

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE MATERNO-INFANTIL
MESTRADO ACADÊMICO

HELIANA TRINDADE MARINHO

ESTUDO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DOS MARCADORES
KI-67 E CD71 NAS LEUCEMIAS AGUDAS EM CENTRO ONCOLÓGICO DE
REFERÊNCIA NO ESTADO DO MARANHÃO.

São Luís

2010

HELIANA TRINDADE MARINHO

ESTUDO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DOS MARCADORES KI-67 E
CD71 NAS LEUCEMIAS AGUDAS EM CENTRO ONCOLÓGICO DE REFERÊNCIA NO
ESTADO DO MARANHÃO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Saúde Materno-Infantil.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Antonio Gomes Oliveira

São Luís

2010

HELIANA TRINDADE MARINHO

ESTUDO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DOS MARCADORES KI-67 E
CD71 NAS LEUCEMIAS AGUDAS EM CENTRO ONCOLÓGICO DE REFERÊNCIA NO
ESTADO DO MARANHÃO.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil
da Universidade Federal do Maranhão para
obtenção do título de Mestre em Saúde
Materno-Infantil.

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. PhD. Marcos Augusto Grigolin Grisotto (Examinador)
Centro Universitário do Maranhão (UNICEUMA)

Profa. Dra. Dorlene Maria Cardoso de Aquino (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Profa. Dra. Érika Bárbara Abreu Fonseca Thomaz (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Aos meus pais, minha fonte inspiradora e base para tudo em minha vida.

Ao meu amado noivo, Francisco das Chagas Garcia Santana, o melhor companheiro que alguém poderia ter, pelo seu amor e apoio mesmo sentindo pela minha ausência.

À minha melhor amiga Elda Pereira Noronha, pelo incentivo, cooperação, compreensão e apoio em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

AGRADECIMENTOS

À Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

Ao Prof. Dr. Raimundo Antonio Gomes Oliveira pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional, pela paciência, pelos ensinamentos, dicas de pesquisa e pelas horas de leituras gastas durante o desenvolvimento desta pesquisa.

À Profa. Dra. Érika Bárbara Abreu Fonseca Thomaz, que nos acolheu e contribuiu com a análise estatística deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro neste projeto.

Ao Instituto de Oncologia Aldenora Bello em especial aos pais e pacientes que permitiram a pesquisa, a todos os funcionários do arquivo, ao diretor administrativo José Generoso da Silva, às médicas Cíntia Assunção Silva, Geni Lourdes de Resende Ramos Veras e Lígia Maria Mendes Gonçalves que tanto contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil em especial a Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito, a Profa. Dra. Maria Bethânia da Costa Chein e a secretária Helena Ribeiro Sousa pela oportunidade de aprendizado e qualificação profissional. Aos amigos de turma pelo carinho, amizade e convívio, especialmente Lila Isabel Câmara de Paula e Juliana Maria Trindade Bezerra. Agradeço sempre nossa amizade.

Ao Instituto Nacional do Câncer (INCA), em especial à Profa. Maria do Socorro Pombo, pela contribuição técnica e por sua atenção.

Ao Laboratório de Pesquisa Clínica do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (LPC-CEPEC/HUFMA), em especial à Nivânia Lisboa Camelo, Ênio Fernandes Aragão, Ademilton Costa Alves, Felipe Albuquerque Marques, Aécio Assunção Braga, Bruna Aparecida Sousa Penha, Hiran Reis Sousa e Alexandre Magno Moraes Furtado pela ajuda, pelos bons momentos e amizade. À médica Sônia Maria Pereira Cruz pela ajuda e participação nesta pesquisa.

Aos meus familiares, ao meu irmão e meu amigo Flávio Donalwan Sá Maximino pelo incentivo constante nas situações mais adversas. Minha eterna gratidão.

“Deleita-te no Senhor e Ele te concederá
os desejos do teu coração”

Salmo 37:4

RESUMO

Esta pesquisa objetivou estudar a proliferação celular através do marcador Ki-67 e CD71 nas leucemias agudas, bem como estabelecer a relação entre eles e sua relação com a resposta terapêutica. Os pacientes foram selecionados de forma prospectiva tendo início em dezembro de 2008 e término em novembro de 2009 (12 meses). Foram coletadas amostras de medula óssea ou sangue periférico de 54 pacientes diagnosticados com leucemias agudas, provenientes do hospital de referência para tratamento oncológico no estado do Maranhão (no nordeste brasileiro), sendo determinada a expressão dos marcadores Ki-67 e CD71 por citometria de fluxo. A maior parte dos pacientes era da região nordeste, seguidos da região central, noroeste, sudoeste e sudeste do Maranhão. Não houve pacientes da região sul do estado. Os valores da expressão de Ki-67 em medula óssea e sangue periférico no total de pacientes apresentaram-se maiores na LLAB que as demais leucemias agudas. O CD71 apresentou na medula óssea uma maior expressão na LLAT e no sangue periférico, uma maior expressão na LMA. Foi observada diferença estatística na expressão de Ki-67 em sangue periférico e medula óssea apenas na LMA. Foi observada correlação positiva entre o Ki-67 e CD71 em sangue periférico na LLAB. Na medula óssea, os marcadores apresentaram correlação linear na LMA. Não foi encontrada relação entre os marcadores de proliferação celular e a resposta ao tratamento. Uma continuidade do estudo de proliferação celular com um número de pacientes maior, atrelados a outras técnicas de proliferação celular se faz necessária para avaliação de outros parâmetros como a evolução clínica, prognóstico e sobrevida dos pacientes leucêmicos em nosso estado.

Palavras-chaves: leucemia aguda, proliferação celular, Ki-67 e CD71.

ABSTRACT

This research aimed to study cell proliferation by Ki-67 marker and CD71 in acute leukemias, as well as establish the relationship between them and their relationship to therapeutic response. Patients were selected prospectively commencing in December 2008 and ending in November 2009 (12 months). Samples were collected from bone marrow or peripheral blood of 54 patients diagnosed with acute leukemia, from the referral hospital for cancer treatment in the state of Maranhão (northeastern Brazil) and determined the expression of Ki-67 markers and CD71 by flow cytometry. Most patients were from the northeast, followed by the central, northwest, southwest and southeast of Maranhão. No patients were in southern state. The values of Ki-67 in bone marrow and peripheral blood in the patients were higher in B-ALL than other acute leukemias. The bone marrow CD71 showed increased expression in T-ALL and peripheral blood, increased expression in AML. Was no statistical difference in Ki-67 in peripheral blood and bone marrow only in AML. A significant positive correlation between Ki-67 and CD71 in peripheral blood in B-ALL. In bone marrow, the markers showed a linear correlation in AML. No relationship was found between markers of cell proliferation and response to treatment. A continuing study of cell proliferation with a greater number of patients, coupled with other techniques of cell proliferation it is necessary to evaluate other parameters such as clinical course, prognosis and survival of leukemia patients in our state.

Keywords: acute leukemia, cell proliferation, Ki-67 and CD71.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do princípio de funcionamento do Citômetro de Fluxo.	24
Figura 2 – Controle isotópico do Ki-67 (FITC).	40
Figura 3 – Dupla marcação com Ki-67 (FITC) e CD71 (PE).	40
Figura 4 - Controle do CD71: tubo sem marcação.	41
Figura 5 - Dupla marcação com o CD71 (FITC) e CD34 (PE).	41
Figura 6 - Etapas do estudo da proliferação celular por citometria de fluxo: (a) Marcação dos anticorpos monoclonais de proliferação celular (CD71 e Ki-67). (b) Aquisição dos tubos marcados com os anticorpos de proliferação celular. (c) Análise dos resultados	43
Figura 7 – Análise do marcador CD71 por citometria de fluxo: a) <i>Dot plot</i> do tamanho (FSC) <i>versus</i> granularidade (SSC). (b) <i>Dot plot</i> do CD45 <i>versus</i> complexidade (SSC) no <i>gate</i> de blasto (R2). (c) Controle de membrana do CD71 (tubo não marcado). d) <i>Dot plot</i> da dupla marcação do CD71 <i>versus</i> CD34. e) Análise estatística do CD71.	44
Figura 8 – Análise do marcador Ki-67 por citometria de fluxo: a) <i>Dot plot</i> do tamanho (FSC) <i>versus</i> granularidade (SSC). (b) <i>Dot plot</i> do CD45 <i>versus</i> complexidade (SSC) no <i>gate</i> de blasto (R2). (c) Controle isotópico do Ki-67. d) <i>Dot plot</i> da dupla marcação do Ki-67 <i>versus</i> CD34. e) Análise estatística do Ki-67.	45
Figura 09: Mapa da distribuição dos pacientes nas regiões geográficas do Estado do Maranhão, Brasil.	50
Figura 10 – Gráficos de dispersão das variáveis de proliferação celular em sangue periférico nos pacientes portadores de leucemias agudas do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA. (a) Gráfico de dispersão do Ki-67 <i>versus</i> CD71 em sangue periférico na LLAB. (b) Gráfico de dispersão do Ki-67 <i>versus</i> CD71 em sangue periférico na LLABI. (c) Gráfico de dispersão do Ki-67 <i>versus</i> CD71 em sangue periférico na LLABII.	56
Figura11 – Gráficos de dispersão das variáveis de proliferação celular em medula óssea nos pacientes portadores de leucemias agudas do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.(a) Gráfico de dispersão do Ki-67 <i>versus</i> CD71 em medula óssea na LMA.(b) Gráfico de dispersão do Ki-67 <i>versus</i> CD71 em medula óssea na LMA M3.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Expressão dos marcadores Ki-67 e CD71 (sangue periférico e medula óssea) por tipo de leucemia aguda em pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	52
Tabela 02: Expressão dos marcadores Ki-67 e CD71 (sangue periférico e medula óssea) por subtipo de leucemia aguda em pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	54
Tabela 03: Correlação entre as variáveis de proliferação celular em medula óssea e sangue periférico nos pacientes portadores de leucemia aguda do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	55
Tabela 04: Estratificação das características laboratoriais (hemoglobina, contagem de plaquetas e contagem de leucócitos) nos pacientes portadores de leucemia aguda do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	59
Tabela 05: Dados laboratoriais (hemoglobina, contagem de plaquetas e contagem de leucócitos) nos pacientes portadores de leucemia aguda do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	59
Tabela 06: Relação entre a resposta ao tratamento e os achados laboratoriais ao diagnóstico dos pacientes portadores de leucemia aguda do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	61
Tabela 07: Relação da expressão dos marcadores Ki-67 e CD71 (medula óssea ou sangue periférico) com a resposta ao tratamento dos pacientes portadores de leucemias agudas do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANAE - Alfa-naftil-acetato-esterase

BAL - Leucemia Bifenotípica

BFMA - Grupo Europeu Berlim-Frankfurt-Munique

Blst – Blastos

CALGB – Câncer e Leucemia do Grupo B

CDK - Quinase dependente de ciclina

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

EGIL - Grupo Europeu para caracterização imunológica das leucemias

FAB - Grupo Cooperativo *Franco-Americano-Britânico*

FITC - Isotiocianato de Fluoresceína

GBTLI - Grupo Brasileiro para o Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda

Hb - Hemoglobina

IARC - International Agency For Research On Cancer

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMOAB - Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello

INCA - Instituto Nacional do Câncer

Leuc - Leucócitos

LLA - Leucemia Linfóide Aguda

LLAs - Leucemias Linfóides Agudas

LLAB - Leucemia Linfóide Aguda B

LLAT - Leucemia Linfóide Aguda T

LLC - Leucemias Linfóides Crônicas

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

LMAs - Leucemias Mielóides Agudas

LMC - Leucemia Mielóide Crônica

LPC-CEPEC/HUUFMA - Laboratório de Pesquisa Clínica do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão

MPF - Fator Promotor de Maturação

MO - medula óssea

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAS - Ácido periódico de Schiff

PBS - Phosphate-Buffered Saline

PCNA - Antígeno de Proliferação Nuclear

PE - Ficoeritrina

Plaq - Plaquetas

POX - Mieloperoxidase

RCPB - Registro de Câncer de Base Populacional

RNA – Ácido ribonucléico

SMD - Síndrome Mielodisplásica

SP - Sangue periférico

UFMA - Universidade Federal do Maranhão

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEORICA	19
2.1 Leucemias: Histórico, Biologia, Classificação e Epidemiologia	20
2.2 Citometria de Fluxo	24
2.3 Princípios de Cinética Celular nas Leucemias Agudas	25
2.4 Proliferação celular nas leucemias agudas	29
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4 PACIENTES E METÓDOS	35
4.1 Pacientes	36
4.2 Aspectos clínicos e laboratoriais	37
4.3 Coletas das amostras	38
4.3.1 Sangue periférico	38
4.3.2 Aspirado de medula óssea	38
4.4 Diagnósticos das leucemias agudas por Imunofenotipagem	39
4.5 Estudos dos marcadores de Proliferação Celular	39
4.5.1 Técnica de marcação do Ki-67	39
4.5.2 Técnica de marcação do CD71	41

4.6 Aquisição e análise por citometria de fluxo	42
4.7 Aspectos éticos	46
4.8 Análise dos resultados	46
5 RESULTADOS	48
5.1 Características dos pacientes	49
5.2 Estudo da Proliferação Celular	51
5.2.1 Estudo da proliferação celular através do marcador Ki-67 e CD71 em medula óssea e sangue periférico	51
5.2.2 Correlação entre as variáveis de proliferação nos pacientes portadores de leucemia aguda	55
5.3 Características laboratoriais das leucemias agudas	58
5.4 Relações entre a resposta ao tratamento, os achados laboratoriais e a expressão das variáveis Ki-67 e CD71 no sangue periférico e medula óssea.	60
6 DISCUSSÃO	64
6.1 Caracterização dos pacientes	65
6.2 Estudo da proliferação celular	69
6.3 Parâmetros laboratoriais das leucemias agudas	72
6.4 Relação entre os parâmetros laboratoriais e a expressão dos marcadores de proliferação celular com a resposta terapêutica.	74
7 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	78
ANEXOS/APÊNDICES	87

1 – INTRODUÇÃO

As leucemias agudas são neoplasias primárias de medula óssea caracterizadas por formarem um grupo heterogêneo de doenças, nas quais existe a substituição dos elementos medulares e sangüíneos normais por células imaturas denominadas blastos, bem como acúmulo destas células em outros tecidos (ZHANG et al, 2006).

As leucemias são as neoplasias mais comuns na criança, correspondendo a cerca de 30% de todas as doenças malignas em pacientes com menos de 15 anos de idade (BATHIA; ROBINSON, 2003). As leucemias linfóides agudas (LLAs) são mais freqüentes que leucemias mielóides agudas (LMAs), representando 80-85% de todas as leucemias em menores de 14 anos de idade (CHOWDHURY; BRADY, 2008).

As manifestações clínicas das leucemias agudas são explicadas pela fisiopatologia da doença. De qualquer forma, o efeito final é a diminuição da produção de hemácias, granulócitos e plaquetas, causando quadro de anemia, neutropenia e plaquetopenia no sangue periférico. Um aspecto importante é que a maioria dos pacientes com leucemia apresenta doença disseminada ao diagnóstico, notando-se, muitas das vezes, a presença de células blásticas leucêmicas no sangue periférico e envolvimento do baço, fígado e linfonodos (POMBO – DE - OLIVEIRA et al., 2004).

Morfologicamente, todas as leucemias agudas são caracterizadas pela presença de células hematológicas imaturas. O grande problema é diferenciar tais células, se é linhagem mielóide ou linfóide, e mais, determinar a sub-linhagem, ou seja, o seu subtipo. Apesar de morfologicamente semelhantes, o tratamento de tais doenças difere sobremaneira entre seus diferentes tipos ou subtipos. Deste modo, diagnosticar corretamente representa uma grande possibilidade de cura. Falhar no diagnóstico corresponde a erro no tratamento e óbito (OLIVEIRA, 2004).

A citometria de fluxo surgiu como uma poderosa tecnologia capaz de fazer o diagnóstico diferencial preciso e exato de quase 99,0 % dos subtipos de leucemias agudas, através da imunofenotipagem com os anticorpos monoclonais (JAFE et al, 2008).

A utilização desta tecnologia é ampla em laboratórios clínicos e de pesquisa pela disponibilidade do estudo dos antígenos em membrana celular, componentes intracitoplasmáticos e nucleares. Ela tem sido utilizada na investigação da célula como um todo ou em seus constituintes celulares, como organelas, núcleo, DNA, RNA, cromossomos, citoquinas, hormônios e conteúdos protéicos. Métodos para estudos funcionais celulares estão em constante desenvolvimento por esta tecnologia, como por exemplo: proliferação celular, síntese de DNA e análise do ciclo do DNA celular (BACAL; STRACHMAN, 2003).

A aplicação de marcadores de proliferação celular assegura não só uma medida mais acurada da quantidade de células em proliferação, por estarem expressos nos vários estágios do ciclo celular, como também a possibilidade de investigação das neoplasias humanas de maneira simplificada, rápida e pouco dispendiosa (HALL; LEVINSON, 1990; RABENHORST et al.; 1994).

Os estudos de proliferação tentam correlacionar marcadores de proliferação com a sensibilidade a regimes quimioterápicos de indução e com a resposta ao tratamento, traduzidos pela obtenção de remissão completa, maior duração da remissão, maior sobrevida total e maior sobrevida livre de doença (BEITLER, 1997).

A idéia de que proliferação celular e agressividade neoplásica possa se tratar de fenômenos associados não é recente. Desde a década de 70 vários autores procuraram correlacionar parâmetros cinéticos das células leucêmicas com a sensibilidade a regimes quimioterápicos de indução e com a sobrevida (RICCARDI et al., 1986).

O anticorpo Ki-67 reconhece um antígeno que está associado ao núcleo celular e que, em células continuamente ciclizantes, é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em G₀, permitindo a avaliação da fração de crescimento de células normais ou neoplásicas. Assim, o índice de proliferação avaliado pela porcentagem de células positivas para o Ki-67 representa um importante marcador de prognóstico em vários estudos (GERDES et al., 1984; TIEMANN et al., 2005; KATZENBERGER et al, 2006; SCHRADER et al, 2004).

O ferro, um dos elementos fundamentais da vida, é transportado por transferrina no soro e absorvida pelas células através do receptor de transferrina (PONKA, 1999; KAWABATA et al, 2001). O receptor de transferrina é amplamente expresso na membrana, proteína esta que desempenha um papel fundamental no metabolismo do ferro. A transferrina se liga ao ferro férrico com alta afinidade para solubilizá-lo, tornando-o reativo e entregando-o às células (RENÉE et al, 2003). O receptor de transferrina CD71 tem sido utilizado para medir a cinética celular, pois células que estão proliferando requerem ferro e, portanto, expressam o receptor de transferrina (PILERI et al., 1987).

Antes da realização deste trabalho, não se utilizavam técnicas para determinação da proliferação celular nas leucemias agudas em nosso estado. Como consequência, inexistiam dados científicos sobre a proliferação celular em nossa população. Deste modo, o presente trabalho vem contribuir com a implantação de técnicas que anteriormente não eram utilizadas em nosso meio, colaborando com a formação técnica-científica em nosso estado.

Além disso, a proliferação celular está intimamente ligada à agressividade neoplásica e à resposta terapêutica. Portanto, esta pesquisa fornece informações que associadas ao diagnóstico, podem contribuir de forma significativa para a elevação das taxas de cura, bem como a melhora da qualidade de vida dos pacientes leucêmicos em nosso estado.

2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Leucemias: Histórico, Biologia, Classificação e Epidemiologia

A primeira descrição de um caso de leucemia foi feita por Velpeau em 1827, apesar de algumas observações terem sido feitas desde 1825 sobre pacientes com aumento do volume do baço e aparentarem sangue espesso. Apesar de não se observar foco infeccioso, devido ao aspecto do sangue, estas mudanças foram atribuídas à presença de “material purulento” no sangue, introduzindo-se o termo “leucocitemia”. Em, 1847, Virchow utilizou o termo “sangue branco” ou “leucemia”, palavra que deriva do grego, para descrever a aparência pouco característica do sangue de seu paciente, e a inversão da proporção usual de células brancas e vermelhas (MILLER, 1991).

A leucemia resulta de uma proliferação desordenada de células hematopoéticas, chamadas de blastos, que ocupam o espaço das células normais na medula óssea e disseminam-se para o sangue periférico e órgãos como baço, fígado e linfonodos (GUNZ, 1990).

Tradicionalmente, as leucemias são agrupadas em agudas e crônicas com base na sua história natural e no nível de maturação das células neoplásicas. A leucemia aguda possui um curso clínico mais rápido, caracterizando-se por um defeito na maturação, o que induz a um acúmulo de células imaturas (blastos) e, se não tratada, leva ao óbito em poucas semanas ou meses. As leucemias crônicas, ao contrário, são definidas por hiperplasia maciça de elementos maduros e têm curso indolente, com história natural que pode durar até anos (MENDES, 2002).

As leucemias são classificadas em linfóide, mielóide e bifenotípica, dependendo da linhagem de células afetada. Alguns hematologistas franceses, americanos e britânicos

formaram o grupo cooperativo FAB em 1976, introduzindo e padronizando critérios diagnósticos para a classificação das leucemias. Segundo esta classificação, as leucemias mielóides agudas são subclassificadas em 8 tipos: M0 (LMA sem diferenciação morfológica), M1 (LMA com mínima diferença morfológica); M2 (LMA com diferenciação); M3 (LMA promielocítica; M4 (LMA mielomonocítica); M5 (LMA monocítica); M6 (eritroleucemia) e M7 (LMA megacarioblástica) (JENNINGS; FOON, 1997; LUSIS, 2000; YAMAMOTO, 2000). Por outro lado, segundo essa mesma classificação, as leucemias linfóides agudas foram subdividas em L1 (cujos blastos são pequenos, de tamanho uniforme com alta relação núcleo citoplasma, citoplasma escasso e nucléolo pouco evidente), L2 (blastos de tamanho variável, com baixa relação núcleo citoplasma, citoplasma basófilo e nucléolo único e evidente) e L3 (blastos de tamanho uniforme e citoplasmas intensamente basófilo com vacúolos) (BENNETT et al, 1976).

Em 1995, o grupo europeu para caracterização das leucemias (EGIL) estabeleceu critérios para a classificação imunológica das mesmas baseadas na expressão dos marcadores celulares. As leucemias agudas foram divididas em LLA de linhagem B e de linhagem T, sendo ambas ainda subdivididas em quatro tipos (BI a BIV e TI a TIV). A LMA foi subdividida em 6 tipos (mieolomonocítica, eritróide, megacariocítica, pouco diferenciada, LMA TdT+ e LMA associada com a expressão associada de um ou dois marcadores linfóides). A leucemia bifenotípica (BAL) foi assim designada de acordo com a expressão de dois ou mais marcadores de diferentes linhagens. (BENE et al, 1995).

Dados revelam que as leucemias representam 31% de todos os casos de câncer em menores de 15 anos e 25% em menores de 20 anos e sua ocorrência varia de acordo com a faixa etária, acometendo 17% de crianças menores de 1 ano de vida, aumentando para 46%

aos 2 e 3 anos de idade, e então diminuindo para 9% aos 19 anos de idade (SMITH; RIES, 2002; INCA, 2009).

Nos Estados Unidos da América, entre 1992 e 2004 foi constatada uma taxa de incidência de leucemia em menores de 14 anos de 41,4/1 milhão de pessoas (LINABERY; ROSS, 2008). Na Inglaterra e no País de Gales a incidência média de leucemia em menores de 14 anos passou de 38,3 entre 1971 a 1975, para 46, 1/ 1 milhão de pessoas no período de 1996 a 2000 (SHAH; COLEMAN, 2007).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (2008), as primeiras informações sobre a incidência de câncer na infância no Brasil foram apresentadas pelo Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP) de São Paulo (1969-1978), Recife (1967-1979) e Fortaleza (1978-1980). Nestas localidades, as leucemias foram o tipo de câncer infantil mais incidente, tanto no sexo masculino como no feminino. A segunda publicação da International Agency For Research On Cancer (IARC) mostrou os resultados dos RCBP de Goiânia (1989-1994) e Belém (1987-1991), sendo as leucemias o tipo mais incidente nestas localidades (PARKIN et al., 1998).

Estudos mostraram demonstraram uma tendência decrescente na mortalidade por leucemia aguda no Brasil no período entre 1980 e 2002. Segundo os autores, há uma correlação significativa entre o índice de exclusão social e as taxas de mortalidade por leucemia aguda, pois a mortalidade diminuiu nos estados mais desenvolvidos. Houve um decréscimo da mortalidade em ambos os sexos no Distrito Federal e nos estados do Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, observando-se, em contrapartida, aumento da mortalidade por leucemia aguda nos estados de Alagoas, Ceará, Maranhão, Piauí, Amazonas e Rio Grande do Norte (RIBEIRO, 2007). Dentre todas as leucemias, a leucemia linfóide aguda (LLA) é de maior ocorrência em crianças de 0 a 14

anos, com percentuais que variam de 67% a 85% das leucemias (COEBERGH et al. 2001; INCA, 2009).

A incidência de LLA na população é de 1/25.000 indivíduos/ano de 0 a 14 anos. O pico de incidência da LLA ocorre entre 2 e 5 anos de idade (GREAVES et al., 1985; MARGOLIN et al, 2005). Aproximadamente 4900 crianças apresentam diagnóstico de LLA por ano nos EUA, com uma incidência de 3 a 4 casos/100.000 crianças brancas ou 29,2 casos por milhão, incluindo todas as crianças dos Estados Unidos da América (MARGOLIN et al, 2005).

A LMA representa cerca de 15%-20% das LA da infância e 80% das dos adultos (MARTINS; FALÇÃO, 2000; HALL, 2001). A mediana de idade ao diagnóstico da LMA é de aproximadamente 65 anos nos EUA, com uma incidência anual de 2,7 casos para 100.000 pessoas para todas as idades, e 13,7 casos por 100.000 pessoas para aqueles com idade de 65 anos ou mais (SEKERES; STONE, 2002).

A LMA é mais comum no sexo masculino do que no sexo feminino. As LMAs têm maior coeficiente de incidência, para ambos os sexos, em Osaka (10,8/1.000.000; 8,6/1.000.000), Shangai (13,5/1.000.000; 10,5/1.000.000), Eslovênia (10,1/1.000.000; 4,3/1.000.000) e a população maori da Nova Zelândia (13,4/1.000.000; 12,0/1.000.000). Há um certo predomínio do sexo masculino, excetuando-se Zaragoza, onde as LMAs ocorrem cerca de três vezes mais no sexo feminino (7,8/1.000.000) (LÖWENBERG, 2001; BAIN, 2003; DOUER, 2003; IOVINO; CAMACHO, 2003; RODRIGUES et al, 2003).

2.2 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi originalmente desenvolvida, no fim dos anos 50, para a contagem e análise de células sanguíneas. A hematologia e a imunologia celular foram indubitavelmente as duas áreas da Biologia que impulsionaram o desenvolvimento da tecnologia da citometria de fluxo (VASCONCELOS, 2007).

A citometria de fluxo é, por definição, a medida (metria) das propriedades celulares (cito). Corresponde a uma técnica que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem numa suspensão líquida. Quando as partículas intersectam o feixe de luz, ocorre um processo de dispersão fotônica e/ou de emissão de fluorescência, cuja intensidade está dependente das características das partículas. Os fótons que são dispersos frontalmente vão ser recebidos e analisados por um fotodíodo (detector da dispersão frontal) e os que são dispersos ortogonalmente (90°) são recebidos por uma série de filtros ópticos e são analisados em tubos fotomultiplicadores (dispersão lateral e fluorescência) (MELAMED et al, 1990; DOLEZEL, 1997) (Figura 01).

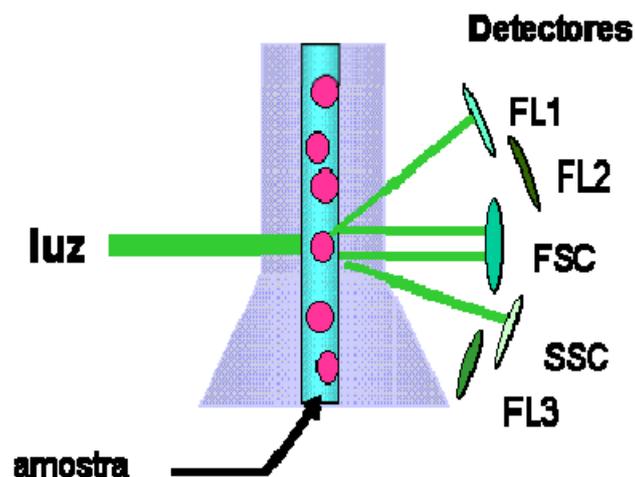


Figura 01: Representação esquemática do funcionamento de um citômetro de fluxo. As células na suspensão líquida intersectam o feixe de luz emitindo fluorescência. A luz dispersada (frontal e lateral) é recebida e analisada por detectores.

A importância da citometria de fluxo decorre da habilidade do método de medir vários parâmetros de milhares de células, individualmente, em poucos minutos. Desta maneira, ela pode ser utilizada para definir e enumerar adequadamente subpopulações celulares. Os estudos de proliferação celular foram uma das primeiras aplicações da citometria de fluxo e ainda hoje continua sendo usada. Esse tipo de avaliação possibilita um melhor conhecimento da atividade proliferativa da população celular estudada, permitindo informações a respeito do prognóstico e da monitorização da resposta da neoplasia à terapêutica, uma vez que nem todas as células malignas apresentam-se no mesmo estágio proliferativo no ciclo celular (FREITAS JÚNIOR, et al, 2003).

2.3 Princípios de Cinética Celular nas Leucemias Agudas

A proliferação celular é um dos eventos mais importantes dentro dos processos biológicos e não há dúvida quanto à relevância de se avaliar a atividade proliferativa no estudo de muitos processos patológicos (HALL; LEVINSON, 1990). A proliferação celular pode ser definida como o aumento do número de células resultante da complementação do ciclo celular (LEVINE et al, 1994).

O ciclo celular corresponde ao intervalo entre duas mitoses sucessivas que originam duas células, sendo que uma destas, ou ambas, se dividem novamente (ANDREEFF, 1986). Este engloba uma cascata de eventos, processados de maneira ordenada, assegurando a duplicação fiel dos componentes celulares em uma seqüência lógica e a divisão destes componentes em duas células filhas (LEVINE, et al., 1994).

O ciclo celular é dividido em uma fase mitótica (M), durante a qual a célula divide-se fisicamente, e uma interfase, durante a qual os cromossomos duplicam e a célula cresce antes da divisão (HOFFBRAND et al, 2008). A interfase é um período de intensas atividades relacionadas com a proliferação e está dividida nas fases G1, S, G2 e G0, que são caracterizadas por mudanças no conteúdo de DNA. (LEVINE et al.,1994; RABENHORST et al., 1994). As células fora do ciclo celular estão na chamada fase G0 e podem permanecer nesta fase por tempo indeterminado (HALL; LEVINSON, 1990; ALBERTS et al., 1994; RABERNHOST et al., 1993; RABERNHOST et al; 1994).

Muitos tipos celulares requerem um tempo prolongado para passar da fase de quiescência (G0) para a fase de compromisso com a divisão celular (G1). Existem inúmeros fatores que agem determinando a permanência das células em G0, o começo da proliferação ou ainda o retorno à fase de quiescência (HARTWELL; WEINERT, 1989; McINTOSH; KOONCE, 1989; MURRAY; KIRSCHMNER, 1989, STUDZINSKI, 1989, NOURSE, 1990).

Os eventos do ciclo celular são concatenados, de modo que o início de um evento depende do término completo de cada um dos eventos anteriores (LARSEN, 1992). Estudos sobre os mecanismos envolvidos nesse processo, iniciados nos anos setenta, evidenciaram que estes são dirigidos por um grande número de macromoléculas controladoras, descritas por Hartwell e Weinert, ativadas em seqüências altamente organizadas e que funcionam como verdadeiros check points (HARTWELL; WEINERT, 1989). Estas moléculas atuam como um sistema de controle do ciclo celular, sendo capazes de checar no final de cada fase, por exemplo, se as condições são favoráveis à mitose, se há dano ao DNA, ou se a replicação cromossômica está exata, permitindo, então, o início da fase subsequente (ARISAWA et al, 1999)

O início ou *start* do ciclo celular é controlado por hormônios, fatores nutricionais e de crescimento, sendo que estes últimos estimulam a proliferação celular, através da ligação com receptores específicos, os quais, quando ativados, emitem um sinal de transdução do citoplasma ao núcleo celular (RABERNHOST et al., 1994).

Como resultado da utilização de várias técnicas bioquímicas e de genética molecular, observou-se que o controle da proliferação celular foi conservado através da evolução, por meio de mecanismos moduladores similares. Uma vez que a célula tenha tomado a decisão de proceder sobre o *start*, os outros eventos seguirão ordenadamente como resultado de uma rota do ciclo celular. A progressão ordenada dentro do ciclo celular é garantida por uma diversidade de proteínas. Um ponto essencial na regulação do ciclo celular é dado pelas proteínas CDK (quinase dependente de ciclina), cuja regulação por fosforilação é feita pelas ciclinas (ALBERTS et al., 1994; HALL; COATES, 1994).

As ciclinas recebem este nome por estarem presentes durante o ciclo celular. Estas são proteínas que ocorrem ciclicamente sendo ativadas e degradadas durante o ciclo celular. As ciclinas podem ser classificadas em pelo menos dois tipos: as mitóticas, que em conjunto com as CDKs formam o fator promotor de maturação (MPF), e as ciclinas G1, necessárias para a entrada da célula na fase S. Dentre as ciclinas, as mais importantes e mais bem caracterizadas são as ciclinas A, B, D e E (HALL; COATES, 1995).

Dentre as quinases dependentes de ciclinas (CDKs), pode-se citar a CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6. Acredita-se que essas proteínas funcionem somente na forma de complexos, ou seja, a subunidade catalítica desse complexo, a CDK, só exercerá seu papel quando associada ao seu par regulatório, a ciclina. Quando complexos ciclina-CDK estão presentes em concentrações suficientemente altas, certos pontos de checagem são passados e a célula entra na fase seguinte do ciclo celular (ALBERTS et al, 2001).

Uma vez que as células entram em fase S, o ciclo celular fica independente de fatores extracelulares e ele progride até a divisão celular e a produção de duas células-filhas (LASKEY, et al, 1989; PARDEE, 1989).

O ciclo celular é um processo complexo que se situa no core da hematopoiese (HOFFBRAND et al, 2008). Ao processo de formação das células sanguíneas dá-se o nome de hematopoiese (OLIVEIRA, 2004). Nas primeiras semanas da gestação, o saco vitelínico é o principal local da hematopoiese, de 6 semanas até 6 a 7 meses de vida fetal, o fígado e o baço são os principais órgãos hematopoiéticos e continuam a produzir células sanguíneas até cerca de duas semanas após o nascimento. A medula óssea é o sítio hematopoiético mais importante durante a infância e a vida adulta, é a única fonte de novas células sanguíneas (HOFFBRAND et al, 2008).

As células sanguíneas derivam de progenitores primitivos com a capacidade pluripotente de auto-renovação, localizados na medula óssea, de modo que o “pool” celular é constantemente mantido, dando origem às células hematopoiéticas por um processo de diferenciação e de divisão celular (CALABRETTA; BASERGA, 1991).

A diferenciação celular a partir da célula-tronco hematopoiética passa por uma etapa de células progenitoras comprometidas, isto é, com potencial de desenvolvimento restrito (HOFFBRAND et al, 2008). Uma vez comprometida, estas células vão amadurecer, adquirir propriedades funcionais específicas e ser lançadas na circulação sanguínea (OLIVEIRA, 2004).

A duração do ciclo celular varia de tecido a tecido, mas os princípios básicos são comuns a todos (HOFFBRAND et al, 2008). Na medula óssea normal o tempo de duração da fase S é de 13 a 14 horas para mieloblastos, promielócitos e mielócitos, e o tempo total do

ciclo celular é de 18 a 20 horas para mieloblastos, de 22 a 25 horas para promielócitos, e de 40 a 50 horas para mielócitos (ANDREEFF, 1986)

A existência de falhas no sistema de regulação do ciclo celular permite que células geneticamente anormais dividam-se, acumulando danos genéticos ocasionando, em consequência, o início da progressão das neoplasias (BEITLER, 1997).

Independentemente de suas causas primárias, as neoplasias apresentam distúrbios no controle do ciclo celular, que levam ao aumento da divisão celular e à formação de massas tumorais (RABENHORST et al, 1993)

As células normais podem sofrer transformação neoplásica. Esta é atribuída a mudanças nos parâmetros de cinética celular (PRESTON et al, 1990). Na leucemia aguda, a população de células imaturas (blastos) predomina na medula óssea, podendo-se, contudo, encontrar células em diferentes estágios de maturação, definidos pelos critérios morfológicos e citoquímicos já descritos. Acredita-se que ocorreria uma parada de maturação celular que levaria ao acúmulo de células blásticas devido ao aumento na proliferação e da morte celular (ANDREEFF, 1986).

2.4 Proliferação celular nas leucemias agudas

O emprego de marcadores biológicos na avaliação do comportamento clínico das neoplasias se constitui em um importante instrumento auxiliar, posto que as alterações determinantes da progressão de qualquer carcinogênese são resultados de numerosos eventos celulares que ocorrem em nível genético e bioquímico (SCHLUTE et al., 1993; SHI et al.,

1991; BRUNO; DARZYNKIEWICZ, 1992; HEIDEBRECHT et al., 1996; PIERGA et al., 1996; ELLIS et al., 1996).

A aplicação de marcadores de proliferação celular asseguram, não só uma medida mais acurada da quantidade de células em proliferação, por estarem expressas nos vários estágios do ciclo celular, como a possibilidade de investigação das neoplasias humanas de maneira simplificada, rápida e pouco dispendiosa (HALL; LEVINSON, 1990; RABENHORST et al.; 1994).

A determinação do receptor de transferrina (CD71) fornece parâmetros para medir a cinética celular. As células proliferantes requerem ferro e, portanto, expressam receptores de transferrina. Nas células que tem um alto requerimento de ferro o número de receptores é alto (NECKERS, 1991).

Um trabalho realizado por Scott et al (1988) estudou os marcadores CD71 e Ki-67 nas doenças onco-hematológicas. Observaram neste estudo que nas leucemias agudas a expressão desses marcadores era maior nas leucemias agudas que nas leucemias crônicas B e T.

Em um estudo realizado por Thorstensen e Romslo (1993), em pacientes com LLA, observou-se que crianças de 1 a 3 anos de idade apresentaram maior expressão do CD71 que adultos e adolescentes entre 10 e 15 anos, sugerindo que a expressão deste marcador diminui com a idade.

O Ki-67 foi identificado como uma proteína nuclear, logo após o anticorpo correspondente foi descrito pelo mesmo grupo na cidade de Kiel (daí o "Ki"), após imunização de camundongos com células do linfoma de Hodgkin linhagem L428 (67 refere-se ao número da placa de cultura em tecido que foi encontrado) (GERDES et al, 1991).

O anticorpo Ki-67 reconhece um antígeno que está associado ao núcleo celular e que, em células continuamente ciclizantes, é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0 (GERDES et al., 1984).

O índice de proliferação celular usando como marcador o Ki-67 tem demonstrado correlações positivas entre a marcação com o Ki-67 e o grau de malignidade e outros aspectos prognósticos em vários tipos de neoplasias (ARISAWA et al, 1999).

Drach et al (1989) estudaram a expressão do Ki-67 em medula óssea e sangue periférico de pacientes diagnosticados com leucemias agudas e linfomas. Neste estudo observaram que dentre os pacientes diagnosticados com LLA, aqueles com LLAT tiveram a maior expressão do Ki-67, apresentando a LMA menor expressão em relação às LLAs. Os autores também estudaram as taxas de proliferação em sangue periférico e medula óssea, observando que a expressão deste marcador no sangue periférico diferia da encontrada na medula óssea, sendo maior nesta última. Resultados semelhantes foram encontrados por Ito et al (1992), que avaliaram em crianças com leucemia aguda os marcadores de proliferação celular Ki-67 e o antígeno de proliferação nuclear (PCNA), apresentando os casos de LLA uma maior expressão que na LMA. Dentre as LLAs, a LLA tipo T apresentou uma maior proporção de células positivas para o Ki-67. Os autores sugerem em seu estudo que a expressão do Ki-67 reflete diferenças na atividade proliferativa, dependendo do tipo da doença.

Yamada et al (1991) estudaram o prognóstico da proporção de célula Ki-67 positivas em adultos com leucemia de células T, para tanto, estudaram pacientes com leucemia aguda de células T e doenças crônicas da leucemia de células T. Embora não tenha sido observada diferença na quantidade de células leucêmicas entre os casos agudos e crônicos, havia grandes diferenças na porcentagem de células positivas para o Ki-67. Os autores observaram também

uma correlação inversa entre a sobrevida dos pacientes e a expressão do Ki-67, onde os pacientes com maior expressão do marcador tendem a uma menor sobrevida. Os autores também indicam, em seu estudo, que o Ki-67 pode ser utilizado como um indicador de progressão da doença, sugerindo que este marcador poderia servir como um instrumento útil para avaliar a resposta ao tratamento em pacientes com leucemia de células T do adulto.

Liuqing et al (2006) estudaram o Ki-67 juntamente com marcadores de apoptose. Neste estudo a expressão dos marcadores foi determinada em medula óssea de crianças diagnosticadas com leucemia aguda e crianças com medula normal como controle. Observaram uma significativa correlação positiva entre os marcadores de apoptose e o Ki-67, sugerindo que estes marcadores são expressos na leucemia aguda infantil e estão envolvidos na modulação da apoptose e proliferação celular.

3 - OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Estudar a proliferação celular utilizando os marcadores Ki-67 e CD71 nos pacientes com leucemias agudas em centro oncológico de referência no Estado do Maranhão.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os pacientes leucêmicos quanto ao diagnóstico, sexo, idade e localização geográfica no estado do Maranhão;
- Quantificar a expressão do antígeno Ki-67 e CD71 em sangue periférico e medula óssea nos tipos e subtipos de leucemias;
- Correlacionar os índices de proliferação obtidos por citometria de fluxo, segundo tipos e subtipos de leucemias;
- Avaliar os níveis de hemoglobina, leucócitos totais, porcentagem de blastos e contagem de plaquetas, em sangue e porcentagem de blastos em medula óssea dos portadores de leucemias agudas ao diagnóstico;
- Relacionar os índices de proliferação celular e os parâmetros laboratoriais com a resposta terapêutica.

4 – MÉTODOS

4.1 Pacientes

A seleção dos pacientes para o estudo foi efetuada de forma prospectiva tendo início em dezembro de 2008 e término em novembro de 2009 (12 meses). Os pacientes foram provenientes do Instituto de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB), diagnosticados no Laboratório de Pesquisa Clínica do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (LPC-CEPEC/HUUFMA) como portadores de leucemias agudas “de novo”, seguindo o limite mínimo de 20% de blastos definidos pela classificação da OMS (2001).

As LLAs foram subdividas segundo classificação EGIL em BI, BII, BIII e BIV (BENNET et al, 1995). A LMA foi dividida em M0 e M1 (sem maturação), M2 e M4 (com maturação) e M3 (leucemia promielocítica). Não foi possível dividir a LLAT em subtipos, pois no diagnóstico imunofenotípico não utilizamos alguns reagentes para complementação do painel e diagnóstico diferencial.

Foram excluídos do estudo os pacientes com diagnóstico de leucemia bifenotípica aguda (n=2), pacientes em crise blástica de leucemia mielóide crônica (n=0), pacientes com leucemias agudas secundárias a outras neoplasias (n=0), bem como pacientes que perderam a expressão do CD34 (n=4).

4.2 Aspectos clínicos e laboratoriais

Os dados clínicos foram obtidos através de revisão de prontuários médicos. Foram analisados sexo, idade ao diagnóstico, municípios de residência (divididos em regiões geográficas segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE), estado clínico atual, e dados laboratoriais do hemograma e mielograma ao diagnóstico e após o tratamento, a fim de realizar a avaliação da resposta terapêutica.

Como critério para análise da resposta terapêutica considerou-se como remissão uma medula óssea com menos de 5% de blastos após a primeira fase de indução do tratamento, segundo os protocolos de tratamento utilizados no IMOAB, o protocolo do Grupo Brasileiro para o Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda (GBTLI-99) para LLA. Foi utilizado protocolo do Grupo Europeu Berlim-Frankfurt-Munique (BFM-83), para LMAs.

Os pacientes que abandonaram o tratamento (n=2) não puderam ser avaliados quanto à remissão e não remissão, sendo excluídos da análise. Os pacientes que foram a óbito (n=15) foram incluídos na não remissão

Para avaliação laboratorial, os valores de hemoglobina foram estratificados em três categorias: menor que 7g/dl, entre 7 e 10 g/dl e maior que 10g/dl. As plaquetas foram estratificadas em menores de 50.000/mm³, entre 50.000 e 100.000/mm³ e acima de 100.000/mm³. Os leucócitos foram estratificados em menores de 10.000/mm³, valores entre 10.000 e 50.000/mm³ e acima de 50.000/mm³.

4.3 Coletas das amostras

4.3.1 Sangue periférico

Foram obtidas amostras de sangue periférico através da punção venosa em tubos contendo EDTA. A contagem global de leucócitos, eritrócitos, plaquetas e dosagem de hemoglobina foram realizadas por sistema automatizado. A contagem diferencial de leucócitos (incluindo os blastos) foi realizada por microscopia óptica comum.

A avaliação morfológica seguiu os critérios do grupo FAB (BENNETT et al, 1976; BENNETT et al, 1985; BENNET ET al, 1991) como triagem para a imunofenotipagem das leucemias agudas.

4.3.2. Aspirado de Medula óssea

A amostra do aspirado de medula óssea (mielograma) colhida pelo Serviço de Oncologia do IMOAB, foi submetida à distensão em lâminas para obtenção do esfregaço e o restante colocado em tubo com EDTA para imunofenotipagem. Os esfregaços foram corados pelo May-Grunwald-Giemsa e com colorações citoquímicas para mieloperoxidase (POX), e quando necessário para alfa-naftil-acetato-esterase (ANAE) e ácido periódico de Schiff (PAS).

A porcentagem de blastos na medula foi obtida após a contagem de um total de 250 células. Nas lâminas com colorações citoquímicas específicas, a porcentagem de células positivas foi determinada após contagem de 100 blastos.

4.4 Diagnósticos das leucemias agudas por Imunofenotipagem

A imunofenotipagem foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se um painel de anticorpos monoclonais (Becton Dickinson, San José CA, USA) direcionado contra antígenos T relacionados (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 e CD8), antígenos B relacionados (CD10, CD19, CD22, CD79a além de anticorpos policlonais anti-IgM e cadeias leves das imunoglobulinas kappa e lambda), antígenos de diferenciação mielóide (CD13, CD14, CD33, CD64, CD117, anti-mieloperoxidase ou MPO), eritróide (alfa-glicoforina), plaquetário (CD61 e CD41a) e antígenos de linhagem não específica (CD45, HLA-DR, CD34 e terminal deoxinucleotidil transferase ou TdT).

4.5 Estudos dos marcadores de proliferação celular

4.5.1 Técnica de marcação do Ki-67

Foi utilizada a técnica segundo o fabricante (Becton Dickinson, San Jose CA, USA) e adaptada com a técnica de dupla marcação utilizada pelo Hospital das Clínicas (USP) em citoplasma e membrana, sendo necessário um controle isotópico oriundo do próprio kit utilizado. Empregou-se neste estudo a dupla marcação com o anticorpo anti-Ki-67 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e o anticorpo anti-CD34, típico de células blásticas, conjugado com ficoeritrina (PE) (Figura 02 e Figura 03).

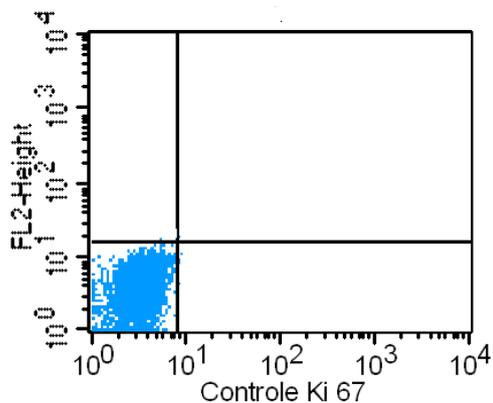


Figura 02: Controle isotípico do Ki-67 (FITC)

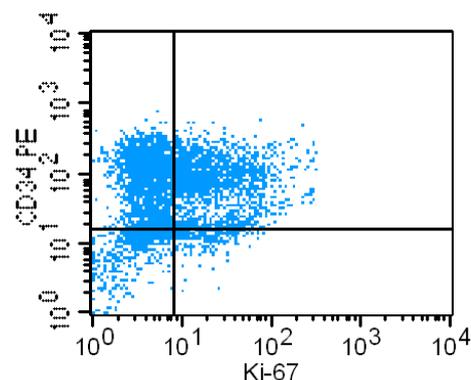


Figura 03: Dupla marcação com anticorpo anti-Ki-67 (FITC) e anti-CD34 (PE)

A suspensão celular foi ajustada na concentração 1×10^6 células por tubo, previamente identificado com os anticorpos monoclonais. Primeiramente, foi realizada marcação em membrana através do anticorpo anti-CD34 PE, sendo incubado por 20 minutos em câmara escura.

À suspensão celular foi adicionado 1 ml de solução de lise (Becton Dickinson, FACS lysing solution, San José, CA, USA) diluída 1:10 em água destilada, com posterior incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em PBS 1%, seguido de nova centrifugação.

Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensionadas em 200 μ l de tampão permeabilizante (BD FACS™ Permeabilizing Solution), incubadas por 5 minutos e, posteriormente centrifugadas, seguido pelo descarte do sobrenadante. Ao sedimento foi adicionado anticorpo anti-Ki-67 FITC e no tubo controle foi adicionado o controle isotípico, segundo indicações técnicas do fabricante. Os tubos foram incubados

em câmara escura por 20 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, realizou-se a lavagem com PBS 1% e centrifugação, descartando o sobrenadante. Ao sedimento foi adicionado 500 μ l de paraformaldeído 1% (Paraformaldehyde, Sigma-Aldrich), preservando a temperatura de 4°C ao abrigo da luz até o momento da aquisição no citômetro de fluxo.

4.5.2 Técnica de marcação do CD71

Foi utilizada a técnica de dupla marcação, utilizada pelo Hospital das Clínicas (USP) em membrana, sendo necessário um controle, que correspondia a um tubo não marcado do próprio paciente. Empregou-se neste estudo a dupla marcação com o anticorpo monoclonal anti-CD71 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e o anticorpo anti-CD34, típico de células blásticas, conjugado com ficoeritrina (PE) (Figura 04 e Figura 05).

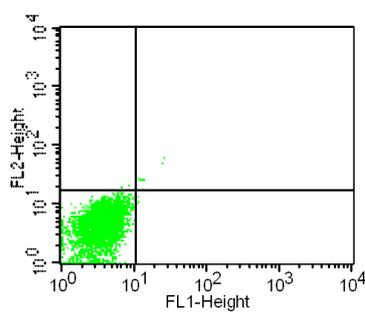


Figura 04: Controle do CD71: tubo sem marcação

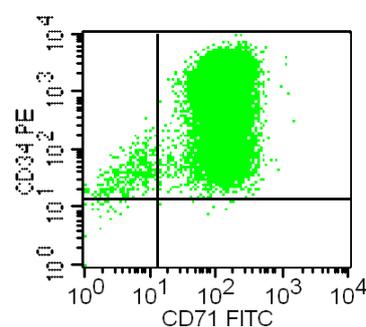


Figura 05: Dupla marcação com o anticorpo anti-CD71 (FITC) e anti-CD34 (PE)

A suspensão celular foi ajustada na concentração 1×10^6 células por tubo, previamente identificado com os monoclonais a serem utilizados. Foi realizada marcação em membrana com 5 μ l do anticorpo anti-CD71 FITC e anti-CD34 PE, sendo incubado por 20 minutos em câmara escura.

À suspensão celular foi adicionado 1 ml de solução de lise (Becton Dickinson, FACS lysing solution, San José, CA, USA) previamente diluída 1:10 em água destilada, homogeneizando em vórtex e incubando por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. O sedimento foi ressuspendido em PBS 1%, seguido de nova centrifugação.

Após descarte do sobrenadante, ao sedimento foi adicionado 500 μ l de paraformaldeído 1%, preservando a temperatura de 4°C ao abrigo da luz até o momento da aquisição no citômetro de fluxo.

4.6 Aquisição e análise por citometria de fluxo

Após a marcação dos anticorpos monoclonais, foram realizadas leituras e análises em citômetro de fluxo (FACS Calibur de Becton Dickinson, San José, CA, USA), utilizando-se o Cell Quest software, versão 3.1 (Cell Quest™ Software, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA), com aquisição de 10.000 eventos por tubo. Utilizou-se uma janela de análise (*gate*) a partir dos parâmetros de dispersão luminosa (FSC x SSC). A partir do *gate* das células em estudo, foram obtidos gráficos do tipo *dot plot* no canal FL1 (fluorescência do FITC) e canal FL2

(fluorescência do PE). Os resultados foram fornecidos na forma de porcentagem de células positivas para os anticorpos monoclonais estudados (Figura 06 a 08).



Figura 06: Etapas do estudo da proliferação celular por citometria de fluxo: (a) Marcação dos anticorpos monoclonais de proliferação celular (CD71 e Ki-67). (b) Aquisição dos tubos marcados com os anticorpos de proliferação celular. (c) Análise dos resultados.

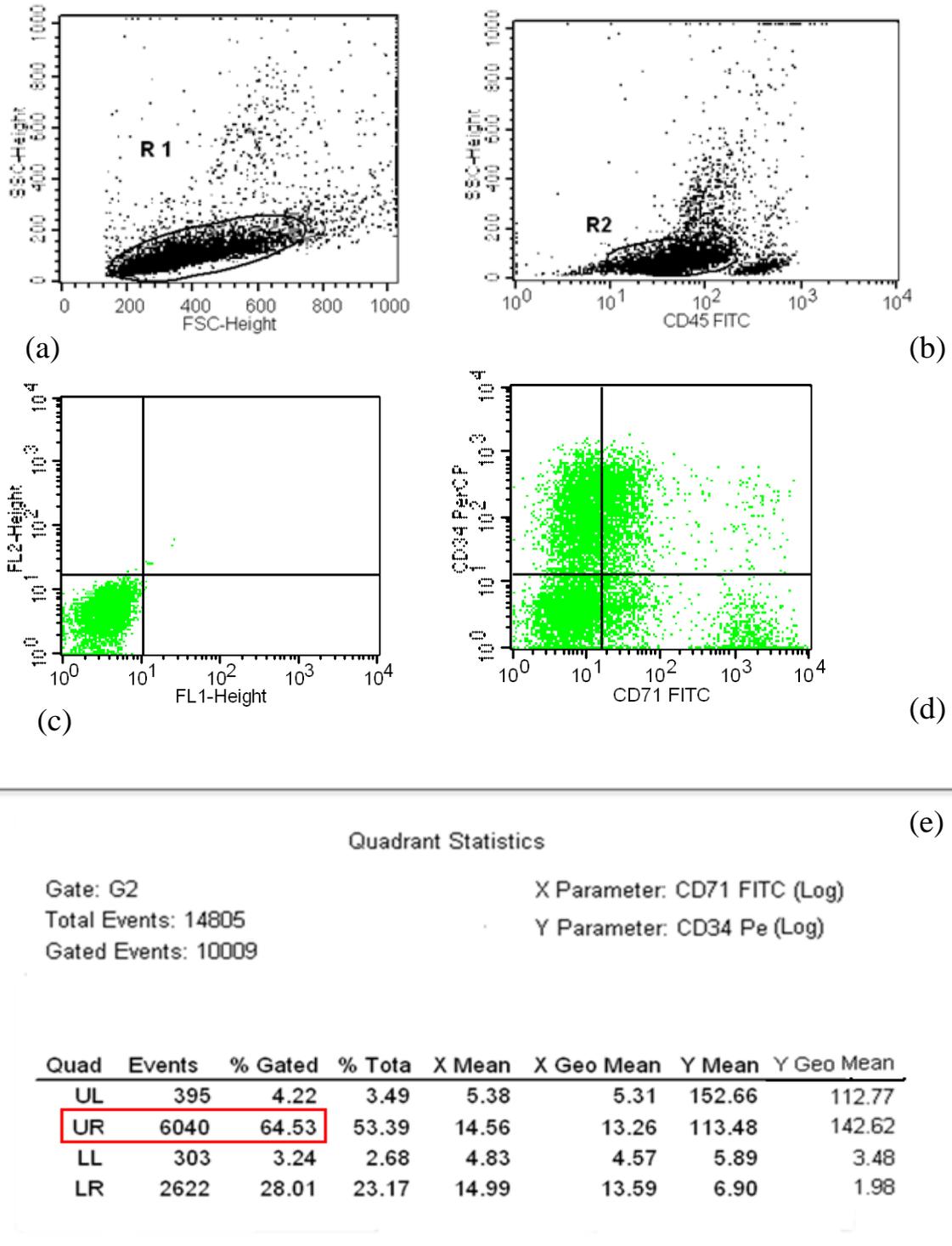
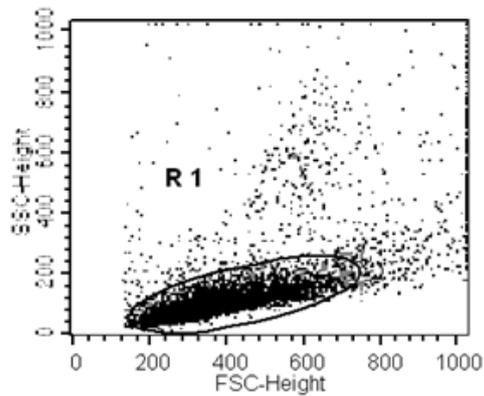
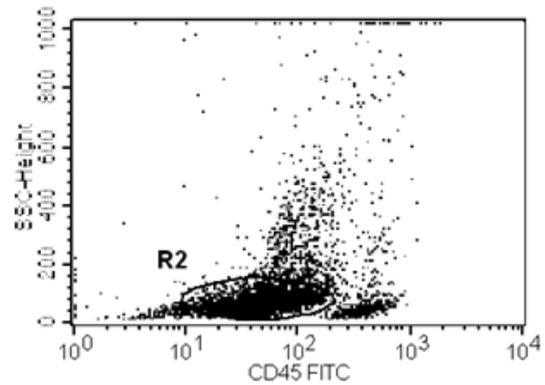


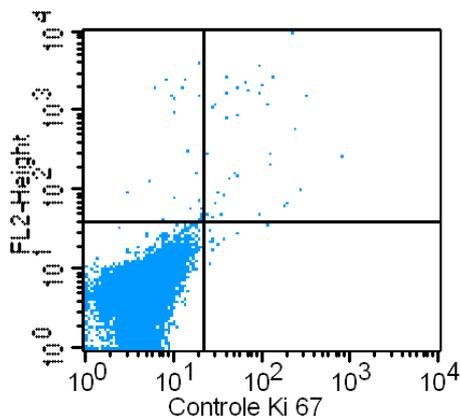
Figura 07: Análise do marcador CD71 por citometria de fluxo: a) *Dot plot* do tamanho (FSC) versus granularidade (SSC). (b) *Dot plot* do anticorpo anti-CD45 versus complexidade (SSC) no gate de blasto (R2). (c) Controle de membrana do anti-CD71 (tubo não marcado). (d) *Dot plot* da dupla marcação do anticorpo anti-CD71 versus anti-CD34. (e) Análise estatística do anticorpo anti-CD71.



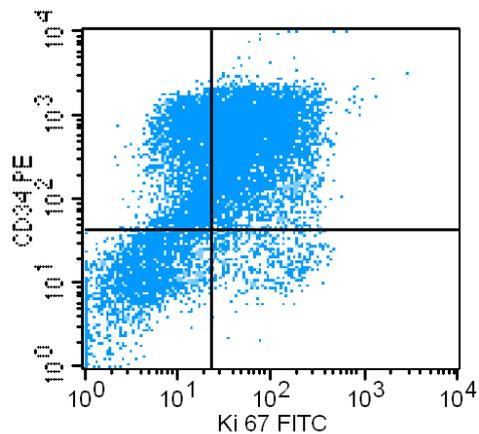
(a)



(b)



(c)



(d)

Quadrant Statistics							
Gate: G2				X Parameter: Ki 67 FITC (Log)			
Total Events: 25646				Y Parameter: CD34 PE (Log)			
Gated Events: 12255							
Quad	Events	% Gated	% Tota	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	3155	25.74	12.30	13.91	12.86	506.24	314.37
UR	6490	52.96	25.31	81.70	61.34	679.54	470.60
LL	2193	17.89	8.55	5.62	4.39	15.68	12.32
LR	417	3.40	1.63	114.99	84.48	21.41	18.89

(e)

Figura 08: Análise do marcador Ki-67 por citometria de fluxo: a) *Dot plot* do tamanho (FSC) versus granularidade (SSC). (b) *Dot plot* do anticorpo anti-CD45 versus complexidade (SSC) no *gate* de blasto (R2). (c) Controle isotípico do anticorpo anti-Ki-67. (d) *Dot plot* da dupla marcação do anticorpo anti-Ki-67 versus anticorpo anti-CD34. (e) Análise estatística do anticorpo anti-Ki-67.

4.7 Aspectos Éticos

Este projeto integra o projeto “Estudo Imunofenotípico por Citometria de Fluxo das Leucemias Agudas na Infância no Estado do Maranhão”, que foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e aprovado conforme as diretrizes descritas na Resolução de nº 196/96 e com parecer consubstanciado nº 115/2008 de 11 de março de 2008 (ANEXO A, B e C).

4.8 Análises Estatística

Os dados obtidos na pesquisa foram analisados por diferentes testes estatísticos, sendo considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Para caracterização dos pacientes, dados laboratoriais ao diagnóstico e expressão dos marcadores Ki-67 e CD71 em sangue periférico e medula óssea foram calculadas médias, medianas, e desvios padrões.

Para avaliação da distribuição dos dados (teste de normalidade), foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. As variáveis estudadas apresentaram distribuição assimétrica, assim, utilizaram-se testes não-paramétricos.

Na avaliação de diferenças na expressão dos marcadores de proliferação celular Ki-67 e CD71 em sangue periférico e medula óssea segundo os subtipos de leucemia, bem como idade e sexo, empregou-se os testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.

A relação entre as variáveis de proliferação celular foi avaliada através do cálculo dos coeficientes de correlação de Spearman para cada par de variáveis. O estudo da influência das variáveis analisadas e dos parâmetros laboratoriais sobre a resposta ao tratamento foi feita através dos testes Qui-Quadrado e Fisher.

5 – RESULTADOS

5.1 Características dos pacientes

Do total de 60 pacientes diagnosticados com leucemia aguda no referido período, 4 foram excluídos pois perderam a expressão do CD34, o que impossibilitaria a análise da proliferação apenas nas células neoplásicas, e 2 pacientes que foram diagnosticados com leucemia bifenotípica aguda, pois constituiu uma população muito pequena para avaliação. Isto possibilitou a análise da proliferação celular de um total de 54 pacientes.

Em relação ao subtipo de leucemia aguda, dos 54 pacientes avaliados, 34 pacientes (63,0%) eram portadores de LLA e 20 (37,0%) de LMA. Do total de casos com LLA, 73,5% (25/34) foram tipo B e 26,5% (9/34) tipo T.

Em relação ao sexo, 70,4% (38/54) foram do sexo masculino e 29,6% (16/54) do sexo feminino, numa proporção M: F de 2,4: 1,0.

A mediana da idade foi 9,0 anos (1 - 67) anos para o total de pacientes. Do total de pacientes, 70,3% dos pacientes (n=38) se encontravam na faixa etária menor de 19 anos e 29,7% dos pacientes (n=16), se encontravam na faixa adulta (maiores de 19 anos).

Os pacientes portadores de LLA B apresentaram mediana de 5,0 anos (1 - 56). Os pacientes portadores de LLAT apresentaram mediana de 10,0 anos (2 - 19). Para os pacientes com LMA, a mediana foi de 21,5 anos (1 - 67).

Segundo o município de residência, os 54 pacientes de nosso estudo foram procedentes de 36 diferentes municípios do Estado do Maranhão, e distribuídos nas seguintes regiões geográficas segundo o IBGE: noroeste (8 municípios), nordeste (16 municípios), sudoeste (3 municípios), central (8 municípios) e sudeste (1 município) (Apêndice A). A Figura 09 apresenta mapa da distribuição dos pacientes nas regiões geográficas do Estado do Maranhão.

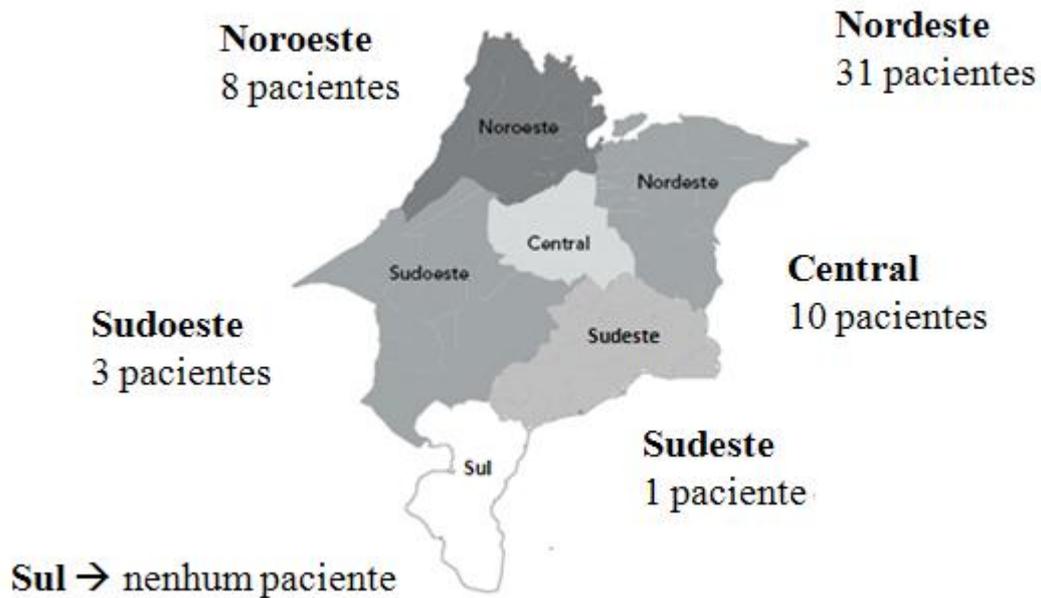


Figura 09: Mapa da distribuição dos pacientes nas regiões geográficas do Estado do Maranhão, Brasil.

Foram diagnosticados com LLA B na região noroeste 3 pacientes, na região nordeste 16 pacientes, na região sudoeste 3 pacientes e na região central 3 pacientes, não sendo encontrados pacientes com LLA B na região sudeste. Para LLA T foram diagnosticados 3 pacientes na região noroeste, 3 pacientes na região nordeste, na região central, 2 pacientes e na região sudeste apenas 1 paciente, não sendo encontrados pacientes com LLA T na região sudoeste. Na região noroeste, foram diagnosticados com LMA, 2 pacientes, na região nordeste foram diagnosticados 11 pacientes e na região central foram encontrados 5 pacientes, não sendo encontrados pacientes portadores de LMA nas regiões sudoeste e sudeste.

5.2 Estudos da proliferação celular

As diferentes variáveis de proliferação foram estudadas separadamente nos blastos do sangue periférico e medula óssea dos pacientes portadores de LLA (B e T) e LMA, posteriormente, os dados foram comparados entre si.

5.2.1 Estudo da proliferação celular através do marcador Ki-67 e CD71 em medula óssea e sangue periférico.

Os valores da expressão do Ki-67 e do CD71 por tipo de leucemias agudas encontram-se na tabela 01.

Tabela 01: Expressão dos marcadores Ki-67 e CD71 (sangue periférico e medula óssea) por tipo de leucemia aguda em pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Tipo de leucemia	Ki-67										CD71								
	MO					SP					MO					SP			
	N	\bar{X}	dp	Med		N	\bar{X}	dp	Med	p*	N	\bar{X}	dp	Med	N	\bar{X}	dp	Med	p*
LLAB	18	26,2	18,3	25,8		6	37,8	26,0	44,2	0,3399	18	26,1	24,4	17,5	6	13,0	11,7	9,7	0,1433
LLAT	5	12,9	15,0	10,8		4	27,7	24,4	30,9	0,1416	5	40,6	33,3	38,0	4	25,3	33,2	9,6	0,2207
LMA	15	16,5	13,3	9,9		5	26,0	3,6	4,2	0,0129**	15	36,1	30,0	32,3	5	49,6	41,5	64,5	0,6312

\bar{X} = média em %; dp= desvio padrão; Med= mediana em %; MO= medula óssea; SP= sangue periférico.

* p valor para Mann-Whitney.

** Valor estatisticamente significante (p < 0,05).

No total de pacientes, a mediana da expressão do Ki-67 em medula óssea apresentou-se maior para a LLA B com 25,8%, contra 10,8% da LLAT e 9,9% na LMA, entretanto, não apresentou diferença estatística ($p=0,1318$). A expressão do Ki-67 em sangue periférico apresentou maior mediana maior na LLAB com 44,2%, contra 30,9% da LLAT e 4,2% na LMA, não apresentando diferença estatística ($p=0,1513$).

Na análise do CD71 em medula óssea, observou-se uma maior expressão deste marcador na LLAT, com mediana de 38,0%, contra 17,5% das LLAB e 32,3% das LMA, não apresentando diferença estatística ($p=0,6198$). No sangue periférico a expressão da mediana do CD71 foi maior na LMA com 64,5%, contra 9,7% das LLA-B e 9,6% das LLA-T, não apresentando diferença estatística ($p=0,4926$).

Em relação aos tipos de leucemias agudas, houve diferença estatisticamente significativa ($p= 0,0129$) quando foram comparados os valores do Ki-67 em sangue periférico e Ki-67 em medula óssea nas LMAs (Tabela 01).

Quando analisadas as expressões dos marcadores de proliferação por faixa etária (infanto-juvenil e adulta), não houve significância estatística ($p=0,2981$).

Os valores da expressão do Ki-67 e do CD71 por subtipo de leucemias agudas encontram-se na tabela 02.

Tabela 02: Expressão dos marcadores Ki-67 e CD71 (sangue periférico e medula óssea) por subtipo de leucemia aguda em pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Tipo de leucemia	Ki-67								CD71							
	MO				SP				MO				SP			
	N	\bar{X}	Dp	Med	N	\bar{X}	dp	Med	N	\bar{X}	dp	Med	N	\bar{X}	dp	Med
LLAB																
BI	3	12,8	18,7	10,0	2	55,4	5,0	57,4	3	40,5	26,6	33,3	2	15,9	9,0	19,2
BII	7	34,6	18,4	27,2	2	22,6	24,6	17,9	7	28,3	24,7	15,3	2	23,4	38,7	4,0
BIII	7	22,7	12,9	30,2	2	27,1	26,4	38,1	7	18,4	14,3	14,5	2	16,0	15,3	15,8
BIV	2	3,51	2,17	3,51	-	-	-	-	2	54,6	58,9	54,6	-	-	-	-
LLAT	9	12,9	15,0	10,8	9	27,7	24,4	30,8	9	40,6	33,3	38,0	9	25,3	33,2	9,6
LMA																
M0.M1	4	14,1	0,4	12,4	3	2,1	2,0	1,8	4	29,7	23,5	27,0	3	51,4	43,3	64,5
M2.M4	3	13,1	11,8	9,2	-	-	-	-	3	31,7	23,9	30,4	-	-	-	-
M3	3	11,7	7,5	12,6	1	-	-	-	3	17,1	18,3	9,5	1	-	-	-

\bar{X} = média em %; dp= desvio padrão; Med= mediana em %; MO= medula óssea; SP= sangue periférico.

Quando analisadas as expressões dos marcadores de proliferação entre os subtipos de leucemias agudas, não houve significância estatística ($p=0,2981$). Não foi possível determinar as expressões dos marcadores estudados em menores e maiores de 19 anos, devido ao pequeno número de pacientes analisados em cada subgrupo.

5.2.2 Correlação entre as variáveis de proliferação nos pacientes portadores de leucemia aguda.

Foram analisadas todas as variáveis de proliferação nos portadores de LLA (B e T) e LMA, correlacionando-as entre si e em sua expressão no sangue periférico e na medula óssea (Tabela 03 e Figura).

Tabela 03: Correlação entre as variáveis de proliferação celular em medula óssea e sangue periférico nos pacientes portadores de leucemia aguda do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Ki-67 versus CD71	Sangue Periférico		Medula óssea	
	R	p	R	P
LLAB	1,0000	0,0000*	0,0263	0,9148
LLABI	1,0000	0,0000*	0,7778	0,2222
LLABII	1,0000	0,0000*	0,1500	0,7001
LLABIII	0,8000	0,2000	0,5052	0,1195
LLABIV	-	-	-	-
LLAT	0,7000	0,1881	0,8000	0,2000
LMA	0,3000	0,6238	0,6071	0,0164*
M0. M1	0,5000	0,6667	0,8000	0,2000
M2. M4	-	-	0,3714	0,4985
M3	-	-	1,0000	0,0000*

* Valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$); R= Coeficiente de correlação

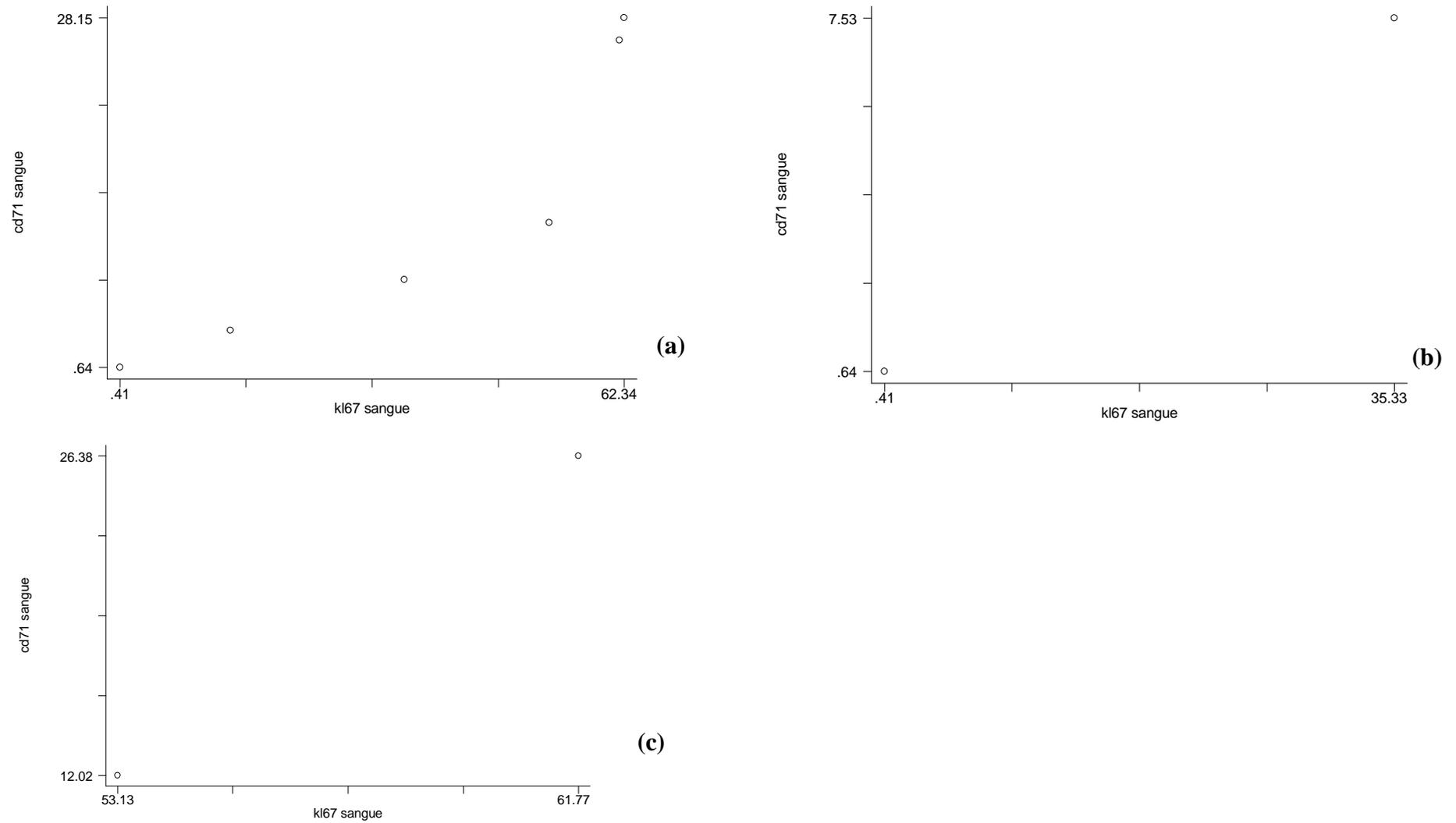


Figura10: Gráficos de dispersão das variáveis de proliferação celular em sangue periférico nos pacientes portadores de leucemias agudas do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.(a) Gráfico de dispersão do Ki-67 *versus* CD71 em sangue periférico na LLAB.(b) Gráfico de dispersão do Ki-67 *versus* CD71 em sangue periférico na LLABI.(c) Gráfico de dispersão do Ki-67 *versus* CD71 em sangue periférico na LLABII.

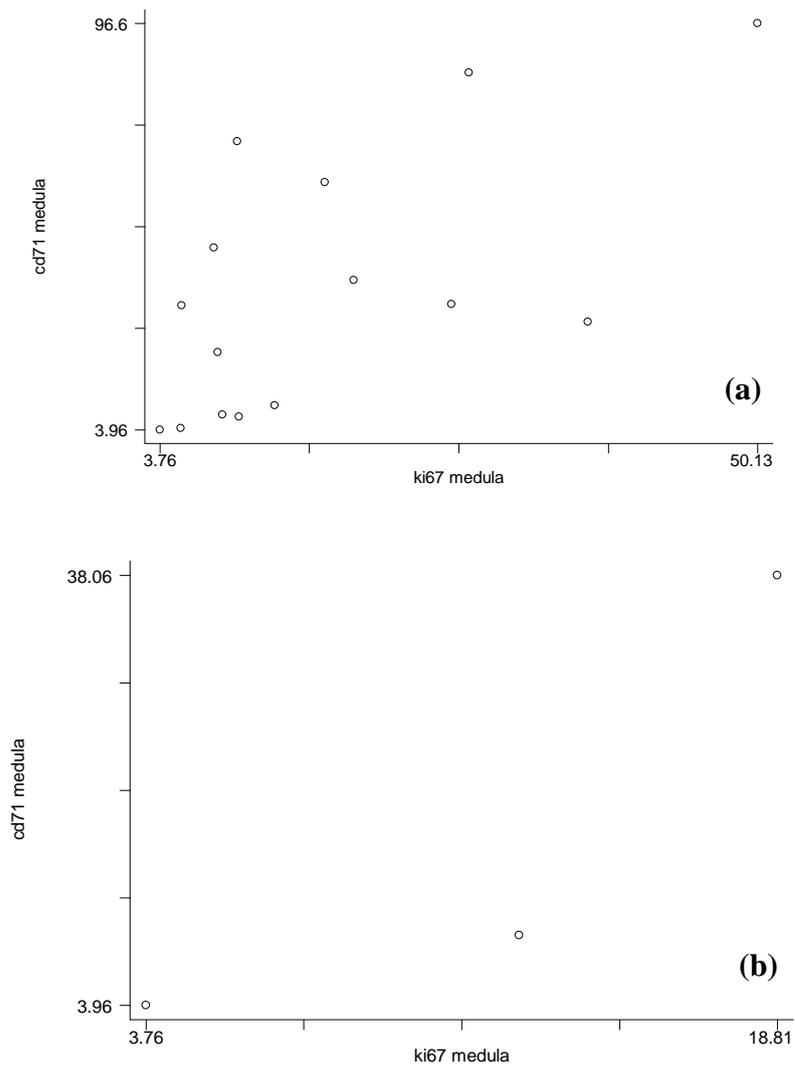


Figura11: Gráficos de dispersão das variáveis de proliferação celular em medula óssea nos pacientes portadores de leucemias agudas do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.(a) Gráfico de dispersão do Ki-67 *versus* CD71 em medula óssea na LMA.(b) Gráfico de dispersão do Ki-67 *versus* CD71 em medula óssea na LMA M3.

Observou-se correlação linear positiva entre a expressão do antígeno Ki-67 e o CD71 em sangue periférico na LLAB ($p=0,0000$ e $R=1,0000$), sendo que, quanto maior o valor de Ki-67, maior a expressão do antígeno CD71. Existe também correlação entre a expressão do Ki-67 e do CD71 nos subtipos de LLAB, no sangue periférico. Na LLABI, observou-se correlação linear ($p=0,0000$ e $R=1,0000$). Na LLABII, observou-se correlação linear positiva entre a expressão do Ki-67 e CD71 ($p=0,0000$ e $R=1,0000$), entretanto, analisando o gráfico de dispersão, observamos que esta correlação positiva nos subtipos não é avaliável, pois o

número de pacientes por subtipo é pequeno. Na LLAT, LMA e seus subtipos não houve correlação entre Ki-67 e CD71 em sangue periférico.

Na medula óssea existe correlação linear entre a expressão do antígeno Ki-67 e o CD71 na LMA ($p=0,0164$ e $R=0,6071$). Quanto aos subtipos apenas o subtipo M3 apresentou correlação linear entre o Ki-67 e o CD71 ($p=0,0000$ e $R=1,0000$), entretanto, analisando o gráfico de dispersão, observamos que esta correlação é influenciada pelo número de pacientes. Na LLAT, LLAB e seus subtipos, não foram observados correlação entre as variáveis de proliferação.

5.3 Características laboratoriais das leucemias agudas

Os resultados das características laboratoriais para os níveis de hemoglobina, contagem de leucócitos, porcentagem de blastos e contagem de plaquetas, ao diagnóstico dos pacientes em estudo encontram-se nas tabelas 04 a 05.

Tabela 04: Estratificação das características laboratoriais (hemoglobina, contagem de plaquetas e contagem de leucócitos) nos pacientes portadores de leucemia aguda do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Tipo de leucemia	Hemoglobina						Contagem de plaquetas						Contagem de leucócitos					
	< 7g/dl		7-10g/dl		>10g/dl		< 50.000/mm ³		50.000-100.000 /mm ³		> 100.000/mm ³		<10.000/mm ³		10.000-50.000/mm ³		>50.000/mm ³	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
LLAB	5	20,0	17	68,0	3	12,0	19	76,0	3	12,0	3	12,0	13	52,0	7	28,0	5	20,0
LLAT	1	11,1	5	55,5	3	33,4	4	44,4	3	33,3	2	22,3	1	11,1	3	33,4	5	55,5
LMA	7	35,0	9	45,0	4	20,0	13	65,0	5	25,0	2	10,0	10	50,0	4	20,0	6	30,0

Tabela 05: Dados laboratoriais (hemoglobina, contagem de plaquetas e contagem de leucócitos) nos pacientes portadores de leucemia aguda do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Tipo de leucemia	Hb g/dl			Plaq./mm ³			Leuc. /mm ³			Blst. MO%			Blst. SP%		
	\bar{X}	dp	Med	\bar{X}	dp	Med	\bar{X}	dp	Med	\bar{X}	dp	Med	\bar{X}	dp	Med
LLAB	8,5	1,9	8,4	44.160	43.857	32.000	29.608	43.119	7.890	74,0	28,4	83,0	76,5	19,37	70,5
LLAT	8,9	2,0	9,4	65.888	55.600	54.000	72.603	63.455	64.000	81,2	20,6	81,0	82,2	20,6	89,5
LMA	7,8	3,0	7,7	51.730	72.726	14.000	32.656	48.128	8.795	63,6	26,0	75,0	74,8	29,91	90,0

\bar{X} = média; dp= desvio padrão; Med= mediana; MO= medula óssea; SP= sangue periférico; Hb= hemoglobina; Plaq.= Plaquetas; Leuc.= leucócitos; Blst= blastos; MO = medula óssea; SP = sangue periférico.

Dos 25 pacientes diagnosticados com LLAB, a maioria (n=17), apresentaram valores de hemoglobina entre 7 e 10 g/dl. Para a LLAT, dos 9 pacientes, 5 pacientes apresentaram valores de hemoglobina entre 7 e 10g/dl. Na LMA, dos 20 pacientes, a maioria (n=9) apresentou valores de hemoglobina entre 7 e 10g/dl.

Dos pacientes com LLAB (n=25), a maioria dos pacientes (n=19) apresentou contagem de plaquetas menor que $50.000/\text{mm}^3$. Nos pacientes diagnosticados com LLAT (n=9), a maioria dos pacientes (n=4) apresentou contagem de plaqueta menor que $50.000/\text{mm}^3$. Dos pacientes com LMA, a maioria (n=13) apresentou contagem de plaquetas menor que $50.000/\text{mm}^3$.

Os pacientes com LLAB (n=25) apresentaram em sua maioria (n=13) contagem de leucócitos menor que $10.000/\text{mm}^3$. Os pacientes com LLAT (n=9) apresentaram contagem de leucócitos acima de $10.000/\text{mm}^3$ (n=8). Para a LMA, a maioria dos pacientes (n=10) apresentou valores menores que $10.000/\text{mm}^3$.

Quanto à porcentagem de blastos em medula óssea e sangue periférico, em todos os tipos de leucemias estudados, se apresentou elevada. Na LLAB apresentou mediana de 83,0% para a medula óssea e 79,5% para o sangue periférico. Na LLAT, a mediana foi de 81,0% em medula óssea e 89,5% para sangue periférico. Na LMA, a mediana foi de 75,0% em medula óssea e 90,0% para o sangue periférico.

5.4 Relações entre a resposta ao tratamento, os achados laboratoriais e a expressão das variáveis Ki-67 e CD71 no sangue periférico e medula óssea.

Dos pacientes diagnosticados com LLAB, 16 remitiram, 8 não remitiram e 1 foi excluído da análise por abandono ao tratamento. Para a LLAT, 6 pacientes remitiram, 2

não remeteram e 1 também foi excluído da análise por abandono ao tratamento. Na LMA, 12 pacientes remeteram e 8 não remeteram, sem abandonos ao tratamento.

Em menores de 19 anos, 27 pacientes remeteram e 11 não remeteram. Em maiores de 19 anos 8 remeteram e 7 não remeteram.

Na tabela 06 estão os dados referentes à relação entre a resposta ao tratamento e os achados laboratoriais ao diagnóstico.

Tabela 06: Relação entre a resposta ao tratamento e os achados laboratoriais ao diagnóstico dos pacientes portadores de leucemia aguda do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Hemoglobina	Remissão		Não remissão		p*
	N	%	N	%	
< 7 g/dl	4	33,3	8	66,7	0,014**
7-10 g/dl	24	80,0	6	20,0	
> 10 g/dl	6	60,0	4	40,0	
Plaquetas	Remissão		Não remissão		
	N	%	N	%	
< 50.000/mm ³	24	68,5	11	31,5	0,418
50.000 – 100.000/mm ³	7	70,0	3	30,0	
> 100.000/mm ³	3	42,9	4	57,1	
Leucócitos	Remissão		Não remissão		
	N	%	N	%	
< 10.000/mm ³	14	60,9	9	39,1	0,758
10.000 – 50.000/mm ³	9	64,3	5	35,7	
> 50.000/mm ³	11	73,3	4	26,7	

* p valor para Teste de Fisher.

** Valor estatisticamente significativo (p < 0,05).

A maioria dos pacientes (n=30) apresentaram valores de hemoglobina entre 7 e 10 g/dl, sendo que 24 pacientes remeteram, correspondendo a 80% dos pacientes. Quando foram relacionados os achados laboratoriais com a resposta ao tratamento, houve relação entre os valores de hemoglobina com a resposta ao tratamento (p=0,014).

A maioria dos pacientes (n=35) apresentou número de plaquetas menor que 50.000/mm³, sendo que 24 pacientes responderam ao tratamento (remeteram),

correspondendo a 68,5%. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na resposta ao tratamento, em função das plaquetas ($p=0,418$).

Do total de 54 pacientes, 23 apresentaram valores de leucócitos menores de $10.000/\text{mm}^3$, sendo que destes, 14 pacientes remitiram, correspondendo a 60,9%. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na resposta ao tratamento, em função do número de leucócitos ($p=0,758$).

Relacionamos à expressão dos marcadores Ki-67 e CD71 nos blastos da medula óssea ou sangue periférico, por tipo de leucemia, com a resposta ao tratamento de pacientes diagnosticados com leucemia aguda. Para isso, utilizamos como valor de corte, as medianas da porcentagem de blastos por amostra biológica (Tabela 07).

Tabela 07: Relação da expressão dos marcadores Ki-67 e CD71 (medula óssea ou sangue periférico) com a resposta ao tratamento dos pacientes portadores de leucemias agudas do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

	LLAB			LLAT			LMA		
	N (%)		p*	N (%)		p*	N (%)		p*
Ki-67 em MO	< 25,8%	≥ 25,8%		< 10,8%	≥ 10,8%		< 9,9%	≥ 9,9%	
Remissão	8 (50,0%)	7 (70,0%)	0,4284	2 (66,7%)	-	-	6(60,0%)	2(40,0%)	0,6842
Não remissão	8 (50,0%)	3 (30,0)		1 (33,3%)	1(100,0%)		4(40,0%)	3(60,0%)	
Total	16 (100,0)	10(100,0%)		3 (100,0)	1(100,0%)		10(100,0%)	5(100,0%)	
Ki-67 em SP	< 44,2%	≥ 44,2%	p*	< 30,9%	≥ 30,9%	p*	<4,2%	≥ 4,2%	p*
Remissão	3(100,0%)	2(66,7%)	-	1(33,3)	1(100,0%)	-	2(100,0%)	-	-
Não remissão	-	1(33,3%)		2(66,7%)	-		-	3(100,0%)	
Total	3(100,0%)	3(100,0%)		3(100,0%)	1(100,0%)		2(100,0%)	3(100,0%)	
CD71 em MO	< 17,5%	≥ 17,5%	p*	< 38,0%	≥ 38,0%	p*	<32,3%	≥32,3%	p*
Remissão	7(77,8%)	5(55,5%)	0,6199	1(50,0%)	2(100,0%)	-	6(66,7%)	3(42,8%)	0,6199
Não remissão	2(22,2%)	4(44,5%)		1(50,0%)	-		3(33,3%)	4(57,2%)	
Total	9(100,0%)	9(100,0%)		2(100,0%)	2(100,0%)		9(100,0%)	7(100,0%)	
CD71 em SP	< 9,7%	≥ 9,7%	p*	< 9,6%	≥ 9,6%	p*	<64,5%	≥ 64,5%	p*
Remissão	2(100,0%)	2(66,7%)	-	-	1(100,0%)	-	1(50,0%)	1(33,3%)	-
Não remissão	-	1(33,3%)		3(100,0%)	-		1(50,0%)	2(66,7%)	
Total	2(100,0%)	3(100,0%)		3(100,0%)	1(100,0%)		2(100,0%)	3(100,0%)	

* p valor para Teste de Fisher.

MO = medula óssea; SP = sangue periférico

Nota: Utilizou-se a mediana da expressão dos marcadores de proliferação em % nos tipos de leucemias agudas como critério de categorização destas variáveis.

A análise da expressão do Ki-67 em blastos na medula óssea só foi possível nas LLA B e LMA, devido ao pequeno número de pacientes avaliáveis para as LLAT. Para as LLAB, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes desses marcadores com a evolução do paciente (p=0,4284). Resultado semelhante foi encontrado na LMA, não apresentando valores significativos (p=0,6842).

Para o CD71 em medula, não se observou diferença estatisticamente significativa entre a expressão deste marcador nos blastos de medula óssea em LLAB (p=0,6199). Na

LMA, resultado semelhante foi encontrado, não apresentando diferença significativa entre este marcador e a resposta ao tratamento. Não foi possível analisar a LLAT devido ao pequeno número de pacientes avaliáveis.

Não foi possível analisar essa correlação nos tipos de leucemia aguda em Ki-67 e CD71 em sangue periférico, pois o número de pacientes avaliáveis era pequeno.

6 – DISCUSSÃO

6.1 Caracterização dos pacientes

Neste estudo foram analisados prospectivamente 54 casos de leucemias agudas referentes ao período de dezembro de 2008 a novembro de 2009 (12 meses), que deram entrada no Instituto Maranhense de Oncologia Hospital Aldenora Bello e foram submetidos aos estudos de proliferação celular.

A partir dos dados clínicos foi possível caracterizar os pacientes quanto ao diagnóstico, sexo, idade e localização geográfica no estado no Maranhão. Segundo Mello (2007), diversas variáveis clínicas tem valor prognóstico e servem para estratificar os pacientes em grupos de risco, o que tem se tornado elemento essencial para o desenho e avaliação dos tratamentos atuais.

Em nosso estudo, dos 54 pacientes, a maioria foi do sexo masculino (70,4%), correspondendo a 2,4: 1,0. Os resultados de várias pesquisas internacionais confirmam o predomínio da leucemia aguda no sexo masculino (PAOLUCCI et al, 2001; SILVERMAN et al, 2001). Alguns investigadores evidenciaram que crianças do sexo masculino apresentam pior prognóstico que do sexo feminino (CHESSELLS et al., 2000; PUI et al., 1995). Segundo Friedmann e Weinstein (2000), de modo semelhante, o sexo masculino tem sido considerado como uma característica prognóstica adversa. Segundo este mesmo autor, muitos trabalhos não têm mostrado o sexo como uma variável estatisticamente significativa, isto porque estas discrepâncias são tratamento-dependente e mudam com os avanços da terapia. Estudos realizados por Silverman et al. (2001) e por Pui et al. (2004) evidenciaram que o sexo masculino deixou de ser considerado fator de pior prognóstico nestes estudos clínicos, com sobrevida livre de

eventos, em cinco anos, de 80%, para os meninos. Contudo, com a finalidade de caracterizar os pacientes atendidos, tal variável foi considerada em nossa população.

A maioria dos pacientes foi diagnosticada com LLA (63,0%), dos quais 73,5% (25/34) tipo B e 26,5% (9/34) tipo T. As LMA constituíram (37,0%) do total de leucemias agudas. Dados epidemiológicos da literatura refletem percentuais de LLA que variam de 67% a 85% dos casos (COEBERGH et al, 2001). A inclusão em nosso trabalho dos 4 casos que perderam a expressão do CD34 (todos LLA B) refletiriam um valor real de 65,5% de LLA.

Quanto ao tipo de LLA, estudos realizados por Rego et al., em 1996, em Ribeirão Preto, que avaliaram 153 pacientes, obtiveram 82% de LLA B; Dworzak e Panzer-Grümayer., em 2003, na Áustria, encontraram que 87% das LLA eram do tipo B. Udayakumar et al., em seus estudos de 2007, encontraram 83% das LLA com tipo B. Todos estes dados refletem mesma tendência encontrada em nosso estudo (73,5% (25/34) tipo B e 26,5% (9/34) tipo T.

Segundo Margolin et al (2005) existe uma relação entre a idade ao diagnóstico e o prognóstico, apresentando crianças relativamente, pior prognóstico para a leucemia aguda. Os nossos resultados, quanto à idade, a maioria dos pacientes diagnosticados com leucemia aguda, se encontravam na faixa-infante juvenil (70,3%), apresentando mediana de 9 anos.

Na LLAB a maioria dos pacientes eram crianças (mediana de 5,0 anos). Smith e colaboradores (1996) descreveram que pacientes com idade inferior a nove anos apresentam melhor prognóstico, o que fez com que esta variável ao diagnóstico tenha sido considerada na estratificação de risco para LLA de células B.

Nos casos de LLAT do presente estudo a maior parte dos pacientes encontrava-se na faixa infantil, em maior parte constituída de crianças mais velhas que se aproximavam da faixa juvenil. Geralmente, a LLA nos adolescentes é de linhagem T, com idades que variam de 10 e 21 anos, e o prognóstico é mais adverso. (CRIST et al., 1988; MCLEAN et al., 1996).

A frequência do fenótipo T nos pacientes com LLA varia entre 7,4% a 16,4% em estudos nacionais e internacionais (REGO et al, 1996; PAOLUCCI et al 2001; SILVERMAN et al, 2001.). Em nosso estudo, houve uma maior porcentagem da LLA T (26,5%) em relação ao total de LLAs, podendo estar associado à maior proporção de adolescentes na amostra em relação às outras casuísticas. No início desta pesquisa, foi priorizado pela instituição oncológica a realização de imunofenotipagem e dos estudos de proliferação celular na faixa infanto-juvenil.

Para as LMAs, a maior parte dos nossos pacientes constituía-se de adultos jovens (mediana de 21,5 anos), apresentando apenas 2 casos de pacientes acima de 60 anos (idosos). Corroborando com os dados encontrados, estudos relatam que as LMAs correspondem à cerca de 80% das leucemias agudas em adulto e 20% das leucemias em crianças (CHESSELLS, 2000; BATHIA; ROBINSON, 2003).

A avaliação da incidência dos tipos de leucemias no mundo tem mostrado variações importantes em relação à distribuição geográfica, sugerindo que possam existir diferentes fatores etiológicos. No Brasil, estudos epidemiológicos mostraram a relação entre tipos de leucemia aguda com a sazonalidade e condições socioeconômicas, além de evidenciar variações da incidência dessas doenças em diferentes estados brasileiros (POMBO-DE-OLIVEIRA, et al, 2005.). A distribuição dos pacientes, segundo município de residência, por regiões geográficas em nosso estado, apresentou

um maior número de pacientes na região nordeste, seguidos da região central, noroeste, sudoeste e sudeste. Sugere-se que essa distribuição seja por conta da proximidade dos municípios ao hospital estudado, observando que, quanto mais longe a região geográfica, menor a quantidade de pacientes atendidos, fato que explica nenhum paciente da região sul. Sugere-se ainda, que além da proximidade, as condições socioeconômicas também influenciam, pois as condições financeiras inviabilizam o deslocamento para outros centros brasileiros de referência para o tratamento de câncer.

6.2 Estudo da proliferação celular

A expressão das variáveis de proliferação (Ki-67 e CD71) foram estudadas separadamente, pois segundo a literatura, na leucemia os parâmetros cinéticos são diferentes nos blastos circulantes (sangue periférico) e nos blastos em medula óssea (UCCI et al, 1986).

Na tabela 01, encontram-se os valores obtidos para a expressão do Ki-67 e do CD71, em sangue periférico e medula óssea por tipo de leucemia aguda. Foram analisados os valores de Ki-67 em medula óssea no total de pacientes, apresentando a LLAB uma maior expressão da mediana quando comparadas às expressões em LLAT e LMA. Quando analisado o Ki-67 em sangue periférico, também observamos uma maior expressão da mediana na LLAB quando comparados à LLAT e LMA, mesmo não sendo estatisticamente significante.

Quando comparamos os nossos resultados com os dados da literatura, observamos que as medianas da expressão do Ki-67 em medula óssea e sangue

periférico neste trabalho não são diferentes das relatadas por outros autores, que também encontraram uma mediana de células positivas para o Ki-67 superior na LLA B (DRACH et al, 1989; ITO et al, 1992.). Corroborando com nossos dados, White et al (1994), também observaram que na LLAB a positividade do Ki-67 é maior quando comparada aos outros tipos de leucemias agudas.

Quando comparamos a expressão do Ki-67 em medula óssea com a expressão do Ki-67 em sangue periférico, houve diferença estatística apenas na LMA entre os tipos de amostras biológicas. Nossos resultados são semelhantes aos obtidos por Drach e colaboradores (1989), que também encontraram diferenças na expressão da variável estudada no sangue periférico e medula óssea. Estudo realizado por Bleiter (1997), também observou diferença estatística entre o sangue periférico e medula óssea na LMA.

Pelo fato de o ferro ser indispensável para as células em proliferação, os receptores de transferrina (CD71) estão sempre expressos nas células em fase S do ciclo celular, sejam elas normais ou malignas (HABESHAW et al, 1983). É válido, portanto, utilizar o anticorpo monoclonal anti-CD71, que se liga ao receptor de transferrina, para medir a proliferação das células blásticas (células CD34 positivas). O CD71 apresentou expressões diferenciadas quanto ao tipo de leucemia, dependendo da amostra, observando na medula óssea uma maior expressão na LLAT e no sangue periférico, uma maior expressão na LMA. O trabalho de Beitler (1997) que encontrou uma porcentagem maior de células que expressam receptores de transferrina na LLAT em medula óssea (mediana 81,0%) confirmam nossos resultados. Nesse estudo também foi possível observar uma maior expressão da LMA (mediana de 32,0%) em sangue periférico, quando relacionado à LLA B, que apresentou a menor expressão desse receptor (6,0%), concluindo que os blastos linfóides B em sangue periférico apresentam

menor expressão do antígeno CD71, quando comparados aos outros tipos de leucemias agudas.

Quando observada a expressão dos marcadores Ki-67 e CD71 por subtipos de leucemia (Tabela 02), não houve diferença estatística. É difícil comparar os resultados da expressão dos marcadores de proliferação celular quando relacionados aos subtipos de leucemias agudas, pois não existem estudos com esta estratificação, além disso, muitos estudos demonstram que a positividade dos marcadores varia de paciente para paciente (SCOTT et al, 1988; ITO et al, 1992.). Considerando nossa pequena casuística e essa variação entre os pacientes, não é possível uma uniformidade quando os mesmos são estratificados por subtipos de leucemias agudas. Esta razão não nos permite tecer resultados conclusivos. Sugere-se para esta avaliação um aumento do período de coleta, atrelado a outras técnicas e marcadores de proliferação celular, buscando uma fidedignidade maior dos resultados, ou mesmo seu estudo apenas nas fases do ciclo celular.

A avaliação comparativa entre a atividade proliferativa das células nos diferentes tipos de leucemias agudas em nosso estudo demonstrou que em sangue periférico apenas a LLAB apresentou correlação justificando que o Ki-67 aumenta juntamente com o CD71. Na medula óssea, nossos resultados apresentaram correlação linear no total de LMA. Muito embora, se saiba que tal avaliação comparativa seja mais significativa quando se utiliza técnicas que estudem as células e suas fases no ciclo celular, o que não pôde ser avaliado em nosso estudo.

Em relação à comparação do Ki-67 com CD71, não podemos inferir neste trabalho qual deles seria o mais sensível para detectar células em fase proliferativa, mesmo tendo o Ki-67 apresentando maiores valores de medianas (Tabela 03) e alguns

estudos se referirem ao Ki-67 como um melhor marcador de proliferação celular que o antígeno CD71 (SCOTT et al, 1988), pois não foram realizados estudos de índice de DNA (DNA ploidia), que visa estudar a proliferação celular por meio da determinação do conteúdo de DNA, permitindo uma análise rápida e precisa de um grande número de células, bem como um conhecimento exato da distribuição de conteúdo de DNA dentro das diferentes fases do ciclo celular (TUBIANA; COURDI, 1989).

6.3 Parâmetros laboratoriais das leucemias agudas

Considerando os valores de hemoglobina encontrados no hemograma ao diagnóstico em nosso estudo, 68% (n=17) dos pacientes com LLAB apresentaram valores de hemoglobina entre 7 e 10g/dl. O mesmo ocorreu para a LLAT, onde 55,5% (n=5) dos pacientes apresentaram valores de hemoglobina nesta faixa de valores. Resultado semelhante foi observado nas LMAs, onde 45% dos pacientes (n=9) também apresentaram valores entre 7 e 10g/dl de hemoglobina. Independente do tipo de leucemias estudado houve quadro de anemia na maioria dos pacientes. A anemia em pacientes diagnosticados com leucemia aguda é descrita na literatura devido à diminuição dos eritrócitos e sangramentos decorrentes da trombocitopenia (JEHA; PUI 2009).

Em relação à contagem de plaquetas em nosso estudo, 76% (n=19) dos pacientes com LLAB apresentaram contagem de plaquetas inferior a $50.000/\text{mm}^3$. Na LLAT, observamos o mesmo, apresentando 44,4% (n=4) dos pacientes contagens de plaquetas menores que $50.000/\text{mm}^3$. Na LMA, 65% dos pacientes (n=13), também apresentaram contagem inferior a $50.000/\text{mm}^3$. Em todos os tipos analisados, observamos na maioria dos pacientes um quadro de plaquetopenia. A literatura descreve que ao diagnóstico, na maioria dos pacientes com LLA (B ou T), estes apresentam plaquetopenia, sendo a contagem de plaquetas inferior a $100.000/\text{mm}^3$ (KOTILO, 1995; HEISTERKAMP et al, 2000; RIZZATI; ZAGO, 2002; MARGOLIN et al, 2005). Sugere-se tal diminuição às leucemias agudas causarem infiltração e/ou supressão da plaquetopoeise na medula óssea (OLIVEIRA, 2007).

Em relação à contagem de leucócitos, 52,0% (n=13) dos pacientes diagnosticados com LLAB apresentaram contagem abaixo de $10.000/\text{mm}^3$. O mesmo foi observado na LMA com 50,0% (n=10) dos pacientes com contagem abaixo de $10.000/\text{mm}^3$. A LLAT teve contagem diferente dos outros dois tipos mencionados, apresentando 88,9% (n=8) dos pacientes com contagem de leucócitos acima de $10.000/\text{mm}^3$. Nossos dados são compatíveis com os dados da literatura, como reportado por Farias e Castro (2004), cuja contagem de leucócitos no hemograma ao diagnóstico na LLAB ocasionalmente é elevada e mais frequentemente diminuída ou normal. Para a LMA, a literatura descreve valores na contagem de leucócitos variando de 1.000 a $200.000/\text{mm}^3$ (SILVA et al, 2006), semelhantes aos encontrados em nosso estudo (amplitude de 1.250 a $189.000/\text{mm}^3$), muito embora a maior parte dos nossos pacientes tenham apresentado leucopenia. Quanto às LLATs, nossos resultados revelaram leucocitose em todos os pacientes, o que também é confirmado através de vários

estudos em leucemias agudas que descrevem elevada contagem de leucócitos na grande maioria das LLATs (UCKUN et al., 1998; JEHA; PUI 2009; CHIARETTI;FOÀ, 2009).

. Além destes dados laboratoriais a porcentagem de blastos, tanto em sangue periférico ou medula óssea, foram estudadas ao diagnóstico. A porcentagem de blastos encontrou-se aumentada em todos os tipos de leucemias estudadas (LLAB, LLAT e LMA), tanto em medula óssea quanto em sangue periférico. Para as leucemias agudas, em geral, (LLAB, LLAT e LMA), o diagnóstico inicial fundamenta-se na demonstração de pelo menos 20% de blastos na medula óssea e, quando o caso, em sangue periférico, onde na medula ocorre a substituição dos espaços adiposos e elementos medulares normais por estas células leucêmicas, culminando em um percentual elevado em medula óssea e extravasamento das células blásticas para o sangue periférico, como ocorrido em nosso estudo nos tipos de leucemias agudas estudadas (LEE et al, 1998).

6.4 Relação entre os parâmetros laboratoriais e a expressão dos marcadores de proliferação celular com a resposta terapêutica.

Quando analisamos os parâmetros laboratoriais com a resposta terapêutica, observamos que apenas a hemoglobina teve uma relação com a resposta terapêutica do paciente, não apresentando os leucócitos e as plaquetas relação significativa com a resposta terapêutica em nosso estudo. Na literatura alguns estudos tentam relacionar a hemoglobina ao diagnóstico nas leucemias agudas com a resposta do paciente ao final do tratamento. Os primeiros estudos foram realizados por Gunz e Burns em 1955, que

concluíram que os níveis mais baixos de hemoglobina conferia uma pior perspectiva da doença. Zippin et al (1975), observou que pacientes com níveis de hemoglobina maior que 9g/dl apresentaram uma melhoria no tempo médio de sobrevida. Resultados semelhantes também foram encontrados no estudo realizado por Hann e colaboradores (1981).

Na comparação entre os marcadores de proliferação celular (Ki-67 e CD71) em sangue periférico ou medula óssea em relação à resposta ao tratamento, não observamos diferença estatisticamente significativa com a evolução do paciente nos tipos de leucemias agudas que foram estudadas (LLAB, LLAT e LMA), ou seja, a presença desses marcadores não interferiu de modo negativo na evolução clínica (Tabela 07).

Nossos dados corroboram com os de Beitler (1997), que também encontrou resultados semelhantes quando comparou o Ki-67 e o CD71, em sangue periférico e medula óssea, nas leucemias agudas com a resposta ao tratamento. Entretanto, há algumas discordâncias na literatura. Inúmeras pesquisas apontam que existe uma forte correlação entre a expressão dos marcadores de proliferação celular com a resposta ao tratamento e ao prognóstico, indicando que quanto maior for seu nível menor a resposta (BROWN; GATTER; 1990).

Um estudo desenvolvido por Scott e colaboradores (1988), observou que a expressão de mais de 10% do Ki-67 em blastos nas leucemias agudas indicou uma não remissão, caracterizando casos de mau prognóstico. A maioria dos estudos da literatura se refere à porcentagem de células que expressam o CD71 e Ki-67, porém não mencionam se existe correlação desses achados com a resposta ao tratamento.

De forma geral, todos esses dados parecem indicar que a proliferação celular difere nas leucemias agudas estudadas. Uma continuidade do estudo de proliferação

celular com um número de pacientes maior, utilizando esses marcadores, atrelados a outras técnicas de proliferação celular se faz necessária para avaliação de outros parâmetros como a evolução clínica, prognóstico e sobrevida dos pacientes leucêmicos em nosso estado.

7 - CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho sugerem que:

- A maioria dos pacientes eram do sexo masculino. Os pacientes diagnosticados com LLA (B e T) encontravam-se na faixa infanto-juvenil e a maior parte dos pacientes diagnosticados com LMA era de adultos jovens. Segundo o município de residência, a maioria dos pacientes era da região nordeste do Estado do Maranhão;
- Os valores da expressão de Ki-67 em medula óssea e sangue periférico no total de pacientes apresentaram-se maiores na LLAB que as demais leucemias agudas. O CD71 apresentou na medula óssea uma maior expressão na LLAT e no sangue periférico, uma maior expressão na LMA;
- Foi observada correlação positiva entre o Ki-67 e CD71 em sangue periférico na LLAB. Na medula óssea, os marcadores apresentaram correlação linear na LMA;
- A hemoglobina e a contagem de plaquetas ao diagnóstico apresentaram-se diminuídas na maioria dos pacientes com LLAB, LLAT e LMA. A contagem de leucócitos apresentou-se aumentada nos pacientes com LLAT, apresentando-se de modo variado nos pacientes com LLAB e LMA. A porcentagem de blastos encontrou-se aumentada tanto em sangue periférico ou medula óssea;
- Valores de hemoglobina ao diagnóstico apresentaram relação positiva com a resposta terapêutica. Não foi encontrada relação entre os marcadores de proliferação celular e a resposta ao tratamento.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 3 ed. New York: Garland, 1994.p. 1294.
- ANDREEFF, M.; Cell kinetics of leukemia. **Semin. Hematol.**, v.23,p.300-314, 1986.
- ARISAWA, E.A.L. et al. Marcadores Biológicos: PCNA e Ki-67 Breve Revisão **Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos**, v.2, n.1,p.54-60,1999.
- BACAL, N.S.; FAULHABER, M.H.W. **Aplicação prática em citometria de fluxo**.São Paulo: Editora Atheneu, 2003.
- BAIN, J.B. **Diagnóstico em Leucemias**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.
- BATHIA, S.; ROBINSON, L. Epidemiology of leukemia in childhood. In: NATHAN, DG. et al, **Hematology of Infancy and childhood**. 6th Ed. Philadelphia: Saunders; p.1081-1100, 2003
- BEITLER, M. B. **Estudo da proliferação celular nas leucemias agudas**. 1997. 116 f. Tese (Doutorado em Hematologia) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BENE, M. C. et al. Proposal for the immunological classification of acute leukemias: European Group for the Immunological characterization of leukemia (EGIL). **Leukemia**, v.9, p.1783-1786, 1995.
- BENNETT, J.M. et al. Proposal for the classification of the acute leukemia. French American British (FAB) co-operative Group. **Br J Haematol**, v.33, p. 451-458, 1976.
- BENNETT, J.M. et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Group. **Annals of Internal Medicine**, v. 103, p.620-625, 1985.
- BENNETT, J.M. et al. Proposals for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML M0). **Br J Haematol**, v.78, p. 325-329, 1991.
- BRANDALISE, S et al. Treatment results of 3 consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols – GBTLI-80, BBTLI-82 and GBTLI- 85. **Leukemia**, v.7 (suppl.2), p.142-5,1993.
- BROWN, D.C.; GATTER, K.C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. **Histopathology**, v.17, n.6, p. 489-503, 1990.
- BRUNO, S.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. **Cell Prolif**, v. 25, p.31-40, 1992.
- CALABRETTA, B.; BASERGA, R. Control of cell growth and differentiation. In: HOFFMANN, R.; BENZI, E.J.; SHATTIL, S.J.; FURIE, B.; COHEN, H.J (eds) **Hematology basic principles and practice**. New York: Churchill Livingstone, 1991, p.59-69.

- CHESELLES, J.M. Recent advances in management of acute leukemia. **Arch Dis Childhood**, v. 82, p. 438-442, 2000.
- CHIARETTI, S.; FOÀ, R. T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 94, n.2, p.160-162, 2009.
- CHOWDHURY, T.; BRADY, H.J.M. Insights from clinical studies into the role of the MLL gene in infant and childhood leukemia. **Blood Cells Mol Dis**, v.40, p.192-199, 2008.
- COEBERGH, J.W. et al. Childhood cancer survival in Europe, 1978-1992: the EURO CARE Study. **Eur J Cancer**, v.37, n.6, p.671-672, 2001.
- DOUER, D. The epidemiology of acute promyelocytic leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 16, n. 3, p. 357-367, 2003.
- DOLEZEL, J. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. In: LELLEY, T. **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Vienna: WUV-Universitätsverlag, 1997. p.80-90.
- DRACH, J. et al. Simultaneous flow cytometric analysis of surface markers and nuclear Ki-67 antigen in leukemia and lymphoma. **Cytometry**, v.10, p.743-749, 1989.
- DWORZAK, M. N., PANZER-GRÜMAYER, E. R. Flow cytometric detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 44, p. 1445-1455, 2003.
- ELLIS, P.A. et al. Comparison of MIB-1 proliferation index with S-phase fraction in human breast carcinomas. **Br J Cancer**, v. 73, p.640-643, 1996.
- FARIAS, M.G.; CASTRO, S.M. Diagnóstico Laboratorial das Leucemias linfóides Aguda. **J Bras Med Lab**, v.40, n.2, p.91-98, 2004.
- FREITAS JÚNIOR, R. et al. Citometria de fluxo utilizando-se aspirados da PAAF nos tumores da mama. **Rev. Bras. De Mastologia**, v.13, p.19-24, 2003.
- FRIEDMANN, A.; WEINSTEIN, H. J. The Role of Prognostic Features in the Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Oncologist**. v. 5, p. 321-328, 2000.
- GERDES, J, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am J Pathol**, v.138, p.867-873, 1991.
- GERDES, J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J Immunol**, v. 133, p. 1710-1715, 1984.

GREAVES, M. F; PEGRAM, S.M; CHAN, L.C. Collaborative group study of the epidemiology of acute lymphoblastic subtypes: background and first report. **Leukemia**, v. 9, p.715-733, 1985.

GUNZ, F.W. Leukemia in the past. In: HENDERSON, E.S.; LISTER, T.A. (eds) . **William Dameshek and Frederick Gunz's leukemia**. 5ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1990. p. 3-11.

GUNZ, F. W., BURNS, E. W. Prognosis in acute leukaemia of adults. **NZ MedJ**, v. 64, p.555 – 561,1955.

HABESHAW, J.A. et al. Correlation of transferrin receptor with histological class and outcome in non-Hodgkin Lymphoma. **Lancet**, v.5, p.498-501, 1983.

HALL, G.W. Childhood myeloid leukaemias. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 14, n. 3, p. 573-591, 2001.

HALL, P. A., LEVINSON, D. A. Review: assessment of cell proliferation in histological material. **J Clin Pathol**, v. 43, n. 2, p. 184-182, 1990.

HALL, P.A.; COATES, P.J. Assessment of cell proliferation in pathology-what next? **Histopathology**, v. 26, n. 2, p. 105-112,1995.

HALL, P.A.; COATES, P.J. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. **J. Cell Science**, v.107, p.3569-3577, 1994

HANN, I.M. et al., Haemoglobin and prognosis in childhood acute lymphoblastic leukaemia.**Archives of Disease in Childhood**,v.56, p.684-686,1981.

HARTWELL, L.H.; WEINERT, T.A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v.246, p.629-634, 1989.

HEIDEBRECHT, H.J. et al. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the Ki-67 proteins. **Cell Prolif** , v.29, p.413-425, 1996.

HEISTERKAMP, N. et al. Reduced oncogenicity of p 190 Bcr/ Abl F-actin-binding domain mutants. **Blood**, v.6, n.96, p.2226-2232, 2000.

HOFFBRAND, A.V.; MOSS, P.A.H.; PETTIT, J.E. **Fundamentos em Hematologia**. 5 ed. São Paulo: Artmed, 2008.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade. Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2008. 220 p. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 10 de Jan. 2010.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 10 de Jan. 2010.

IOVINO, C.S.; CAMACHO, L.H. Acute myeloid leukemia: a classification and treatment update. **Clin J Oncol Nurs**, v. 7, n. 5, p. 535-540, 2003.

ITO, M. et al. Cell proliferation in childhood acute leukemia. Comparison of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen immunocytochemical and DNA flow cytometric analysis. **Cancer**, v.69, n.8, p.2176-2182, 1992.

JAFFE, E.S. et al. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. **Blood**, v.112, p.4384-43 99, 2008

JEHA, S.; PUI, C.H. Risk-adapted Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematol Oncol Clin N Am**, v.23, p.973–990, 2009.

JENNINGS, C.D.; FOON, K.A. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. **Blood**, v. 90, n. 8, p. 2863-2892, 1997.

KATZENBERGER, T. et al. The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. **Blood**, v.107, p.3407, 2006.

KAWABATA, H. et al. Regulation of expression of murine transferrin receptor 2. **Blood**, v.98, p.1949-1954, 2001.

KOTILO, P.N. Flow citometric analysis in diagnostic hematology. In: RODAK, B.F. **Diagnostic Hematology**. Saunders Company, 1995.

LARSEN, J.K. Cell proliferation: analysis by flow cytometry. **Nouv. Rev Fr Hematol**, v.34, p.317-335, 1992.

LASKEY, R.A.; FAIRMAN, M.P.; BLOW, J.J. S phase of the cell cycle. **Science**, v.246, p.609-614, 1989.

LEE, R.G. et al. **Wintrobe Hematologia Clinica**, I ed. São Paulo: Manole, 1998.

LEVINE, A.J. et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of p53 tumour suppressor gene in tumorigenesis. **Br J Cancer**, v. 29, n. 3, p. 409-406, 1994.

LINABERY, A.M.; ROSS, J.A. Childhood and Adolescent Cancer Survival in the U.S. by Race and Ethnicity (Diagnostic Period 1975–1999). **Cancer**, v. 113, n.9, p.2575-2596, 2008.

LIUQING, Z. et al. Expression of survivin, CDK4, Ki-67 and clinical significance in pediatric acute leukemia. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**, v.26, n.5, p.552-554, 2006.

LÖWENBERG, B. Prognostic factors in acute myeloid leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 14, n. 1, p. 65-75, 2001.

LUSIS, M.K.P. Classificação FAB das leucemias mielóides agudas. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 22, n. 2, p. 1175-1178, 2000.

MC LEAN, T. W. et al. TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 88, p. 4242-4258, 1996.

MARGOLIN, J. F. et al. Acute Lymphoblastic Leukemia. In: PIZZO, P. A.; POPLACK, D. G. **Principles and practice of pediatric oncology**. Lippincott Williams and Wilkins, 2005, p. 539-590.

MARTINS, S.L.R.; FALCÃO, R.T. A importância da imunofenotipagem na leucemia mielóide aguda. **Rev Assoc Med Bras**, v. 46, n. 1, p. 57-62, 2000.

McINTOSH, J.R; KOONCE, M.P. Mitosis. **Science**, v.246, p.622-628, 1989.

MELAMED, M.R., et al. **Flow cytometry & sorting**. 2a ed. New York: Wiley-Liss. 1990.

MELLO, M. R. B. **Estudo do Índice de DNA e de Alterações Moleculares em Células Blásticas de Pacientes Portadores de Leucemia Linfóide Aguda Diagnosticados na Fundação Hemope**. 2007. 69f. Dissertação(Mestrado em Ciências Médicas). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

MENDES, W. L. **Análise das características clínico-epidemiológicas e de sobrevida dos casos de câncer pediátrico do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer de São Paulo, 1988, 1991, 1994 & 1997**. 2002.122f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia, São Paulo.

MILLER, K.B. Clinical manifestation of acute nonlymphocytic leukemia. In: HOFFMANN, R. et al. (eds). **Hematology basic principles and practice**. New York: Chorchill Livingstone, 1991. p.715-731.

MURRAY, A.W; KIRSCHMNER, M.W. Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. **Science**, v. 246, p.614-621, 1989.

NECKERS, LM. Regulation of transferrin receptor expression and control of cell growth. **Pathobiology**, v.59, p.11-18, 1991.

NOURSE, J. et al. Chromosomal translocation t(1;19) results in syntesis of a homeobox fusion Mrna that codes for a potencial chimeric transcription factor. **Cell**, v. 60, p.535-545, 1990.

OLIVEIRA, R.A.G.; POLI-NETO, A. **Anemias e Leucemias**. 1 ed. São Paulo: Roca, 2004.

OLIVEIRA, R.A.G. **Hemograma: Como fazer e interpretar**. 1 ed. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2007.

PAOLUCCI, G. et al. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. Long-term results of the AIEOP-ALL 87 study. **Haematology**, v.96, p. 478-484, 2001.

PARDEE, A.B. G1 events an regulation of cell proliferation. **Science**, v.246, p.603-608, 1989.

PARKIN, D.M. et al. **International incidence of childhood cancer**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, v. II, 1998.

PIERGA, J.Y. et al. Long term prognostic value of growth fraction determination by Ki-67 immunostaining in primary operable breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 37, p.57-64, 1996.

PILERI, S. et al. Immunohistochemical determination of growth fractions in human permanent cell lines and lymphoid tumors: a critical comparision of the monoclonal antibodies OKT9 and Ki-67. **Br.J.Haematol.**, v.65, p.271-286, 1987.

POMBO – DE - OLIVEIRA, B.M. et al. Leucemias agudas na infância. **Rev. Med. Minas Gerais**, v.14 (Supl.1), p.33-39, 2005.

PONKA, P. Cellular iron metabolism. **Kidney Int Suppl**, v.69, p.S2–S11, 1999.

PUI, C.H. et al. Mechanisms of Disease: Acute Lymphoblastic Leukemia. **N Engl J Med**. v. 350, p. 1535-1548, 2004.

PUI, C. H, et al. Biology and treatment of infant leukemias. **Leukemia**, v. 9, p.762-769, 1995.

PRESTON, et al. Increased cell division as a cause of human cancer. **Cancer Res**, v.50, p.7415-7421, 1990.

RABENHORST, S. H. et al. Ciclo celular mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. **Rev. Bras. Cancerologia**, v. 40, n. 3, p. 141-147, 1994

RABENHORST, S.H.; et al. Marcadores de proliferação celular. **Rev Bras Pathol Clin**, v.29, n. 1, p. 24-28, 1993.

REGO, E.M. et al. Characterization of acute lymphoblastic leukemia subtypes in brazilian patients. **Leuk Res**, v. 20, p. 349-355, 1996.

RENNÉ, M.N. et al. Transferrin receptor 1 is differentially required in lymphocyte development. **Blood**, v.102, 3711-3718, 2003.

RIBEIRO, K.C.B. et al. Trends in childhood leukemia mortality in Brazil and correlation with social inequalities. **Cancer**, v.110, n.8, p.1823-1831, 2007.

RICCARDI, A. et al. Acutenon-lymphoblastic leukemia: reliability and prognostic significance of bone marrow A phase size determined with propidium iodine DNA flow cytofluorometry. **Scan J Haematol**, v.36, p.11-17, 1986.

- RIZZATI , E.G.; ZAGO, M.A. Aplicações da Biologia Molecular às Leucemias Agudas. **Ser Monog Esc Bras Hemat**, n.9, p.1-14, 2002.
- RODRIGUES, C.A. et al. Acute myeloid leukemia in elderly patients: experience of a single center. **Braz J Med Biol Res**,v. 36, n. 6, p. 703-708, 2003.
- SARTORI,P.C.E. et al. Treatment of childhood acut myeloid leukemia using the BFM-83 protocol. **Med Pediatr Oncol**, v.21,p. 8-13, 1993.
- SCHLUTER, C. et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. **J Cell Biol** , v.123, p.513-522, 1993.
- SCHRADER, C. et al. Topoisomerase IIalpha expression in mantle cell lymphoma: a marker of cell proliferation and a prognostic factor for clinical outcome. **Leukemia**,v. 18, p.1200-1206, 2004.
- SCOTT, C.S. et al. Membrane transferrin receptor (TfR) and nuclear proliferation-associated Ki-67 expression in hematopoietic malignancies. **Leukemia**, v.2, p.438-442, 1988.
- SEKERES, M.A.; STONE, R.M. The challenge of AML in older patients. **Curr Opin. Oncol** , v.14, p. 24-30,2002
- SHAH, A.; COLEMAN, M.P. Increasing incidence of childhood leukaemia: a controversy re-examined. **Brit. Jour. of Cancer**,v.97, p.1009-1012, 2007.
- SHI, S.R. et al. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: Anenhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **J Histochem Cytochem**, v. 39, p.741-748, 1991.
- SILVA, G.C.S. et al, Diagnóstico Laboratorial das leucemias mielóides agudas. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 2, p. 77-84, 2006
- SILVERMAN, L.B. et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. **Blood**. 2001; 97: 1211-8.
- SMITH, M.A.; RIES, G.L.A. Childhood cancer: incidence, survival and mortality. In: PIZZO, P.A.; DAVID, G; POPLACK, D.G.(eds). **Principles and practice of pediatric oncology**. 4 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2002. p.1-12.
- SMITH, M. A et al. Uniform criteria for childhood acute lymphoblastic leukemia risk classification. **J Clin Oncol**, v. 14, p. 680-681, 1996.
- STUDZINSKI, G.P. Oncogenes, growth, and the cell cycle: an overview. **Cell Tissue Kinet**, v.22, p.405-424, 1989.
- THORSTENSEN, K.; ROMSLO, I. The rol of transferrin in the mechanism of cellular iron uptake. **Biochem J**, v.104, p. 438-440,1991.

TIEMANN, M. et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. **Br J Haematol**, v.131, p.29-38, 2005.

TUBIANA, M.; COURDI, A. Cell proliferation kinetics in human and experimental tumors. Relation to probability of metastatic dissemination and long-term outcome. *Radiother. Oncol.*, v.15, p.1-18, 1989.

UCCI, G. et al. Rate and time of DNA synthesis of human leukaemic bone marrow and peripheral blood. **Cell Tissue Kinet.**, v.19, p.429-435, 1986.

UCKUN, F.M. et al. Biology and Treatment of Childhood T-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**, v. 91, n. 3, p. 735-746, 1998.

UDAYAKUMAR, A. et al. Cytogenetic profile of childhood acute lymphoblastic leukemia in Oman. **Arch Med Res**, v..38, p.305-312, 2007.

VASCONCELOS, D.M. Análise de marcadores intracelulares por citometria de fluxo nas leucemias. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.29, n.2, p.103-108, 2007.

YAMADA, Y. et al. Prognostic significance of the proportion of Ki-67-positive cells in adult T-cell leukemia. **Cancer**, v.67, n.10, p.2605-2609, 1991.

YAMAMOTO, M. Imunofenotipagem em leucemias mielóides agudas. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 22, n. 2, p. 169-174, 2000.

WHITE D.M., et al. Assessment of proliferative activity in leukaemic bone marrow using the monoclonal antibody Ki-67. **J. Clin. Pathol.**, v.47, p.209-213, 1994.

ZHANG L et al. Expression of Survivin, CDK4, Ki-67 and Clinical Significance in Pediatric Acute Leukemia. **Journ of Huazhong University of Science and Technology**, v.26 (5), p.552-554, 2006.

ZIPPIN, C. et al. Time trends in survival in acute lymphocytic leukemia. **J Natl Cancer Inst**, v.54, p.581-586, 1975.

ANEXOS/ APÊNDICES

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE MATERNO-INFANTIL****PROJETO: ESTUDO IMUNOFENOTÍPICO DAS LEUCEMIAS AGUDAS NA
INFÂNCIA NO ESTADO DO MARANHÃO.****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****(Aos Pais ou Responsáveis)**

Prezado(a) Senhor(a),

Você está sendo convidado(a) a autorizar a participação do seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade no presente estudo, que pretende identificar, através de exames laboratoriais, qual o subtipo de Leucemia que o mesmo é portador.

Para a realização dos exames laboratoriais serão necessárias amostras de sangue e de medula óssea do seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade. Essas amostras serão coletadas por técnicos treinados e especializados, do Hospital Aldenora Belo, proporcionando segurança e o mínimo de desconforto possível.

Com essas amostras de sangue e medula óssea, iremos realizar os seguintes exames laboratoriais: Hemograma, Mielograma, Imunofenotipagem e Estudo da Proliferação Celular. Através desse conjunto de exames poderemos identificar, de forma bastante criteriosa, qual o tipo de Leucemia que a criança é portadora.

Após a realização dos exames, as amostras de sangue e medula óssea serão desprezadas de forma adequada.

Com a autorização da participação do seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade, nesse projeto, poderemos ter conhecimento do tipo de Leucemia que o mesmo é portador, e assim, o médico indicará o tratamento mais adequado, melhorando desta forma a qualidade de vida e aumentando as chances de cura.

Você poderá entrar em contato com a nossa equipe a qualquer momento para tirar dúvidas.

Após as informações acima fornecidas, no caso de aceitar a participação do seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade, no estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Você terá a garantia de sigilo, direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo da continuidade na forma de tratamento, assistência,

cuidado, ou acompanhamento, proporcionados a seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade.

Responsável: _____ Data do aceite: ___/___/___

Nomes dos Pesquisadores:

Pesquisador Responsável: Raimundo Antonio Gomes Oliveira
Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (98) 8111-2027

Pesquisadores participantes:

Elda Pereira Noronha - Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar):
(98)3221-4729 (98)8162-0427

Heliana Trindade Marinho – Telefone para contato: (98) 3245-3722 (98)
88263226

Sônia Maria Pereira Cruz - Telefone para contato: (98) 3232-3812.

Nivânia Lisboa Camelo - Telefone para contato: (98) 8119-8595

Ênio Fernandes Aragão Soares - Telefone para contato: (98) 8114-9038

Comitê de Ética em pesquisa-Hospital Universitário- UFMA

Rua Barão de Itapary, 227, 4º Andar, Centro Telefone: 2109-1250

Coordenador: Prof. Wildoberto Batista Gurgel

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE MATERNO-INFANTIL****PROJETO: ESTUDO IMUNOFENOTÍPICO DAS LEUCEMIAS AGUDAS NA
INFÂNCIA NO ESTADO DO MARANHÃO.****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado(a) Senhor(a),

Você está sendo convidado(a) para participar do presente estudo, que pretende identificar, através de exames laboratoriais, qual o seu subtipo de Leucemia.

Para a realização dos exames laboratoriais, serão necessárias amostras de seu sangue e de sua medula óssea. Essas amostras serão coletadas por técnicos treinados e especializados, do Hospital Aldenora Belo, proporcionando segurança e o mínimo de desconforto possível.

Com as suas amostras de sangue e medula óssea, iremos realizar os seguintes exames laboratoriais: Hemograma, Mielograma, Imunofenotipagem e Estudo da Proliferação Celular. Através desse conjunto de exames poderemos identificar, de forma bastante criteriosa, qual o tipo de sua Leucemia.

Após a realização dos exames, as suas amostras de sangue e medula óssea serão desprezadas de forma adequada.

Com a sua participação nesse projeto, poderemos ter conhecimento do tipo de Leucemia que você é portador, e assim, o seu médico indicará o tratamento mais adequado, melhorando desta forma a sua qualidade de vida e aumentando suas chances de cura.

Você poderá entrar em contato com a nossa equipe a qualquer momento para tirar dúvidas.

Após as informações acima fornecidas, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Você terá a garantia de sigilo, direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo da continuidade na forma de tratamento, assistência, cuidado, ou acompanhamento.

Paciente: _____ Data do aceite: ___/___/___

Nomes dos Pesquisadores:

Pesquisador Responsável: Raimundo Antonio Gomes Oliveira
Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (98) 8111-2027

Pesquisadores participantes:

Elda Pereira Noronha - Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar):
(98)3221-4729 (98)8162-0427

Heliana Trindade Marinho – Telefone para contato: (98) 3245-3722 (98)
88263226

Sônia Maria Pereira Cruz - Telefone para contato: (98) 3232-3812.

Nivânia Lisboa Camelo - Telefone para contato: (98) 8119-8595

Ênio Fernandes Aragão Soares - Telefone para contato: (98) 8114-9038

Comitê de Ética em pesquisa-Hospital Universitário- UFMA

Rua Barão de Itapary, 227, 4º Andar, Centro Telefone: 2109-1250

Coordenador: Prof. Wildoberto Batista Gurgel

ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO

	Universidade Federal do Maranhão Hospital Universitário Diretoria Adjunta de Ensino, Pesquisa e Extensão Comitê de Ética em Pesquisa			
PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL Anti-projeto de pesquisa do Mestrado Materno infantil	Nº. do Parecer: 115/2008 Nº do Protocolo: 33104-2040/2007 Data de Entrada no CEP: 13/12/2007 Data da Assembléia: 14/03/2008 Parecer: APROVADO			
I - Identificação: Título do projeto: Estudo imunofenotípico das leucemias agudas na infância no Estado do Maranhão. Identificação do Pesquisador Responsável: Raimundo Antonio Gomes Oliveira Identificação da Equipe executora: Raimundo Antonio Gomes Oliveira, Eida Pereira Noronha, Ênio Fernandes Aragão Soares, Nivânia Lisboa Camelo, Sônia Maria Pereira Cruz e Lígia Maria Mendes Gonçalves Instituição onde será realizado: Hospital Universitário - UFMA- Laboratório de Análises Clínicas, CEPEC- Laboratório de Pesquisa Clínica e Departamento de Farmácia – Laboratório de Hematologia Clínica <table border="1" data-bbox="406 920 1265 974"> <tr> <td>Área temática: III</td> <td>Multicêntrico: NÃO</td> <td>Cooperação estrangeira: NÃO</td> </tr> </table>		Área temática: III	Multicêntrico: NÃO	Cooperação estrangeira: NÃO
Área temática: III	Multicêntrico: NÃO	Cooperação estrangeira: NÃO		
II – Objetivos: Determinar o perfil imunofenotípico e cinético das leucemias agudas em crianças no Estado do Maranhão.				
III- Sumário do projeto: Trata-se de um anteprojecto de pesquisa apresentado ao Programa de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil, como pré-requisito do processo seletivo do Mestrado Acadêmico da UFMA, cuja estrutura é a seguinte: folha de rosto, curriculum vitae dos pesquisadores, protocolo de pesquisa propriamente dito, contendo: sumário, introdução e justificativa, objetivos, casuística e métodos, orçamento previsto, financiamento e execução, cronograma, resultados e impactos esperados, equipe executora, referências bibliográficas e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Tipo de pesquisa: Estudo prospectivo randomizado em pacientes encaminhados ao Hospital Aldenora Belo e diagnosticados como portadores de leucemias agudas, no período de maio de 2008 a outubro de 2009. A metodologia está devidamente detalhada, como está transcrito a seguir: Os pacientes serão divididos de acordo com a faixa etária em: crianças com menos de 15 anos, adultos de 15 a 60 anos e idosos acima de 60 anos. Para cada faixa etária serão avaliados os marcadores de proliferação celular. O diagnóstico das leucemias agudas será feito com base no hemograma, mielograma, provas citoquímicas e imunofenotipagem por citometria de fluxo, do sangue periférico e medula óssea de pacientes encaminhados ao Hospital Aldenora Belo do município de São Luis- Maranhão, para diagnóstico diferencial de leucemias agudas. Os critérios utilizados serão: de acordo com os conceitos morfo-citoquímicos FAB(BENNET et al, 1976; BENNET, DANIEL et al, 1991) e imunofenotípicos da classificação EGIL(BENE et al, 1995). Marcadores de proliferação celular: serão estudados os marcadores de proliferação celular Ki-67 e CD71, bem como a DNA ploidy por citometria fluxo. Análise estatística: serão usados a análise de variância, método de Kaplan-Meier, teste delog-rank e o teste de fisher, quando indicados.				

IV- Comentários frente à resolução 196/96 CNS e complementares:

A justificativa apresenta de forma resumida o projeto e deixa bem clara a relevância do mesmo: É através do diagnóstico correto que se pode prognosticar ou tomar decisões terapêuticas específicas para uma determinada doença. As leucemias agudas são neoplasias cuja evolução clínica difere sobremaneira entre seus portadores. A determinação dos diferentes subtipos é a forma mais específica de poder prognosticar e tratar de modo particular cada paciente. Como não há nenhum dado científico sobre os diferentes subtipos imunológicos de leucemias em nossa população, este trabalho que ora se apresenta poderá dar subsídios mais sólidos para conduta terapêutica que vão, além do diagnóstico, pode aumentar a qualidade de vida e diminuir a morbimortalidade de uma doença tão grave e incidente na infância.

Infelizmente, no Estado do Maranhão ainda não se faz diagnósticos das leucemias agudas através dos marcadores imunológicos, muitos menos estudos clínicos com marcadores de prognóstico, exceto em raros casos pontuais de pacientes com familiares em condições financeiras de encaminharem suas amostras para centros mais avançados. Desde modo, boa parte dos pacientes são tratados e prognosticados apenas através da morfologia e clínica, o que por vezes pode ofuscar a escolha mais correta de tratamento e frustrar resultados alentadores de cura. Também, como consequência, inviabiliza-se um estudo clínico de tal assunto em nossa comunidade.

Assim, nos parece indispensável e de forte impacto utilizar-mos de métodos seguros e que possam classificar e subclassificar os diversos tipos de leucemias agudas em requeiram marcadores imunológicos (antígenos de membrana), com a utilização da citometria de fluxo, e a partir de então, fazer-se um estudo cinético correlacionando-os com o prognósticos destas doenças.

A metodologia está devidamente detalhada e de acordo com os objetivos propostos. Entretanto o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) deve atender as normas da Res. 196/96 do CNS/MS.

Inicialmente o processo apresentava apenas uma folha de rosto, na qual eram citados três unidades/órgãos nos quais a pesquisa será desenvolvida. Mas esta pendência já foi resolvida.

Ainda não há garantia de financiamento para alguns dos itens de material de consumo.

V – Parecer Consubstanciado do CEP:

Diante do exposto, o protocolo 33104-2040/07, referente o título Estudo imunofenotípico das leucemias agudas na infância no Estado do Maranhão, pleiteado por Raimundo Antonio Gomes Oliveira é considerado: **APROVADO**.

Relatórios parciais (um por ano) devem ser apresentados ao CEP-HUUFMA, sendo o primeiro para 23/05/2008, ou se houver algum evento adverso, emenda ou alteração no protocolo. O relatório final deve ser entregue, acompanhado de cópia do trabalho final gravado em CD ROM.

Obs: Este parecer se refere só à forma como o projeto dessa pesquisa desenhado e foi protocolado junto ao CEP, não dando nenhum respaldo à pesquisa para fins de publicação ou apresentação em congresso, bancas ou outros eventos científicos. Para isto, o pesquisador deve solicitar o Parecer Consubstanciado Aprovando Relatório de Pesquisa ou o Parecer Consubstanciado Aprovando a finalização da Pesquisa.

São Luís, MA, 23 de maio de 2008.


Roberto Balista Gurgel
Filósofo
Coordenador do CEP-HUUFMA
Ethica homini habitat est



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
DIRETORIA ADJUNTA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO
DIVISÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA



COMISSÃO CIENTÍFICA

Parecer Consubstanciado do Projeto

Título do Projeto:

Estudo imunofenotípico das leucemias agudas na infância no Estado do Maranhão

Pesquisador(es) Responsável(is):

Elda Pereira Noronha; Énio Fernandes Aragão Soares; Nivânia Lisboa Camelo; Sonia Maria Pereira Cruz; Lígia Maria Mendes Gonçalves.

Professor Orientador:

Raimundo Antonio Gomes Oliveira

Data: 12.02.2008

Protocolo: 33104-2040/2007

Data do Parecer: 11.03.2008

Parecer final
Comissão Científica:

Diante da relevância do estudo e após avaliação da COMIC do projeto "Estudo imunofenotípico das leucemias agudas na infância no Estado do Maranhão" o referido projeto obteve **Resultado final**:

APROVADO COM PENDÊNCIA RETIRADO NÃO APROVADO

São Luís, 09.04.2008


Arlene de Jesus Mendes Caldas
Coordenadora da COMIC-HUUFMA

APÊNDICE A – Distribuição dos pacientes segundo município de residência e regiões geográficas no estado do Maranhão, Brasil.

Tabela 1a: Distribuição dos pacientes na região noroeste do estado do Maranhão, Brasil.

Municípios	Pacientes (n)
Cedral	1
Governador Newton Belo	1
Governador Nunes Freire	1
Pedro do Rosário	1
Pindaré-Mirim	1
Turilândia	1
Vitória do Mearim	1
Zé Doca	1
Total de pacientes	8
Total de municípios	8

Tabela 1b: Distribuição dos pacientes na região nordeste do estado do Maranhão, Brasil

Municípios	Pacientes (n)
Alto Alegre do Pindaré	2
Belágua	1
Cantanhede	1
Chapadinha	1
Humberto de Campos	1
Icatú	1
Itapecuru-Mirim	1
Morros	1
Nina Rodrigues	1
Paço do Lumiar	1
Presidente Juscelino	1
Primeira Cruz	1
Rosário	1
São José Ribamar	1
São Luís	15
Senador Alexandre Costa	1
Total de pacientes	31
Total de municípios	16

Tabela 1c: Distribuição dos pacientes na região sudoeste do estado do Maranhão, Brasil.

Municípios	Pacientes (n)
Grajaú	1
Montes Altos	1
Santa Luzia do Tide	1
Total de pacientes	3
Total de municípios	3

Tabela 1d: Distribuição dos pacientes na região central do estado do Maranhão, Brasil.

Municípios	Pacientes (n)
Arari	3
Bacabal	1
Conceição do Lago-Açu	1
Lago Verde	1
Pedreiras	1
Presidente Dutra	1
Santa Luzia	1
Tuntun	1
Total de pacientes	10
Total de municípios	8

Tabela 1e: Distribuição dos pacientes na região sudeste do estado do Maranhão, Brasil

Municípios	Pacientes (n)
Nova Iorque	1
Total de pacientes	1
Total de municípios	1

APÊNDICE B – Artigo científico

1 ARTIGO CIENTIFICO

1.1 Classificação do Qualis do Periódico na área de Medicina II

ISSN	Título	Estrato	Área de Avaliação
0100-879	Brazilian Journal of Medical and Biological Research	B1	Medicina II

1.1.1 Normas editoriais

Preparação dos manuscritos. Os manuscritos devem ser escritos em Inglês. Solicita-se aos autores que usem o inglês americano, exceto, naturalmente, nas referências, cujos títulos devem aparecer exatamente como publicadas. Orientações sobre gramática, pontuação e escrita científica podem ser encontradas nas seguintes fontes: *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*. 7th edn. Rockefeller University Press, Reston, 2006; *Medical Style and Format*. Huth EJ (Editor). ISI Press, Philadelphia, 1987, Marketed by Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Formato do texto. Solicitamos que os textos sejam remetidos sob a forma de arquivo do Microsoft Word criado com MS Word versão 6.5 ou uma versão posterior. Use fonte serifada, preferivelmente **Times New Roman**, com **12 pontos** e **espaço duplo** em todo o trabalho, incluindo página de título, resumo, texto, agradecimentos, referências bibliográficas, legendas das figuras e tabelas. A numeração das páginas deve ficar no canto superior direito, começando com a página de título como página 1. Não use abreviações no título ou no resumo e limite seu uso no texto. A extensão do

manuscrito e o número de tabelas e figuras devem ser os menores possíveis. Verifique se todas as referências bibliográficas foram citadas no texto. Nomes genéricos devem ser usados para todas as drogas. Os instrumentos podem ser citados pelo nome comercial; o nome e a localização do fabricante (cidade, estado, país e email) devem ser dados entre parênteses no texto. Rodapé, se for imprescindível deve ser numerado, super-escrito, consecutivamente no texto e deve ser apresentado em uma página à parte após o resumo.

Títulos e Subtítulos. Utilize somente três tipos de títulos no texto. Indique claramente o nível do título usando as convenções tipográficas abaixo. A posição de todos os títulos e subtítulos deve ser à esquerda da margem.

Dados da identificação

Título do trabalho - O título deve ser tão breve e informativo quanto possível, não deve conter abreviações.

Autores - Iniciais do nome e sobrenome de todos os autores com números super-escritos identificando a instituição de cada autor.

Instituição - Instituição de cada autor, identificada com o número super-escrito (Departamento, Faculdade, Universidade, Cidade, Estado e País). Quando um autor for do Brasil, o nome da instituição deve estar em português.

Título Resumido - O título resumido será utilizado no topo das páginas. Não deve exceder 60 letras e espaços.

Palavras Chaves - Deve ser incluída uma lista de não mais que 6 palavras chaves ou termos de indexação.

Agradecimentos - Se necessário, agradeça brevemente assistência de cunho técnico, conselhos e assistência de colegas, etc. Apoio financeiro para a pesquisa e bolsas de estudo devem ser citados na página de título.

Tabelas. As tabelas devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e reunidas após a seção de Referências. Todas as tabelas devem ser citadas no texto em ordem numérica. Cada tabela deve ser digitada com espaço duplo em uma folha separada (ou, se for excepcionalmente grande ou que requeira símbolos especiais ou algum arranjo não usual, a tabela deve ser enviada como uma imagem em um arquivo .tif ou .jpg). Defina todas as abreviações nas legendas das tabelas, mesmo que estejam definidas no texto.

Figuras. Todas as imagens devem pelo menos 12.5cm de largura. Serem numeradas na ordem em que são citadas no texto usando números arábicos consecutivos. Informação de abscissas e ordenadas ou outras informações nas figuras devem ter somente a primeira letra da palavra em maiúscula e as demais letras devem ser minúsculas. O tamanho e formato da letra deve ser uniformizado.

Legendas. Digite todas as legendas em espaço duplo consecutivamente em uma folha separada. Comece cada legenda com um pequeno título. Defina todas as abreviações e símbolos usados na figura, mesmo se eles estiverem definidos no texto. Numere as figuras na ordem em que elas são citadas no texto, usando algarismos arábicos consecutivos. Gráfico (preto e branco ou colorido) deve ser 300 dpi de resolução

Referências. Autores são responsáveis pela acurácia completa e correta citação das

referências ao longo do texto. Sempre que possível as citações de referência devem estar em inglês. A lista de referência deve estar em espaço duplo em ordem numérica em uma folha separada. Numere as referências na ordem em que elas forem citadas no texto pela primeira vez, usando algarismos arábicos entre parênteses. Duas ou mais referências devem ser separadas por vírgula sem espaço (1,5,7) e três ou mais referências consecutivas devem ser separadas por um hífen (4-9). As seguintes informações devem ser dadas na citação:

- Último nome e iniciais dos 6 primeiros autores (sem pontuação). Se houver mais de 6 autores, depois do 6º, nome coloque "et al."
- Título do artigo.
- Nome da revista em itálico abreviado.
- Ano da publicação, volume e páginas
- Se a referência for um livro, dê também os nomes e as iniciais dos editores, da editora e a cidade.

1.1.3 Artigo completo

Título original: Expressão do antígeno Ki-67 e CD71 em células blásticas nas leucemias agudas através da citometria de fluxo

H. T. Marinho^{1,3}, E. P. Noronha^{1,3}, E. B. A. F. Thomaz² e R. A. G. Oliveira³.

¹ Programa de Pós Graduação em Saúde Materno-Infantil – Mestrado Acadêmico, ² Departamento de Saúde Pública, ³ Centro de Pesquisa Clínica do Maranhão - Hospital Universitário Presidente Dutra, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

Título resumido: Ki-67 e CD71 nas leucemias agudas

Palavras chaves: leucemia aguda, Ki-67, CD71, proliferação celular, citometria de fluxo

Agradecimentos: Pesquisa apoiada pela Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) e CAPES. H.T Marinho e E. P. Noronha foram beneficiários de bolsas de estudo da Capes.

Endereço para correspondência

R. A. G. Oliveira, Centro de Pesquisa Clínica do Maranhão, Hospital Universitário Presidente Dutra (HUUFMA).

Rua Almirante Tamandaré, 01, Centro.

Cep: 65020-600, São Luís, MA, Brasil.

E-mails: helianamarinho@yahoo.com.br; rago@usp.com.br

RESUMO

Esta pesquisa objetivou estudar a proliferação celular através do marcador Ki-67 e CD71 nas leucemias agudas, bem como estabelecer a relação entre eles. Os pacientes foram selecionados de forma prospectiva tendo início em dezembro de 2008 e término em novembro de 2009 (12 meses). Foram coletadas amostras de medula óssea ou sangue periférico dos pacientes diagnosticados como portadores de leucemias agudas, provenientes do hospital de referência para tratamento oncológico no estado do Maranhão (no nordeste brasileiro), sendo determinada a expressão dos marcadores Ki-67 e CD71 por citometria de fluxo. A maioria dos pacientes foi diagnosticada com Leucemia Linfóide Aguda (LLA) (63,0%), dos quais 73,5% tipo B e 26,5% tipo T. Os valores da expressão de Ki-67 em medula óssea e sangue periférico no total de pacientes apresentaram-se maiores na LLAB que as demais leucemias agudas. O CD71 apresentou na medula óssea uma maior expressão na LLAT e no sangue periférico, uma maior expressão na LMA. Foi observada correlação positiva entre o Ki-67 e CD71 em sangue periférico na LLAB. Na medula óssea, os marcadores apresentaram correlação linear na LMA. Nossos dados parecem indicar que a expressão dos marcadores estudados difere nas leucemias agudas.

INTRODUÇÃO

As leucemias agudas são neoplasias primárias de medula óssea caracterizadas por formarem um grupo heterogêneo de doenças, nas quais existe a substituição dos elementos medulares e sanguíneos normais por células imaturas denominadas blastos, bem como acúmulo destas células em outros tecidos. Uma das bases importantes da patogênese da leucemia é a proliferação desordenada (1).

A citometria de fluxo tem sido usada para avaliar a proliferação celular, baseado na detecção do antígeno Ki-67, presente no núcleo das células nas fases do ciclo celular (G1, S e G2), bem como na mitose. Células quiescentes ou em repouso (fase G0) não expressam o antígeno Ki-67 (2). Visto que o antígeno Ki-67 está presente em todas as células que estão proliferando, torna-se evidente que sua presença torna-se um excelente marcador para determinar a fração de crescimento de uma população de célula (3). O CD71 ou receptor de transferrina é amplamente expresso na membrana celular. Tem sido utilizado para medir a cinética celular, pois células que estão proliferando requerem ferro e, portanto, expressam o receptor de transferrina (4).

O objetivo do presente estudo foi detectar o antígeno Ki-67 e CD71 em células blásticas nas leucemias agudas por meio da citometria de fluxo.

SUJEITOS E MÉTODOS

Sujeitos

Foram diagnosticados cinquenta e quatro pacientes com leucemia aguda no hospital de referência para tratamento oncológico na capital do estado do Maranhão (nordeste brasileiro) entre dezembro de 2008 e novembro de 2009 (12 meses). O diagnóstico foi baseado no aspecto citomorfológico e imunofenotípico dos blastos em medula óssea ou sangue periférico. A imunofenotipagem foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se um painel de anticorpos monoclonais (Becton Dickinson, San José CA, USA) direcionado contra antígenos de células precursoras e antígenos da linhagem B, T ou mielóide.

Para avaliação da resposta ao tratamento foi realizado mielograma ao final da fase de indução e considerou-se como critério de remissão a presença de menos de 5% de blastos na medula óssea. Os pacientes que foram a óbito antes do final da indução (n=20) foram considerados como pacientes que não entraram em remissão. Pacientes com LLA foram tratados de acordo com o Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Infantis, GBTLI/99. Adultos e crianças com LMA foram tratados de acordo com o Grupo de Estudo Alemão Berlin, Frankfurt, Münster, BFM-83 (5,6).

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HU-UFMA), parecer consubstanciado 115/2008.

Determinação do Ki-67 por citometria de fluxo

A determinação da expressão do antígeno Ki-67 nas células blásticas foi realizada usando o anticorpo monoclonal (AcMo) anti-Ki-67 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Becton Dickinson, San Jose CA, USA) e o anticorpo anti-CD34, marcador de células blásticas, conjugado com ficoeritrina (PE) (Becton Dickinson, San Jose CA, USA) através da citometria de fluxo.

A suspensão celular foi ajustada na concentração 1×10^6 células por tubo, previamente identificado com os AcMo. Primeiramente, foi realizada marcação em membrana através do AcMo CD34 PE, sendo incubado por 20 minutos em câmara escura.

À suspensão celular foi adicionado 1 ml de solução de lise (Becton Dickinson, FACS lysing solution, San José, CA, USA) diluída 1:10 em água destilada, com posterior incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. A amostra foi então centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em PBS 1%, seguido de nova centrifugação.

Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensionadas em 200 μ l de tampão permeabilizante (BD FACS™ Permeabilizing Solution), incubadas por 5 minutos e, posteriormente centrifugadas, seguido pelo descarte do sobrenadante. Ao sedimento foi adicionado o AcMo anti-Ki-67 FITC de acordo com recomendações técnicas do fabricante, e ao tubo controle foi adicionado o controle isotópico. Os tubos foram incubados em câmara escura por 20 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, realizou-se a lavagem com PBS 1% e centrifugação, descartando o sobrenadante. Ao sedimento foi adicionado 500 μ l de paraformaldeído 1% (Paraformaldehyde, Sigma-Aldrich), preservando-o a temperatura de 4°C ao abrigo da luz.

Determinação do CD71 por citometria de fluxo

A suspensão celular foi ajustada na concentração 1×10^6 células por tubo, previamente identificado com os AcMo a serem utilizados. Foi realizada marcação em membrana, segundo as indicações técnicas do fabricante, para os AcMo anti-CD71 FITC e anti-CD34 PE, sendo incubados por 20 minutos em câmara escura.

À suspensão celular foi adicionado 1 ml de solução de lise (Becton Dickinson, FACS lysing solution, San José, CA, USA) previamente diluída 1:10 em água destilada, homogeneizando em vórtex e incubando por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. O sedimento foi ressuspendido em PBS 1%, seguido de nova centrifugação. Após descarte do sobrenadante, ao sedimento foi adicionado 500 μ l de paraformaldeído 1%, preservando a temperatura de 4°C ao abrigo da luz até o momento da aquisição no citômetro de fluxo.

Aquisição e análise por citometria de fluxo

Após a marcação dos AcMo, foram realizadas leituras e análises em citômetro de fluxo (FACSCalibur da Becton Dickinson, San José, CA, USA), utilizando-se o Cell Quest software, versão 3.1 (Cell Quest TM Software, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA), com aquisição de 10.000 eventos da janela de análise (*gate*) por tubo. A partir da janela de análise estabelecida para os parâmetros de dispersão luminosa (FSC x SSC) foram obtidos gráficos do tipo *dot plot* no canal FL1 (fluorescência para FITC) e canal FL2 (fluorescência para PE). Os

resultados foram fornecidos na forma de percentagem de células blásticas positivas para os AcMo estudados.

Análise estatística

Para avaliação da distribuição dos dados (teste de normalidade), foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Para variáveis com distribuição assimétrica, utilizaram-se testes não-paramétricos. Os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados na avaliação para comparar dois grupos, sendo considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Em relação ao subtipo de leucemia aguda, dos 54 pacientes avaliados, 34 pacientes (63,0%) eram portadores de LLA e 20 (37,0%) de LMA. Do total de casos com LLA, 73,5% (25/34) foram tipo B e 26,5% (9/34) tipo T.

A expressão do antígeno Ki-67 e CD71 foram estudadas através da citometria de fluxo, com AcMo anti-Ki-67 em 39 amostras de medula óssea e 15 amostras de sangue periférico. Na figura 01 um *dot plot* criado após a análise por citometria de fluxo, mostra a células positivas na medula óssea de um paciente com leucemia linfóide aguda (LLA).

No total de pacientes, a mediana da expressão do Ki-67 em medula óssea apresentou-se maior para a LLA B com 25,8%, contra 10,8% da LLAT e 9,9% na LMA, entretanto, não apresentou diferença estatística ($p=0,1318$). A expressão do Ki-67 em

sangue periférico apresentou maior mediana na LLAB com 44,2%, contra 30,9% da LLAT e 4,2% na LMA, mas sem diferença estatística significativa ($p=0,1513$).

Na análise do CD71 em medula óssea, observou-se uma maior expressão deste marcador na LLAT, com mediana de 38,0%, contra 17,5% das LLAB e 32,3% das LMA, mas não apresentando diferença estatística ($p=0,6198$). No sangue periférico a expressão da mediana do CD71 foi maior na LMA com 64,5%, contra 9,7% das LLA-B e 9,6% das LLA-T, não apresentando diferença estatística ($p=0,4926$).

Em relação aos tipos de leucemias agudas, houve diferença estatisticamente significativa ($p= 0,0129$) quando foram comparados os valores do Ki-67 em sangue periférico e Ki-67 em medula óssea nas LMAs (Tabela01).

Observou-se correlação linear positiva entre a expressão do antígeno Ki-67 e o CD71 em sangue periférico na LLAB ($p = 0,0000$ e $R = 1,0000$), sendo que, quanto maior o valor de Ki-67, maior a expressão do antígeno CD71. Na LLAT, LMA e seus subtipos não houve correlação entre Ki-67 e CD71 em sangue periférico. Na medula óssea houve correlação linear entre a expressão do antígeno Ki-67 e o CD71 na LMA ($p = 0,0164$ e $R = 0,6071$). Na LLAT e LLAB, não foram observados correlação entre as variáveis de proliferação (Figura 02).

DISCUSSÃO

Dos 54 pacientes submetidos aos estudos de proliferação celular, a maioria foi diagnosticada com LLA (63,0%), dos quais 73,5% (25/34) tipo B e 26,5% (9/34) tipo T. As LMA constituíram (37,0%) do total de leucemias agudas. Dados epidemiológicos da

literatura refletem percentuais de LLA que variam de 67% a 85% dos casos (COEBERGH et al, 2001). A inclusão em nosso trabalho dos 4 casos que perderam a expressão do CD34 (todos LLA B) refletiria um valor real de 65,5% de LLA.

Quanto ao tipo de LLA, estudos realizados em Ribeirão Preto (7), que avaliaram 153 pacientes, obtiveram 82% de LLA B; no ano 2003, na Áustria (8), os autores encontraram que 87% das LLA eram do tipo B. Em 2007 (9), foi encontrado em outra pesquisa 83% das LLA com tipo B. Todos estes dados refletem mesma tendência encontrada em nosso estudo 73,5% (25/34) tipo B e 26,5% (9/34) tipo T.

A expressão do Ki-67 foi estudada separadamente em medula óssea e em sangue periférico, pois os parâmetros cinéticos do KI-67 são diferentes entre os blastos no sangue e na medula óssea (10).

Na tabela 01, encontram-se os valores obtidos para a expressão do Ki-67, em sangue periférico e medula óssea por tipo de leucemia aguda. Foram analisados os valores de Ki-67 em medula óssea no total de pacientes, apresentando a LLAB uma maior expressão da mediana quando comparadas às expressões em LLAT e LMA. Quando analisado o Ki-67 em sangue periférico, também se observou uma maior expressão da mediana na LLAB quando comparadas à LLAT e LMA, mesmo não sendo estatisticamente significativa ($p=0,1318$).

Quando comparamos os nossos resultados com os dados da literatura, observamos que as medianas da expressão do Ki-67 em medula óssea e sangue periférico neste trabalho não são diferentes das relatadas por outros autores, que também encontraram uma mediana de células positivas para o Ki-67 superior na LLA B (11,12). Corroborando com nossos dados, em outro estudo (13), também observaram que na LLAB a positividade do Ki-67 é maior quando comparada aos outros tipos de leucemias agudas.

Quando comparamos a expressão do Ki-67 em medula óssea com a expressão do Ki-67 em sangue periférico, houve diferença estatística ($p= 0,0129$) apenas na LMA entre os tipos de amostras biológicas. Nossos resultados são semelhantes aos obtidos por outros pesquisadores (11), que também encontraram diferenças na expressão da variável estudada no sangue periférico e medula óssea.

O CD71 apresentou expressões diferenciadas quanto ao tipo de leucemia, dependendo da amostra, observando na medula óssea uma maior expressão na LLAT e no sangue periférico, uma maior expressão na LMA. Um trabalho realizado no ano de 1997 (14) encontrou uma porcentagem maior de células que expressam receptores de transferrina na LLAT em medula óssea (mediana 81,0%), confirmando nossos resultados. Nesse estudo também foi possível observar uma maior expressão da LMA (mediana de 32,0%) em sangue periférico, quando relacionado à LLA B, que apresentou a menor expressão desse receptor (6,0%), concluindo que os blastos linfóides B em sangue periférico apresentam menor expressão do antígeno CD71, quando comparados aos outros tipos de leucemias agudas.

A avaliação comparativa entre a atividade proliferativa das células nos diferentes tipos de leucemias agudas em nosso estudo demonstrou que em sangue periférico apenas a LLAB apresentou correlação justificando que o Ki-67 aumenta juntamente com o CD71. Na medula óssea, nossos resultados apresentaram correlação linear na LMA. Muito embora, se saiba que tal avaliação comparativa seja mais significativa quando se utiliza técnicas que estudem as células e suas fases no ciclo celular, o que não pôde ser avaliado em nosso estudo.

Nossos dados parecem indicar que a proliferação celular difere nas leucemias agudas. Estes resultados expandidos a um maior número de pacientes, incluindo a avaliação do índice de DNA, associados a um estudo de evolução clínica a médio-longo

prazo, se faz necessária para avaliação da proliferação celular no prognóstico e sobrevida de pacientes com leucemias agudas.

REFERENCIAS

- 1 - Zhang L, Liu J, Lin H, Hu Q, Liu A, Hu Y. Expression of Survivin, CDK4, Ki-67 and Clinical Significance in Pediatric Acute Leukemia. *Journ of Huazhong University of Science and Technology* 2006;26 (5): 552-554
- 2- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133:1710-1715.
- 3-Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *J. of Cellular Physiology* 2000; 182:311-322.
- 4 - Pileri S, Gerdes J, Rivano M, Tazzari PL, Magnani M, Gobbi M et al. Immunohistochemical determination of growth fractions in human permanent cell lines and lymphoid tumors: a critical comparison of the monoclonal antibodies OKT9 and Ki-67. *Br.J.Haematol.* 1987; 65; 271-286.
- 5 - Brandalise S, Odone S, Pereira W, Andrea W, Zanichelli M. Aranega V. Treatment results of 3 consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols – GBTLI-80, BBTLI-82 and GBTLI- 85. *Leukemia* 1993; 7 (suppl.2):142-145.
- 6 – Sartori P, Taylor M, Stevens M, Darbyshire P, MANN J. Treatment of childhood acute myeloid leukemia using the BFM-83 protocol. *Med Pediatr Oncol*,1993; 21: 8-13.
- 7- Rego E, Garcia A, Viana S, Falcão R. Characterization of acute lymphoblastic leukemia subtypes in brazilian patients. *Leuk Res* 1996; 20:349-355.
- 8 - Dworzak M, Panzer-Grümayer E. Flow cytometric detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 1445-1455.
- 9 - Udayakumarad A, Bashirbe W, Patharece A, Walibde Y, Zachariabe M, Khanbe A, et al. Cytogenetic profile of childhood acute lymphoblastic leukemia in Oman. *Arch Med Res* 2007;38:305-312.
- 10 - Ucci G, Riccardi A, Dörmer P, Danova M. Rate and time of DNA synthesis of human leukaemic bone marrow and peripheral blood. *Cell Tissue Kinet.* 1986; 19:429-435.
- 11 – Drach J, Gattringer C, Glassl H, Schwarting R, Stein H, Huber H. Simultaneous flow cytometric analysis of surface markers and nuclear Ki-67 antigen in leukemia and lymphoma. *Cytometry* 1989,10:743-749.
- 12 – Ito M, Tsurusawa M, Zha Z, Kawai S, Takasaki Y, Fujimoto T. Cell proliferation in childhood acute leukemia. Comparison of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen immunocytochemical and DNA flow cytometric analysis. *Cancer* 1992 69:2176-2182.
- 13- White D, Smith A, Smith J. Assessment of proliferative activity in leukaemic bone marrow using the monoclonal antibody Ki-67. **J. Clin. Pathol.**, v.47, p.209-213, 1994.

14 - Beitler, M. B. Estudo da proliferação celular nas leucemias agudas. Tese (Doutorado em Hematologia). São Paulo: Faculdade de Medicina, USP; 1997.

15 - Brown D, Gatter K,. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990; 17: 489-503.

16 - Scott C, Ramsden W, Limbert H, Master P, Roberts B. Membrane transferrin receptor (TfR) and nuclear proliferation-associated Ki-67 expression in hematopoietic malignancies. *Leukemia* 1988;2:438-442.

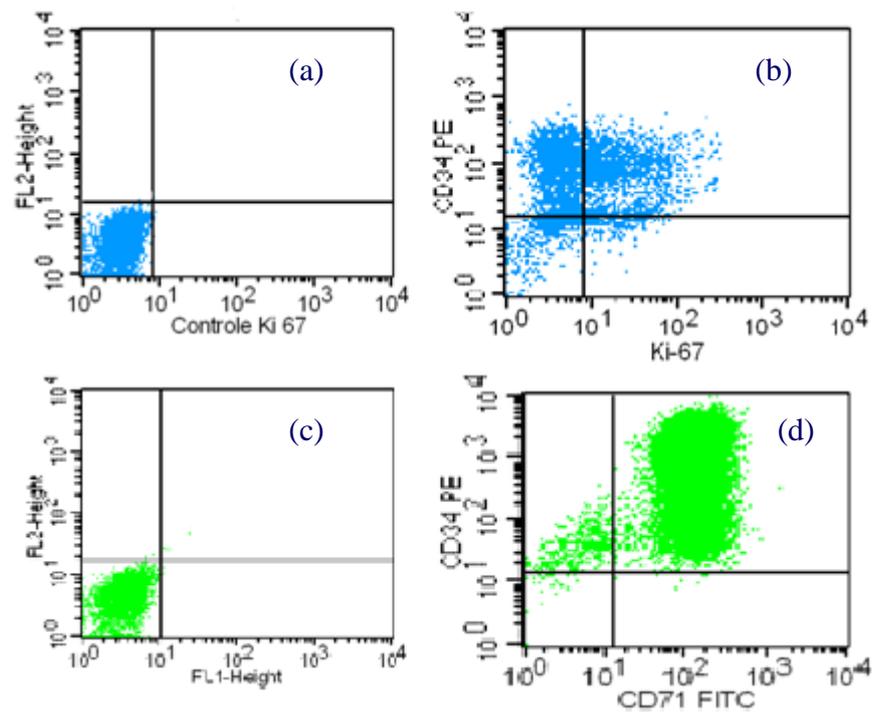


Figura 01: Análise do marcador Ki-67 e CD71 por citometria de fluxo: a) *Dot plot* do controle isotópico do Ki-67. (b) *Dot plot* da dupla marcação do anticorpo anti-Ki-67 versus anticorpo anti-CD34. (c) *Dot plot* do controle do anticorpo anti-CD71. d) *Dot plot* da dupla marcação do anticorpo anti-CD71 versus anticorpo anti-CD34.

Tabela 01: Expressão dos marcadores Ki-67 e CD71 (sangue periférico e medula óssea) por tipo de leucemia aguda em pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Tipo de leucemia	Ki-67										CD71								
	MO					SP					MO					SP			
	N	\bar{x}	dp	Med		N	\bar{x}	dp	Med	p*	N	\bar{x}	dp	Med	N	\bar{x}	dp	Med	p*
LLAB	18	26,2	18,3	25,8		6	37,8	26,0	44,2	0,3399	18	26,1	24,4	17,5	6	13,0	11,7	9,7	0,1433
LLAT	5	12,9	15,0	10,8		4	27,7	24,4	30,9	0,1416	5	40,6	33,3	38,0	4	25,3	33,2	9,6	0,2207
LMA	15	16,5	13,3	9,9		5	26,0	3,6	4,2	0,0129*	15	36,1	30,0	32,3	5	49,6	41,5	64,5	0,6312

\bar{x} = média em %; dp= desvio padrão; Med= mediana em %; MO= medula óssea; SP= sangue periférico.

* p valor para Mann-Whitney.

** Valor estatisticamente significativo (p < 0,05).

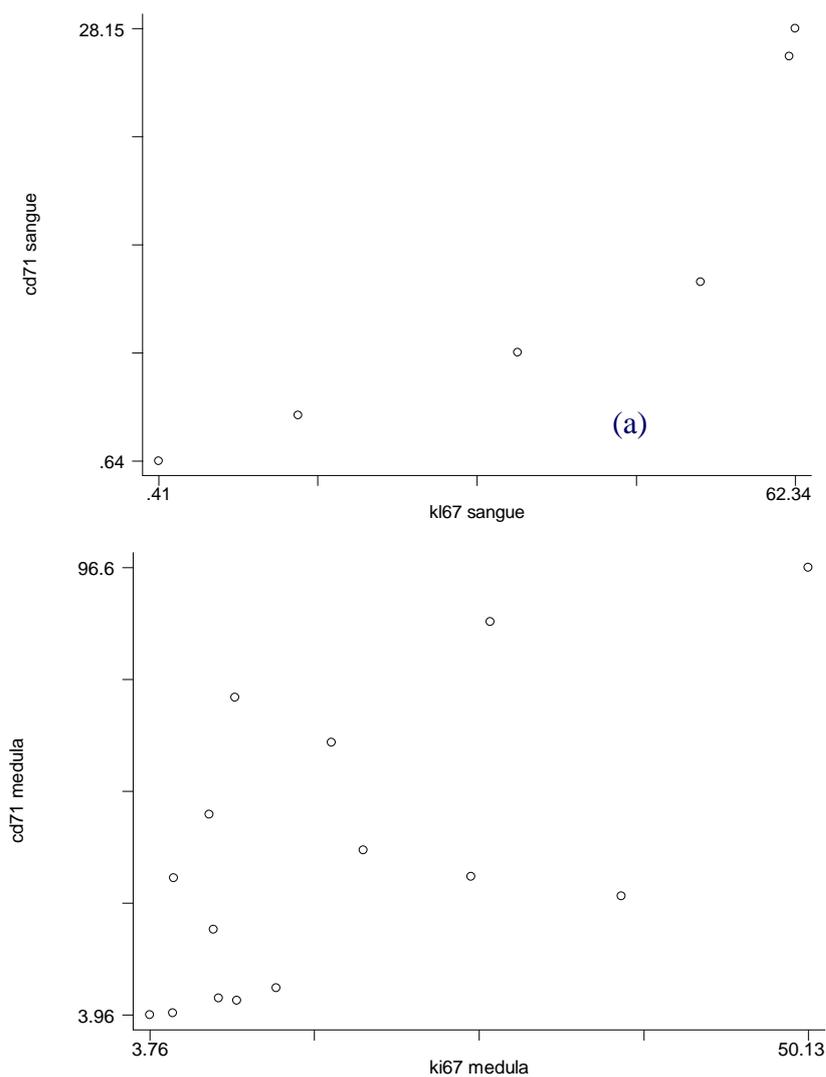


Figura 02: Gráficos de dispersão dos marcadores Ki-67 e CD71 em sangue periférico e medula óssea nos pacientes portadores de leucemias agudas do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.(a) Gráfico de dispersão do Ki-67 *versus* CD71 em sangue periférico na LLAB.(b) Gráfico de dispersão do Ki-67 *versus* CD71 em medula óssea na LMA.