

LIDUINA FERREIRO SANTANA



SUDAN BLACK-B E ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF (P/S) NO DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL E PROGNÓSTICO DAS LEUCEMIAS AGUDAS.

Trabalho apresentado como requisito
final ao curso de Especialização em
Hematologia e Hemoterapia.
Convênio MEC/IBID III/UPG.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FORTALEZA - CEARÁ

AGRADECIMENTOS:

Ao Dr. José Murilo Martins e a Dra. Maria da Silva Pitombeira o reconhecimento sincero pela orientação e o incentivo na execução deste trabalho.

A Dra. Maria Neuman M. A. Cunha pela preciosa orientação técnica,

A Dra. Elsie Sobreira Muniz pela valiosa contribuição na revisão dos prontuários.

Ao Prof. Roberto Claudio F. Bezerra pelo dedicado trabalho de planejamento estatístico.

A Srta. Norma de Carvalho Linhares pela excelente ajuda na pesquisa bibliográfica.

A todos os professores do Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia pelos ensinamentos proporcionados durante a realização deste curso.

AOS MEUS PAIS

MEUS IRMÃOS

EDSON SEABRA

ANDERSON

Í N D I C E

- 1 - INTRODUÇÃO**
- 2 - MATERIAL E MÉTODOS**
- 3 - RESULTADOS**
- 4 - DISCUSSÃO**
- 5 - CONCLUSÃO**
- 6 - SUMMARY**
- 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

SUDAN BLACK-B E ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF (PAS) NO DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL E PROGNÓSTICO DAS LEUCEMIAS AGUDAS.

LIDUINA RIBEIRO SANTANA *

RESUMO

A importância do Sudan black - B e do ácido periódico de Schiff (PAS) no diagnóstico diferencial das leucemias agudas, foi avaliada em 69 pacientes diagnosticados no Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Prof. Walter Cantídeo da Universidade Federal do Ceará. O diagnóstico morfológico efetuado em duas ocasiões: diagnóstico de terapêutica e diagnóstico de revisão, foi comparado com o diagnóstico citoquímico. Os índices de concordância foram respectivamente de 96% e 94%, sendo estatisticamente semelhantes.

A positividade do PAS na leucemia linfóide aguda (LLA) foi correlacionada ao sexo, idade e sobrevida dos pacientes. Não foi encontrada significância estatística com nenhuma dessas variáveis. A reação do PAS não demonstrou ser de utilidade no diagnóstico diferencial das leucemias agudas e sua reatividade não foi considerada como um importante fator de prognóstico.

1 - INTRODUÇÃO

O emprego das reações citoquímicas e a sua utilidade no diagnóstico diferencial das leucemias agudas, tem sido objeto de muitos trabalhos (2-6-19-20-23).

Hayhoe e colaboradores (14) publicaram uma monografia na qual concluíram, a partir de um estudo de 140 casos, que a combinação de critérios citomorfológicos com reações citoquímicas, conduziriam a um diagnóstico menos subjetivo do tipo celular, na maioria dos casos de leucemias agudas. Posteriormente surgiram novos trabalhos (4-26-31), explorando várias técnicas histoquímicas, tentando demonstrar componentes celulares característicos das células primitivas.

*Farmaceutica Bioquímica do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Ceará e aluna do curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia.

Em 1976, o grupo cooperativo Francês - Americano - Britânico (FAB) (5), propôs uma classificação das leucemias agudas baseada nos critérios morfológicos e citoquímicos das células blásticas, com a finalidade de uniformizar um sistema de classificação e nomenclatura dessas leucemias. Na ocasião foram utilizadas diversas reações citoquímicas. A reação da mieloperoxidase ou alternativamente o Sudan black - B, esterases e a reação do PAS foram de especial importância. Outros estudos (10) tiveram por finalidade, verificar a utilidade desta classificação em avaliar a resposta terapêutica e o prognóstico.

A comparação entre o diagnóstico morfológico e o diagnóstico citoquímico (4,26), tem possibilitado uma redução nos resultados equivocados. O considerável aumento da identificação celular, tem proporcionado a escolha da terapêutica mais apropriada.

O Sudan black - B e o ácido periódico de Schiff (PAS) são as reações citoquímicas mais usadas rotineiramente para a diferenciação das leucemias agudas. O Sudan black - B tem por finalidade evidenciar a presença de lipídeos celulares e tissulares (1-8-17-20). Muitos hematologistas (12,20) tem procurado demonstrar o comportamento dos leucócitos normais e leucêmicos diante desta reação. Existe uma unânime concordância de que a maioria das células blásticas leucêmicas, de origem mielóide, são sudanófilas. Ao contrário, os blastos leucêmicos de origem linfóide, apresentam pequena ou, o que é mais frequente, nenhuma positividade frente a esta reação.

A reação do ácido periódico de Schiff (PAS) evidencia a presença, no citoplasma, de carboidratos (como glicogênio), mucopolissacarídeos, mucoproteínas, glicoproteínas e glicolipídeos (8-17-20). A aplicação desta técnica em hematologia, caracteriza a presença das substâncias acima referidas nas diversas linhagens leucocitárias, como também suas alterações em consequência de diversos estados patológicos.

Os blastos da leucemia linfóide aguda, geralmente apresentam um variado grau de atividade do PAS, com a presença de grânulos de va-

rios tamanhos (finos, grossos ou blocos), contrastando com os blastos leucêmicos da linhagem mielóide, cuja positividade limita-se a uma coloração rósea difusa ou raros finos grânulos (20). Trabalhos mais recentes (4, 11), levantaram a questão sobre estes diferentes tipos de positividade nas duas linhagens e conseqüentemente sua utilidade na identificação dos blastos leucêmicos. O uso da reação do PAS na leucemia aguda tem sido avaliado em diferentes trabalhos (14-20-22-24-27), os quais procuram correlacionar tanto a quantidade como a distribuição da positividade desta reação nas leucemias de origem linfóide. Outros (3-9-16-18) tem procurado ligar esta reação a algum valor prognóstico, incluindo a duração da primeira remissão, a sobrevida e a idade do paciente. Os resultados e as conclusões são em geral conflitantes.

A partir destas considerações, planejamos este estudo com os seguintes propósitos: verificar a validade dessas duas reações no diagnóstico diferencial das leucemias agudas; comparar, através dessas duas técnicas, o diagnóstico citoquímico com o diagnóstico morfológico; investigar um possível correlacionamento entre a intensidade da reação do PAS e o sexo, a idade e a sobrevida dos pacientes na leucemia linfóide aguda.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

O material estudado consistiu de esfregaços da medula óssea de 69 pacientes, de ambos os sexos, com leucemias agudas, diagnosticados no Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Prof. Walter Cantídeo da Universidade Federal do Ceará, no período de janeiro de 1983 a dezembro de 1985.

Todas as aspirações medulares foram realizadas ao nível do manúbrio, antes do início da terapêutica.

As lâminas coradas pela citoquímica, foram interpretadas sem o conhecimento prévio do diagnóstico morfológico.

O diagnóstico morfológico inicial - diagnóstico de terapêutica - foi recentemente revisto pelo mesmo examinador, que emitiu um segundo

laudo diagnóstico de revisão (7). Ambos os diagnósticos, baseados na classificação FAB foram comparados com o diagnóstico citoquímico.

As reações empregadas incluíram o Sudan black - B e o ácido periódico de Schiff (PAS). A reação do Sudan black - B foi executada usando o método recomendado por Sheehan e Storey (28,29). Após os esfregaços serem fixados com vapor de formaldeído, foram corados pela solução do Sudan por 1 hora. As lâminas depois de imersas em etanol a 70% para remoção do excesso de corante, foram contracoradas pelo Giemsa. A positividade desta reação nas células blásticas leucêmicas foi determinada pela contagem de 200 blastos, verificando o percentual de blastos sudanófilos.

A técnica utilizada na reação do ácido periódico de Schiff (PAS) foi a de McManus - Hotchkiss (15,21) modificada por Hayhoe (14). Os esfregaços depois de fixados com formalina a 10% em etanol absoluto, foram lavados em água corrente, cobertos com ácido periódico por 10 minutos, novamente lavados e depois de secos, imersos na fuccina básica de Schiff por 60 minutos. Após lavagens em água sulfurosa por 2 a 3 minutos, foram lavados em água corrente por 5 a 10 minutos e contracorados pela hematoxilina de Carazzi. A positividade do PAS nos blastos leucêmicos, foi avaliada pelo método semi-quantitativo de acordo com Hayhoe e colaboradores (14). Os "scores" nas células blásticas de cada amostra estudada foram dados pela soma de 100 células classificadas individualmente. A reatividade das células variou de 0 a 4+. Em 9 casos, esta reação foi executada utilizando-se o esfregaço já previamente corado pelo método clássico panóptico (May - Grünwald - Giemsa) (13,23).

Os "scores" do PAS na leucemia linfóide aguda foram correlacionados a tres variáveis clínicas: idade, sexo e sobrevida, através do teste exato de Fischer e do teste do χ^2 . A sobrevida foi considerada o tempo entre a consulta inicial e a morte ou o último contato com o paciente.

Foi aplicado o teste de 2 proporções, para verificar, se os índices de concordância das comparações do diagnóstico morfológico com o diagnóstico citoquímico são significativos.

Todas as análises estatísticas foram efetuadas baseadas no $\alpha = 0,05\%$.

3 - RESULTADOS

Dos 69 casos, 40 (58%) eram do sexo masculino e 29 (42%) do sexo feminino, com a idade variando de 6 meses a 79 anos.

Trinta e nove (56,5%) apresentaram positividade com a reação do Sudan black - B, sendo que 36 variaram de 4 a 85%, 1 apresentou 3% de positividade e 2 casos tiveram 2% de positividade. Os 30 casos restantes foram negativos. As células blásticas positivas apresentaram um grau de positividade variável, com raros grânulos espalhados ou uma fraca reação localizada até uma forte positividade local ou por toda a célula.

Os "scores" do PAS nos 69 casos, variaram de 0 a 214. As células blásticas positivas apresentaram uma reatividade variável, com a presença de grânulos interpretados como + a +++, sendo observado em algumas lâminas blocos de material PAS positivo.

A distribuição de frequência dos "scores" do PAS foi correlacionada à positividade do Sudan black - B, ou seja - 36 pacientes Sudan black - B positivos variando de 4 a 85% apresentaram a distribuição de frequência expressa no gráfico 1. Vinte e nove casos (80,5%) apresentaram "scores" abaixo de 50, cinco (14%) tiveram "scores" variando de 50-100 e 2 casos (5,5%) foram fortemente PAS positivos com os "scores" acima de 150. Os dois casos com "scores" elevados apresentaram grânulos de tamanhos variados (+ a ++++), sendo observado em um deles a presença de blocos e numerosos eritroblastos também intensamente PAS positivos.

Os "scores" dos 33 pacientes restantes, ou seja, 30 Sudan black B negativos, 2 casos com 2% de positividade e 1 com 3% de positividade, se encontram no gráfico 2. Em dezenove casos (58%) foram observados "scores" abaixo de 50, sete (21%) tiveram "scores" entre 50 - 100 e 7 (21%) apresentaram "scores" acima de 100.

Os 36 casos com o Sudan black - B positivo variando de 4 a 85%, foram diagnosticados como leucemia mieloide aguda (LMA). Os 33 restantes (30 Sudan black - B negativos, 2 com 2% de positividade e 1 com 3% de positividade), foram diagnosticados como leucemia linfóide aguda (LLA).

As tabelas I e II mostram as comparações entre o diagnóstico citotímico e os dois diagnósticos morfológicos (diagnóstico de terapêutica e diagnóstico de revisão). O índice de concordância entre o diagnóstico citotímico e o diagnóstico de terapêutica foi de 96%. Considerando o diagnóstico morfológico de revisão, obteve-se um índice de concordância de 94%. Comparando os índices de concordância através do teste de 2 proporções (Z), eles foram estatisticamente semelhantes ($Z = 0,427$).

As tabelas III, IV e V referem-se respectivamente às correlações entre a média dos "scores" do PAS e a sobrevida (anos), o sexo e a idade (anos) dos pacientes com leucemia linfóide aguda.

O teste exato de Fischer foi aplicado para verificar a dependência entre o PAS (média dos "scores") e a sobrevida (anos) dos pacientes. O resultado não foi estatisticamente significativo ($P = 0,236$).

Não existiu correlação entre o PAS (média dos "scores"), a idade (anos) e o sexo dos pacientes. Um "score" alto ou baixo do PAS não mostrou correlação com a idade abaixo ou acima de 10 anos ou com o sexo do paciente. Através do teste do X^2 os resultados não foram estatisticamente significantes ($X^2 = 2,34$; $X^2 = 3,03$).

4 - DISCUSSÃO

Stass e colaboradores em recente trabalho (30), levantou a questão sobre a especificidade do Sudan black - B no diagnóstico da leucemia mielóide aguda e numa revisão de 350 pacientes com leucemia linfóide aguda, encontraram 6 pacientes com 5% ou mais de blastos sudanófilos. No nosso estudo, o Sudan black - B foi considerado ser uma reação útil no diagnóstico diferencial das leucemias agudas. Segundo os critérios da classificação FAB (5), quando mais de 3% das células blásticas são Sudan black - B positivas, o paciente é considerado como tendo leucemia mielóide aguda. Baseado neste critério, achamos razoável considerar como leucemia linfóide aguda, os casos que foram Sudan black - B negativos ou que apresentaram 3% ou menos de positividade frente a esta reação.

O Sudan black - B mostrou uma especial importância na distinção entre leucemia mielóide aguda subtipo M1 e leucemia linfóide aguda subtipo L2,

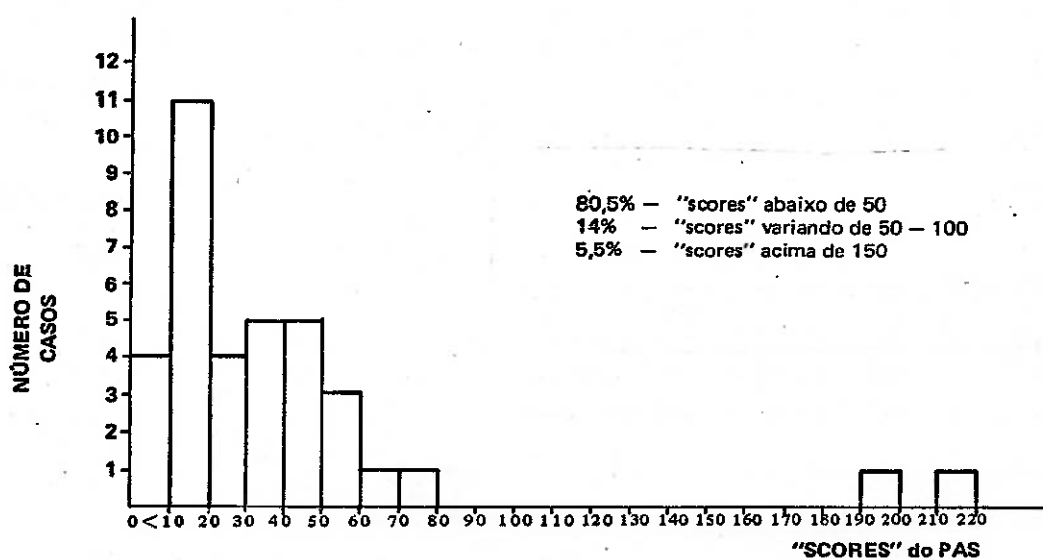


GRÁFICO I

Distribuição de frequência dos
"SCORES" do PAS dos 36 pacientes
com leucemia mieloide aguda.

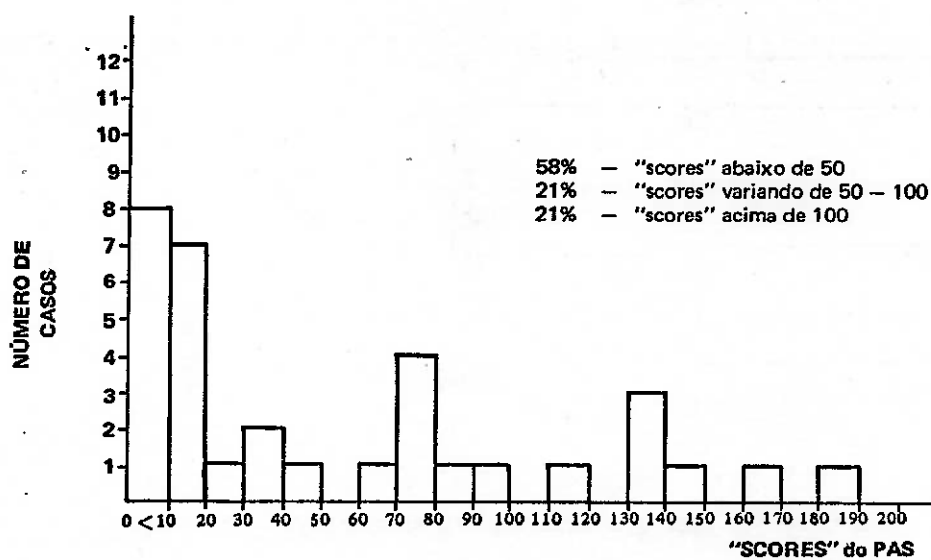


GRÁFICO II

Distribuição de frequência dos
"SCORES" do PAS dos 22 pacientes

TABELA I

COMPARAÇÃO ENTRE O DIAGNÓSTICO CITOQUÍMICO E O DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO
(diagnóstico de Terapêutica)

DIAGNÓSTICO LEUCEMIA	DIAGNÓSTICO CITOQUÍMICO	DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO
LEUCEMIA MIELOÍDE AGUDA (LMA)	36	33
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA)	33	35
INCONCLUSIVO*	—	01
TOTAL	69	69

ÍNDICE DE CONCORDÂNCIA $\frac{66}{69} = 0,96$

* INCONCLUSIVO L2 ou M1

TABELA II

COMPARAÇÃO ENTRE O DIAGNÓSTICO CITOQUÍMICO E O DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO
(diagnóstico de revisão)

DIAGNÓSTICO LEUCEMIA	DIAGNÓSTICO CITOQUÍMICO	DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO
LEUCEMIA MIELOÍDE AGUDA (LMA)	35	39
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA)	32	28
TOTAL*	67	67

ÍNDICE DE CONCORDÂNCIA $\frac{63}{67} = 0,94$

* O diagnóstico morfológico de revisão não foi efetuado em 2 casos por falta de condições dos esfregaços.

TABELA III

**CORRELAÇÃO ENTRE OS "SCORES" DO PAS E A SOBREVIDA (ANOS)
DOS PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA**

SOBREVIDA (ANOS) PAS "MÉDIA DOS SCORES"	≤ 1	> 1	TOTAL
≤ 55	11	3	14
> 55	8	0	8
TOTAL	19	3	22*

$$P = 0,236$$

* Esta correlação foi feita com os pacientes diagnosticados até dezembro de 1984

TABELA IV

**CORRELAÇÃO ENTRE OS "SCORES" DO PAS E O SEXO DOS PACIENTES COM LEUCEMIA
LINFÓIDE AGUDA**

SEXO PAS "MÉDIA DOS SCORES"	♂	♀	TOTAL
≤ 55	10	9	19
> 55	11	3	14
TOTAL	21	12	33

$$X^2 = 2,34$$

TABELA V

**CORRELAÇÃO ENTRE OS "SCORES" DO PAS E A IDADE (ANOS) DOS PACIENTES COM
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA**

IDADE (ANOS) PAS "MÉDIA DO "SCORES"	≤ 10	> 10	TOTAL
≤ 55	4	15	19
> 55	7	7	14
TOTAL	11	22	33

$$X^2 = 3,03$$

tendo sido definido por meio desta, o caso inconclusivo do diagnóstico morfológico.

Ao contrário, a reação do PAS não provou sua utilidade no diagnóstico diferencial das leucemias agudas. Como pôde ser observado (Gráficos 1 e 2), a distribuição de frequência dos "scores" do PAS foram variáveis tanto para a leucemia mielóide como para a leucemia linfóide aguda, não oferecendo desta maneira requisitos para se definir um critério de classificação através desta reação. A presença de grânulos grosseiros ou até mesmo blocos de material PAS positivos, que anteriormente só eram referidos no blastos da leucemia linfóide aguda, tem sido encontrado agora em casos de leucemia mielóide aguda.

Bennett (11), através de cuidadosa revisão, mostrou que aproximadamente 1/3 dos pacientes com leucemia mielóide aguda, 60% daqueles com leucemia mielomonocítica e quase 80% com leucemia monocítica, apresentam positividade frente a reação do PAS, com a presença de anéis e agregados de blocos. Esses dados confirmam os nossos resultados, onde encontramos 4 casos com forte positividade do PAS em casos de leucemia mielóide aguda. Um caso particularmente, Sudan black - B positivo, diagnosticado pela morfologia como M4, chamou atenção pela intensa positividade da reação do PAS, com a presença de blocos na maioria dos blastos. Neste mesmo caso, foram observados numerosos eritroblastos intensamente PAS positivos. Esta intensa positividade nos eritroblastos, levou-nos a pensar numa eritroleucemia (M6), porém, morfológicamente os blastos apresentavam características monocíticas bem nítidas. Entretanto não dispúnhamos de reações citoquímicas adicionais, como as este-rases, o que poderia ter levado a uma elucidação mais clara do diagnóstico.

Partindo dessas considerações, a importância da reação do PAS como uma técnica de identificação da leucemia linfóide aguda precisa ser reavaliada. Sua utilidade torna-se mais efetiva na suspeita de casos de eritroleucemia (M6), como tem sido comprovado por Hayhoe e colaboradores (25), mostrando um número variável de eritroblastos com reação intensa no citoplasma, geralmente granular no precursores e difusa nos elementos mais maduros.

A comparação entre o diagnóstico citoquímico e o diagnóstico morfológico, foi feita somente entre os dois grandes grupos de leucemias agudas. Ficaria difícil confirmar somente através do Sudan black - B, um caso duvidoso entre uma leucemia mielóide aguda (M4/M2), sem o auxílio de uma naftol AS-D acetato (NASDA) com e sem fluoreto (4). Apesar dos índices de concordância terem sido altos com relação aos dois diagnósticos morfológicos, a comparação feita somente entre os 2 grandes grupos de leucemias foi importante, pois a citoquímica confirmou o diagnóstico morfológico e demonstrou sua utilidade maior nos casos duvidosos como M1 ou L2.

Em crianças com leucemia linfóide aguda, a reação do PAS tem sido usada como um fator de prognóstico. A literatura está repleta de resultados controversos. Laurie (18) descreveu em 1968, que uma forte positividade do PAS está correlacionada a uma sobrevida e primeira remissão mais longas, em crianças com leucemia linfóide aguda. Feldges e colaboradores (9), concluíram que a positividade do PAS estava diretamente ligada a duração da primeira remissão. Nossos resultados foram consistentes com os de Bennett (3) e Humphrey (16). Estes autores não encontraram indicação de valor prognósticos na reação do PAS.

5 - CONCLUSÃO

No nosso estudo concluímos que:

- I - A reação do Sudan black - B, é uma reação útil no diagnóstico diferencial dos dois grandes grupos de leucemias agudas.
- II - A reação do Sudan black - B possui uma importância maior nos casos duvidosos entre LLA (L2) e LMA (M1).
- III - A reação do PAS pode apresentar resultados variáveis, tanto para leucemia linfóide aguda, como para leucemia mielóide aguda.
- IV - A reação do PAS não demonstrou sua utilidade no diagnóstico diferencial das leucemias agudas, em especial no que se refere a identificação da leucemia linfóide aguda.

- V - Na diferenciação citoquímica das leucemias agudas, incluindo os subgrupos, é aconselhável o uso de um número maior de reações citoquímicas.
- VI - A reação do PAS não provou ser um importante fator de prognóstico na leucemia linfóide aguda.
- VII - O diagnóstico citoquímico junto ao diagnóstico morfológico, reduz a probabilidade de um diagnóstico equivoco, nos casos de leucemias agudas.

6 - SUMMARY

The importance of Sudan black - B and of periodic acid - Schiff (PAS) in the differential diagnosis of acute leukemia was evaluated in 69 patients diagnosed in the Service of Hematology from the University Hospital Prof. Walter Cantídeo from the Federal University of Ceará. The morphological diagnosis effected in two occasions: therapeutic diagnosis and revision diagnosis was compared with the cytochemical diagnosis. The index of concordance were respectively of 96% and 94%, being estatistically similar.

The positivity of PAS in the acute lymphoide leukemia (ALL), was correlated to sex, age and survival time of patients. No estatistical significance was found in any of these variables. The PAS reaction did not demonstrate utility in the differential diagnosis of acute leukemia and its reactivity was not considered as an important factor of prognostic.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACKERMAN, G.A. A modification of the Sudan black - B technique for the possible cytochemical demonstration of masked lipids. Science, 115: 629-31, 1952.
2. BENNETT, J. M. & DUTCHER, T.F. The cytochemistry of acute leukemia: _____ observations on glycogen and neutral fat in bone marrow aspirates. Blood, 33 : 341-7, 1969.
3. BENNETT, J. M. & HENDERSON, E. S. Lymphoblastic leukemia. Br. Med. J. , 2: 513, 1969.
4. BENNETT, J. M. & REED, C. E. Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. Blood Cells, 1 : 101 - 8, 1975.
5. BENNETT, J. M. ; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A. G. ; GRALNICK, H. R. ; SULTAN, C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. Br. J. Haemat., 33: 451-8, 1976.
6. CATOVSKY, D.; HOFFBRAND, A. V.; IKOKU, N. B.; PETRIE, A.; GALTON, D. A. G. Significance of cell differentiation in acute myeloide leukemia. Blood Cells, 1 : 201 - 11, 1975.
7. CAVALCANTE FILHO, J. Q. Citomorfologia das leucemias agudas. Classificação FAB. 1986. P. Datilografado.
8. CHAVES, P.M. & MONTEIRO MARINHO, H. Citoquímica: suas aplicações em hemocitologia. Separata da Rev. Med. Est. Guanabara, 29 (4): 185 - 219, 1962.
9. FELDGES, A. J.; AUR, R.J.A.; VERZOSA, M.S.; DANIELS, S. Periodic - acid -Schiff reaction, a useful index of duration of complete remission in acute _____ childhood lymphocytic leukemia. Acta Haemat., 52: 8 - 13, 1974.
10. FONN, K.A.; NAIEM, F.; YALE, C.; GALL, R.P. Acute myelogenous leukemia: _____ morphologic classification and response to therapy. Leuk. Res., 3 (3):171-3, 1979.

11. GRALNICK, H.R.; GALTON, D.A.G.; CATOVSKY, D.; SULTAN, C.; BENNET, J. M.
Classification of acute leukemia. Ann. Intern. Med., 87(6): 740 - 53,
1977.
12. HAYHOE, F.G.J. The cytochemical demonstration of lipids in blood and bone
marrow cells. J. Path. Bact., 65: 413 - 21, 1953.
13. HAYHOE, F. G. J.; QUAGLINO, D.; FLEMANS, R.J. Consecutive use of _____
Romanowsky and periodic-acid-Schiff techniques in the study of blood
and bone marrow cells. Br. J. Haemat., 6: 23 - 5, 1960.
14. HAYHOE, F. G. J.; QUAGLINO, D.; DOLL, R. The cytology and cytochemistry of
acute leukaemias: a study of 140 cases. London, Her Majesty's _____
Stationery Office, 1964. 105p. (Medical Research Council Special Report
Series, 304).
15. HOTCHKISS, R. D. A microchemical reaction resulting in the staining of _____
polysaccharide. Structures in fixed tissue preparations. Arch Biochem.,
16: 131-41, 1948.
16. HUMPHREY, G. B.; NESBIT, M. E.; BRUNNING, R. D. Prognostic value of the _____
periodic-acid-Schiff (PAS) reaction in lymphoblastic leukemia. Am. J.
Clin. Pathol., 61: 393-7, 1974.
17. JAMRA, M. & LORENZI, T. F. Citologia. Citoquímica. In: _____. Leucócitos, leu
cemias, linfomas. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1983. 395p. cap. 2
p. 8 - 18.
18. LAURIE, H.C. Duration of remissions in lymphoblastic leukaemia of childhood.
Br. Med. J., 2 : 95 - 7, 1968.
19. LI, C. Y. Leukemia Cytochemistry, Mayo Clin. Proc., 56: 712 - 3, 1981.
20. LORENZI, T. F. Citoquímica das células do sangue como meio de avaliação e
seguimento dos estados leucêmicos. J. B. M., 2 (11): 1227 - 63, 1965.
21. McMANUS, J. F. A. Histological demonstration of mucin after periodic acid.
Nature (London), 158: 202, 1946.

22. MITUS, W. J.; BERGNA, L. J. MEDNICOFF, I. B.; DAMESHEK, W. Cytochemical studies of glycogen content of lymphocytes in lymphocytic _____ proliferations. Blood, 13: 748 - 56, 1958.
23. QUAGLINO, D. Cytochemical techniques in acute leukaemias. Separata do : Congr. Europ. Soc. Haemat., 7² London, 1959. Proceedings... part II. p. 386 - 9, 1960.
24. QUAGLINO, D. & HAYHOE, F.G.J. Observations on the periodic - acid - Schiff reaction in lymphoproliferative diseases. J. Path. Bact., 78: 521-32 , 1959.
25. QUAGLINO, D. & HAYHOE, F, G. J. Periodic - acid - Schiff positivity in erythroblasts with special reference to Di Guglielmo's syndrome. Br. J. Haemat., 6: 26 - 33, 1960.
26. SHAW, M. T. The cytochemistry of acute leukemia: a diagnostic and _____ prognostic evaluation. Semin. Oncol., 3 (3): 219 - 28, 1976.
27. SHAW, M. T. & ISHMAEL, D. R. Acute lymphocytic leukemia with atypical _____ cytochemical features. Am. J. Clin.Pathol. 63(3): 415 - 20, 1975.
28. SHEEHAN, H. L. The staining of leucocyte granules by Sudan black-B. J. Path. Bact. 49: 580 - 81, 1939.
29. SHEEHAN, H. L. & STOREY, G. W. An improved method of staining leucocyte _____ granulos with Sudan black - B. J. Path. Bact., 59: 336 - 7, 1947.
30. STASS, S. A.; PUI, C - H.; MELVIM. S.; ROVIGATTI, U.; WILLIAMS, D.; _____ MOTRONI, T.; KALWINSKY, D.; DAHS, G. V. Sudan black - B positive acute lymphoblastic leukaemia. Br. J. Haemat., 57 (3): 413 - 21, 1984.
31. YAM, L. T.; LI, C. Y.; CROSBY, W. H. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am. J. Clin Pathol., 55: 55: 283 - 90, 1971.