fluorescência de CD10 em hematogônias.
- PA5: Coeficiente de curtose de intensidade de fluorescência de CD10 em hematogônias.
- PA6: Média de intensidade de fluorescência de CD19 em hematogônias.
- PA7: Desvio-padrão de intensidade de fluorescência de CD19 em hematogônias.
- PA8: Coeficiente de variação de intensidade de fluorescência de CD19 em hematogônias.
- PA9: Coeficiente de inclinação de intensidade de fluorescência de CD19 em hematogônias.
- PA10: Coeficiente de curtose de intensidade de fluorescência de CD19 em hematogônias.
- PA11: Média de intensidade de fluorescência de CD10 em blastos.
- PA12: Desvio-padrão de intensidade de fluorescência de CD10 em blastos.
- PA13: Coeficiente de variação de intensidade de fluorescência de CD10 em blastos.
- PA14: Coeficiente de inclinação de intensidade de fluorescência de CD10 em blastos.
- PA15: Coeficiente de curtose de intensidade de fluorescência de CD10 em blastos.
- PA16: Média de intensidade de fluorescência de CD19 em blastos.
- PA17: Desvio-padrão de intensidade de fluorescência de CD19 em blastos
- PA18: Coeficiente de variação de intensidade de fluorescência de CD19 em blastos.
- PA19: Coeficiente de inclinação de intensidade de fluorescência de CD19 em blastos.

- PA20: Coeficiente de curtose de intensidade de fluorescência de CD19 em blastos.

3.12.4 Análise estatística

Os valores obtidos dos parâmetros de avaliação foram avaliados pela análise estatística de Kolmogorov-Smirnov para determinação de uma natureza normal de distribuição destes. As médias de cada parâmetro de avaliação das amostras do grupo controle foram comparadas com as médias dos pacientes com leucemia pelo *teste-t de student*.

Os valores individuais dos parâmetros de cada amostra dos dois grupos foram comparados com a curva gerada pelos valores dos parâmetros equivalentes do grupo controle para identificação da posição destes dentro do intervalo gerado pela média \pm 2, 2,5 e 3 desvios-padrão, e determinação de uma sensibilidade e especificidade na identificação de doença pela teoria das probabilidades.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

O estudo foi realizado no Hospital Infantil Albert Sabin de Fortaleza no período de janeiro a dezembro de 2004, com a coleta de 36 amostras de medula óssea de pacientes pediátricos não neoplásicos para o grupo controle e 39 amostras de medula óssea de pacientes pediátricos portadores de leucemia linfoblástica aguda de linhagem B. O objetivo foi a comparação da expressão do marcador CD10 e do CD19 em hematogônias e blastos leucêmicos.

Durante a elaboração do trabalho foram encontradas algumas dificuldades de elaboração técnica. Das 36 amostras de sangue periférico do grupo controle, duas delas (Caso 10 e 27) apresentaram lise incompleta sendo necessária a repetição do procedimento com uso de um volume maior da solução de lise em 50%. Das amostras das medulas dos pacientes com leucemia linfoblástica, nenhum caso apresentou lise incompleta. Nenhuma amostra apresentou excesso de restos celulares para os dois grupos.

No grupo controle (Anexo A), 19 (52,7%) pacientes foram do sexo masculino e 17 (47,3%) do sexo feminino. Nos pacientes portadores de leucemia (Anexo B) 23 (58,9%) foram do sexo masculino e 16 (41,1%) do sexo feminino. A idade variou de 24 dias de vida a 15 anos com uma média de 5 anos para o grupo controle e, de 4 meses a 14 anos com uma média de 6,6 anos para os pacientes com leucemia linfoblástica aguda.

Na análise citológica do grupo controle, todas medulas (100%) apresentaram celularidade normal. A contagem de blastos foi inferior a 5% variando de 0 a 4% com uma média de 1%. As hematogônias identificadas por microscopia óptica variaram de 0% a 10% com uma média de 2%. (Anexo C).

Na análise citológica das medulas dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda, 9 (23%) das medulas foram normocelular e 30 (77%) hiper celular. A contagem de blastos variou de 75 a 100% com uma média de 90,6%. Hematogônias não foram identificadas neste grupo. De acordo com a classificação FAB, das 39 amostras do grupo dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda

(Anexo E), 28 (71,8%) foram LLA-L1, 9 (23,1%) LLA-L2 e 2 (5,1%) LLA-L3. (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição estatística dos subtipos de leucemias linfoblásticas agudas segundo a classificação FAB.

Subtipo FAB	Número de casos	Percentual (%)
LLA-L1	28	71,8
LLA-L2	9	23,1
LLA-L3	2	5,1
TOTAL	39	100

No estudo imunofenotípico dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda, pela classificação do grupo EGIL: 20 (51,3%) foram de LLA comum (B-II); 17 (43,6%) LLA pré-B (B-III); 2 (5,1%) LLA de células B madura; e nenhum caso de LLA pró-B. (Tabela 2) (Anexo E)

Tabela 2 – Análise estatística da distribuição dos pacientes com LLA pela classificação definida pelo grupo EGIL.

Subtipo imunológico	Número de casos	Percentual (%)
BI – LLA pró B	0	0
BII – LLA comum	20	51,3
BIII – LLA pré B	17	43,6
BIV – LLA B madura	2	5,1
TOTAL	39	100

Os valores obtidos, em cada amostra, para cada parâmetro de avaliação do grupo controle e nas amostras dos pacientes com leucemia, foram testados pela análise estatística de *Kolmogorov-Smirnov*. Todos os valores apresentaram uma distribuição normal para o nível de significância menor que 5%.

As médias dos valores de cada parâmetro de avaliação foram calculadas no grupo controle (Tabela 3) e no grupo dos pacientes portadores de leucemia

linfoblástica aguda de células precursoras B (Tabela 4) e foram comparadas pelo teste-*t de student*. (Tabela 5) As médias foram diferentes para o nível de significância menor que 5% para os seguintes parâmetros: Desvio-padrão de intensidade de fluorescência de CD10; coeficiente de curtose de intensidade de fluorescência de CD10; desvio-padrão de intensidade de fluorescência de CD19; e coeficiente de inclinação de intensidade de fluorescência de CD19.

Com base na distribuição de freqüências normal dos valores dos parâmetros de avaliação das hematogônias, foram definidos valores de *cut-off*: média ± 2 desvios-padrão, média $\pm 2,5$ desvios-padrão e média ± 3 desvios-padrão para CD10 (Tabela 6) e para CD19 (Tabela 7), que quando ultrapassados, pudessem ser indicativos de doença e definindo-se assim arbitrariamente como um teste de parâmetro positivo na identificação de provável doença.

Os valores absolutos, de cada parâmetro de avaliação de cada amostra, dos pacientes do grupo controle, foram avaliados dentro das distribuições de freqüências respectivas dos mesmos parâmetros do mesmo grupo para determinação de sua posição quanto a estar, ou não, dentro da faixa determinada pelos *cut-off*: média ± 2 desvios-padrão (Quadro 1), média $\pm 2,5$ desvios-padrão e média ± 3 desvios-padrão. (Quadro 2) Os valores absolutos, de cada parâmetro de avaliação das amostras dos pacientes com leucemia, também foram avaliados dentro das distribuições de freqüências respectivas dos mesmos parâmetros de avaliação das hematogônias para determinação de sua posição quanto a estar, ou não, dentro da faixa determinada pelos mesmos *cut-off*: média ± 2 desvios-padrão, (Quadro 3) média $\pm 2,5$ desvios-padrão (Quadro 4) e média ± 3 desvios-padrão (Quadro 5).

Nas amostras do grupo controle, 9 das 36 amostras individuais (25%) apresentaram, em pelo menos um dos parâmetros de avaliação, valores fora do intervalo determinado pela média ± 2 DP. (Quadro 1) Nenhuma amostra deste mesmo grupo apresentou valor fora do intervalo quando aplicado média $\pm 2,5$ ou 3,0 DP. (Quadro 2).

Nas amostras dos pacientes com leucemia, 35 das 39 (89,7%), apresentaram valores fora dos intervalos definidos pela média ± 2 DP do grupo

controle. (Quadro 3) Trinta e uma das 39 amostras (79,5%) apresentaram valores fora do intervalo definido pela média $\pm 2,5DP$ dos valores das hematogônias do grupo controle. (Quadro 4) Para o intervalo, média $\pm 3DP$, 28 de 39 (71,8%) amostras, apresentaram um ou mais parâmetros com valores fora deste. (Quadro 5).

A sensibilidade e especificidade na detecção de doença foram calculadas com base na teoria de probabilidades. média $\pm 2DP$ obteve-se uma sensibilidade de 89,7% e uma especificidade de 75%. Para média $\pm 2,5DP$ obteve-se uma sensibilidade de 79,5% e uma especificidade de 100%. Finalmente para média $\pm 3DP$ obteve-se uma sensibilidade de 71,8% e uma especificidade de 100%. (Tabela 8).

O melhor resultado quanto a sensibilidade *versus* especificidade foi obtido com o *cut-off* média $\pm 2,5DP$. Com uma especificidade de 100%, cada parâmetro de avaliação teve sua sensibilidade determinada individualmente. (Tabela 9) O parâmetro mais sensível na detecção de doença foi a média de intensidade de fluorescência de CD10 em 18 amostras das 39 com uma sensibilidade de 46,1%. A variação dos valores para este parâmetro das hematogônias foi menor que a dos blastos. (Gráfico 1) Em seguida, o desvio-padrão da intensidade de fluorescência de CD19 em 14 amostras das 39 com 35,9%, também com menor variação dos valores para as hematogônias. (Gráfico 7), seguido da média de intensidade de fluorescência de CD19 e do coeficiente de variação da intensidade de fluorescência de CD19 ambos com maior variação nas amostras dos pacientes com leucemia (Gráficos 6 e 8, respectivamente) em 13 amostras das 39 com 33,3% para os dois parâmetros. O coeficiente de variação da intensidade de fluorescência de CD10 com menor variação nas amostras do grupo controle (Gráfico 3) em 11 amostras das 39 com 28,2%. Seguiu o desvio-padrão da intensidade de fluorescência de CD10 com menor variação nas amostras do grupo controle (Gráfico 2) em 7 amostras das 39 com 17,9%, e finalmente os coeficientes de inclinação e de curtose da intensidade de fluorescência de CD19 em 1 amostras das 39 com 2,5%, que tiveram variações semelhantes dentro de intervalos semelhantes com baixa sensibilidade. (Gráficos 9 e 10) Os coeficientes de inclinação e curtose de CD10 foram os menos sensíveis com 0%. Os valores do coeficiente de inclinação de CD10 do grupo controle, inversamente, variaram mais do que os das amostras dos pacientes com leucemia que tiveram seus valores contidos no intervalo do primeiro. (Gráfico 4) Os valores do

coeficiente de curtose de CD10 do grupo controle, semelhante ao anterior, variaram mais do que das amostras dos pacientes com leucemia que também tiveram seus valores também contidos no intervalo do primeiro. (Gráfico 5).

Os parâmetros definidos pelos coeficientes de inclinação e curtose de CD10 e CD19 não tiveram valor no resultado final da sensibilidade para o referido *cut-off*. Para CD10 nenhuma das amostras dos pacientes com leucemia foi identificada com valores fora dos respectivos intervalos. Os coeficientes de inclinação e curtose em CD19 identificaram duas amostras dos doentes, entretanto, uma das amostras também foi identificada por dois outros parâmetros e, a outra foi identificada por três outros parâmetros. Os valores dos parâmetros de avaliação foram dispostos em gráficos para os intervalos definidos pela média $\pm 2,5DP$ para os dois grupos permitindo uma visualização gráfica destes (Gráficos 1 a 10).

Tabela 3 - Valores dos parâmetros de avaliação da intensidade de fluorescência de CD10 e de CD19 em hematogônias.

Amostra	CD10					CD19				
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6	PA7	PA8	PA9	PA10
01	665,72	71,27	10,70	0,01	0,41	35,15	78,23	11,41	0,69	1,51
02	688,22	68,16	9,90	0,59	1,78	38,42	87,54	12,71	0,85	0,939
03	682,76	78,06	11,43	1,06	2,68	38,33	86,34	13,52	0,66	0,59
04	629,30	73,01	11,60	0,41	0,62	14,60	81,39	13,24	0,84	1,23
05	662,12	73,56	11,11	0,59	1,30	04,18	80,36	11,41	1,12	2,16
06	631,00	80,13	12,69	0,49	0,97	33,86	79,37	11,95	0,44	0,38
07	655,68	83,90	12,79	0,37	0,54	56,14	97,68	14,88	0,66	0,08
08	682,89	75,12	11,00	0,91	1,93	73,42	77,60	11,52	0,63	0,94
09	691,16	76,80	11,11	0,94	2,41	32,55	75,55	10,90	1,12	1,92
10	635,45	84,33	13,27	0,80	1,44	38,89	88,04	13,78	0,99	1,03
11	688,83	59,45	8,63	0,92	2,58	39,62	79,98	10,81	1,25	2,13
12	738,31	76,48	10,35	1,23	3,15	31,70	66,86	8,77	1,20	1,69
13	696,21	56,49	8,11	0,19	1,95	30,67	68,59	9,01	1,13	1,34
14	730,72	72,33	9,89	1,28	2,84	43,04	76,21	10,25	0,78	0,61
15	714,19	94,43	13,22	0,96	1,19	35,10	80,67	11,60	0,01	-0,19
16	676,64	72,83	10,76	0,45	0,37	74,18	67,32	8,69	0,20	0,02
17	748,27	65,29	8,72	0,21	0,66	15,28	91,41	12,78	0,13	-0,49
18	709,99	94,83	13,35	0,33	0,58	22,36	72,30	10,01	0,33	0,15
19	688,10	56,12	8,15	0,24	1,62	77,51	84,10	12,41	0,78	0,12
20	697,44	67,21	9,63	0,64	1,65	711,54	79,30	11,14	0,63	0,32
21	681,01	79,68	11,70	0,41	0,35	712,52	91,78	12,88	0,56	0,05
22	690,04	76,29	11,05	0,42	0,51	755,48	72,57	9,60	0,62	1,73

23	700,34	61,40	8,76	- 0,23	1,35	735,82	89,11	12,11	- 1,24	1,04
24	668,62	70,72	10,57	- 0,40	0,93	715,17	87,03	12,16	- 0,95	0,50
25	711,31	67,64	9,50	0,01	0,18	699,32	80,36	11,49	- 0,14	-0,25
26	659,81	75,78	11,48	- 0,47	0,65	737,14	84,15	11,41	- 0,95	1,41
27	728,52	65,71	9,02	- 0,38	0,53	692,36	74,70	10,78	- 0,31	-0,03
28	725,32	60,86	8,39	0,12	0,26	733,66	72,28	9,85	- 0,41	0,49
29	758,78	72,96	9,61	0,05	- 0,50	717,27	83,76	11,67	- 0,40	0,08
30	696,11	69,31	9,95	0,30	0,05	753,09	74,49	9,89	- 0,69	0,37
31	686,86	59,76	8,70	0,38	0,41	732,78	69,89	9,53	- 0,78	0,65
32	713,64	52,75	7,39	0,29	0,58	661,63	74,11	11,20	- 0,63	0,50
33	720,71	67,71	9,39	- 0,59	0,36	701,53	72,29	10,30	- 0,35	-0,01
34	664,12	65,06	9,79	0,55	0,91	704,70	80,17	11,37	- 0,58	-0,03
35	632,29	56,02	8,86	- 0,27	1,45	673,08	68,84	10,22	- 0,43	0,11
36	687,89	63,90	9,28	- 0,25	0,87	671,60	85,21	12,68	- 0,56	-0,33
Média	689,96	70,71	10,28	- 0,40	1,10	704,27	79,44	11,34	- 0,67	0,63
D.P.	32,28	9,94	1,58	0,44	0,87	38,13	7,56	1,45	0,33	0,73

Legenda:

DP = desvio-padrão

Tabela 4 - Valores dos parâmetros de avaliação da intensidade de fluorescência de CD10 e de CD19 em blastos.

Amostra	CD10					CD19				
	PA11	PA12	PA13	PA14	PA15	PA16	PA17	PA18	PA19	PA20
01	646,58	65,88	10,19	-0,34	0,16	505,16	79,28	15,69	-0,42	0,09
02	600,25	123,16	20,52	-0,50	-0,28	708,14	68,96	9,74	-0,47	1,25
03	743,13	71,78	9,66	-1,06	1,50	780,51	41,52	5,32	-1,22	4,27
04	822,66	79,00	9,60	-0,77	0,73	558,35	116,76	20,91	-0,67	0,34
05	765,70	79,81	10,42	-0,52	0,10	717,32	60,58	8,45	-0,22	0,18
06	656,70	74,16	11,29	-0,31	0,13	576,16	102,32	17,76	0,03	-0,78
07	626,52	150,59	24,04	-0,76	0,13	633,76	67,10	10,59	-0,31	-0,01
08	744,76	82,36	11,06	-0,14	-0,41	728,18	71,69	9,85	-0,22	0,36
09	904,23	52,53	5,81	-0,29	-0,13	866,51	61,50	7,10	-0,65	0,47
10	618,24	68,45	11,07	-0,15	-0,08	725,88	61,30	8,44	-0,29	-0,31
11	810,48	52,11	6,43	-0,46	0,78	882,07	49,42	5,60	0,02	0,79
12	695,95	78,14	11,23	-0,43	-0,21	655,76	66,23	10,10	-0,22	-0,21
13	686,35	78,21	11,39	-0,66	0,24	632,05	58,29	9,22	-0,15	-0,06
14	720,71	67,72	9,40	-0,60	0,36	701,53	72,30	10,31	-0,35	-0,01
15	825,25	64,28	7,79	-0,41	0,06	725,34	68,36	9,42	-0,27	0,02
16	769,29	82,26	10,69	-0,41	-0,14	665,51	79,42	11,93	-0,20	-0,36
17	837,49	62,34	7,44	-0,31	0,33	708,49	76,69	10,82	-0,11	-0,33
18	628,16	153,33	24,41	-0,64	0,60	743,25	66,89	9,00	-0,15	-0,18
19	617,57	92,01	14,90	-0,21	-0,04	850,29	53,26	6,26	-0,16	1,85
20	760,37	62,93	8,28	-0,51	0,58	687,16	70,14	10,21	-0,12	-0,15
21	589,61	102,32	17,35	-0,04	-0,41	784,50	69,37	8,84	0,07	-0,09
22	747,66	60,89	8,14	0,09	0,40	714,57	55,10	7,71	0,04	0,52
23	801,41	62,33	7,78	-0,69	0,83	718,75	94,26	13,11	-0,10	-0,73
24	752,08	69,88	9,29	-0,50	0,09	705,20	66,71	9,46	-0,25	0,01
25	823,26	54,81	6,66	-0,28	0,66	686,92	77,09	11,22	-0,14	-0,23
26	675,05	88,82	13,16	-0,41	-0,09	854,62	58,19	6,81	0,18	0,84
27	879,19	57,57	6,55	-0,52	0,90	823,88	67,06	8,14	-0,19	0,05
28	386,10	130,26	33,74	-0,01	-0,26	836,81	52,97	6,33	-0,32	0,74
29	807,54	58,22	7,21	-1,20	2,37	734,04	72,73	9,91	-0,28	-0,33
30	755,00	56,29	7,46	-0,49	0,23	596,82	73,71	12,35	-0,33	0,13
31	631,43	107,59	17,04	-0,25	-0,39	589,87	94,92	16,09	-0,12	-0,42
32	836,55	52,22	6,24	-0,69	1,17	798,47	52,64	6,59	-0,48	1,52
33	617,02	65,54	10,62	-0,33	0,53	789,18	51,64	6,54	-0,01	1,38
34	344,04	128,19	37,26	0,50	0,98	715,03	60,06	8,40	-0,43	-0,11
35	796,57	85,23	10,70	-1,01	0,59	582,07	110,41	18,97	0,04	-0,80
36	755,08	66,97	8,87	-0,52	0,05	814,30	69,60	8,55	-0,54	0,27
37	862,38	51,04	5,92	-0,03	0,08	728,53	57,90	7,95	-0,17	0,77
38	815,32	79,31	9,73	-0,61	0,28	699,11	74,33	10,63	-0,51	0,07
39	869,23	56,48	6,50	-0,60	0,68	741,80	82,17	11,08	-0,28	-0,31
Média	712,08	80,61	12,42	-0,44	0,34	713,78	69,97	10,21	-0,24	0,28
D.P.	122,38	27,38	7,41	0,33	0,59	93,15	16,90	3,76	0,26	0,94

Legenda:

DP = desvio-padrão

Tabela 5 - Análise comparativa das médias dos parâmetros de avaliação entre hematogônias e blastos pelo teste-*t de student*.

	Médias		p
	Hematogônias	Blastos	
Média da intensidade de fluorescência de CD10	689,96	712,08	0,250
Desvio-padrão de intensidade de fluorescência de CD10	70,71	80,61	0,040
Coefficiente de variação de intensidade de fluorescência de CD10	10,28	12,42	0,103
Coefficiente de inclinação de intensidade de fluorescência de CD10	-0,40	-0,44	0,623
Coefficiente de curtose de intensidade de fluorescência de CD10	1,10	0,34	< 0,001
Média da intensidade de fluorescência de CD19	704,27	713,78	0,461
Desvio-padrão de intensidade de fluorescência de CD19	79,44	69,97	0,004
Coefficiente de variação de intensidade de fluorescência de CD19	11,34	10,21	0,087
Coefficiente de inclinação de intensidade de fluorescência de CD19	-0,67	-0,24	< 0,001
coeficiente de curtose de intensidade de fluorescência de CD19	0,63	0,28	0,064

Tabela 6 - Definição dos valores dos *cut-off* com base na média e desvio-padrão dos parâmetros de avaliação de CD10 das hematogônias.

	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5
Média	689,96	70,71	10,28	-0,40	1,10
D.P.	32,28	9,94	1,58	0,44	0,87
Média - 2DP	625,40	50,83	7,12	-1,28	-0,64
Média + 2DP	754,52	90,59	13,44	0,48	2,84
Média - 2,5DP	609,26	45,86	6,33	-1,50	-1,08
Média +2,5DP	770,66	95,56	14,23	0,70	3,28
Média - 3DP	593,12	40,89	5,54	-1,72	-1,51
Média + 3DP	786,80	100,52	15,02	0,93	3,72

Legenda:

DP = desvio-padrão

Tabela 7 - Definição dos valores dos *cut-off* com base na média e desvio-padrão dos parâmetros de avaliação de CD19 das hematogônias.

	PA6	PA7	PA8	PA9	PA10
Média	704,27	79,44	11,34	-0,67	0,63
D.P.	38,13	7,56	1,45	0,33	0,73
Média - 2DP	628,01	64,32	8,44	-1,33	-0,83
Média + 2DP	780,53	94,56	14,24	-0,01	2,09
Média - 2,5DP	608,95	60,54	7,72	-1,50	-1,20
Média +2,5DP	799,60	98,34	14,97	0,16	2,46
Média - 3DP	589,88	56,76	6,99	-1,66	-1,56
Média + 3DP	818,66	102,13	15,69	0,32	2,83

Legenda:

DP = desvio-padrão

Quadro 1 - Análise comparativa de cada parâmetro de avaliação de cada amostra das hematogônias dentro da distribuição de frequência dos respectivos parâmetros de avaliação do grupo controle tendo com base no *cut-off*, média \pm 2DP.

Amostra	CD10					CD19				
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6	PA7	PA8	PA9	PA10
01										
02										
03										
04						x				
05										x
06										
07							x	x		
08										
09										
10										
11										x
12					x					
13										
14										
15		x							x	
16										
17										
18		x								
19										
20										
21										
22										
23										
24										
25										
26										
27										
28										
29	x									
30										
31										
32										
33										
34				x						
35										
36										

Legenda:

x – Parâmetro de avaliação cujo valor encontra-se fora do intervalo definido pelo *cut-off*.

Quadro 2 - Análise comparativa de cada parâmetro de avaliação de cada amostra das hematogônias dentro da distribuição de frequência dos respectivos parâmetros de avaliação do grupo controle tendo com base no *cut-off*, média \pm 2,5 e 3,0DP.

Amostra	CD10					CD19				
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6	PA7	PA8	PA9	PA10
01										
02										
03										
04										
05										
06										
07										
08										
09										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23										
24										
25										
26										
27										
28										
29										
30										
31										
32										
33										
34										
35										
36										

Legenda:

x – Parâmetro de avaliação cujo valor encontra-se fora do intervalo definido pelo *cut-off*.

Quadro 3 - Análise comparativa de cada parâmetro de avaliação de cada amostra dos pacientes com leucemia dentro da distribuição de frequência dos respectivos parâmetros de avaliação do grupo controle com base no *cut-off*, média \pm 2DP.

Caso	CD10					CD19				
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6	PA7	PA8	PA9	PA10
01						x		x		
02	x	x	x							
03							x	x		x
04	x					x	x	x		
05	x						x			
06						x	x	x	x	
07		x	x							
08										
09	x		x			x	x	x		
10	x						x			
11	x		x			x	x	x	x	
12										
13							x			
14										
15	x									
16	x									
17	x									
18		x	x							
19	x	x	x			x	x	x		
20	x									
21	x	x	x			x			x	
22							x	x	x	
23	x									
24										
25	x		x							
26						x	x	x	x	
27	x		x			x		x		
28	x	x	x			x	x	x		
29	x									
30	x					x				
31		x	x			x	x	x		
32	x		x			x	x	x		
33	x					x	x	x		
34	x	x	x	x			x	x		
35	x					x	x	x	x	
36	x					x				
37	x		x				x	x		
38	x									
39	x		x							

Legenda:

x – Parâmetro de avaliação cujo valor encontra-se fora do intervalo definido pelo *cut-off*.

Quadro 4 - Análise comparativa de cada parâmetro de avaliação de cada amostra dos pacientes com leucemia dentro da distribuição de frequência dos respectivos parâmetros de avaliação do grupo controle com base no *cut-off*, média \pm 2,5DP.

Caso	CD10					CD19				
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6	PA7	PA8	PA9	PA10
01						x		x		
02	x	x	x							
03							x	x		x
04	x					x	x	x		
05										
06						x	x	x		
07		x	x							
08										
09	x		x			x		x		
10										
11	x					x	x	x		
12										
13							x			
14										
15	x									
16										
17	x									
18		x	x							
19			x			x	x	x		
20										
21	x	x	x							
22							x			
23	x									
24										
25	x									
26						x	x	x	x	
27	x					x				
28	x	x	x			x	x	x		
29	x									
30						x				
31		x	x			x		x		
32	x		x				x	x		
33							x	x		
34	x	x	x				x			
35	x					x	x	x		
36						x				
37	x		x				x			
38	x									
39	x									

Legenda:

x – Parâmetro de avaliação cujo valor encontra-se fora do intervalo definido pelo *cut-off*.

Quadro 5 - Análise comparativa de cada parâmetro de avaliação de cada amostra dos pacientes com leucemia dentro da distribuição de freqüência dos respectivos parâmetros de avaliação do grupo controle com base no *cut-off*, média \pm 3DP.

Caso	CD10					CD19				
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6	PA7	PA8	PA9	PA10
01						x		x		
02		x	x							
03							x	x		x
04	x					x	x	x		
05										
06						x	x	x		
07		x	x							
08										
09	x					x				
10										
11	x					x	x	x		
12										
13										
14										
15	x									
16										
17	x									
18		x	x							
19						x	x	x		
20										
21	x	x	x							
22							x			
23	x									
24										
25	x									
26						x		x		
27	x					x				
28	x	x	x			x	x	x		
29	x									
30										
31		x	x			x		x		
32	x						x	x		
33							x	x		
34	x	x	x							
35	x					x	x	x		
36										
37	x									
38	x									
39	x									

Legenda:

x – Parâmetro de avaliação cujo valor encontra-se fora do intervalo definido pelo *cut-off*.

Gráfico 1 – Variação dos valores das médias de intensidade de fluorescência de CD10 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.

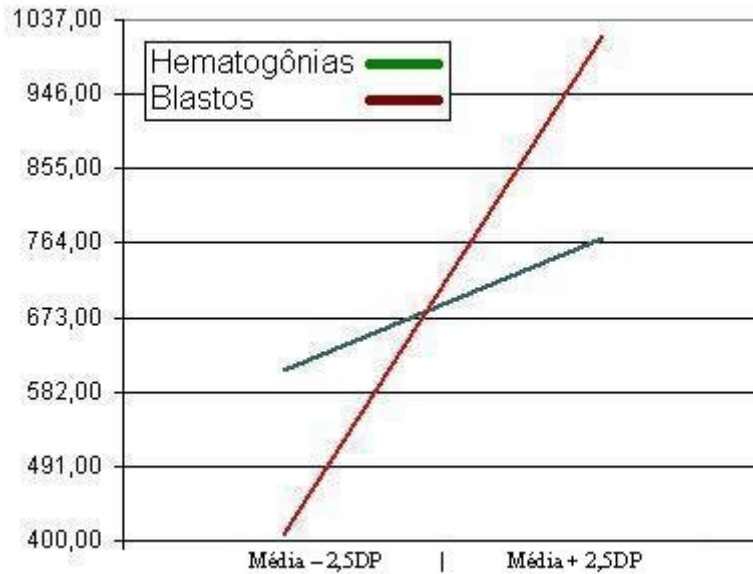


Gráfico 2 – Variação dos valores dos desvios-padrão de intensidade de fluorescência de CD10 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.

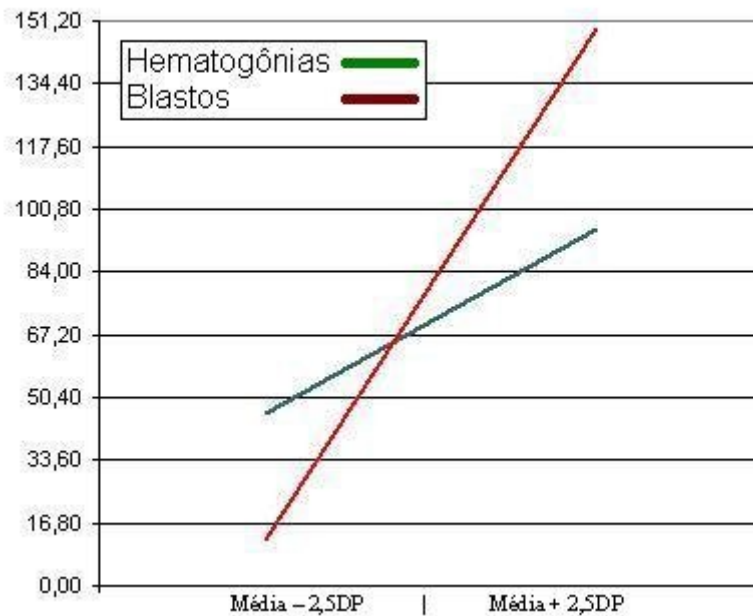


Gráfico 3 – Variação dos valores dos coeficientes de variação de intensidade de fluorescência de CD10 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.

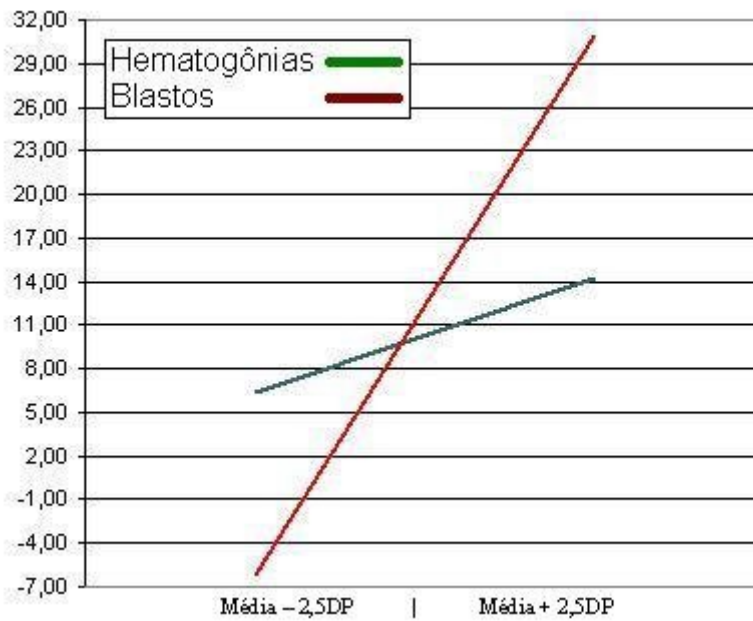


Gráfico 4 – Variação dos valores dos coeficientes de inclinação de intensidade de fluorescência de CD10 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.

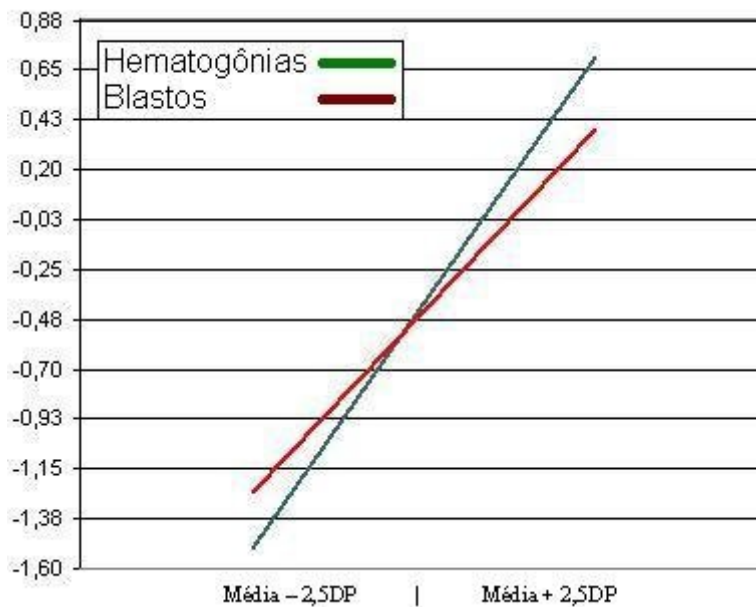


Gráfico 5 – Variação dos valores dos coeficientes de curtose de intensidade de fluorescência de CD10 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.

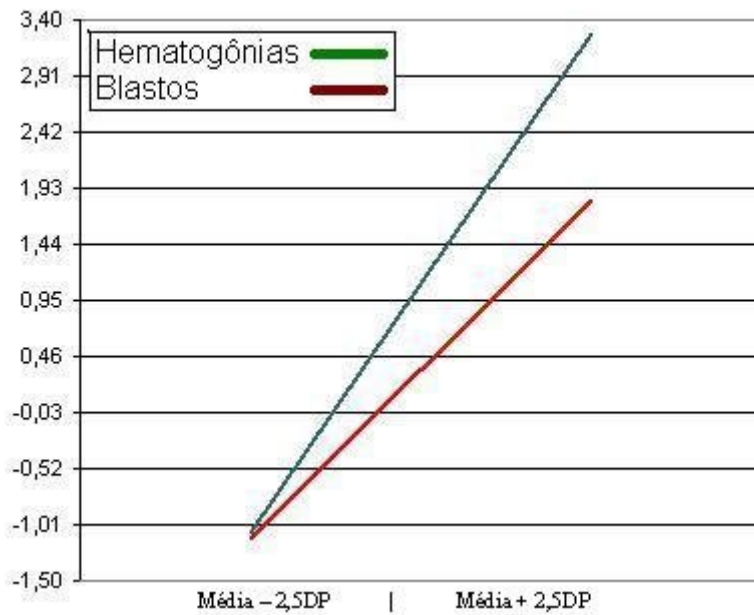


Gráfico 6 – Variação dos valores das médias de intensidade de fluorescência de CD19 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.

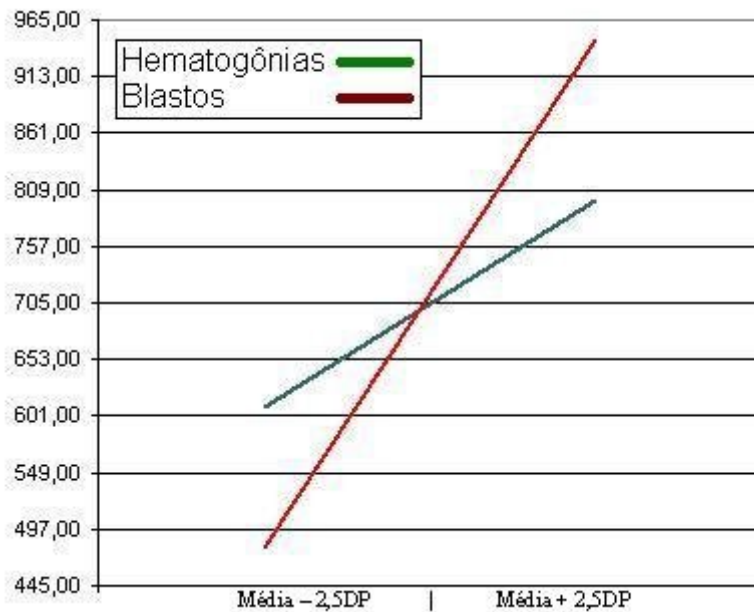


Gráfico 7 – Variação dos valores dos desvios-padrão de intensidade de fluorescência de CD19 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.

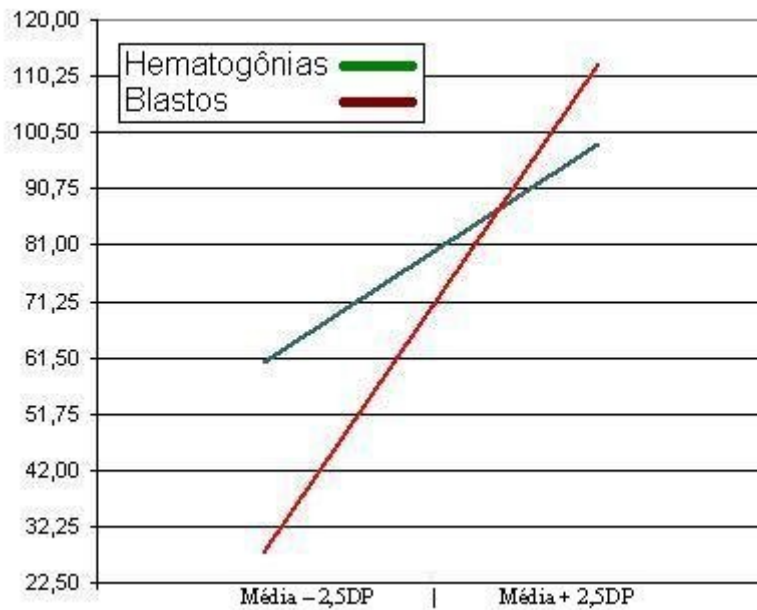


Gráfico 8 – Variação dos valores dos coeficientes de variação de intensidade de fluorescência de CD19 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.

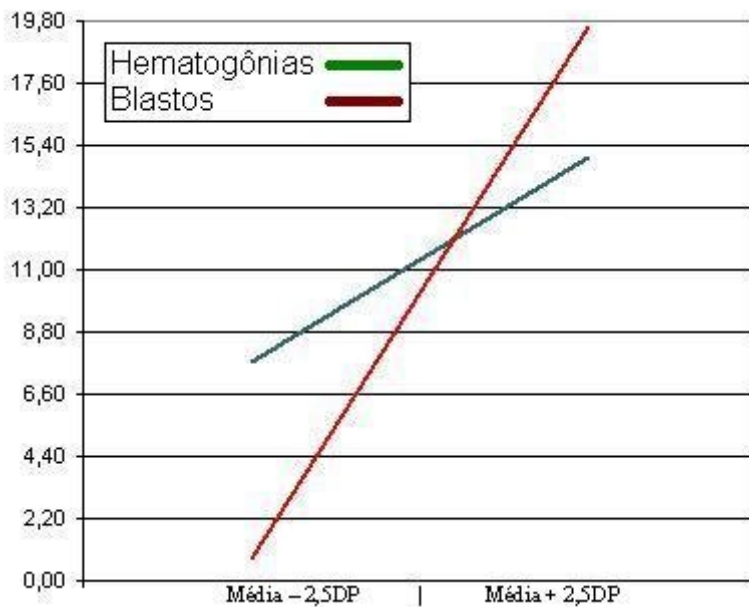


Gráfico 9 – Variação dos valores dos coeficientes de inclinação de intensidade de fluorescência de CD19 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.

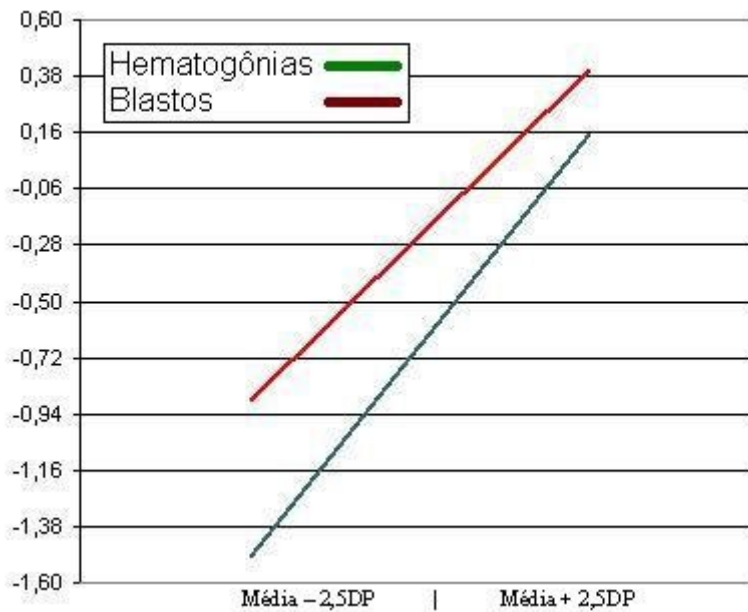


Gráfico 10 – Variação dos valores dos coeficientes de curtose de intensidade de fluorescência de CD19 em hematogônias e blastos leucêmicos. Média \pm 2,5DP.

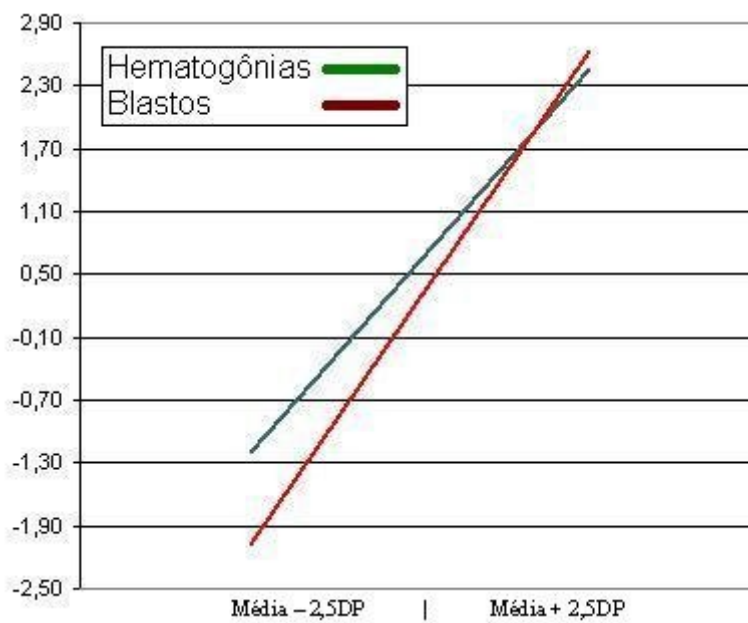


Tabela 8 - Análise comparativa da sensibilidade e especificidade na detecção da doença com base nos três níveis de *cut-off* aplicados a todos os parâmetros de avaliação.

<i>Cut-off</i>	Sensibilidade	Especificidade
Média \pm 2 desvios-padrão	89,7%	75%
Média \pm 2,5 desvios-padrão	79,5%	100%
Média \pm 3 desvios-padrão	71,8%	100%

Tabela 9 - Análise comparativa das sensibilidades individuais de cada parâmetro de avaliação para o *cut-off* de média \pm 2,5DP.

Parâmetro de avaliação	Sensibilidade %
Média da intensidade de fluorescência de CD10	46,1
Desvio-padrão de intensidade de fluorescência de CD10	17,9
Coefficiente de variação de intensidade de fluorescência de CD10	28,2
Coefficiente de inclinação de intensidade de fluorescência de CD10	0
coeficiente de curtose de intensidade de fluorescência de CD10	0
Média da intensidade de fluorescência de CD19	33,3
Desvio-padrão de intensidade de fluorescência de CD19	35,9
Coefficiente de variação de intensidade de fluorescência de CD19	33,3
Coefficiente de inclinação de intensidade de fluorescência de CD19	2,5
coeficiente de curtose de intensidade de fluorescência de CD19	2,5

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Hematogônias são células indiferenciadas da medula óssea e correspondem aos precursores linfóides de linhagem B normais (DAVIS et al, 1993) que estão em número bastante reduzido mas podendo chegar a representar até 72% dos elementos nucleados da medula óssea. (RIMSZA et al, 2000). As leucemias linfoblásticas agudas são proliferações monoclonais de células linfóides imaturas caracterizadas pelo acúmulo destas na medula óssea e disseminação para o resto do organismo com infiltração de praticamente qualquer órgão (JAFFE et al, 2001).

A dificuldade no diagnóstico diferencial morfológico entre hematogônias e blastos leucêmicos, às vezes, pode exigir complementação diagnóstica com as técnicas laboratoriais mais avançadas. O aumento de células jovens na medula óssea ocorre em diversas situações clínicas sendo mais evidente nos quadros regenerativos medulares que seguem as aplasias transitórias como: pós-indução terapêutica por quimioterápicos com supressores medulares no tratamento de neoplasias; pós-transplantes de medula óssea; citopenias congênitas e auto-imunes (MCKENNA et al, 2001).

A caracterização imunológica das células precursoras normais da medula, e seu equivalente neoplásico, já está bem definida na literatura (CAMPANA et al, 1988; RIMSZA et al, 2000). A identificação de um perfil imunofenotípico é a base na distinção das duas entidades e requer um painel de anticorpos amplo. A dupla expressão de CD10 e CD19 constitui o perfil básico de células imaturas linfóides de linhagem B (DWORZAK, 1988). O uso de apenas dois marcadores imunológicos nesta distinção ainda não tem sido referido em publicações anteriores.

A simples referência de positividade de células para CD10 e CD19 bem como a visualização dos gráficos, não permite a diferenciação entre um tipo neoplásico de um não neoplásico. As curvas de expressão destes marcadores foram analisadas em seus aspectos geométricos, no aspecto de intensidade de fluorescência para estes dois marcadores. Dada a sua alta semelhança, não é possível a distinção para os dois tipos celulares, isto é, neoplásico e não neoplásico, sem a aplicação dos recursos matemáticos e estatísticos. Os parâmetros, média de intensidade de fluorescência, desvio-padrão da curva, coeficiente de variação,

coeficiente de inclinação e coeficiente de curtose para ambos marcadores dos dois grupos, foram analisados e apresentaram diferenças significativas na distinção de células da linhagem B de natureza neoplásica da não neoplásica para a maioria dos parâmetros.

Os valores dos parâmetros de avaliação das amostras dos pacientes com LLA foram comparados com os intervalos média \pm 2DP, média \pm 2,5DP e média \pm 3DP para definição de um *cut-off* com melhor sensibilidade e especificidade. A média \pm 2,5DP apresentou maior sensibilidade, 79,5%, para uma especificidade de 100%.

Em ordem crescente, a maior sensibilidade foi para: a média de intensidade de fluorescência de CD10 em 18 amostras das 39 com uma sensibilidade de 46,1%; o desvio-padrão da intensidade de fluorescência de CD19 em 14 amostras das 39 com 35,9%; a média de intensidade de fluorescência de CD19 e do coeficiente de variação da intensidade de fluorescência de CD19 em 13 amostras das 39 com 33,3%; coeficiente de variação da intensidade de fluorescência de CD10 em 11 amostras das 39 com 28,2%; o desvio-padrão da intensidade de fluorescência de CD10 em 7 amostras das 39 com 17,9%; os coeficientes de inclinação e de curtose da intensidade de fluorescência de CD19 em 1 amostra das 39 com 2,5%; e os coeficientes de inclinação e curtose de CD10 em nenhuma com 0%.

Os coeficientes de inclinação e curtose de CD10 e CD19 não alteraram o resultado final da sensibilidade. Para CD10 nenhuma das amostras dos pacientes com leucemia foi identificada com valores fora dos respectivos intervalos e os coeficientes de inclinação e curtose de CD19 identificaram três amostras dos doentes que também foram identificadas por outros parâmetros.

A sensibilidade e especificidade global de todos os parâmetros para o *cut-off* média \pm 2,5DP foi de 79,5% com uma especificidade de 100%.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A utilização de apenas dois marcadores (CD19 e CD10) possibilita diferenciar hematogônias de blastos leucêmicos com alta sensibilidade e especificidade.

A expressão dos marcadores CD10 e CD19 em hematogônias e blastos leucêmicos apresentam diferenças significativas sendo útil na diferenciação dos dois tipos celulares.

As médias de intensidade de fluorescência de CD10 e CD19 apresentam diferenças e conseguiu-se a detecção da leucemia com uma sensibilidade de 46,1% e 33,3% respectivamente com 100% de especificidade.

Os desvios-padrão da intensidade de fluorescência de CD10 e CD19 apresentam diferenças e conseguiu-se a detecção da leucemia com uma sensibilidade de 17,9% e 35,9% respectivamente com 100% de especificidade.

Os coeficientes de variação da intensidade de fluorescência de CD10 apresentam diferenças e conseguiu-se a detecção da leucemia com uma sensibilidade de 28,3% e 33,3% respectivamente com 100% de especificidade.

Os coeficientes de inclinação e de curtose da intensidade de fluorescência de CD19 apresentam poucas diferenças e conseguiu-se a detecção da leucemia com uma sensibilidade apenas de 2,5% para ambos marcadores com 100% de especificidade.

Os coeficientes de inclinação e de curtose da intensidade de fluorescência de CD10 não apresentam diferenças significativas e não detectaram nenhum caso de leucemia.

A sensibilidade global da análise de todos os parâmetros foi de 79,5% com 100% de especificidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS

ANDERSON, K.C.; BATES, M.P.; SLAUGHENHOUPP, B.L.; PINKUS, G.S. Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. **Blood**,v.63,n.6, p.1424-1433,1984.

ANJOS, A.R.; ALVARES-SILVA, M.; BORELLI, P. Matriz extracelular e leucemia. **Rev. Brás. Hematol. Hemoter**,v.22, n.3, 2000

BACAL, N.S.; FAULHABER, M.H. Aplicação prática em citometria de fluxo. Atheneu. Capítulo 6 Páginas 47-69, 2003

BAIN, B.J.; BARNETT, D.; LINCH, D.; MATUTES,E. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders. **Clin Lab Haem**, v. 24, p. 1-13, 2002.

BASSO, G.; LANZA, F.; ORFAO, A.; MORETTI, S.; CASTOLDI, G. Clinical and biological significance of CD34 expression in acute leukemia. **J Biol Regul Homeost Agents**, v.15, p. 68-78, 2001.

BASSO, G.; BULDINI, B.; ZEN, L.; ORFAO, A.; New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. **Haematologica**, v.86, p. 675-692, 2001.

BENE, M.C.; CASTOLDI, G.; KINAPP, W.; LUDWIG, H.D. Proposal for the immunological classification of acute leukemias. **Leukemia**, v.9, p. 1783-1786, 1995.

BOFILL, M.; JANOSSY, G.; JANOSSA, M.; BURFORD, G.D. Human B cell development – II Subpopulations in the human fetus. **The Journal of Immunology**, v.134, n.3, p.1531-1538, 1985.

BORELLA, L.; GREEN, A.; WEBSTER, R.G. Immunologic rebound after cessation of long-term chemotherapy in acute leukemia. **Blood**, v.40, n.1, p. 42-51, 1972.

BOROWITZ, M.J.; SHUSTER, J.; Carroll, A.J.; NASH, M. Prognostic significance of fluorescence intensity of surface marker expression in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. A pediatric oncology group study. **Blood**, v. 89, n. 11, p. 3960-3966, 1997.

BRASHEM, C.J.; KERSEY, J.H.; BOLLUM, F.J.; LEBIEN, T.W. Ontogenic studies of lymphoid progenitor cells in human bone marrow. **Hematol.**, v. 10, n.10, p. 886-892, 1982.

BRAYLAN, R.C.; ATWATER, S.K.; DIAMOND, L.; HASSETT, J.M. U.S.-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: Data reporting. **Cytometry** , v. 30, p. 245-248, 1997.

BROWN, M.; WITTEWER, C. Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. **Clinical chemistry**, v. 46, p. 1221-1229, 2000.

CALDWELL, M.D.; POJE, E.; HELIKSON, M.A. B-cell precursor in normal pediatric bone marrow. **Am J Clin Pathol**, v. 95, p. 816-823, 1991.

CAMPANA. D.; JANOSSY, G.; BOFILL, M.; TREJDOSIEWICZ, L.K. Human B cell development – I. Phenotypic differences of B lymphocytes in the bone marrow and peripheral lymphoid tissue. **The Journal of Immunology**, v. 134, n. 3, p. 1524-1530, 1985.

CAMPANA, D.; JANOSSY, G. Proliferation of normal and malignant human immature lymphoid cells. **Blood**,v. 71, n. 5, p. 1201-1210, 1988.

CAMPANA, D.; BEHM, F.G. Immunophenotyping of leukemia. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p. 59-75, 2000.

CLARK, P.; NORMANSELL, D.E.; INNES, D.J.; HESS, C.E. Lymphocyte subsets in normal bone marrow. **Blood**, v. 67, n.6, p.1600-1606, 1986.

COUNSTAN-SMITH, E.; SANCHO, J.; HANCOCK, M. L.; BOYETT, J. M.; BEHM, F.G.; RAIMONDI, S.C.; SANDLUND, J.T.; RIVERA, G.K.; RUBNITZ, J.E.; RIBEIRO, R.C.; PUI, C-H.; CAMPANA, D. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 96, n. 8, p. 2691-2696, 2000.

DAVIS, R.E.; LONGACRI, T.A.; CORNBLEET, J. Hematogones in the bone marrow of adults. **Hematopathology**, v. 102, n.2, p. 202-211, 1993.

DWORZARK, M.N.; FRITSCH, G.; FROSCI, G.; PRINTZ, D.; GADNER, H. Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. **Blood**, v.92, n.9, p. 3203-3209, 1998.

EMERENCIANO, M.; BOSSA, Y.; ZANROSSO, C.W.; ALENCAR, M.D.; OLIVEIRA, M.S. Frequência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas. **Rev Brasileira Cancerol**, v.50, n. 3, p. 183-189, 2004.

FARAHAT, N.; LENS, D.; ZOMAS, A.; MORILLA, R.; MATUTES, E.; CATOVSKY, D. Quantitative flow cytometry can distinguish between and leukaemic B-cell precursors. **Br. J. Haematol.**, v. 91, p. 640-646, 1995.

FRANCÉS, M.A. El limfoblasto en la leukemia linfoblástica aguda: morfología y citoquímica. **Haematologica**, v. 87, n. 1, p. 259-262, 2003.

FRATER, J.L.; YASEEN, N.R.; PETERSON, L.C.; TALLMAN, M.S.; GOOLSBY, C.L. Biphenotypic acute leukemia with coexpression of CD79a and markers of myeloid lineage. **Arch Pathol Lab Med**. 2003 Mar;127(3):356-9.

FUKUSHIMA, T.; SUMAZAKI, R.; KOIKE, K.; TSUCHIDA, M. Multicolor Flow-cytometric, morphologic, and clonogenic analysis of marrow CD10-positive cells in children with leukemia in remission or nonmalignant diseases. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v.20, n. 3, p. 222-228, 1998.

GEORGOPOULOS, K.; BIGBY, M.; WANG, J-H. The Ikarus gene is required for the development of all lymphoid lineages. **Cell**, v. 79, p. 143-156, 1994.

GREAVES, M.F.; HARIRI, G.; NEWMAN, R.A.; SUTHERLAND, D.R. Selective expression of common acute lymphoblastic leukemia (gp100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. **Blood**, v. 61, n. 4, p. 628-639, 1983.

ESCALON, E.A. Acute Lymphocytic Leukemia in Childhood. **International Pediatrics**, v. 14, n. 2, p. 83-90, 1999.

HOKLAND, P.; RITZ, J.; SCHLOSSMAN, S.F.; NADLER, L.M. Ordely expression of B cell antigens during the in vitro differentiation of nonmalignant human pre-B cells. **The Journal of Immunology**, v. 135, n.3, p. 1746-1751, 1985.

HOLLANDER, Z.; SHAH, V.O.; CIVIN, C.I.; LOKEN, M.R. Assessment of proliferation during maturation of the B lymphoid lineage in normal human bone marrow. **Blood**, v. 71, n. 2, p.528-531, 1988.

HURWITZ, C.A.; GORE, S.D.; Stone, K.D.; CIVIN, C.I. Flow cytometric detection of rare normal human marrow cells with immunophenotypes characteristics of acute lymphoblastic leukemia cells. **Leukemia**, v. 6, n. 4, p. 233-239, 1992.

JAFFE, E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H.; VARDIMAN; J.W. Pathology And genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. In: BRUNNING, D.D. Precursor B lymphoblastic leukaemia /lymphoblastic lymphoma. 1st ed. Lyon: IARCPress,111 - 117, 2001

JERRY KAPLER, J. Desenho representativo dos elementos que compõem o citômetro de fluxo.Cancer Research Laboratory at the University of California. Disponível em http://biology.berkeley.edu/crl/flow_cytometry_basic.html

JERRY KAPLER, J. Desenho representativo do funcionamento interno do sistema de fluxo para leitura individual das células. Cancer Research Laboratory at the University of California. Disponível em

http://biology.berkeley.edu/crl/flow_cytometry_basic.html

KALEEM, Z.; CRAWFORD, E.; PATHAN, H.; JASPER, L. Flow cytometric analysis of acute leukemias. *Arch Pathol Lab Med*, v. 127, p. 42-48, 2003.

KHALIL, S.H.; JACKSON, J.M.; PYLE, R.H.; ROBICHAUD, M. Immunophenotyping of acute leukemia at Faisal Specialist Hospital and Research Centre of Acute Leukemia at Faisal Specialist Hospital and Research Centre . Disponível na URL: <http://www.kfshrc.edu.sa/annals/152/94109ar.html> (1 of 9), 2004.

KROFT, S.H.; ASPLUND, S.L.; MCKENNA, R.W.; KARANDIKAR, N.J. Hematogones in the peripheral blood of adults: a four-colour flow cytometry study of 102 patients. *British Journal of Haematology*, v. 126, p. 209-212, 2004.

LEBIEN, T.W. Fates of human b-cell precursors. *Blood*, v. 96, n. 1, p. 9-23, 2000.

LEDOUARIN, N.M.; DIETHERLEN-LIÈVRE, F.; OLIVER, P.D. Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells. *The American Journal of Anatomy*, v. 170, p. 261-299, 1984.

KILLICK, S.; MATUTES, E.; POWLES, R.L.; HAMBLIN, M.; SWANSBURY, J.; TRELEAVEN, J.G.; ZOMAS, A.; ATRA, A.; CATOVSKY, D. Outcome of biphenotypic acute leukemia. *Haematologica*, v. 84, p. 699-706, 1999.

LOKEN, M.R.; SHAH, V.O.; DATTILIO, K.I.; CIVIN, C.I. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood*, v. 70, n. 5, p. 1316-1324, 1987.

MENÉNDEZ, M.C. ; ORFAO, A. Immunophenotypic characteristics of PB-mobilised CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J Biol Regul Homeost Agents*, v. 15, p. 53-61, 1999.

MCGINNIS, K.; LETARTE, M.; PAIGE, C.J. B-lineage colonies from normal, human bone marrow are initiated by B cells and their progenitors. *Blood*, v. 77, n. 5, p. 961-970, 1991.

MCKENNA, R.W.; WASHINGTON, L.T.; AQUINO, D.B.; PICKER, L.J. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood*, v. 98, n. 8, p. 2498-2507, 2001.

MICKLEM, H.S. B lymphocytes, T lymphocytes and lymphopoiesis. *Clinics in haematology*, v. 8, n. 2, p. 395-418, 1979.

MORILLA, R. Immunophenotyping by flow cytometry: Leukemia panels. *Proceedings*, vol. 34, n. 3, p. 443-446, 1999.

O'DONNELL, M.R Acute leukemias. RICHARD, M.D.; LAWRENCE, R.; WILLIAM, J.; LAWRENCE, D. Cancer Management: A Multidisciplinary Approach; Medical, Surgical, & Radiation Oncology (Paperback). Chapter 34, p. 733-757, 2004.

ORFAO, A.; SCHMITZ, G.; BRANDO, B.; RUIZ-ARGUELLES, A. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: Current status and future directions. *Clinical Chemistry*, v. 45, p. 1708-1717, 1999.

PAOLUCCI, P.; HAYWARD, A.R.; RAPSON, N.T. Pre-B and B cells in children on leukaemia remission maintenance treatment. *Clin exp Immunol*, v. 37, p. 259-266, 1979.

PEZZUTTO A, DORKEN B, MOLDENHAUER G, CLARK E.A. Amplification of human B cell activation by a monoclonal antibody to the B cell-specific antigen CD22, Bp 130/140. *J Immunol*, v. 138, n. 1, p. 98-103, 1987.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S.; KUMB, C.E. Citologia e imunofenotipagem de leucemias em oncohematologia pediátrica. 1ª ed. Rio de Janeiro. 1998

PUI, C.; SCHRAPPE, M.; RIBEIRO, R.C.; NIEMEYER, C.M. Childhood and adolescents lymphoid and myeloid leukemia. *Haematology*, v. 40, p. 118-145, 2004.

REGO, E.M.; GARCIA, A.B.; CARNEIRO, J.J.; FALCÃO, R.P. Immunophenotype of normal and leukemic bone marrow B-precursors in Brazilian population. A comparative analysis by quantitative fluorescence cytometry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 183-194, 2001.

REILLY, J.T.; BAIN, B.J.; ENGLAND, J.M.; HYDE, K. The role of cytology, cytochemistry, immunophenotyping and cytogenetic analysis in the diagnosis of haematological neoplasias. **Clin Lab Haem**, v. 18, p. 231-236, 1996.

RICHARD, G.; BRODY, J.; SUN, T. A case of megacariocytic leukemia with hematogones. **Leukemia**, v. 7, n. 11, p. 1900-1903, 1993.

RILEY, R.S.; MASSEY, D.; JACKSON-COOK, C.; IDOW, M. Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. **Hematol Oncol Clin N Am**, v. 16, p. 245-299, 2002.

RIMSZA, L.M.; VISWANATHA, D.S.; WINTER, S.S.; LEITH, C.P. The presence of CD34+ cell clusters predicts impending relapse in children with acute lymphoblastic leukemia receiving maintenance chemotherapy. **Am J Clin Pathol**, v. 110, p. 313-320, 1998.

RIMSZA, L.M.; LARSON, R.S.; WINTER, S.S.; FOUKAR, K. Benign hematogone-rich lymphoid proliferations can be distinguished from B-lineage acute lymphoblastic leukemia by integration of morphology, immunophenotype, adhesion molecule expression and architectural features. **Am J Clin Pathol**, v. 114, n. 1, p. 66-75, 2000.

RIMSZA, L.M.; DOUGLAS, V.K.; TIGHE, P.; SAXONHOUSE, M.A. Benign B-cell precursors (hematogones) are the predominant lymphoid population in the bone marrow of preterm infants. **Biol Neonate**, v. 86, p. 247-253, 2004.

ROGUEDAS AM, WATIER H, PAINTAUD G, DE MURET A, VAILLANT L, MACHET L. Intralesional therapy with anti-CD20 monoclonal antibody rituximab: local and systemic efficacy in primary cutaneous B-cell lymphoma. **Br J Dermatol**, v. 152, n. 3,

p. 541-544, 2005.

ROSSI, M.I.; YOKOTA, T.; MEDINA, K.L.; GARRETT, K.P. B lymphopoiesis is active throughout human life, but there are developmental age-related changes. *Blood*, v. 101, n. 2, p. 576-584, 2003.

ROTHER, G.; SCHMITZ, G.; ADORF, D.; BARLAGE, S. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*, v. 10, p. 877-895, 1996.

RUIZ-ARGUELLES, A.; DUQUE, R.E.; ORFAO, A. Report on the first latin American consensus conference for flow cytometric immunophenotyping of leukemia. *Cytometry*, v. 34, p. 39-42, 1998.

RYAN, D.; KOSOVER, S.; MITCHELL, S.; FRANTZ, C.; Subpopulations of common acute lymphoblastic leukemia antigen-positive lymphoid cells in normal bone marrow identified by hematopoietic differentiation antigens. *Blood*, v. 68, n. 2, p. 417-425, 1986.

RYAN, D.H.; CHAPPLE, C.W.; STUART, A.; KOSOVER, A.A. Phenotypic similarities and differences between CALLA-positive acute lymphoblastic leukemia cells and normal marrow CALLA-positive B cell precursors. *Blood*, v. 70, n. 3, p. 814-821, 1987.

SILVA, T.L.; REIS, A.; HEWITT, C.; ROSEIRO, J.C. Citometria de fluxo – Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. Boletim de biotecnologia – 2004. Disponível em: URL: <http://dequim.ist.utl.pt/bbio/77/pdf/citometria2.pdf>

STEKHOVEN, J.H.; LANGENHUYSEN, C.A.; BAKKERN, J.A.; HOLLAND, R. Morphology and incidence of the “posttherapeutic lymphoid cell” in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol.*, v. 124, n. 1, p. 46-52, 1986.

STELZER, G.T.; MARTI, G.; HURLEY, A.; MCCOY, P.Jr. U.S.-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by

flow cytometry: Standardization and validation of laboratory procedures. **Cytometry**, v. 30, p. 214-230, 1997.

UCKUN, F.M.; LEDRETTTER,; J.A. Immunobiologic differences between normal and leucemic human B-cell precursor. **Immunology**, v. 85, p. 8603-8607, 1988.

VAN EYS, J.; PULLEN, J.; HEAD, D.; BOYETT, J. The French-American-British (FAB) classification of leukemia. The Pediatric Oncology Group experience with lymphocytic leukemia. **Cancer**, v. 57, n. 5, p. 1046-1051, 1986.

VECCHIO, L.; BRANDO, B.; LANZA, F. ; ORTOLANI, C. Recommended reporting format for flow cytometry diagnosis of acute leukemia. **Haematologica**, v. 89, p. 594-598, 2004.

VELANGI, M.R.; REID, M.M.; BOWN, N.; JACKSON, G.H. Acute lymphoblastic leukaemia of the subtype in adults in the Northern health region of England 1983-99. **J Clin Pathol**, v. 55, p. 591-595, 2002.

VIDRIALES,M.B.; PÉREZ,J.J.; LÓPEZ-BERGES, M.C.; GUTIÉRREZ, N. Inmunofenotipo del linfoblasto normal y patológico y sus implicación de enfermedad residual mínima em la leucemia aguda linfoblástica (LAL) del adulto **Haematologica**, v. 87, p. 262-267, 2002.

VOGEL, P.; ERF, P.V.; ROSENTHAL, N. Hematological observations on bone marrow obtained by sternal puncture. **Am J Clin Pathol**, v. 7, p. 436-447, 1937.

WELLS, D.A.; SALE, G.E.; SHULMAN, H.M.; MYERSON, D. Multidimensional flow cytometry of marrow can differentiate leukemic from normal lymphoblasts and myeloblast after chemotherapy and bone marrow transplantation. **Am J Clin Pathol**, v. 110, p. 84-94, 1998.

WONG, K.F.; MA, S.K.; CHAN, J.K.; CHUNG, J.S. Leishman's stain. A Romanowsky stain suboptimal for demonstration of Auer rods. **Am J Hematol**,v. 45, n. 3, p. 275-276, 1994.

ANEXOS

ANEXO A – Lista geral de identificação do grupo controle.

CASO	NOME	IDADE	SEXO	DIAGNÓSTICO
1	RBSC	2 anos	F	Calazar
2	AJM	3 anos	M	Anemia ferropênica
3	FRS	7 anos	F	Anemia ferropênica
4	BJMS	3 anos	F	Púrpura trombocitopênica idiopática
5	RNAJR	29 dias	F	Doença de Gauchet
6	FRS	10 anos	M	Anemia ferropênica
7	FDAO	6 anos	M	Calazar
8	IZT	5 anos	M	Calazar
9	ESBL	4 anos	F	Púrpura trombocitopênica idiopática
10	PLS	4 anos	F	Tuberculose
11	JPPS	1 ano	M	Septicemia
12	MNMGFS	2 anos	M	Anemia ferropênica
13	VCFS	9 meses	F	Calazar
14	KJOR	6 anos	F	Púrpura trombocitopênica idiopática
15	LFFS	9 anos	M	Hidronefrose
16	MASL	3 anos	M	Púrpura trombocitopênica idiopática
17	PWMA	1 ano	M	Virose
18	SSS	6 anos	F	Calazar
19	MNESS	8 meses	F	Calazar
20	CBA	6 anos	F	Septicemia
21	ANN	11 anos	F	Linfocitose assintomática
22	ELP	2 anos	M	Anemia ferropênica
23	RSN	9 anos	M	Síndrome genética a esclarecer
24	JAFQJ	9 meses	M	Leucopenia febril
25	JASC	11 anos	M	Anemia ferropênica
26	RNMCG	24 dias	M	Calazar
27	CILS	5 anos	F	Anemia ferropênica
28	JRA	5 anos	M	Anemia ferropênica
29	PHSS	5 anos	M	Virose
30	LSP	1 ano	F	Calazar
31	AECN	15 anos	M	Anemia ferropênica
32	BH	7 anos	F	Calazar
33	MLSS	2 anos	F	Anemia ferropênica
34	JWN	10 anos	M	Púrpura trombocitopênica idiopática
35	RSF	12 anos	M	Anemia ferropênica
36	AJS	11 anos	F	Púrpura trombocitopênica idiopática

Anexo B – Lista geral de identificação do grupo de pacientes portadores de leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B.

CASO	NOME	IDADE	SEXO	DIAGNÓSTICO
1	AKCS	1 ano	F	LLA-L1
2	TSV	2 anos	F	LLA-L1
3	BDCN	1 ano	F	LLA-L1
4	FMLC	6 anos	M	LLA-L2
5	FAGL	16 anos	M	LLA-L1
6	GBS	11 anos	M	LLA-L1
7	HNS	11 anos	M	LLA-L1
8	JCBA	6 anos	M	LLA-L1
9	JANC	7 anos	F	LLA-L2
10	GSF	11 anos	M	LLA-L2
11	RXR	14 anos	M	LLA-L1
12	GPST	3 anos	F	LLA-L1
13	AAMN	9 anos	M	LLA-L2
14	CSS	17 anos	M	LLA-L1
15	SGA	5 anos	M	LLA-L1
16	LHSB	2 anos	M	LLA-L2
17	GSC	4 anos	M	LLA-L1
18	DFCB	5 anos	M	LLA-L1
19	FDLS	4 meses	M	LLA-L1
20	CELS	4 anos	F	LLA-L2
21	VRS	10 anos	F	LLA-L1
22	SS	6 anos	F	LLA-L2
23	LFLS	10 anos	M	LLA-L2
24	AAN	5 meses	F	LLA-L1
25	FDML	6 anos	M	LLA-L1
26	JHA	17 anos	M	LLA-L1
27	EMS	5 anos	M	LLA-L1
28	JKFS	2 anos	M	LLA-L1
29	RSS	6 anos	F	LLA-L2
30	TLS	4 anos	F	LLA-L1
31	KOS	5 anos	M	LLA-L2
32	SLC	3 anos	F	LLA-L1
33	MIML	4 anos	F	LLA-L2
34	MPA	14 anos	M	LLA-L1
35	GGVP	1 ano	M	LLA-L1
36	HKS	6 anos	M	LLA-L1
37	JSS	8 anos	F	LLA-L2
38	GCSS	14 anos	F	LLA-L1
39	ACC	3 anos	F	LLA-L1

Anexo C – Análise citológica das medulas ósseas do pacientes do grupo controle.

Amostra	Contagem diferencial						Celularidade
	SE (%)	SG (%)	SL (%)	SM (%)	HG (%)	BL (%)	
01	42	51	5	0	1	1	Normocelular
02	21	69	8	2	0	0	Normocelular
03	20	56	18	2	0	4	Normocelular
04	16	57	23	1	1	2	Normocelular
05	22	50	15	4	9	0	Normocelular
06	24	60	11	1	1	3	Normocelular
07	24	72	4	0	0	0	Normocelular
08	18	53	20	0	8	1	Normocelular
09	16	59	20	3	0	2	Normocelular
10	28	42	19	0	10	1	Normocelular
11	24	61	11	2	1	1	Normocelular
12	19	53	24	0	3	1	Normocelular
13	31	60	8	1	0	0	Normocelular
14	22	66	6	1	4	1	Normocelular
15	40	50	8	1	0	1	Normocelular
16	27	59	13	0	0	1	Normocelular
17	35	61	3	0	0	1	Normocelular
18	32	49	13	2	4	0	Normocelular
19	27	60	6	4	0	3	Normocelular
20	24	63	12	0	0	1	Normocelular
21	26	55	15	0	3	1	Normocelular
22	19	72	4	2	0	3	Normocelular
23	23	54	17	1	3	2	Normocelular
24	21	64	13	0	1	1	Normocelular
25	16	75	7	0	2	0	Normocelular
26	55	45	3	1	0	1	Normocelular
27	8	40	42	2	7	1	Normocelular
28	17	60	20	2	0	1	Normocelular
29	14	71	13	2	0	0	Normocelular
30	17	70	10	3	0	0	Normocelular
31	14	69	16	0	0	1	Normocelular
32	19	59	18	0	3	1	Normocelular
33	21	57	16	1	4	1	Normocelular
34	20	56	15	2	6	1	Normocelular
35	50	44	5	0	1	0	Normocelular
36	19	60	18	0	3	0	Normocelular

Legenda: SE = setor eritróide, SG = setor granulocítico, SL = setor linfocítico, SM = setor monocítico, HG = hematogônias e BL = blastos

Anexo D – Análise citológica das medulas ósseas dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B.

Amostra	Contagem diferencial e estudo citoquímico				
	BL (%)	PAS	Peroxidase e PS	Outras Citoquímicas	Celularidade
01	87	Positiva	Negativa	Negativa	Normocelular
02	90	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
03	100	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
04	89	Negativa	Negativa	Negativa	Hiper celular
05	87	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
06	95	Negativa	Negativa	Negativa	Normocelular
07	93	Negativa	Negativa	Negativa	Hiper celular
08	85	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
09	95	Negativa	Negativa	Negativa	Hiper celular
10	92	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
11	86	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
12	88	Negativa	Negativa	Negativa	Normocelular
13	75	Negativa	Negativa	Negativa	Normocelular
14	89	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
15	99	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
16	99	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
17	100	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
18	84	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
19	95	Negativa	Negativa	Negativa	Normocelular
20	95	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
21	91	Negativa	Negativa	Negativa	Normocelular
22	89	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
23	86	Negativa	Negativa	Negativa	Hiper celular
24	80	Negativa	Negativa	Negativa	Hiper celular
25	98	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
26	87	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
27	93	Negativa	Negativa	Negativa	Hiper celular
28	90	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
29	90	Negativa	Negativa	Negativa	Normocelular
30	100	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
31	75	Negativa	Negativa	Negativa	Normocelular
32	98	Negativa	Negativa	Negativa	Hiper celular
33	96	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
34	87	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
35	89	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
36	87	Negativa	Negativa	Negativa	Hiper celular
37	98	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular
38	99	Positiva	Negativa	Negativa	Normocelular
39	85	Positiva	Negativa	Negativa	Hiper celular

Legenda: PAS = reação citoquímica para o ácido periódico de Schiff, BL = blastos, PS = Preto de Sudan e FAB = classificação FAB

Anexo E – Análise imunofenotípica das medulas ósseas dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B.

Amostra	FAB	Estágio maturativo Grupo EGIL
01	LLA-L2	LLA pre-B
02	LLA-L1	LLA pre-B
03	LLA-L1	LLA pre-B
04	LLA-L2	LLA pre-B
05	LLA-L1	LLA comum
06	LLA-L1	LLA comum
07	LLA-L1	LLA pre-B
08	LLA-L2	LLA comum
09	LLA-L1	LLA comum
10	LLA-L1	LLA comum
11	LLA-L2	LLA comum
12	LLA-L1	LLA comum
13	LLA-L1	LLA comum
14	LLA-L3	LLA B madura
15	LLA-L2	LLA comum
16	LLA-L1	LLA comum
17	LLA-L1	LLA comum
18	LLA-L1	LLA pre-B
19	LLA-L1	LLA pre-B
20	LLA-L2	LLA comum
21	LLA-L1	LLA comum
22	LLA-L1	LLA pre-B
23	LLA-L1	LLA pre-B
24	LLA-L1	LLA comum
25	LLA-L2	LLA pre-B
26	LLA-L1	LLA pre-B
27	LLA-L1	LLA comum
28	LLA-L1	LLA comum
29	LLA-L2	LLA pre-B
30	LLA-L1	LLA comum
31	LLA-L1	LLA pre-B
32	LLA-L1	LLA comum
33	LLA-L2	LLA pre-B
34	LLA-L1	LLA comum
35	LLA-L3	LLA B madura
36	LLA-L1	LLA pre-B
37	LLA-L1	LLA pre-B
38	LLA-L1	LLA comum
39	LLA-L1	LLA pre-B

Legenda: PAS = reação citoquímica para o ácido periódico de Schiff, BL = blastos, PS = Preto de Sudan e FAB = classificação FAB

Anexo F – Solução de lise para hemácias.

NH ₄ Cl.....	0,829g
NaHCO ₃	0,084g
E.D.T.A.dissódico.....	3,7mg
MilliQ qsp.....	100ml
Ajuste do pH para 7,3	

Fonte: ROTHE, 1996

Anexo G – Solução de tampão de lavagem.

NaCl.....	0,82g
KCl.....	0,2g
KH ₂ PO ₄	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,13g
MilliQ qsp.....	1.000ml
Ajuste do pH para 7,3	

Fonte: ROTHE, 1996

Anexo H – Solução PBS-Azida-BSA.

PBS10x.....	100ml
EDTA.....	500mg
Azida.....	2g
BSA.....	20g
MilliQqsp.....	1000ml
Ajuste do pH para 7,3	

Fonte: ROTHE, 1996

Anexo I – Solução de Paraformaldeído 1%.

Paraformaldeído.....	1g
PBS 10x.....	10ml
MilliQ qsp.....	100ml
Ajuste do pH para 7,3	

Fonte: ROTHE, 1996