

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ

ESTUDO IMUNOFENOTÍPICO POR CTOMETRIA DE FLUXO DAS
LEUCEMIAS AGUDAS EM CRIANÇAS DO HOSPITAL ALBERT SABIN

Mônica Magalhães Coutinho Dantas

Fortaleza-Ceará
2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ - HEMOCE

Mônica Magalhães Coutinho Dantas

**Farmacêutica Bioquímica, aluna do XIV Curso de
Especialização em Hematologia e Hemoterapia**

**ESTUDO IMUNOFENOTÍPICO POR CITOMETRIA DE FLUXO
DAS LEUCEMIAS AGUDAS EM CRIANÇAS
DO HOSPITAL ALBERT SABIN**

**Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia
da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de
Especialista.**

**Fortaleza-Ceará
2000**

ESTUDO IMUNOFENOTÍPICO POR CITOMETRIA DE FLUXO
DAS LEUCEMIAS AGUDAS EM CRIANÇAS
DO HOSPITAL ALBERT SABIN

Mônica Magalhães Coutinho Dantas

ORIENTADORA:

ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES

Prof^a Adjunta do Departamento de Análises Clínica e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia - Centro de Ciências da Saúde / UFC

AGRADECIMENTOS

- À Dra Romélia Pinheiro Gonçalves pela orientação dada e apoio recebido na execução deste trabalho.
- Ao Laboratório Clementino Fraga por proporcionar condições para a realização deste trabalho.
- Ao Dr. Ajax pela sua colaboração na execução final deste trabalho.
- Ao Dr. Herivaldo por sua ajuda e disponibilidade.
- Aos funcionários do Hospital Albert Sabin que contribuíram indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é essencial para uma melhor caracterização das leucemias agudas já que permite distinguir com grande confiabilidade a LMA da LLA e ainda definir os subtipos específicos da LLA de linhagem B e T.

O presente trabalho tem como objetivo o estudo imunofenotípico por citometria de fluxo das leucemias agudas em crianças que tiveram a imunofenotipagem solicitada ao laboratório Clementino Fraga, durante o ano de 1999.

A citometria de fluxo foi realizada no citômetro EPICS-PROFILE da Coulter, através da técnica de imunofluorescência direta. Foram estudadas 28 amostras de sangue periférico de crianças provenientes do Hospital Albert Sabim.

Concluímos através da imunofenotipagem por citometria de fluxo que 67,86% dos pacientes eram portadores de leucemia linfóide aguda e 32,14% eram portadores de leucemia mielóide aguda. Quanto aos pacientes portadores de leucemia linfóide aguda 89,47% eram portadores de leucemia linfóide aguda de linhagem B e 10,53% de leucemia linfóide aguda de linhagem T.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO.....	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
RESULTADOS.....	20
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	25
CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

INTRODUÇÃO

1. HEMATOPOESE

A porção celular do sangue é composta de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, essas três linhagens ou séries diferentes de células originam-se de um número muito pequeno de células primordiais pluripotentes. A célula primordial pluripotente tem a capacidade peculiar de auto-renovação e o potencial de crescimento e de diferenciação ao longo das linhagens granulocítica, monocítica, eritróide, megacariocítica e linfóide. Algumas células primordiais se dividem e dão origem à progénie que perde a capacidade de diferenciação e torna-se condicionada (comprometida), a uma linhagem hematopoética específica. Essas células progenitoras condicionadas proliferam e diferenciam-se em células precursoras morfológicamente identificáveis que, a seguir, sofrem maturação final, assumindo funções muito especializadas e perdendo sua capacidade de proliferação. Foram desenvolvidas técnicas que mantêm o crescimento e a diferenciação de células hematopoéticas *in vitro*. Graças ao uso dessas técnicas, colônias hematopoéticas de linhagens mistas e puras foram identificadas e caracterizadas com base nos fatores necessários para o seu crescimento. Essas colônias hematopoéticas são denominadas unidades formadoras de colônias (UFC), sendo o tipo específico de colônia designado por sufixos que indicam os tipos celulares constituintes (Harrisson e col., 1995). A figura 1 fornece um resumo da diferenciação hematopoética.

O órgão central formador das células do sangue é a medula óssea. Nela se localizam as células pluripotentes que estão constantemente produzindo células adultas para serem lançadas na periferia. A medula óssea tem uma estrutura anatômica muito especial, denominada microambiente medular ou estroma medular, que permite a proliferação ou multiplicação das células pluripotentes e, ao mesmo tempo, a diferenciação destas (Lorenzi, 1999).

O microambiente medular é composto de diferentes elementos celulares: células reticulares, adipócitos, células do tecido conjuntivo frouxo e células histiocitárias, e de uma matriz extracelular (ECM). A ECM é constituída de várias substâncias (macromoléculas) secretadas pelas células estromais, que tem duas funções importantes: (1) permitir a fixação das stem-cells trazidas pela circulação periférica ao

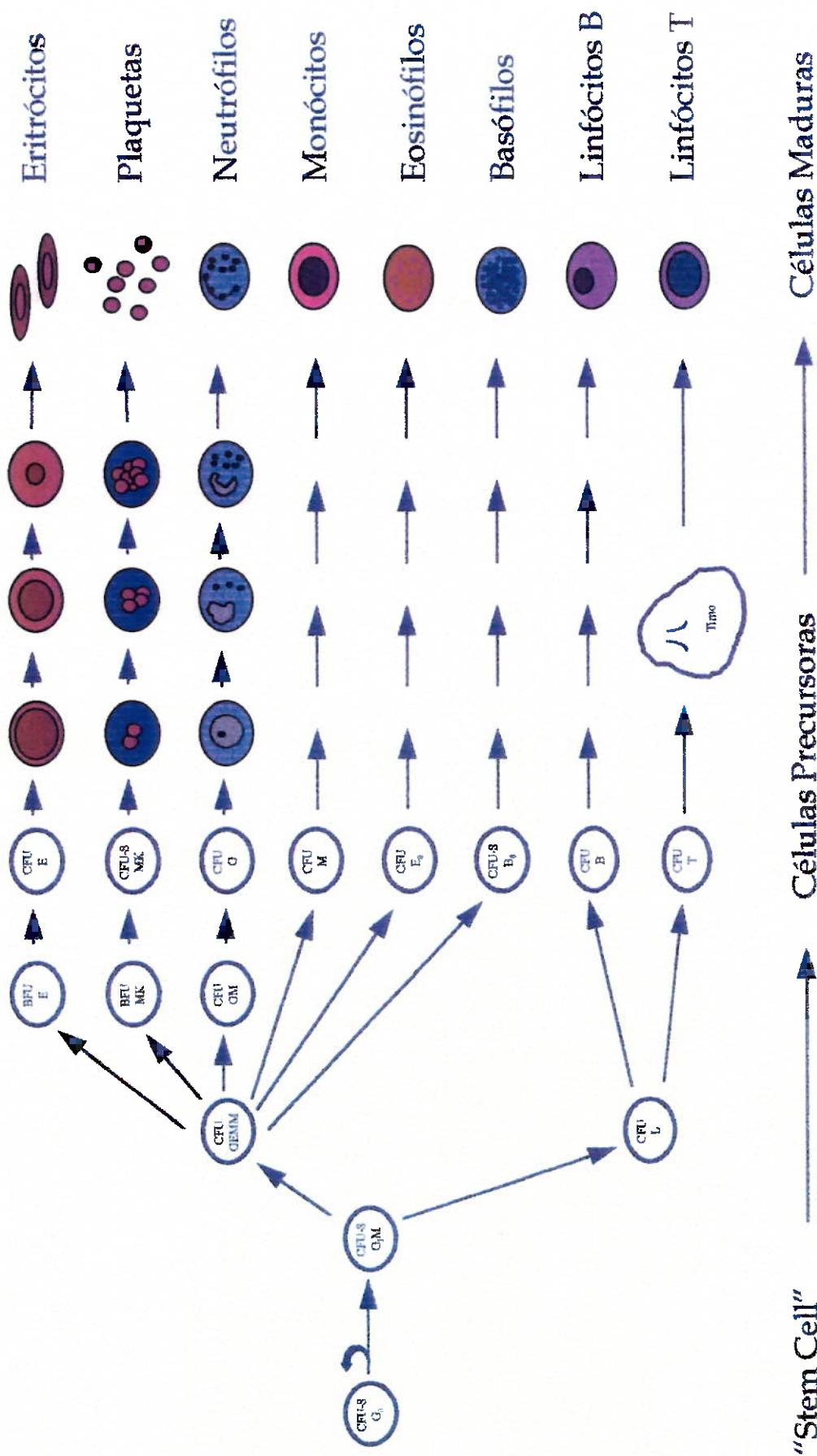


Figura 1. Representação esquemática da hematopoiese.

estroma medular, por meio de seus receptores especiais de membrana (receptores ou moléculas de adesão); (2) propiciar o contato íntimo entre essas células e os fatores de crescimento hematopoéticos secretados pelas células estromais que entram em contato com seus respectivos receptores (R) de membrana (Lorenzi, 1999).

Nesse microambiente há um inter-relacionamento íntimo entre os precursores granulocíticos, eritroblásticos e plaquetários com os elementos estromais. A integridade do estroma permite a manutenção de condições físicas e químicas ideais para que haja proliferação e maturação normais dos precursores. Quando essas condições se alteram, o sangue também se altera, podendo surgir várias patologias (Lorenzi, 1999).

Em uma linhagem hematopoética há o aparecimento de抗ígenos específicos na superfície celular durante o processo de diferenciação e maturação. Isto obedece a uma sequência iniciada com o gene que codifica um determinado抗ígeno. De maneira ordenada, ocorre a determinação da linhagem, rearranjo dos alelos, deleção dos genes dos alelos, deleção dos genes rearranjados porém improdutivos, formação do RNAm, produção do抗ígeno, aparecimento no citoplasma e posterior expressão na superfície celular (Emerson, 1991).

A detecção de抗ígenos de diferenciação celular ou CD (*cluster differentiation*) foi um passo importante para a compreensão dos estágios evolutivos das células sanguíneas, desde as mais imaturas até os elementos completamente diferenciados (Lorenzi, 1999).

As características imunológicas das células leucêmicas não são exclusivas da leucemia, mas, ao contrário, refletem os fenótipos de células normais em estágios de diferenciação distintos. Concomitantemente, torna-se básico o entendimento da expressão dos marcadores imunológicos durante a diferenciação celular, para o uso de dados marcadores na classificação da leucemia (Wintrobe e col, 1998). As figuras 2 e 3 mostram a ontogenia dos linfócitos T e B.

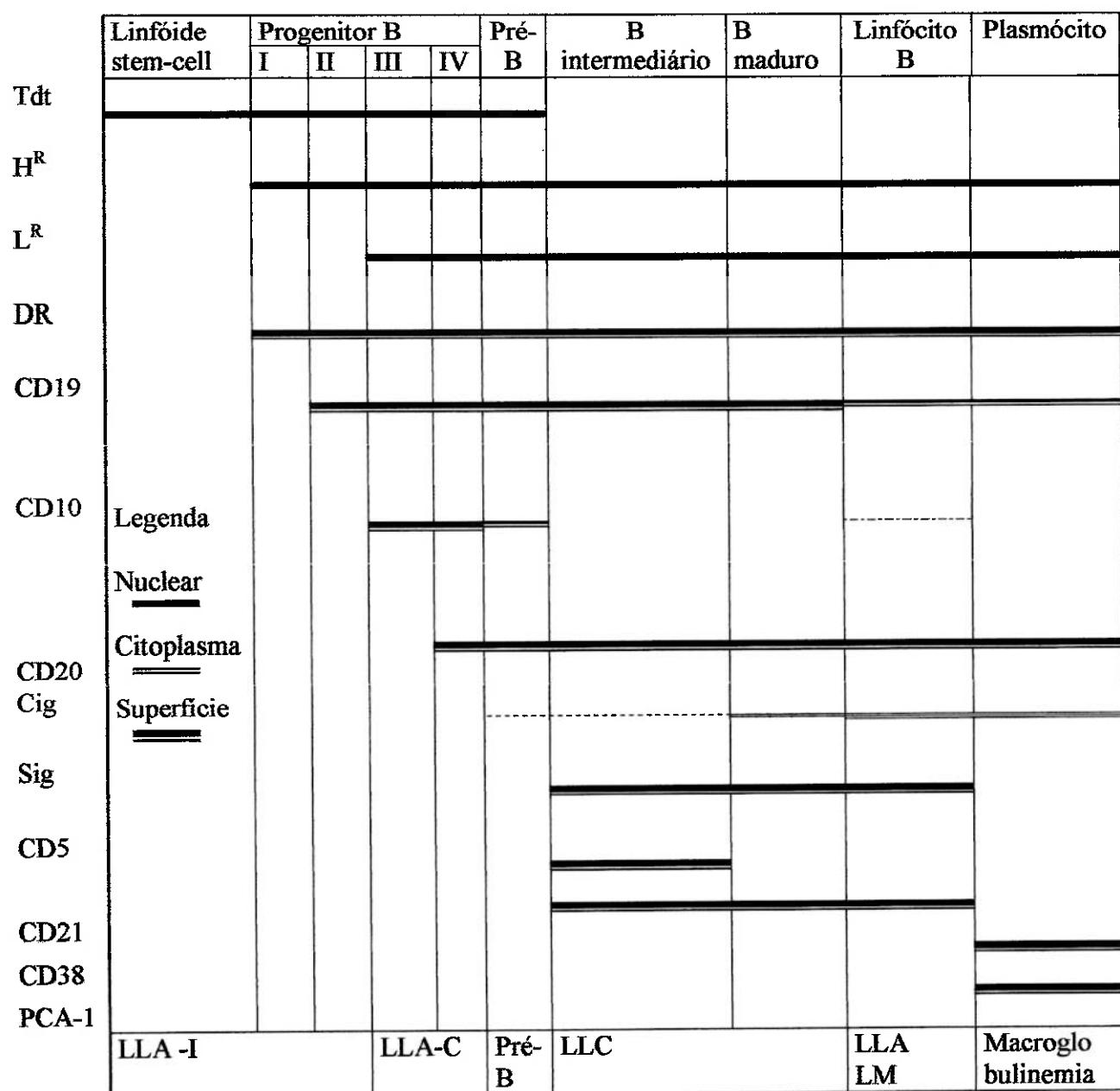
A associação do uso de anticorpos monoclonais, da citometria de fluxo e o aperfeiçoamento dos métodos de coloração imunocitológica levaram a uma melhor caracterização imunofenotípica das células hematopoéticas normais (Drexler e col., 1988).

Figura 2. Principais Características da diferenciação celular das células T

Stem cell Linfóide	protimócito	Timócito comum	Timócito maduro		Linfócito T		Linfócito T ativado	
			Helper	Supr.	Helper	Supr.	Helper	Supr.
TdT								
T _β R								
CD7								
CD5								
CD71								
CD38								
CD1								
CD2								
CD3	Características							
	Nuclear		—					
CD4	Superfície		—					
CD8								
DR								
	LLA -I	LLAPRÉ-T	LLA T e LL		LLC-T		LPCT, LCCT, LTA	

Principais características imunofenotípicas e imunológicas dos estágios de diferenciação do linfócito T e correspondência com as doenças neoplásicas. T_βR = rearranjo do gene do receptor T_β; TdT = desoxinucleotidil transferase terminal; DR = HLA -DR; CD = grupos de diferenciação; LLA = leucemia linfoblástica aguda; LLC = leucemia linfóide crônica; LCCT= leucemia cutânea de células T; LL = linfoma linfoblástico; LPCT = linfoma periférico de células T; LTA = leucemia de células T em adulto/linfoma; LLA- I = leucemia linfóide aguda indiferenciada (Li e col., 1996).

Figura 3. Principais características na diferenciação das células B



Principais características imunofenotípicas e imunológicas dos estágios de diferenciação do linfócito B e correspondência com as doenças neoplásicas. TdT = desoxinucleotidil transferase terminal; H^R = rearranjo do gene de cadeia pesada; DR = HLA-DR; CD = grupos de diferenciação; LLA = leucemia linfoblástica aguda; LLC = leucemia linfóide crônica; LLA-C = leucemia linfóide aguda comum; ML = linfoma maligno; LLA- I = leucemia linfóide aguda indiferenciada (Li e col., 1996).

2. LEUCEMIAS AGUDAS

As leucemias são neoplasias derivadas de células hematopoéticas, que proliferam a princípio na medula óssea, antes de se disseminar para o sangue periférico, baço, linfonodos e, por fim, outros tecidos (Harrison e col., 1995).

Atualmente, as leucemias agudas são definidas como a proliferação clonal de precursores hematopoéticos transformados por eventos genéticos ou por outros fatores predisponentes (Lowenberg e Delwel, 1991; Buccheri e col., 1992). Nas leucemias agudas a transformação maligna pode atingir linhagens celulares em dois estágios diferentes de desenvolvimento hematopoético: a célula multipotente primitiva e a célula precursora mielóide ou linfóide. O estágio de desenvolvimento celular onde essa transformação ocorre parece ter importantes implicações terapêuticas e prognósticas (Buccheri e col., 1992). As leucemias agudas compreendem um grupo heterogêneo de patologias com etiologia, história natural e prognósticos distintos (Bain, 1990).

A causa da leucemia não é conhecida na maioria pacientes, embora tanto os fatores genéticos quanto os ambientais sejam importantes. A leucemia aguda ocorre com frequência aumentada em vários distúrbios congênitos, incluindo as síndromes de Down, Bloom, Klinefelter, Fanconi e Wiskott-Aldrich (Harrison e col., 1995).

Os fatores ambientais também desempenham algum papel na etiologia da leucemia. A exposição à irradiação aumenta o risco de desenvolvimento da LMA (leucemia mielóide aguda) e, possivelmente, da LLA (leucemia linfóide aguda). A exposição a produtos químicos, como o benzeno e outros hidrocarbonetos aromáticos, ou o tratamento com agentes alquilantes e outras drogas quimioterápicas também resulta em incidência aumentada de LMA (Harrison e col., 1995).

Foi estabelecida uma causa viral da leucemia humana apenas para a de células T do adulto (LTA), causada pelo vírus da leucemia de células T humanas tipo I (HTLV-I). O vírus de Epstein-Barr (EBV) tem sido associado a uma forma de LLA (subtipo L3) (Harrison e col., 1995).

Embora afetando todos os grupos etários, a LLA tem sua maior incidência em crianças entre 1 e 5 anos de idade, com um pico por volta dos 3 a 4 anos. Foi observada uma ligeira predominância em homens (57%) em todas as análises demográficas da doença. A LMA exibe um aumento de sua incidência com a idade. A

incidência é inferior a 1 por 100000 por ano para idades abaixo dos 30 anos, até 14 por 100000 por volta dos 75 anos; os homens têm uma incidência maior que as mulheres. A LMA responde por 12% dos casos de leucemia em crianças com menos de 10 anos e 28% entre os 10 e 15 anos; em adultos, a LMA responde por 80% a 90% dos casos de leucemia aguda (wintrobe,1998)

A característica mais proeminente das células neoplásicas na leucemia aguda consiste num defeito de maturação após o nível de mieloblasto ou de promielócito na LMA e ao nível de linfoblasto na LLA. As células leucêmicas em proliferação acumulam-se na medula óssea, suprimindo a hematopoese normal e resultando, por fim, na substituição dos elementos normais. A consequente escassez de progenitores normais propicia o desenvolvimento de anemia, infecções e complicações hemorrágicas que caracterizam a doença. As células leucêmicas proliferam primariamente na medula óssea, circulam no sangue e podem infiltrar-se em outros tecidos, como linfonodos, fígado e baço, pele, gengivas, vísceras e sistema nervoso central (SNC). Embora o diagnóstico de leucemia seja quase sempre estabelecido com base na observação de grandes números de blastos no sangue, a maioria das células leucêmicas é encontrada na medula óssea (Harrison e col.,1995).

O mecanismo da transformação neoplásica que produz leucemia não está bem elucidado, mas envolve uma alteração fundamental do DNA, conferindo características malignas hereditárias à célula transformada e sua descendência. Com o uso de técnicas sensíveis é possível detectar anormalidades citogenéticas clonais na maioria dos pacientes com leucemias agudas e crônicas. A ocorrência de rearranjos cromossômicos nas células leucêmicas pode alterar a estrutura ou a regulação dos oncogenes celulares, produzindo alterações quantitativas ou qualitativa nos produtos gênicos, podendo desempenhar algum papel ao desencadear ou ao manter o estado leucêmico (Harrison e col.,1995).

O diagnóstico de leucemia exige demonstração de células leucêmicas na medula óssea, no sangue periférico ou em tecidos extramedulares. Tipicamente, a medula óssea é hipercelular, com, infiltração monomórfica de blastos leucêmicos e acentuada redução dos elementos medulares normais (Harrison e col.,1995). Atualmente são classificadas de acordo com critérios morfológicos, citoquímicos, imunológicos, citogenéticos ou pela combinação destes (Bain,1990).

Para ter utilidade uma classificação deve ser reproduzível, biologicamente significativa e ter importância clínica. Desta forma, até o momento não existe uma classificação ideal para as leucemias agudas, apesar de inúmeras propostas (Stass, 1987).

A classificação mais amplamente aceita foi proposta por um grupo cooperativo Francês, Americano e Britânico (FAB). Este grupo reuniu-se em 1976, com o objetivo de formular critérios diagnósticos para a classificação morfológica e citoquímica das leucemias sem tratamento prévio. Os seguintes critérios foram introduzidos e padronizados: presença de mais de 30% de células blásticas definiria a leucemia aguda e mais de 3% de células blásticas mieloperoxidase e/ou Sudan black positivas caracterizaria a leucemia aguda de linhagem mielóide (LMA). A ausência de positividade nestas duas provas citoquímicas caracterizaria a leucemia aguda de linhagem linfóide (LLA). Esta classificação difundida a partir de então, procura uniformizar a nomenclatura dos subtipos das leucemias agudas (Bennett e col., 1976).

A classificação FAB ampliada define oito variantes de LMA diferindo com relação à linhagem celular e ao grau de diferenciação. Quatro tipos (M0,M1,M2 e M3) caracterizam-se pela diferenciação granulocítica e diferem entre si em termo da extensão e natureza da maturação. A leucemia M4 está associada à diferenciação granulocítica e monocítica, M5 com diferenciação predominantemente monocítica, M6 com eritroblástica e M7 com aspectos megacariocíticos. A leucemia mieloblastica aguda (M0,M1 e M2) representa aproximadamente 50% de todos os casos de LMA, LMA M4 por 25%, a leucemia promielocítica aguda (M3) por 10%, anemia monocítica (M5a e M5b) por 10%, eritroleucemia aguda (M6) por 5% ou menos, e leucemia megacriocítica aguda por 3% ou menos (Wintrobe e col., 1998).

Apesar dos critérios ultraestruturais geralmente não estarem incorporados na classificação FAB, a leucemia megacriocítica (LMA-M7) foi incluída nesta classificação. Isto se deveu à demonstração de megacarioblastos utilizando-se microscopia eletrônica (morfológica ou citoquímica) ou marcadores imunológicos (Bennett e col., 1985b).

No decorrer dos anos, foram identificados alguns casos de leucemia aguda, que, do ponto de vista citoquímico, poderiam ser classificados como leucemia aguda de linhagem linfóide. Entretanto, com a utilização de anticorpos monoclonais na

identificação de抗ígenos de diferenciação, observou-se a presença de抗ígenos mieloides. Esses casos que não se enquadravam dentro dos critérios para classificação do subtipo mielóide ou linfóide foram reconhecidos, em 1991 pelo grupo FAB, como um outro subtipo designado de leucemia mielóide com diferenciação mínima ou LMA-M0. Esta classificação baseou-se na observação de 3% ou mais de células blásticas positivas para mieloperoxidase em citoquímica ultraestrutural e/ou 20% de células blásticas expressando o抗ígeno CD13 citoplasmático (Bennett e col., 1991). As características de cada subtipo encontram-se na tabela 1.

Corantes citoquímicos são úteis na diferenciação entre LLA e LMA e, são essenciais para a identificação dos subtipos pertencentes a cada um desses grupos principais. O ácido periódico-Schiff (PAS), a peroxidase e Sudan Black são usados na avaliação diagnóstica inicial (Wintrobe, 1998). A mieloperoxidase e o Sudan Black estão primariamente presentes nas células que sofrem diferenciação granulocítica. As células leucêmicas de cerca de metade dos pacientes com LLA reagem com o corante ácido periódico Schiff, revelando inclusões de glicogênio semelhantes a blocos. Os linfoblastos não contêm enzimas lisossômicas granulocíticas ou monocíticas e, por conseguinte, não reagem com corantes citoquímicos para peroxidase, preto de Sudão e esterase inespecífica (Harrison e col., 1995).

De acordo com a mesma classificação (FAB, 1976) as leucemias linfóides agudas (LLA) foram subdivididas em três tipos (Bennett e col., 1976), descritos na tabela 2.

Devem ser tomadas várias precauções na interpretação dos dados da classificação FAB. A primeira delas diz respeito à facilidade com que os linfoblastos são confundidos com mieoloblastos M0 e M1 indiferenciados. Uma diferenciação confiável exige fenotipagem citoquímica e, ocasionalmente imunológica. Um segundo problema é criado pelo fato de que aproximadamente 10% dos pacientes com LLA têm uma população morfológicamente heterogênea de blastos, alguns L1 e outros L2. Uma consideração final é que a concordância entre morfologistas experimentados não é ótima (Wintrobe, 1998).

A imunofenotipagem, determinada com um painel apropriado para células B e T, pode ser importante tanto na confirmação do diagnóstico morfológico quanto na identificação de subtipos específicos dessas linhagens. A imunofenotipagem permite

ainda distinguir com alto grau de confiabilidade a LMA da forma linfóide aguda (Drexler e col., 1988).

Tabela 1. Classificação morfológica das Leucemias Mielóides Agudas

Subtipos morfológicos das leucemias mielóides agudas

Subtipo	Morfologia	Reatividade com colorações ou marcadores especiais		
		Peroxidase ou Black	Ácido Sudan periódico	Marcadores protéicos típicos
M0, indiferenciada	Células primitivas ausência de corantes citoquímicos	—	—	CD34,33,13
M1, LMA sem maturação	Ausência ou pequeno número de grânulos azurófilos	+/-	+/-	CD34,33,13
M2, LMA com maturação	Blastos com grânulos promielocíticos, possível presença de bastonetes de Auer	+++	—	CD34, 33,15,13
M3, leucemia promielocítica	Promielócitos hipergranulares quase sempre com múltiplos bastonetes de Auer por célula	+++	+/-	CD33,13,(HIA-Dr-)
M4, leucemia mielomonocítica aguda	Células de aspecto moncitóide no sangue periférico; o subtipo é M4 com eosinofilia	+/-	—	CD34,33,15,14,13
M5, leucemia monocítica aguda	Indiferenciado; Diferenciado, com 80% de promonócitos e monócitos.	—	+/-	CD33,15,14,13
M6, eritroleucemia aguda	Predomínio de eritroblastos e precursores eritróides acentuadamente displásicos	+/-	+++	CD33 glicoforina
M7, leucemia megariocítica aguda	Blastos indiferenciados que reagem com anticorpos antiplaquetários e que contém peroxidase plaquetária	—	+	CD33,CD41

Tabela 2. Classificação Morfológica (FAB) da Leucemia Linfocítica Aguda

Citologia	L1	L2	L3
Tamanho	Pequenas	grande, heterogênea	grande, homogênea
Cromatina nuclear	Homogênea	heterogênea	Pontilhado homogênea
Forma nuclear	Regular	irregular, fendas	Regular, oval, redondo
Nucléolos	Não visíveis	Visíveis, grandes	Proeminentes
Quantidade de citoplasma	Escasso	variável	Moderadamente abundante
Basofilia do citoplasma	Leve	variável	Intensa
Vacúolos do citoplasma	Variável	variável	Proeminente

Praticamente todas as leucemias linfocíticas de origem celular B expressam CD19, enquanto a maioria das mieloides expressa CD33, as leucemias agudas de ambas as linhagens quase sempre expressam CD34, marcador de células hematopoéticas. As células da LLA-T expressam marcadores de linhagem celular T, como CD2, CD5 ou CD7 (Harrison e col., 1995). As tabelas 3 e 4 mostram a correspondência entre a classificação FAB e imunofenotipagem de linhagem B e T respectivamente.

Tabela 3. Classificação imunológica da leucemia linfóide aguda de linhagem B e a correspondência com a classificação FAB. +, positivo; -, negativo; +/-, positivo ou negativo.

LLA	Marcadores							
	Linhagem B	Tdt	HLA-DR	CD19	CD-10	IgS	IgC	FAB
Céls B precursoras	+	+	+	-	-	-	-	L1 ou L2
Comum	+	+	+	+	-	-	-	L1 ou L2
Pré-B	+	+	+	+	-	+	+	L1 ou L2
Céls B	-	+	+	+/	+/	+	+	L3

Tabela 4. Classificação imunológica da leucemia linfóide aguda de linhagem T e a correspondência com a classificação FAB. +, positivo; -, negativo; +/-, positivo ou negativo.

LLA	Marcadores				
	Linhagem T	Tdt	CD-7	CD-2	FAB
Céls T precursoras	+	+	-		L1 ou L2
Céls T	+	+	+		L1 ou L2

Estudos recentes têm demonstrado que a fidelidade de linhagem (mielóide ou linfóide) não é preservada em muitos casos de leucemia aguda. A heterogeneidade de linhagem tem sido proposta empregando estudos morfológicos, citogenéticos, imunológicos e moleculares. A leucemia aguda com fenótipo e genótipo de mais de uma linhagem hematopoética, leucemia bifenotípica, é de difícil classificação. Pode ter com origem a proliferação clonal de células mais primitivas, as "stem cell" multipotentes. Ainda há controvérsias quanto a incidência, sua importância clínica e o seu prognóstico (Buccheri e col., 1992).

Com desenvolvimento da imunocitoquímica, da citogenética e o estabelecimento dos sub-tipos de leucemias pelo critério FAB foi proposta uma nova classificação englobando a morfologia, a imunofenotipagem e a citogenética, denominada classificação MIC. Em 1985, na Bélgica, foi realizado o primeiro conclave com o fito de classificar a LLA (First MIC Cooperative Study Group, 1986) e 2 anos mais tardes esse mesmo grupo classificou a LMA (Second MIC Cooperative Study Group, 1988). O encontro frequente de certas anormalidades citogenéticas mostrou ter significância prognóstica. Por exemplo na linhagem mielóide as translocações fenótipo-específicas incluem a M2 t(8;21), M3 t(15;17), M4 E₀/inv (16), e estão associadas com um melhor prognóstico, em contrapartida a t(9;22), e -5(ou-5q), -7(ou-7q) e t(4;11) tem prognóstico mais reservado. Na LLA da infância, a análise cariotípica mostrou-se de grande valor prognóstico. Por exemplo: cariótipos hiperdiplopoides (mais de 50 cromossomos) têm melhor resposta ao tratamento. Por outro lado os pacientes com cariótipos pseudodiplopoides têm resposta terapêutica mais pobre. Certas anormalidades citogenéticas na LLA, como a t(9;22) e t(11;14) estão associadas com mau prognóstico. Na LLA, translocações fenótipo-específica incluem

a t(8;14) na leucemia de células B; t(11;14) na leucemia de células T e a t(1;19) na leucemia de células pré-B. A execução laboriosa dos testes necessários para essa classificação dificulta o seu uso rotineiro (Tese de mestrado Mota, A).

3. IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

Todos os ensaios imunológicos baseiam-se na ligação primária do anticorpo ao antígeno ou nos fenômenos secundários resultantes de tal interação. Esses ensaios imunológicos rotineiramente envolvem o uso de anticorpos produzidos em animais e dirigidos contra uma variedade de抗ígenos. Infelizmente, os procedimentos da imunização convencional geralmente produzem populações heterogêneas de anticorpos, com variados graus de reatividade cruzada com抗ígenos estruturalmente relacionados. Esses problemas tornaram difícil padronizar os imunoensaios e acumular grandes quantidades de anti-soros que possam ser usadas como reagentes de referência (Wintrobe e col., 1998).

Com o desenvolvimento da técnica do hibridoma, a partir da década de 70 foi possível a produção em larga escala de anticorpos monoclonais (AcMo) contra os抗ígenos de superfície leucocitária. No Primeiro Seminário sobre os抗ígenos de Diferenciação Leucocitária, foi convencionado um sistema unificado de nomenclatura para os AcMo. Para melhor definir os anticorpos que apresentavam reatividade semelhante foi empregado a denominação de grupos de determinantes抗ígenicos “cluster determinants” - CD. (Knapp e col., 1989; Clark e Lanier, 1989).

Os anticorpos monoclonais apresentam nítida vantagem em relação aos anticorpos produzidos pela imunização convencional. Essas vantagens incluem sua homogeneidade, a presivibilidade de sua especificidade e afinidade, e a capacidade de produzir tais anticorpos em quantidades ilimitadas (Wintrobe e col., 1998).

A conjugação do anticorpo monoclonal a um corante permite a identificação de estruturas celulares nos locais onde se processa a reação抗ígeno-anticorpo. Pode-se reconhecer, então, as estruturas抗ígenicas presentes nas várias linhagens de células da medula óssea, do sangue periférico e dos órgãos linfoides (Lorenzi, 1999).

Como esses抗ígenos variam em função do tipo de célula eles podem ser considerados “marcadores” das várias linhagens: granulocítica, linfocitária,

monocitária, eritrocitária e megacariocitária (Lorenzi, 1999). Os principais marcadores celulares, a linhagem e suas funções estão demonstradas na tabela 5.

Um número crescente de anticorpos monoclonais tem sido utilizado para o diagnóstico das diferentes doenças tumorais dos órgãos hematopoéticos, podendo-se escolher alguns mais específicos para definir o tipo de linhagem proliferante (Lorenzi, 1999).

A caracterização das células leucêmicas é, sem dúvida, a área onde se tem encontrado maior utilidade clínica para imunofenotipagem imunológica. Dessa forma, é importante destacar que esta deve basear-se na comparação com as características das células normais. A semelhança entre células neoplásicas e normais permite a caracterização da linhagem e a determinação do momento de diferenciação celular, ambas de reconhecida utilidade (Orfão, 1997).

O uso da citometria de fluxo para analisar várias populações celulares representa um importante avanço tecnológico na medicina. Seu valor como instrumento de pesquisa ficou comprovado no estudo da leucemia, linfoma, auto-imunidade, cinética do ciclo de células tumorais e marcadores cromossômicos (Wintrobe e col., 1998).

A citometria de fluxo é o método de eleição para a imunofenotipagem das células leucêmicas ou linfomatosas. Este método rápido, objetivo e quantitativo é utilizado no estudo das leucemias agudas para: a) determinação da linhagem celular; b) análise da clonalidade; c) análise da maturação ontogenética; d) acompanhamento do tratamento e detecção da Doença Residual Mínima (Rego, 1997).

O estudo imunofenotípico por citometria de fluxo está baseado na identificação de um ou mais抗ígenos na superfície ou no interior das células, as quais se encontram em suspensão. Amostras de aspirados de medula óssea e sangue periférico são os materiais preferencialmente empregados para a análise por citometria de fluxo. Entretanto, biópsias de MO, gânglios linfáticos ou mesmo tumores sólidos podem ser analisados, mas, nestes casos, alguma forma de dissociação mecânica deve ser empregada para obter-se uma suspensão celular (Rego, 1997).

O citômetro de fluxo é essencialmente um sofisticado microscópico com a capacidade de analisar rapidamente múltiplas propriedades de células isoladas suspensas num meio líquido. As células passam a uma velocidade de vários milhares por segundo, sendo gerada uma corrente de fundo, conhecida como bainha, que pode

Tabela 5. Marcadores celulares leucocitários (Vaickus and Foon, 1991).

Antígeno	Peso (kDa)	Reatividade	Função
CD1	43/49	T, sp B	nd
CD2	50	T	Receptor CD58
CD3	20/26	T	Parte do complexo TCR
CD4	59	sp T	Receptor Classe II/HIV
CD5	67	T, sp B	nd
CD6	100	T, sp B	nd
CD7	40	T	nd
CD8	32	sp T	Receptor classe I
CD9	24	Pré-B, mono, plaqueta	nd
CD10	100	Pré-B, precursor linfoide, gran	Endopeptidase neutra (CALLA)
CD11b	155/95	Mono, gran, NK	Receptor C3bi (CR3)
CD11a	150/95	Mono, gran, NK, sp B	nd
CD13	150	Mono, gran	Aminopeptidase N
CD14	55	Mono	nd
CD15	50-180	Gran	Carboidrato (Hapteno X)
CD16	50-65	NK, gran, macro	FcR III IgG
CD19	95	B	nd
CD20	32/37	B	Canal de íons (?)
CD21	140	sp B	Receptor C3d/VEB
CD22	135	B	nd
CD23	45-50	sp B, eo, mono ativado	FcR IgE
CD25	55	T ativado, B, mono, NK	Cadeia β do receptor IL-2
CD32	40	Mono, gran, B, plaqueta	FcR II IgG
CD33	67	Precursor mielóide, mono	nd
CD34	115	Precursor hematopoético	nd
CD36	90	Mono, plaqueta	R trombospondina/colágeno
CD38	45	Precursor linfoide, plasmócito	nd
CD39	80	sp B, mono	nd
CD40	50	B	Homologia com R NGF
CD41	114-131	Megacariócito, plaqueta	IIb/IIIa
CD42	23	Megacariócito, plaqueta	R Fator von Willebrand
CD44	80-90	Leucócitos, gran	nd
CD45RA	220	NK, sp B, sp T, gran, mono	nd
CD56	135/220	NK, sp T	Isoforma N-CAM
CD57	110	NK, T, sp B	nd
CD58	40-65	Leucócitos	Ligante CD2
CD61	114	Megacariócito, plaqueta	Glicoproteína IIIa
CD64	75	Mono, gran	FcR I IgG
CD71	90	Células proliferantes, macro	Receptor transferrina

ser visualizada como um “ducto líquido” que carrega em seu centro uma coluna sólida de fluido, na qual as células ou partículas movem-se em fila única enquanto passam através do centro do feixe de laser. A bainha deve passar precisamente através do centro do feixe de laser. Além disso, a coluna da amostra no interior da bainha deve ser estreita para que a célula possa estar sempre localizada precisamente no centro do fluxo para se submeter a uma exposição máxima ao feixe de laser. A partícula, ao interromper o feixe de laser, dispersa a luz em todas as direções. A luz dispersada é coletada e analisada. Os resultados são apresentados como gráficos de pontos ou histogramas de dispersão. A dispersão é influenciada pelo tamanho da célula e pelo índice de refração. Basicamente, a dispersão da luz para frente fornece uma medida do tamanho da célula (através do parâmetro Foward Scatter Scan -FSC), ao passo que a dispersão da luz a 90° dá uma indicação da topografia superficial e granulosidade da célula (através do Side Scatter Scan -SSC) (Rego, 1997; Wintrobe e col. ,1998).

A medição da imunofluorescência através da citometria de fluxo é feita com células viáveis em suspensão marcadas com anticorpos marcados com fluorocromo, que se ligam especificamente a抗ígenos de superfície a serem estudados. A percentagem de células marcadas é medida e a intensidade da fluorescência de células individuais permite o estudo das distribuições de抗ígenos de superfície. Além disso, dois ou mais anticorpos podem ser usados simultaneamente para marcar抗ígenos distintos em células individuais. Essa marcação envolve o uso ou de uma única fonte de luz e dois ou mais fluorocromos emitem fluorescência em diferentes comprimentos de onda, ou duas fontes de luz com ondas de diferentes comprimentos de excitação (Wintobe e col.,1998).

Rotineiramente, os estudos empregam de um a três fluorocromos, ou seja, podem detectar a coexpressão de até três抗ígenos por uma mesma célula. Os fluorocromos mais empregados são: a isotiocianato de fluoresceína (FITC), a ficoeritrina (PE) e PerCP (Rego, 1997).

A população celular patológica deve ser identificada e "isolada em uma janela de análise (gate) no citômetro. A escolha de uma dada gate fundamenta-se na análise das características de tamanho e granulosidade do blasto (comparados à morfologia em May-Grunwald-Giemsa); e ou na detecção da expansão das células de um único fênótipo (geralmente imaturo); e/ou na expressão aberrante de抗ígenos. A

gate pode ser definida nos gráficos relacionando FSC x SSC ou combinando-se a marcação para um dado antígeno e uma das características físicas das células (geralmente SSC). A última abordagem permite a melhor definição de diferentes grupos celulares, porém é preferencialmente realizada em estudo com três cores, o que eleva o custo do exame (Rego, 1997).

Uma característica importante da citometria de fluxo é sua capacidade de analisar cada célula individualmente, enquanto os dados são interpretados coletivamente (Wintrobe, 1998).

O principal impacto da citometria de fluxo da célula ativada por fluorescência foi na área dos estudos de marcadores de superfície celular. A disponibilidade dos anticorpos monoclonais abriu inúmeras rotas diagnósticas novas, incluindo quantificação de populações de células T e B e seus subconjuntos, monócitos, células mieloides e uma variedade de células tumorais. A técnica é sensível, capaz de detectar 0,1% de células monoclonais. O uso de imunofluorescência em citometria de fluxo mostrou-se útil no diagnóstico, tratamento e prognóstico de leucemias e linfomas.

OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo estudar o perfil imunofenotípico das leucemias agudas em crianças, através da citometria de fluxo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 28 pacientes com diagnóstico de leucemia aguda em atividade provenientes do Hospital Albert Sabin que solicitaram a imunofenotipagem por citometria de Fluxo ao Laboratório Clementino Fraga, no período de janeiro a dezembro de 1999.

A idade dos pacientes participantes do estudo variou de 2 meses a 16 anos, sendo 13 pacientes do sexo masculino e 15 do sexo feminino.

Os pacientes foram previamente diagnosticados para leucemia aguda através de estudos morfológicos (FAB) e citoquímicos (PAS, peroxidase e Sudan Black) realizados no Hospital Albert Sabin.

Dos 28 pacientes estudados, 9 eram portadores de leucemia mielóide aguda e 19 de leucemia linfóide aguda. Entre os 9 pacientes com diagnóstico de LMA, três foram classificados com M1, dois como M2, dois como M4, um como M5 e um como M7. Entre os 19 pacientes com o diagnóstico de LLA, dez apresentavam quadro citológico compatível com a classificação morfológica FAB-L1, quatro como LLA-L2, um como LLA-L3, quatro pacientes não tiveram seus subtipos definidos pela morfologia (FAB).

Todos os pacientes foram estudados ao diagnóstico, sem terem tido tratamento radioterápico e/ou quimioterápico prévio.

O estudo imunofenotípico por citometria de fluxo foi realizado no citômetro de fluxo EPICS-PROFILE II - Coulter. Foram utilizados amostra de sangue colhida por punção de veia periférica em tubos com EDTA. Inicialmente, procede-se a incubação do sangue com os anticorpos monoclonais específicos, a temperatura ambiente por 15 a 30 minutos. Após a incubação as células são preparadas no Q-PREP - Coulter, visando a lise, tamponamento e conservação dos leucócitos, os reagentes utilizados foram o ácido fórmico para lisar as hemácias, o carbonato de sódio e sulfato de sódio como solução tampão e o paraformaldeído como fixador e conservador dos leucócitos. Segue-se então a leitura da amostra no citômetro através do método de imunofluorescência direta. Escolhe-se a população celular para a leitura através dos parâmetros de tamanho e granulosidade.

Os fluorocromos utilizados foram a ficoeritrina e o isotiocianato de fluoresceína.

O painel de anticorpos utilizado possuía os anticorpos anti- CD2, CD3,CD4, CD8, CD10,CD19, CD13,CD33,CD10,CD14,CD45,CD56,CD34,CD38.

As reações foram consideradas positivas quando expressaram o antígeno maior que 20% (Roncalla e col.; Palacios e col.,1997).

RESULTADOS

A tabela 1 mostra a frequência de distribuição dos pacientes quanto ao tipo de leucemia aguda pela classificação FAB, dos 28 pacientes estudados 19 eram portadores de LLA e 9 de LMA.

Tabela 1. Frequência das leucemias agudas quanto a tipo celular nos pacientes envolvidos no estudo. (Classificação FAB).

Leucemias agudas	fi	fi(%)
Leucemias linfóides	19	67,86
Leucemias mielóides	9	32,14
Total	28	100,00

A tabela 2 mostra a frequência de distribuição dos subtipos de leucemia linfóide pela classificação FAB nos 19 pacientes portadores de LLA, 15 pacientes eram portadores de LLA-L1, 3 de LLA-L2 e 1 de LLA-L3.

Tabela 2. Frequência dos subtipos de LLA nos pacientes envolvidos no estudo.

Subtipos de LLA	fi	fi%
LLA-L1	15	78,95
LLA-L2	3	15,79
LLA-L3	1	5,26
Total	19	100,00

A tabela 3 mostra a frequência de distribuição das leucemias linfóides quanto a linhagem celular, definidas pela imunofenotipagem por citometria de fluxo, dos 19 pacientes portadores de LLA, 17 eram portadores de LLA de linhagem B e 2 de LLA de linhagem T.

Tabela 3. Frequência das leucemias linfóides quanto a linhagem celular .

Leucemias linfóides	f_i	F_i (%)
Leucemias de linhagem B	17,00	89,47
Leucemias de linhagem T	2,00	10,53
Total	19,00	100,00

A tabela 4 mostra a distribuição dos subtipos de LLA (FAB) quanto a linhagem celular definida pela imunofenotipagem por citometria de fluxo. Dos 15 pacientes portadores de LLA-L1, 13 eram LLA-L1 de linhagem B e dois de linhagem T; todos os pacientes portadores de LLA-L2 eram de linhagem B e o único portador de LLA-L3 era de linhagem B.

Tabela 4. Distribuição dos subtipos de LLA quanto a linhagem celular (N=19)

Subtipos de LLA (FAB)	Linhagem celular	
	Células B	Células T
LLA-L1	13	02
LLA-L2	03	0
LLA-L3	01	0
Total	17	02

A tabela 5 mostra a frequência dos marcadores linfóides nos 19 pacientes portadores de LLA. 9 pacientes expressaram CD19, CD10, CD2 e CD3, 6 expressaram CD19 e CD10 e dois pacientes expressaram apenas CD19.

Tabela 5. Frequência dos marcadores linfóides nos pacientes portadores de LLA envolvidos no estudo (N=19).

Marcadores	f_i	f_i (%)
CD19	17,00	89,47
CD10	15,00	78,95
CD2	9,00	47,37
CD3	9,00	47,37

A tabela 6 mostra a frequência de distribuição dos marcadores linfóides nos 17 pacientes com LLA de linhagem B. Todos os 17 pacientes portadores de LLA de linhagem B expressaram CD19, mas somente 15 expressaram CD10, portanto 2 pacientes são portadores de LLA de células B Calla negativa. Sete pacientes apresentaram a expressão associada de CD2 e CD3.

Tabela 6. Frequência dos marcadores linfóides nos pacientes portadores de LLA de linhagem B envolvidos no estudo (N=17).

Marcadores	fi	fi (%)
CD19	17,00	100,00
CD10	15,00	88,23
CD2	7,00	41,18
CD3	7,00	41,18

A tabela 7 mostra a frequência de distribuição dos marcadores linfóides nos 2 pacientes portadores de LLA de linhagem T. Um paciente expressou CD2 e CD3, outro expressou apenas CD3 e nenhum dos dois expressou CD19 e CD10.

Tabela 7. Frequência dos marcadores linfóides nos pacientes portadores de LLA de linhagem T envolvidos no estudo (N=2).

Marcadores	fi	fi (%)
CD19	0	0
CD10	0	0
CD2	2	100,0
CD3	1	75,00

A tabela 8 mostra a frequência de distribuição dos marcadores mielóides nos 19 pacientes portadores de LLA. Dos 19 pacientes, 6 apresentaram a expressão associada de CD13. Esses 6 pacientes são portadores de LLA de linhagem B. Nenhum paciente apresentou a expressão de CD33.

Tabela 8. Frequência dos marcadores mielóides nos pacientes portadores de LLA envolvidos no estudo (N = 19).

Marcadores	fi	fi (%)
CD13	6	31,58
CD33	0	0

A tabela 9 mostra a frequência de distribuição dos subtipos de leucemia mielóide quanto a classificação FAB nos 9 pacientes portadores de LMA. Três pacientes eram portadores de LMA -M1, dois de LMA-M2, dois de LMA-M4, um de LMA-M5 e um de LMA-M7.

Tabela 9. Frequência dos subtipos de LMA nos pacientes envolvidos no estudo (N=9).

Subtipos de LMA	fi	fi%
LMA-M1	3,00	33,33
LMA-M2	2,00	22,22
LMA-M4	2,00	22,22
LMA-M5	1,00	11,11
LMA-M7	1,00	11,11
Total	9,00	100,00

A tabela 10 mostra a frequência de distribuição dos marcadores mielóides nos 9 pacientes portadores de LMA. Todos os 9 pacientes expressaram CD13, mas apenas 3 expressaram CD33.

Tabela 10. Frequência dos marcadores mielóides nos pacientes portadores de LMA envolvidos no estudo (N=9).

Marcadores	fi	fi (%)
CD13	9	100,00
CD33	3	33,33

A tabela 11 mostra a frequência de distribuição dos marcadores linfóides nos 9 pacientes portadores de LMA. Apenas 1 paciente apresentou a expressão associada de CD19, esse paciente expressou ambos os marcadores mielóides (CD13 e CD33).

Tabela 11 Frequência dos marcadores linfóides nos pacientes portadores de LMA envolvidos no estudo (N=9).

Marcadores	Fi	Fi (%)
CD19	1	11,11
CD10	0	0

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

De acordo com classificação FAB 70% das crianças com LLA demonstram morfologia L1, 18% demonstram morfologia de L2 e 3 % demonstram morfologia L3 (Wintrobe e col, 1998). Os valores encontrados no presente trabalho de 78,95% para LLA-L1, 15,79% para LLA-L2 e 5,2% para LLA-L3 estão coerentes com a literatura.

Ainda utilizando a classificação FAB as LMA M0, M1 e M2 correspondem por 50% de todos os casos de LMA, a LMA-M4 por 25%, a LMA-M3 e a LMA-M5 por 10% cada uma, a LMA -M6 por 5% ou menos e a LMA-M7 por 3% ou menos (Wintrobe e col., 1998). Em nosso trabalho os valores encontrados para os subtipos de LMA foram 33% para LMA-M1, 22% para LMA-M2, 22% para LMA-M4, 11% para LMA-M5 e 11% para LMA-M7.

Atualmente, existem 166 marcadores de抗ígenos de diferenciação leucocitária (CD), mas somente alguns tem linhagem específica, assim é preferível realizar a imunofenotipagem com um painel selecionado de marcadores. O painel de anticorpos usados no Hospital infantil St. Jude inclui pelo menos um marcador de alta sensibilidade para as principais linhagens hematopoéticas (CD7 para os casos de linhagem T, CD19 para a linhagem B, e CD13 para mielóide) e um marcador que é altamente específico (CD3 citoplasmático a linhagem T, CD79a para a linhagem B, e MPO para mielóide) (Pui, 1997).

O painel utilizado para a realização da imunofenotipagem das leucemias agudas dos pacientes participantes do nosso trabalho possuía apenas os marcadores mais sensíveis para as respectivas linhagens, como o CD19 e o CD10 para a linhagem B, CD2 e CD3 para linhagem T, CD13 e CD33 para linhagem mielóide. Outros marcadores com o CD34, CD38, CD56, CD4, CD8 e CD14 também foram utilizados mas não possuem especificidade de linhagem. Os anticorpos contidos em nosso painel permitiram apenas a diferenciação das leucemias agudas quanto ao tipo linfóide e mielóide, e quanto a linhagem celular B e T, sendo insuficiente para classificar as leucemias B e T em seus respectivos subtipos celulares.

Bennett e col., relatam que 85% das LLA em crianças são de linhagem celular B, e 20% de linhagem celular T. As formas mais imaturas de LLA de linhagem B são a pré-B e LLA comum. Ambas são positivas para alguns marcadores pan-B e as

células da LLA comum são positivas para o CD10. A LLA pré-B é definida pela presença de IgM citoplasmática. O subtipo B é definido pela presença de Ig na membrana celular, e é observado em somente 2 ou 3% dos casos. Há uma forte correlação entre a morfologia e a classificação imunofenotípica B, já que estes casos são representados pela morfologia do subtipo L3 (FAB).

A LLA de células T é definida pela expressão associada de抗ígenos de células T como CD2, CD7, CD5 ou CD3 (Bennett e col.) A expressão do CD3 quer no citoplasma quer na membrana, é considerada o melhor marcador para linhagem T (Rego, E. M., 1997).

No que diz respeito a frequência de distribuição das LLAs quanto a linhagem celular B e T, observamos em nosso trabalho a frequência de 89,47% para a LLA-B 10,53% para a LLA-T coerentes com os dados encontrados na literatura.

Wintrobe e col., afirmam que praticamente todas as leucemias linfocíticas de origem celular B expressam CD19 e que o CD10 é expresso por aproximadamente 90% dos blastos da LLA-B. No presente trabalho todos os pacientes portadores de LLA-B expressaram CD19 e 88% desses pacientes expressaram CD10.

CD33 é expresso por mieloblastos, promielócitos normais, bem como pela maioria dos blastos da LMA, mas não por linfócitos ou pelos blastos da LLA (Wintrobe e col., 1998). O CD33 pode estar ou não presente em alguns subtipos de LMA como a LMA-M0, M2 e M7 (Rego, 1997). No presente trabalho encontramos uma frequência de marcação para o CD33 na LMA muito reduzida se comparada a encontrada na literatura, a justificativa para essa ocorrência talvez esteja no pequeno número de casos de LMA estudados em nosso trabalho.

As marcações conjuntas para CD33/CD13/CD117, CD79/CD22 e CD3/CD7 identificam as respectivas linhagens (mielóide, B e T) em 98% dos casos de leucemias agudas. A presença de pelo menos dois抗ígenos - MPO, CD13, CD33, CD65w e CD117 - caracteriza a linhagem mielóide do ponto de vista imunofenotípico. Cumpre ressaltar a correlação da expressão de alguns marcadores aberrantes com subtipos de LLA e LMA. Assim, a expressão de CD19 é comum na LMA com t(8;21) e de CD2 na LMA-M3 com t(15;17). O CD7 é frequentemente encontrado na LMA com células muito imaturas (Rego, E.M., 1997).

A expressão associada de抗ígeno mielóide (CD13) na LLA e de抗ígeno linfóide (CD19) na LMA encontrada no presente trabalho é compatível com os

resultados de trabalho de outros autores, que encontraram a expressão associada de CD13 nas LLAs-B, CD19 nas LMAs e CD10 nas LLAs-T (Roncalla e col., 1997).

A utilização de um painel mais abrangente e uma maior casuística permitiria uma melhor definição do perfil imunofenotípico das leucemias agudas através da citometria de fluxo.

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é essencial para uma melhor caracterização das leucemias agudas já que permite distinguir com grande confiabilidade a LMA da LLA e ainda definir os subtipos específicos da LLA de linhagem B e LLA de linhagem T.

CONCLUSÃO

Concluímos através da imunofenotipagem por citometria de fluxo que 67,86% dos pacientes eram portadores de leucemia linfóide aguda e 32,14% eram portadores de leucemia mielóide aguda. Quanto aos pacientes portadores de leucemia linfóide aguda 89,47% eram portadores de leucemia linfóide aguda de linhagem B e 10,53% de leucemia linfóide aguda de linhagem T.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GOLDEBERG, M. A., BUNN, H. F. Hematopoese celular e molecular. In: ISSELBALCHER, H.I. et al (Ed.). **Harrison medicina interna.** 13. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1995. v. 2, p.1796-1799.
- SCHEINBERG, D. A., GOLDE, D. W. As leucemias. In: ISSELBALCHER, H.I. et al (Ed.). **Harrison medicina interna.** 13. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1995. v. 2, p.1849-1857.
- PARASKEVAS, F., FOERSTER, J. Imunodiagnóstico. In: LEE, G.R. (Col.). et al. **Wintrobe hematologia clínica.** São Paulo: Manole, 1998. v. 1, p. 526-552.
- LUKENS, J. N. Classificação e diferenciação das leucemias agudas. In: LEE, G.R. (Col.). et al. **Wintrobe hematologia clínica.** São Paulo: Manole, 1998. v. 2, p. 2062-2078.
- GREER, J. P., KINNEY, M. C. Leucemia não linfocítica aguda. In: LEE, G.R. (Col.). et al. **Wintrobe hematologia clínica.** São Paulo: Manole, 1998. v. 2, p. 2114-2134.
- LORENZI, T. F., **Manual de hematologia: propedêutica clínica.** 2. ed. Rio de Janeiro: Médica e científica Ltda, 1999. p. 1-48.
- LI, C. Y., YAM, L. T., SUN, T. **Modern modalities for the diagnosis of hematologic neoplasms.** New York: Igaku-Shoin, 1996. p. 48-60.
- HOFFBRAND, A. V., PETTIT, J. E. **Essential haematology.** 3. ed. Cambridge: Blackwell Science, 1993. p. 209-231.

MOTA, M. A., A cinética de captação da LDL e da LDL oxidada pelas células blásticas de portadores de leucemias agudas. São Paulo, 1995. 64 p. Tese de (mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1995.

BAIN, B. J. Leukaemia Diagnosis. A guide to the FAB Classification. Philadelphia, J. B. Lippincott, 1990.

BENNETT, J. M., CATOVSKY, D., DANIEL, M. T., FLANDRIN, G., GALTON, D. A. G., GRALNICK, H. R., SULTAN, C. Proposed revised criteria for the classification of the acute myeloid leukaemia. A report of the French American British Cooperative Group. **Ann. Intern. Med.**, v. 103, p. 626-629, 1985a.

BENNETT, J. M., CATOVSKY, D., DANIEL, M. T., FLANDRIN, G., GALTON, D. A. G., GRALNICK, H. R., SULTAN, C. Criteria for the diagnosis of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French American British Cooperative Group. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 103, p. 460-462, 1985b.

BENNETT, J. M., CATOVSKY, D., DANIEL, M. T., FLANDRIN, G., GALTON, D. A. G., GRALNICK, H. R., SULTAN, C. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0). **Br. J. Haematol.**, v. 78, p. 325-329, 1991.

BENNETT, J. M., CATOVSKY, D., DANIEL, M. T., FLANDRIN, G., GALTON, D. A. G., GRALNICK, H. R., SULTAN, C. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. **Br. J. Haematol.**, v. 47, p. 553-561. 1981.

BENNETT, J. M., CATOVSKY, D., DANIEL, M. T., FLANDRIN, G., GALTON, D. A. G., GRALNICK, H. R., SULTAN, C. (FAB Cooperative Group). Proposals for the classification of the acute leukaemias. **Br. J. Haematol.**, v. 33, p. 451-458, 1976.

- BUCCHERI, V., MATUTES, E., DYER, M. J. S., CATOVSKY D. Lineage commitment in biphenotypic acute leukemia. *Leukemia*, v. 7, p. 919-927, 1992.
- DREXLER, H. G., GIGNAC, S. M., MINOWADA, J. Routine immunophenotyping of acute leukemias. *Blut*, v. 57, p. 327-339, 1998.
- EMERSON, S. G. The stem cell model of hematopiesis. In: HOFFMAN, R. et al. **Hematology-basic principles and pratic**. New York: Churchill Livingstone, 1991, p. 72-81.
- FIRST MIC COOPERATIVE STUDY GROUP Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute lymphoblastic leukaemias. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 23, p. 189-197, 1986.
- LOWENBERG, B., DELWEL, F. R. The pathobiology of human acute myeloid leukemia. In: HOFFMAN, R. et al. **Hematology Basic Principles and Pratic**. New York: Churchill Livingstone, 1991, p. 708-715.
- STASS, S. A. **Acute Leukaemia**. New York: Marcel Dekker, 1987.
- SHAPIRO, H. M., Pratical flow cytometry. 2. ed. New York : Alan R. Liss, 1988. p.266-298.
- PUI, C-H. Recent adavances in childhood acute lymphoblastic leukemia. In: Viana, M. B., Fagundes, E.M. **Temas de Hematologia**: programa educacional e conferências do XVI Congresso Nacional Brasileiro de Hematologia. Belo Horizonte: Imprensa Universitária, 1997. p. 8-13.
- GOASGUEN, J.E., BENNETT, J.M. Biological diagnosis of leukemias. In: Viana, M. B., Fagundes, E.M. **Temas de Hematologia**: programa educacional e conferências do XVI Congresso Nacional Brasileiro de Hematologia. Belo Horizonte: Imprensa Universitária, 1997. p.13-28.

ORFÃO, A. Estratégias para imunofenotipagem de hemopatias malignas. In: Viana, M. B., Fagundes, E.M. **Temas de Hematologia**: programa educacional e conferências do XVI Congresso Nacional Brasileiro de Hematologia. Belo Horizonte: Imprensa Universitária, 1997. p.53.

REGO, E.M. Imunofenotipagem e citometria de fluxo. In: Viana, M. B., Fagundes, E.M. **Temas de Hematologia**: programa educacional e conferências do XVI Congresso Nacional Brasileiro de Hematologia. Belo Horizonte: Imprensa Universitária, 1997. p.200-209.

DYER, V.A.R., RONCALLA, M.R. Imunofenótipo de leucemias agudas por citometria de fluxo (resumo 1) In: **CONGRESSO IBERO-LATINO AMERICANO DE CITOMETRIA, REUNIÃO BRASILEIRA DO CLUBE DE CITOMETRIA DE FLUXO**, 6., 1997, Guarujá.. São Paulo: Fundação Oswaldo Cruz, 1997.p.29.

PALACIOS, M.E., SCOLNIK, M.P. Leucemia aguda de linaje mixto: análisis del inmunofentipo de 18 pacientes (resumo 15). In: **CONGRESSO IBERO-LATINO AMERICANO DE CITOMETRIA, REUNIÃO BRASILEIRA DO CLUBE DE CITOMETRIA DE FLUXO**, 6., 1997, Guarujá.. São Paulo: Fundação Oswaldo Cruz, 1997.p.32.

MCKINNEY, P.A. et al. Acute lymphoblastic leukemia incidence in the UK by immunophenotype. **Leukemia**, v.7, n.10, p.1630-1634, Oct. 1993.

NAEEM, S., HAYEE, A. Acute lymphoblastic leukemia -a study of immunophenotypes. **J. Pak. Med. Assoc.**, v.42, n.4, p. 83-86.