

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

ELDA PEREIRA NORONHA

ESTUDO IMUNOFENOTÍPICO DAS LEUCEMIAS AGUDAS NO CENTRO
ONCOLÓGICO DE REFERÊNCIA DO ESTADO DO MARANHÃO

São Luís-MA

2010

ELDA PEREIRA NORONHA

ESTUDO IMUNOFENOTÍPICO DAS LEUCEMIAS AGUDAS NO CENTRO
ONCOLÓGICO DE REFERÊNCIA DO ESTADO DO MARANHÃO

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

Orientador: Dr. Raimundo Antônio Gomes
Oliveira

São Luís-MA

2010

ELDA PEREIRA NORONHA

**ESTUDO IMUNOFENOTÍPICO DAS LEUCEMIAS AGUDAS NO CENTRO
ONCOLÓGICO DE REFERÊNCIA DO ESTADO DO MARANHÃO**

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

Orientador: Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Prof. Dr. José Albuquerque de Figueiredo Neto
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Ao meu tio Pery Noronha Sobrinho, *in memorian*, em quem tanto pensei durante a produção deste trabalho, falecido em decorrência de leucemia aguda.

A todos os pacientes que participaram desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter segurado a minha mão, iluminado os meus pensamentos e por ter me dado forças.

À Fundação de Amparo ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pela concessão de financiamento para realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao meu Orientador Professor Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira, a quem aprendi a admirar desde os tempos de graduação. Sua orientação, dedicação e ensinamentos foram de fundamental importância para o meu crescimento profissional.

À minha amiga Heliana Trindade Marinho, pela sua amizade, companheirismo e força. A sua ajuda foi fundamental nessa caminhada, onde tudo teria sido mais difícil sem a sua colaboração.

À Professora Dra. Érika Bárbara Abreu Fonseca Thomaz por toda sua atenção e pela ajuda com a análise estatística.

Às médicas do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB) Geni Lourdes de Resende Ramos Veras, Lígia Maria Mendes Gonçalves e em especial a Cíntia Assunção Silva que tanto contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa encaminhando para o nosso laboratório as amostras dos pacientes.

Ao diretor administrativo do IMOAB José Generoso da Silva e á diretora técnica Silvia Moreira Feitosa por toda atenção e colaboração com a nossa pesquisa.

Aos funcionários do Arquivo do IMOAB pela colaboração no rastreamento dos prontuários.

À Nivânia Lisboa Camelo pela sua amizade e colaboração na análise morfológica das células.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno Infantil, em especial á Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito, a Profa. Dra. Maria Bethânia da Costa Chein e a secretaria Helena Ribeiro Sousa, pessoas que admiro por sua determinação e por todos os esforços para tornar o nosso programa cada vez melhor.

Ao Laboratório de Pesquisa Clínica do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (LPC-CEPEC/HUFMA), em especial 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, pela colaboração e amizade.

À Dra. Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira, do Instituto Nacional do Câncer (INCA), por ter me recebido em seu laboratório e pela atenção.

Ao meu namorado Gabriel Correia de Farias por toda sua compreensão e apoio nos momentos de estresse e nas fases difíceis, proporcionando, com todo o seu amor e carinho, momentos de alegria, paz e tranquilidade.

Aos meus pais, Raimundo Nonato Ferreira Noronha e Maria José Pereira Noronha, pelo apoio incondicional. Vocês são exemplos de dedicação e amor aos filhos.

Às minhas amigas Haíssa Oliveira Brito e Marcela Braga Mansur pelos incentivos, apoio e carinho, mesmo estando longe.

Aos amigos e colegas de turma do mestrado, e especialmente à Juliana Maria Trindade Bezerra e Lila Isabel Câmara de Paula pela amizade e companheirismo.

Aos amigos e colegas do Hospital da Criança - Dr. Odorico Amaral de Mattos, em especial, Raquel Silva Santos, Omar Moraes, Maria do Carmo Barbosa, Karoline Paixão, Daniel Arcanjo e Veronica Avena pelo apoio e por sempre estarem dispostos a ajudar.

*“Nem tão longe que eu não possa ver, nem
tão perto que eu possa tocar, nem tão
longe que eu não possa crer que um dia
chego lá.”*

Humberto Gessinger

RESUMO

A leucemia aguda é o tipo de câncer mais comum na infância. Para o seu diagnóstico é indispensável a utilização da imunofenotipagem, que permite definir a linhagem, o grau de maturação, e a identificação de marcadores com valor prognóstico. A avaliação da incidência dos subtipos de leucemias no mundo tem mostrado variações importantes em relação à distribuição geográfica, sexo, idade, raça e condições sociais. Este trabalho objetivou determinar o perfil imunofenotípico e a frequência, em diferentes faixas etárias, dos subtipos de leucemias agudas de pacientes tratados no centro oncológico de referencia Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello em São Luís-Maranhão; e estudar, em crianças com Leucemia Linfóide Aguda (LLA), a relação da expressão do CD34 e de fenótipos aberrantes com fatores prognósticos. O diagnóstico das leucemias agudas foi feito com base no hemograma, mielograma, provas citoquímicas e imunofenotipagem por citometria de fluxo. Utilizou-se anticorpos monoclonais contra antígenos T (CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 e CD8), antígenos B (CD10, CD19, CD22, CD79a e IgM), antígenos de diferenciação mielóide (CD13, CD14, CD33, CD64, CD117, MPO), eritróide (alfa-glicoforina), plaquetário (CD61 e CD41a), antígeno de linhagem não específica (CD45) e antígenos de células precursoras (CD34, HLA-DR). As leucemias agudas foram classificadas de acordo com os critérios da classificação Franco-Americana-Britânica (FAB) e do Grupo Europeu para Caracterização Imunológica das Leucemias (EGIL). Analisou-se 70 casos de leucemias agudas *de novo* no período de setembro de 2008 a janeiro de 2010, dos quais 31,4% eram em adultos e 68,6% em crianças. 22,7% dos pacientes adultos foram diagnosticados como LLA e 77,3% como leucemia mielóide aguda (LMA), sendo o subtipo LMA M0 o mais frequente. Em crianças, 77,1% dos pacientes foram diagnosticados como LLA, 18,7% como LMA, sendo mais frequente o subtipo LMA M4 e 4,2% como leucemia bifenotípica aguda (BAL). Entre as LLA, em crianças, a LLAB representou 72,9% dos casos e a LLA T 27,1%. O pico de incidência da LLA foi entre 1 e 4 anos. Os subtipos de LLAB mais frequente foram LLABII (pré-pré-B, B comum), seguido do subtipo LLA BIII (pré-B). Na LLA e LMA houve expressão anômala em 45,2% e 26,9% dos casos, respectivamente. Na LLA, em crianças, não se encontrou diferença estatisticamente significativa, entre os grupos com e sem expressão anômala, em relação aos parâmetros hematológicos e resposta ao tratamento. A expressão do CD34 apresentou-se com correlação negativa com o número de leucócitos e porcentagem de blastos em sangue periférico. Pode-se observar que a expressão do CD34 na LLAB parece estar associada a características de melhor prognóstico, já na LLAT observa-se o contrário. Os anticorpos utilizados foram suficientes para classificar imunologicamente os casos. A utilização da imunofenotipagem para o diagnóstico de leucemias agudas em nosso estado permitiu diagnosticar casos de LMA minimamente diferenciadas (LMA M0), bem como as LLAT ocorridas com elevada frequência em nossa população, sugerindo que podem haver diferenças na prevalência dos subtipos FAB da LMA, assim como dos subtipos de LLA, em diferentes regiões do Brasil.

Palavras-chave: Leucemia aguda. Leucemia linfóide aguda na infância. Imunofenotipagem. Fatores prognósticos.

ABSTRACT

Acute leukaemia is the most common type of cancer in childhood. Its diagnosis depends on immunophenotyping, which enables identification of the lineage, the grade of maturation, and the identification of markers with prognostic value. Assessment of the incidence of leukaemia subtypes worldwide has shown important variations in relation to geographical distribution, sex, age, ethnicity and socio-economic conditions. The objective of this work was to determine the immunophenotypic profile and the frequency, in different age groups, of subtypes of acute leukaemia in patients treated at the oncology center of reference Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, in São Luís, Maranhão, and to study, in children with acute lymphoid leukaemia (ALL), the relationship between the expression of CD34 and the expression of aberrant phenotypes and prognostic factors. The diagnosis of acute leukaemia was obtained based on blood count, myelograms, cytochemical tests and immunophenotyping by flow cytometry. Monoclonal antibodies were used against T antigens (CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 and CD8), B antigens (CD10, CD19, CD22, CD79a and IgM), antigens of myeloid (CD13, CD14, CD33, CD64, CD117, MPO), erythroid (alpha-glycophorin), and platelet (CD61 and CD41a) differentiation, non-specific lineage antigen (CD45) and precursor cell antigens (CD34, HLA-DR). Acute leukaemia was classified according to the French-American-British (FAB) classification criteria and those of the European Group for the Immunological Characterisation of Leukaemias (EGIL). Seventy cases of *de novo* acute leukaemias were analysed over the period from September 2008 to January 2010, of which 31.4% were in adults and 68.6% in children. Among the adult patients 22.7% were diagnosed with ALL and 77.3% with acute myeloid leukaemia (AML), with the AML M0 subtype being most frequent. In children, 77.1% of the patients were diagnosed with ALL, and 18.7% with AML, with the AML M4 subtype the most frequent, and 4.2% with acute biphenotypic leukaemia (ABL). Among ALL, in children, B-ALL represented 72.9% of the cases and T-ALL 27.1%. The peak incidence of ALL was between 1 and 4 years of age. The most frequent subtypes of B-ALL were BII-ALL (pre-pre-B, common B), followed by the subtype BIII-ALL (pre-B). Among ALL and AML there was anomalous expression in 45.2% and 26.9% of cases, respectively. In ALL among children no statistically significant difference was found between the groups with and without anomalous expression in relation to the haematological parameters and the response to treatment. The expression of CD34 was negatively correlated with the number of leucocytes and percentage of blasts in peripheral blood. Furthermore, the expression of CD34 in B-ALL appeared to be associated with characteristics of better prognosis, while in T-ALL the opposite was observed. The antibodies used were sufficient to classify the cases immunologically. The use of immunophenotyping to diagnose acute leukaemias in our state enabled the diagnosis of minimally differentiated cases of AML (AML M0), as well as detection of the increased frequency of T-ALL in our population, suggesting that there may be differences in the prevalence of the FAB subtypes of AML, as well as the subtypes of ALL, in different regions of Brazil.

Key words: Acute leukaemia. Acute Lymphoid leukaemia in childhood. Immunophenotyping. Prognostic factors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANAE	α -naftil acetato esterase
BAL	Leucemia Bifenotípica Aguda
CD	Cluster Differentiation
cit	Citoplasmático
EGIL	Grupo Europeu para Classificação Imunológica das Leucemias
FAB	Grupo Cooperativo Franco-Americano- Britânico para classificação de leucemias agudas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Forward Scatter
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Infantis
Ig	Imunoglobulina
IMF	Intensidade média de fluorescência
IMOAB	Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LA	Leucemia Aguda
LLA	Leucemia linfóide Aguda
LLA MY⁺	Leucemia linfóide com expressão anômala de antígeno mielóide
LLA MY⁻	Leucemia linfóide sem expressão anômala de antígeno mielóide
LMA	Leucemia mielóide aguda
M0	Leucemia mielóide aguda minimamente diferenciada
M1	Leucemia mielóide aguda sem maturação
M2	Leucemia mielóide aguda com maturação
M3	Leucemia aguda promielocítica
M3v	Leucemia aguda promielocítica. Variante hipogranular

M4	Leucemia Mielomonocítica
M5a	Leucemia monoblástica aguda
M5b	Leucemia monocítica aguda
M6	Eritroleucemia
M7	Leucemia megacariocítica
MO	Medula óssea
MPO	Mieloperoxidase
PAS	Ácido periódico de Schiff
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína piridina de clorofila
PBS	Tampão fosfato
S	Superfície
SP	Sangue periférico
SSC	Side Scatter
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Dot plot</i> CD45 x SSC com gate (R1) nos blastos, representado pela população de células em vermelho.	38
Figura 2.	Gate 4 mostra a localização da população de blastos, representada em vermelho, no <i>plot</i> FSC X SSC.	38
Figura 3.	<i>Dot plot</i> do tubo controle negativo da amostra (sem anticorpos monoclonais), com a delimitação dos quadrantes considerados positivos (UL,UR e LL).	39
Figura 4.	<i>Dot plot</i> com células positivas para o CD19 FITC (23.03% + 55.16% = 78.19%) e CD34 PE (23.03%).	39
Figura 5.	Modelo de análise da IMF do CD34.	40
Figura 6.	Distribuição dos casos de leucemia linfóide aguda quanto a idade, de crianças atendidas no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA, no período de setembro de 2008 a janeiro de 2010.	44
Figura 7.	LLA B, com CD45, HLA-DR, CD19, CD10 positivos e expressão variável do CD34.	46
Figura 8.	LLA T, com CD45, CD7, CD13, CD2 e citCD3 positivos, com expressão variável do CD34 e negativa para CD19 e CD33.	48
Figura 9.	LMA M2 com CD34, CD33, CD13, HLA-DR, MPO e CD117 positivos, e negativa para citCD3 e CD7 (< 20%).	52
Figura 10.	Gráficos de dispersão da intensidade de fluorescência (IMF) do CD34 <i>versus</i> número de leucócito e porcentagem de blastos em sangue periférico de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação das LLAs B de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2001) e classificação EGIL (1995).	26
Tabela 2.	Classificação das LLAs T segundo a classificação EGIL.	28
Tabela 3.	Classificação imunológica das LMA.	29
Tabela 4.	Sistema de score da Classificação EGIL para definição de leucemia aguda bifenotípica (EGIL 1998).	30
Tabela 5.	Frequência dos tipos de leucemias agudas em adultos e crianças atendidos no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA, no período de setembro de 2008 a janeiro de 2010.	42
Tabela 6.	Distribuição dos subtipos de LLA e sexo de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	43
Tabela 7.	Parâmetros hematológicos do hemograma, ao diagnóstico, dos subtipos de leucemia linfóide aguda de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	45
Tabela 8.	Perfil da expressão dos marcadores nas LLA B, de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	45
Tabela 9.	Perfil da expressão dos marcadores nas LLA T, de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	47
Tabela 10.	Frequência da expressão anômala na LLAB e LLAT de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	48

Tabela 11.	Frequência quanto aos subtipos FAB e sexos dos pacientes com LMA do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	49
Tabela 12.	Parâmetros hematológicos do hemograma, ao diagnóstico, dos subtipos de LMA de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	50
Tabela 13.	Perfil da expressão dos marcadores nas LMA, de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	50
Tabela 14.	Frequência da expressão anômala na LLA e LMA de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	51
Tabela 15.	Características clínicas dos pacientes com leucemia bifenotípica aguda (BAL) do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	53
Tabela 16.	Avaliação da expressão anômala na LLA em relação aos parâmetros hematológicos e resposta a indução, em crianças atendidas no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	54
Tabela 17.	Correlações da IMF CD34 com parâmetros hematológicos e resposta a indução na LLA em crianças atendidas no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.	55
Tabela 18.	Avaliação de crianças CD34 ⁺ e CD34 ⁻ com LLA B e LLAT em relação a parâmetros hematológicos e resposta a indução.	56
Tabela 19.	Parâmetros hematológicos do hemograma, ao diagnóstico, do paciente com LMA M6	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Critério diagnóstico da FAB para LMA.	24
Quadro 2.	Características morfológicas dos subtipos de LLA, segundo Bennet et al. (1976).	25

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE QUADROS	xv
1. INTRODUÇÃO	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1. Leucemias agudas	20
2.2. Clínica	21
2.3. Epidemiologia das leucemias agudas	22
2.4. Classificação morfológica e citoquímica	23
2.5. Classificação imunológica das leucemias agudas	25
2.5.1. LLA B	25
2.5.2. LLAT	27
2.5.3. LMA	28
2.5.4. BAL	29
2.5.5. Expressão anômala	31
2.6. Fatores prognósticos	31
3.0. OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivo específico	33
4.0. PACIENTES E MÉTODOS	34
4.1. Pacientes	34
4.2. Avaliação Clínica	34
4.3. Diagnóstico das leucemias agudas	34
4.3.1. Coletas	34
4.3.2. Hemogramas	35
4.3.3. Mielograma	35
4.3.4. Citoquímica	35
4.3.5. Painel de monoclonais para imunofenotipagem	36
4.3.6. Preparação das amostras para imunofenotipagem	36
4.3.7. Aquisição e análise das amostras por citometria de fluxo	37
4.4. Tratamento realizado	40
4.5. Análise estatística dos dados	41
4.6. Aspectos éticos	41
5.0. RESULTADOS	42
5.1. Caracterização da amostra	42
5.2. LLA	42
5.2.1. Perfil imunofenotípico das LLA B	45
5.2.2. Perfil imunofenotípico das LLA T	47
5.3. LMA	49
5.3.1. Perfil imunofenotípico das LMA	50
5.4. BAL	53
5.5. Avaliação da expressão anômala na LLA em crianças	53
5.6. Avaliação da expressão do CD34 na LLA em crianças	54

6.0. DISCUSSÃO	57
7.0. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICES	76
APÊNDICE 1. Termo de consentimento livre e esclarecido	77
APÊNDICE 2. Termo de consentimento livre e esclarecido (aos pais ou responsáveis)	78
APÊNDICE 3. Parâmetros hematológicos de pacientes com LMA M6.	79
APÊNDICE 4. Gráficos de dispersão da intensidade média de fluorescência do CD34 <i>versus</i> contagem de leucócito e porcentagem de blasto em sangue periférico	80
APÊNDICE 5. Artigo Científico	81
ANEXO	108
ANEXO A Parecer consubstanciado	109
ANEXO B Classificação do Qualis do Periódico na área de Medicina II e normas editoriais	112

1.0. INTRODUÇÃO

As leucemias agudas são as neoplasias mais comuns na infância, variando de 15 a 45% de todas as doenças malignas diagnosticadas em crianças (REIS; SANTOS; THULER, 2007; CAMARGO et al., 2010).

A leucemia aguda é classificada, de acordo com a linhagem celular envolvida, como leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA). Um pequeno número de pacientes não revela uma linhagem bem definida, apresentando antígenos de linhagem mielóide e linfóide; esses casos recebem a denominação de leucemias de células mistas, híbrida ou leucemia bifenotípica aguda (BAL). As BAL são doenças menos comuns, responsáveis por menos de 5% das LA (KILLICK et al., 1999; LEE et al., 2003; XU et al., 2009).

Segundos dados do Instituto Nacional do Câncer, espera-se que devam ocorrer 9.398 novos casos de leucemia aguda por ano em crianças e adolescentes. No Maranhão as estimativas de casos de leucemia para 2010 apontam para uma incidência de 2,46 casos por 100.000 habitantes para mulheres e 3,28 casos por 100.000 habitantes para homens (INCA, 2009). Não existem dados referentes à estimativa e incidência das leucemias agudas, especificamente em crianças, no Estado do Maranhão. No Brasil, para o sexo masculino, a maior taxa média de incidência ajustada por idade foi observada em Cuiabá (2000-2003), com 90,6 casos por milhão e a menor taxa foi observada em Salvador (1998-2002), com 25,5 por milhão. No sexo feminino, a maior taxa foi observada em Curitiba (1998- 2002), com 69,9 e a menor, assim como no sexo masculino, ocorreu em Salvador (1998-2002), com 18,6 casos por milhão (INCA, 2008).

Dentre os subtipos de Leucemias Agudas, em crianças, as LLAs representam 75% de todos os casos de leucemias agudas (ONCIU, 2009), a LLA B é o subtipo mais comum de LLA, e compreende 75% a 85% de todos os casos de LLA (RILEY et al., 2002). Aproximadamente 12 a 15% das crianças com LLA têm o imunofenótipo T (JEHA; PUI, 2009) e a LMA compreende de 15% a 20% do total de casos (RUBNITZ; GIBSON; SMITH, 2010).

Morfolologicamente, todas as leucemias agudas são caracterizadas pela presença de células hematológicas imaturas na medula e no sangue, denominadas blastos. O grande problema é diferenciar tais células, se da linhagem mielóide ou linfóide, e mais, determinar

sua sub-linhagem e fase maturativa. A classificação correta das leucemias é fundamental para aplicação da terapêutica adequada e seu prognóstico (DIGIUSEPPE, 2007).

Atualmente na prática clínica, a imunofenotipagem por citometria de fluxo desempenha um importante papel no diagnóstico de pacientes com LLA. As características morfológicas ou mesmo citoquímicas dos linfoblastos podem ser indistinguíveis dos mieloblastos em muitos casos de leucemias aguda, e os protocolos de tratamento para LLA e LMA diferem significativamente, desta forma a imunofenotipagem tem um papel fundamental no diagnóstico correto de tais patologias para tratamento adequado. Além disso, a linhagem da LLA é estabelecida pela imunofenotipagem, sendo subdividida em duas categorias que são clínica e biologicamente diferentes: LLA de células precursoras B (LLA B) e LLA de células precursoras T (LLA T) (DIGIUSEPPE, 2007; ONCIU, 2009).

A avaliação da incidência dos subtipos de leucemias no mundo tem mostrado variações importantes em relação à distribuição geográfica, sexo, idade, raça e condições sociais, sugerindo que possam existir diferentes fatores etiológicos (GROVES; LINET; DEVESSA, 1995; POMBO-DE-OLIVEIRA et al., 2009). Portanto, é de grande importância estudos adicionais da frequência dos diferentes subtipos de leucemias agudas em diferentes regiões com diferentes características sócio-econômica, como no caso do Maranhão.

Até antes da realização deste trabalho, não existia nenhum Serviço de Imunofenotipagem em nosso estado. Como consequência, também inexistia qualquer dado científico sobre os diferentes subtipos imunológicos de leucemias em nossa população. Assim, a estratificação e o estudo clínico sob este aspecto nunca foram realizados em nossa comunidade. Deste modo, a presente pesquisa propõe-se a determinar o perfil imunofenotípico dos subtipos de leucemias agudas e relacionar marcadores imunológicos com fatores prognósticos.

Além de tudo, esse trabalho poderá contribuir para conduta terapêutica diferenciada entre portadores de tais neoplasias no Maranhão e elevar as taxas de cura bem como melhorar a qualidade de vida e diminuir a morbimortalidade de uma doença tão grave e de elevada incidência na infância.

2.0. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Leucemias agudas

As leucemias agudas compreendem um grupo heterogêneo de doenças malignas do sistema hematopoiético, caracterizadas pela expansão clonal de células hematopoiéticas imaturas denominadas blastos na medula óssea, sangue periférico e em outros tecidos, com proliferação descontrolada, diminuição da apoptose e bloqueio na diferenciação celular (BUCCHERI; LORENZI, 2006). O clone maligno que sofre a transformação pode ser tanto uma célula pluripotente como uma célula progenitora mais madura (LIGHTFOOT, 2005; KEBRIAIEI; LARSON, 2003). São definidas pelo grupo FAB (Grupo Cooperativo Francês, Americano e Britânico) como entidades que possuem 30% ou mais de blastos na medula óssea (BENNETT et al., 1976), enquanto a classificação WHO preconiza como critério de inclusão para leucemias agudas o limite de 20% de blastos na medula óssea (HARRIS et al., 1999).

São doenças bastante heterogêneas quanto à patogenia (mecanismo leucemogênico), etiologia, prognóstico e resposta ao tratamento. Desse modo, devem ser separadas em entidades biológicas distintas (OLIVEIRA; POLI-NETO, 2004).

De acordo com a evolução da doença e linhagem hematopoiética envolvidas, a leucemia pode ser dividida em leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA). As LLAs caracterizam-se por serem neoplasias resultantes da proliferação anormal de células linfóides imaturas que perderam sua capacidade maturativa, os linfoblastos. Acredita-se que os clones malignos de pacientes com LLA são originados de células progenitoras linfóides da medula óssea ou do timo e caracterizam os estágios iniciais de diferenciação das linhagens B e T, respectivamente (UCKUN et al., 1998; OLIVEIRA; POLI-NETO, 2004). A LMA é um grupo heterogêneo de leucemias que surge em precursores de células de linhagem mielóide, eritróide, megacariocítica e monocítica. Estas leucemias resultam de uma transformação clonal de precursores hematopoiéticos através da aquisição de rearranjos de cromossomos e múltiplas mutações de genes (RUBNITZ; GIBSON; SMITH, 2010) dando origem aos vários tipos de LMA atualmente conhecidos.

Existem também alguns casos de leucemias agudas, cerca de 5% (XU et al., 2009), que são difíceis de classificar, devido à co-expressão em uma mesma célula de antígenos mielóides e linfóides, sendo, por essa razão, designados de leucemias de linhagem

mista, híbrida ou leucemia bifenotípica aguda. Considera-se a leucemia bifenotípica aguda como um tipo incomum de leucemia, originadas de uma célula precursora, com potencial de diferenciação ao longo da linhagem linfóide ou mielóide (MATUTES et al., 1997).

2.2. Clínica

As manifestações clínicas das leucemias agudas são explicadas pela fisiopatologia da doença. Os sinais e sintomas das leucemias agudas refletem a expansão do clone leucêmico na medula óssea com supressão da hematopoiese normal e infiltração dos tecidos não hematopoéticos por células leucêmicas. A supressão da hematopoese normal se deve ao decréscimo do número de progenitores normais, deficiente produção de fatores de crescimento e produção de citocinas inibidoras (MOORE; WILLIAMS; METCALF, 1973; HOMANS; WILLIAMS; METCALF, 1989). É importante salientar que, em geral, não é possível distinguir a LLA da LMA com base nas manifestações clínicas iniciais (RIBEIRO, 2001).

Os pacientes, na sua maioria, apresentam-se com sintomas decorrentes da anemia, neutropenia e trombocitopenia (CORTES; KANTARJIAN, 1995).

A maioria dos pacientes com LMA refere cansaço e dispnéia às atividades físicas, palidez, sinais de sangramento como manchas na pele, sangramento nas mucosas, nariz e outros locais. Além disso, febre e infecções são achados freqüentes, assim como dores ósseas (HAMERSCHLAK, 2008)

Um aspecto importante é que a maioria dos pacientes com leucemia apresenta doença disseminada ao diagnóstico, notando-se a presença de células blásticas leucêmicas no sangue periférico e o envolvimento de baço, fígado e linfonodos. A presença de febre é um achado comum e pode ser decorrente de processo infeccioso, ou ser resultado da produção de citocinas pelas células normais ou leucêmicas. O acometimento do sistema nervoso central (SNC) pode ser encontrado ao diagnóstico em cerca de 5% a 10% dos pacientes com leucemias agudas. O envolvimento testicular clinicamente detectável é incomum nos casos recém-diagnosticados e caracteriza-se pelo aumento testicular indolor, uni ou bilateral. (OLIVEIRA; DINIZ; VIANA, 2004).

2.3. Epidemiologia das leucemias agudas

O câncer infanto-juvenil, até 18 anos, é considerado raro quando comparado com os tumores que afetam os adultos. Espera-se que devam ocorrer 9.398 novos casos por ano em crianças e adolescentes (INCA, 2009). Em geral há uma predominância dos casos de leucemias, que variam de 15% a 45% de todos os tumores pediátricos, seguidos dos linfomas (5% a 25%) e tumores do sistema nervoso central (5% a 22%) (REIS; SANTOS; THULER, 2007; CAMARGO et al., 2010).

A leucemia linfocítica aguda (LLA) é a malignidade mais comum na infância. A ocorrência de LLA é aproximadamente cinco vezes mais freqüente do que a LMA e representa cerca de três quartos de todos os casos de leucemias da infância diagnosticados (PUI, 1997; STANULLA;SCHRAUDER, 2009). O pico de incidência da LLA ocorre entre 2 e 5 anos de idade (PUI; ROBISON; LOOK, 2008), a incidência em crianças do sexo masculino é maior do que no sexo feminino (REIS; SANTOS; THULER et al., 2007; LINABERY;ROSS, 2008). Estudos realizados no Brasil apontam para um pico de incidência de 1 a 4 anos (CAMARGO et al.,2010). Nos EUA, crianças nessa faixa etária, quando comparadas com as demais faixas etárias, apresentaram as maiores taxas de LLA chegando a 73,2/1 milhão de pessoas ano, caindo para 32,2 em crianças de 5 a 9 anos e aproximadamente 19,4 em crianças de 10 a 14 anos (LYNABERY; ROSS, 2008) É mais comum em caucasianos quando comparada a afro-americanos com uma relação de 1,5/100.000 na população branca e 0,8/100.000 na população negra. Existe uma maior freqüência em países industrializados e em áreas urbanas (FARHI; ROSENTHAL, 2000).

A leucemia mielóide aguda (LMA) representa apenas 13% a 14% dos casos de leucemias agudas (LA) nos primeiros dez anos de vida e constitui aproximadamente 36% dos casos de leucemias em crianças mais velhas. (REIFFERS et al., 1989). Diferente das LLA, meninos e meninas são afetados igualmente e as taxas da doença são similares entre diferentes grupos raciais (DOWNING; SHANNON, 2002). Nos adultos, as taxas de LMA começam a subir exponencialmente após os 50 anos de idade; incidências das taxas idade-específicas são de 3,5 por 100.000 em adultos com 50 anos de idade, aumentando significativamente para 15,0 na de idade 70 anos e 35,0 na idade 90 anos (GILES et al., 2002).

As leucemias bifenotípicas (BAL) representam menos de 5% dos casos de leucemias agudas (MATUTES et al.,1997; OWAIDAH et al., 2006). A exata incidência da BAL em crianças não é bem estabelecida, pois esta população tem sido relatada dentro de

estudos com adultos (AL-SERAIHY et al., 2009). Dois trabalhos publicados recentemente, concentrando-se apenas em pacientes pediátricos, relataram uma incidência de 2% e 4,4% (RUBNITZ et al., 2009; PARK et al., 2009).

2.4. Classificação morfológica e citoquímica

A classificação morfológica das leucemias agudas utilizada como consenso é a proposta por um grupo de hematologistas da França, dos Estados Unidos e da Grã-Bretanha, que desenvolveram a classificação Franco-Americano-Britânica (FAB) proposta em 1976 para padronizar a classificação morfológica e citoquímica das leucemias aguda baseada na morfologia das células do sangue periférico e em aspirado de medula óssea, associada ao uso de técnicas citoquímicas (BENNETT et al., 1976).

Inicialmente nove subtipos foram identificados: seis mielóides e três linfóides. As leucemias agudas mielóides foram inicialmente classificadas em M1 (sem maturação), M2 (com maturação), M3 (promielocítica), M4 (mielomonocítica), M5 (monocítica) e M6 (eritroleucemia) (BENNETT et al., 1976). Propostas de revisão dos critérios da classificação FAB foram publicados por BENNETT et al. (1985). Nesse mesmo ano, após a caracterização dos blastos por imunofenotipagem ou por microscopia ultraestrutural, foi incorporada ao grupo FAB o subtipo M7, a leucemia megacarioblástica aguda. Pouco depois, em 1991, também se utilizando de marcadores imunológicos em pacientes que não apresentavam critérios morfológicos e citoquímicos de LMA, foi caracterizado o subtipo M0 (BENNETT et al., 1991).

Quadro 1: Critério diagnóstico da FAB para LMA

M0	Blastos agranulares. MPO negativos ou < 3% positivos; marcadores mielóides CD33 e/ou CD13 positivos, marcadores de linhagem B e T negativos
M1	Células blásticas agranulares e granular > 90%. Pelo menos 3 % dos blastos são MPO +
M2	A porcentagem de mieloblastos varia de 30 a 90%. A maturação granulocítica de promielócitos a neutrófilos mais maduros é > 10%
M3 M3v	A maioria dos blastos são células anormais hipergranuladas (promielócitos) A maioria dos blastos são promielócitos anormais hipogranulados.
M4	Na medula, blastos > 30% e > 20% das células no sangue periférico são de linhagem monocítica, precursores monocíticos são > $5,0 \times 10^9/L$
M4Eo	M4 + eosinófilos anormais na medula óssea
M5	80% das células são precursores monocíticos: monoblastos, promonócitos ou monócitos
M5a	80% das células são monoblastos
M5b	< 80% das células monocíticas são monoblastos, o restante são células mais diferenciadas.
M6	O componente eritróide da medula excede 50% do total de células nucleadas, 30% das células não eritróides são mieloblastos.
M7	Pelo menos 30% dos blastos são megacarioblastos. Blastos de Linhagem megacariocítica são identificados por anticorpos monoclonais: eles expressão diferentes proteínas plaquetárias.

As leucemias linfóides agudas (LLA) são divididas segundo a classificação FAB em L1, L2 e L3 (BENNET et al., 1976) (tabela1). O tipo L1 é o mais comum, representando cerca de 80%; o tipo L2 corresponde a pouco menos de 20%; e o L3 a menos de 3%. No entanto, essa classificação atualmente carece de maior importância, devido à falta de correlação com os aspectos clínicos e com os achados imunofenotípicos e genéticos (BIONDI et al., 2000; TAKETANI et al., 2004). O tipo FAB L3 permanece como tipo de LLA com importância clínica. A maioria dos casos que apresentam a morfologia do tipo L3 corresponde ao linfoma de Burkitt, sempre da linhagem B e expressam cadeia de imunoglobulina em sua superfície na grande maioria dos casos (KHALIDI et al., 1999; ONCIU, 2009).

Quadro 2: Características morfológicas dos subtipos de LLA, segundo Bennet et al. (1976)

CATEGORIA FAB	LLA L1	LLA L2	LLA L3
Tamanho da célula	Predominantemente pequeno	Grande, heterogênea	Grande, homogênea
Cromatina nuclear	Razoavelmente homogênea	Heterogênea	Homogênea
Forma nuclear	Predominantemente regular	Irregular	Regular
Núcleo	Pequeno e pouco perceptível	Geralmente visível muitas vezes grande	Geralmente proeminente
Quantidade de citoplasma	Escassa	Variável, muitas vezes abundante	Moderadamente abundante
Basofilia citoplasmática	Leve a moderada	Variável	Forte
Vacuolização citoplasmática	Variável	Variável	Muitas vezes proeminentes

2.5. Classificação imunológica das leucemias agudas

Em 1995, o Grupo Europeu de Estudos (EGIL- European Group of Immunological Characterization of Leukemias) propõe a classificação imunológica das leucemias agudas. Essa classificação toma por base apenas critérios imunofenotípicos, a partir de sofisticados painéis de marcadores monoclonais. Além de trazer melhores parâmetros de classificação das leucemias agudas em mielóides, linfóide B e linfóide T, pormenoriza estas últimas em seus vários estágios de diferenciação (OLIVEIRA; POLI NETO, 2004).

2.5.1. LLA B

As LLA B são caracterizadas pela expressão de uma variedade de antígenos específicos, os quais freqüentemente incluem PAX-5 (Ativador específico de células B), CD19, CD20, CD22 (superfície e citoplasma), CD24 e CD79a (citoplasma) (ONCIU, 2009).

O primeiro sinal de comprometimento com a linhagem B é a expressão intracitoplasmática do CD79a, este estágio é caracterizado de Pro-B. Nesta fase, há também a expressão de marcadores de células imaturas na membrana, como CD34, HLA-DR e no núcleo do TdT. Em tais células, o CD22 também pode ser observado no citoplasma, mas não na superfície da célula, enquanto o CD19 já é detectável na membrana (ORFAO et al., 2004 ;

BENE, 2005). No próximo estágio, os genes da cadeia pesada de imunoglobulina começam a rearranjar-se nas células precursoras B, e neste estágio há a expressão na superfície do CD10 (ZEMPLIN et al., 2002; BENE, 2005). Em seguida a cadeia pesada μ de Ig é formada e acumula no citoplasma até a cadeia leve de Ig ser produzida, quando isto ocorre, moléculas de IgM são expressadas na superfície da célula (DWORZAK et al., 1998; RUDIN ; THOMPSON, 1998).

Baseado na seqüência de maturação e diferenciação dos antígenos das células B, as LLA B de células precursoras são classificadas em quatro grandes grupos, segundo a classificação proposta pelo grupo Europeu para Classificação Imunológica de leucemias Agudas (EGIL) (BENE et al., 1995) e OMS (BRUNNING et al., 2001) tabela 2.

Tabela 1: Classificação das LLAs B de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2001) e classificação EGIL (1995).

Classificação OMS/ EGIL	TdT	CD34	cCD79	cCD22	CD19	CD10	HLA-DR	cIg	Ig _s
Pró-B/ (BI)	+	+	+	+	+	-	+	-	-
B comum / (BII)	+	-/+	+	+	+	+	+	-	-
Pré-B / (BIII)	+	-/+	+	+	+	+	+	+	-
B madura / (BIV)	+	-	+	+	+	-/+	+	-/+	+

c-citoplasma s-superfície

O subtipo LLA pró - B (BI) é caracterizado pela falta de expressão do CD10, e embora os genes da cadeia pesada de imunoglobulina sejam freqüentemente rearranjados nessas células, as imunoglobulinas ainda não são detectáveis (CAMPANA; BEHM, 2000). Representa 5% dos casos pediátricos e é associado com alta incidência do rearranjo do gene MLL e um pior prognóstico (PUI et al. 1993a; PIETERS; CARROLL, 2010). A maioria dos estudos tanto em crianças quanto em adultos com LLA tem reportado um pior prognóstico para pacientes com fenótipo em que os blastos leucêmicos expressam um fenótipo imaturo pro-B CD10 negativo (CONSOLINI et al., 1998; LUDWIG et al., 1998; CZUCZMAN et al., 1999).

A LLA BII ou LLA comum é caracterizada pela expressão do CD10 e representa aproximadamente 60% dos casos de crianças com LLA, é considerada como bom prognóstico, com cerca de 85% das crianças alcançando um longo tempo de remissão (PUI et al., 1997). A fusão dos genes TEL/AML1 e a hiperdiploidia (índice de DNA > 1,6 ou mais de 50 cromossomos por células leucêmicas), que são associados a um melhor prognóstico, são

encontrados em 25% dos casos de LLA. Ocorrem principalmente em crianças com menos de dez anos de idade e com imunofenótipo LLA BII ou LLA comum, sendo rara acima desta idade e com outro fenótipo (PIETERS; CARROLL, 2010).

A LLA BIII (pré-B) representa aproximadamente 25% dos casos em crianças (PUI et al.,1993a), apresenta a expressão de todos os marcadores de linhagem B, além do CD10 e da cadeia pesada μ de Ig no citoplasma, que é a principal característica para se distinguir entre os subtipos de LLA B II e LLA BIII. Menos informações se têm a respeito desse subtipo, mas em alguns estudos é considerado como de pior prognóstico (BENE, 1999).

A LLA de células B maduras (LLA BIV) representam 2 a 4% das LLA pediátricas, são caracterizadas pela expressão de moléculas completas de Imunoglobulina na superfície da célula, ausência de marcadores de células imatura CD34 e TdT, o CD10 pode ou não ser expresso (CAMPANA; BEHM, 2000; DIGIUSEPPE, 2007). Em geral, a LLA de células B maduras, corresponde ao subtipo morfológico FAB LLA L₃ (BENNETT et al.,1976), e são definidas pela classificação WHO como linfoma/leucemia de Burkitt (JAFFE et al., 2001). Tem um prognóstico favorável somente quando tratados com protocolos de linfoma não Hodgkin-B (PIETERS; CARROLL, 2010).

2.5.2. LLA T

A primeira indicação de comprometimento com a linhagem T é caracterizada pela expressão intracitoplasmática do complexo CD3, este é o sinal do primeiro estágio da diferenciação de células T, pró-T (T-I), onde somente outro marcador é detectado na membrana, o CD7 (BÉNÉ, 2005). O estágio seguinte é caracterizado de pré-T (T-II) e expressa, além do citCD3 e do CD7, outros marcadores na superfície da célula como CD2, CD5 e/ou CD8 (ORFAO et al., 2004). Este é o último estágio em que a maturação das células T pode ser encontrada na medula óssea. As células T alcançam então, as células epiteliais do córtex do timo, onde adquirem a expressão transitória do CD1a, nesse estágio os genes TCR irão começar a se rearranjar (BENE, 2005), e ocorre a expressão simultânea do CD4 e CD8, esse estágio é caracterizado como T cortical (T-III). No próximo passo as células irão sofrer um processo seletivo, em que as futuras células T auxiliares selecionadas positivamente reconhecem seus antígenos específicos em associação com as moléculas de classe II do MHC, perdem a expressão de CD8 e, desta forma, amadurecem. De modo semelhante, as futuras células T citotóxicas selecionadas positivamente reconhecem antígenos em associação com as moléculas de classe I do MHC, perdem CD4 e transforma-se em T maduras. Este estágio é

caracterizado como fase madura – T (T-IV) e há a expressão de CD3 e dos receptores TCR- $\alpha\beta$ ou TCR- $\gamma\delta$ em membrana e ausência de CD1a (OLIVEIRA; POLI- NETO, 2004).

Resumidamente, baseadas na diferenciação tímica normal, as LLA T podem ser divididas em Pró-T (CD7+, CD3cit+), Pré-T (CD2+, CD5+ e/ou CD8+), T cortical (CD1a+/CD4+ e CD8+) e T madura (CD3memb+, CD4+ ou CD8+) (ORFAO et al., 2004).

A classificação EGIL também considera 4 subtipos de LLA T, como descrito na tabela 2 (BENE, 2005).

Tabela 2: Classificação das LLAs T segundo a classificação EGIL.

	CD7	CD3 _{cit}	CD2, CD5, CD8	CD1a	CD3 _s +/CD1a-
T-I	+	+	-	-	-
T-II	+	+	+	-	-
T-III	+	+	+	+	-
T-IV	+	+	+	-	+

Os subtipos de LLAT não são tão estudados como na LLAB, porém alguns estudos mostram que várias características imunofenotípicas parecem ser associadas com um aumento dos riscos de falha no tratamento, incluindo fenótipos imaturos da pro-LLA T e pre-LLA T, expressão de CD3 na membrana ou antígeno MHC de classe II, e negatividade para CD2, CD5, CD1a, ou CD10 (UCKUN et al., 1998; LUDWIG; HAFERLACH; SCHOCH, 2003). Pesquisas mostram que crianças com LLAT cortical (CD1a+) tem melhor resposta ao tratamento e maior duração de sobrevida livre de eventos do que crianças com LLA T de fenótipo imaturo ou maduro (LUDWIG et al., 1993; PULLEN et al., 1999).

2.5.3. LMA

A seqüência maturativa das células mielóides é mais simples e aparentemente menos associada com estágios transicionais (BENE, 2005). O CD117, CD13 e o CD33 são considerados os primeiros antígenos detectados durante a diferenciação de precursores hematopoiéticos na linhagem mielóide. Porém, quando considerados individualmente, nenhum desses marcadores é específico para células leucêmicas mielóide (ORFAO et al., 2004). A primeira molécula comprometida com a linhagem mielóide a aparecer em células progenitoras que expressam CD34 e HLADR é a enzima intracitoplasmática MPO. (BENE, 2005). O CD15, CD65, CD64 e o CD14, juntamente com os outros marcadores citados

anteriormente são co-expressos durante a maturação de células mielomonocíticas, sendo o CD14 e CD64 mais específico da linhagem monocítica e o CD15 e CD65 são considerados mais característicos de células neutrófilas (TERSTAPPEN et al., 1990; WELLS; LOKEN, 2000; BENE, 2005; ORFAO et al., 2003; WOOD, 2007). Dois outros tipos de células devem ser mencionados, apesar de raramente dar origem às leucemias, mas estão incorporados à LMA da classificação FAB. São os eritroblastos e megacarioblastos, essas células não expressam MPO, mas muito cedo adquirem antígenos de diferenciação específicos. O CD36 e alfa-glicoforina são os mais característicos dos eritroblastos. Os megacarioblastos expressam primeiro no citoplasma, e depois na superfície da célula, o CD41 e CD61 bem como membros da família CD42 (BENE, 2005).

A tabela 3 mostra a classificação imunológica das LMA segundo a classificação FAB, adaptada de Szczepanski, Van Der Velden e Van Dongen (2003), com os monoclonais mais utilizados no diagnóstico desta patologia.

Tabela 3: Classificação imunológica das LMA.

LMA	HLA-DR	CD34	CD117	CD13	CD33	CD15	MPO	CD14	CD41/CD61	Glicof A
M0	++	++	++	++	++	±	-	-	-	-
M1	++	++	++	++	++	±	+	-	-	-
M2	+	+	++	++	++	++	++	-	-	-
M3	-	±	+	++	++	±	++	-	-	-
M4	++	±	+	++	++	-	++	+	-	-
M5a/b	++	± / +	+	++	++	-	++	+/++	-	-
M6	+	+	+	+	+	-	+	-	-	++
M7	++	++	+	++	++	-	-	-	++	-

- : < 10% das leucemias são positivas; ± : 10-25% das leucemias são positivas; + : 25-75% das leucemias são positivas; ++ : > 75% das leucemias são positivas.

2.5.4. BAL

A maioria dos casos de leucemias agudas pode ser classificada como mielóide ou linfóide usando o critério FAB e um painel de marcadores imunológicos. Contudo até mesmo com morfologia, citoquímica e imunofenotipagem ainda é difícil diferenciar, em alguns pacientes, a linhagem da célula, se mielóide ou linfóide. Esses casos são classificados como leucemias agudas de linhagem ambígua de acordo com a classificação WHO de neoplasias

hematológicas (JAFFE et al., 2001), incluindo leucemia aguda indiferenciada, leucemia aguda bilineal e leucemia aguda bifenotípica, que acometem cerca de 5% do total de todas as LA. Por definição, na leucemia aguda bifenotípica há uma única linhagem de célula leucêmica que expressa tanto marcadores linfóides quanto mielóides, já na leucemia aguda bilineal existem dois ou mais subtipos de células expressando marcadores linfóides ou mielóides. Na prática clínica essas leucemias não são diferenciadas, sendo classificadas juntas com as BAL (XU et al., 2009). São doenças de péssimo prognóstico tanto em crianças como em adultos, não existindo, ainda, um protocolo consensual de tratamento entre os vários autores. A grande concordância entre eles é que deva ser feita uma quimioterapia bastante agressiva, para um possível transplante de medula óssea após a primeira remissão (OLIVEIRA; POLI-NETO, 2004).

A classificação mais comumente usada para o diagnóstico da leucemia bifenotípica é a classificação EGIL apresentada na tabela 4. Na classificação, os antígenos são categorizados de acordo com sua especificidade para uma dada linhagem e à sua expressão são atribuídos pontos. Casos de leucemias agudas, cujo imunofenótipo some pontuação superior a dois pontos para linhagem mielóide e a um ponto para linhagem linfóide são enquadrados como bifenotípica (BENE et al., 1995).

Tabela 4: Sistema de score da Classificação EGIL para definição de leucemia aguda bifenotípica (EGIL 1998).

PONTOS	Linhagem B	Linhagem T	Linhagem Mielóide
2	citCD79a	CD3(cit/memb)	MPO
	citIgM	TCR- $\alpha\beta$	
	citCD22	TCR- $\gamma\delta$	
1	CD19	CD2	CD117
	CD10	CD5	CD13
	CD20	CD8	CD33
		CD10	CD65s
0,5	TdT	TdT	CD14
	CD24	CD7	CD15
		CD1a	CD64

2.5.5. Expressão anômala

Fenótipos aberrantes (expressão anômala) é um fenômeno bem conhecido em que marcadores associados à linhagem linfóide e marcadores associados à linhagem mielóide são co-expressos em mieloblastos e linfoblastos, respectivamente. A ocorrência de fenótipo aberrante tem sido reportada em ambos, LLA e LMA com variada frequência, contudo, seu valor prognóstico é controverso entre vários estudos (BHUSHAN et al., 2010).

Na LMA fenótipos aberrantes têm sido reportados em mais de 48% dos casos (MACEDO et al.,1995; KHALIDI, et al.,1998). Os antígenos linfóides mais frequentes na LMA incluem o CD7, CD19, CD2, CD5 e CD56 (KHALIDI, et al.,1998; WOOD, 2007). A incidência da expressão de antígenos de linhagem-cruzada (expressão anômala) na LLA é de 45%, sobretudo devido à co-expressão de CD13 ou CD33 (RILEY et al.,2002).

Os mecanismos pelos quais ocorrem a expressão de fenótipos aberrantes no desenvolvimento das leucemias agudas ainda permanecem obscuros, no entanto, já é possível estabelecer associações entre estas expressões incomuns e outras características biológicas da doença, como as associações com translocações cromossômicas e fatores prognósticos. Além disso, os imunofenótipos aberrantes são sabidamente instrumentos de grande importância na detecção de doença residual mínima (DRM) (EMERENCIANO et al., 2004).

2.6. Fatores Prognósticos

Diversas variáveis clínicas e laboratoriais têm 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 (MELLO, 2007). A intensidade do regime terapêutico utilizado é ajustada de acordo com fatores prognósticos associados ao risco de falha de tratamento (STANULLA; SCHRAUDER, 2009).

Dentre fatores prognósticos internacionalmente aceitos e com reprodutibilidade pode-se citar: idade, contagem inicial de leucócitos, presença de doença extramedular ao diagnóstico e avaliação da resposta precoce ao tratamento, avaliada ao final da fase de indução (SCHULTZ et al., 2007; BOROWITZ et al., 2008).

A idade ao diagnóstico têm se mostrado com forte valor prognóstico em diversos estudos, crianças com LLA e idade entre um e nove anos tem melhores resultados do que

crianças menores que um ano e maiores que 10 anos (PUI; EVANS, 1998; HILDEN et al., 2006; PIETERS et al., 2007).

A contagem de leucócitos é uma variável prognóstica continua em que o seu elevado número confere um pior prognóstico, especialmente em pacientes com LLA B (PUI; EVANS, 1998). Dois terços dos pacientes com idade entre 1-9 anos com contagem de leucócitos menor que 50.000 são considerados como de baixo risco para recaída, e, portanto são tratados com regime quimioterápico menos intensivo (PUI; ROBISON; LOOK, 2008).

Na LLA T, contagem de leucócitos acima de 100.000 é associada com um aumento de risco de recaídas com envolvimento do sistema nervoso central (PUI, 2006). Pacientes com LLAT são tratados com uma quimioterapia mais intensiva independente da idade e contagem de leucócito (JEHA; PUI, 2009).

A avaliação citomorfológica da redução de células leucêmicas no sangue periférico ou medula óssea é definida como padrão ouro para avaliação da resposta ao tratamento. A avaliação morfológica da medula óssea após a primeira fase de tratamento (fase de indução) é considerada um importante fator prognóstico. Após a fase de indução quando a medula apresenta, na avaliação morfológica, menos de 5% de blastos caracteriza a doença como de bom prognóstico (STANULLA; SCHRAUDER, 2009; BOROWITZ et al., 2008).

3.0. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- ✓ Determinar o perfil imunofenotípico das leucemias agudas dos pacientes atendidos no centro oncológico de referencia Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís- Maranhão, Brasil.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Conhecer a distribuição dos subtipos imunológicos das LLA e dos subtipos FAB da LMA em diferentes faixas etárias.
- ✓ Avaliar a expressão dos marcadores que foram utilizados no diagnóstico das leucemias agudas.
- ✓ Estudar a expressão de fenótipos aberrantes nas leucemias agudas e sua relação com fatores prognósticos em crianças com LLA.
- ✓ Avaliar a relação da expressão do marcador CD34 com fatores prognósticos em crianças com LLA.

4.0. PACIENTES E MÉTODOS

4.1. Pacientes

A presente pesquisa é um estudo com amostra de conveniência. Foram incluídos 70 pacientes, sendo estes adultos (≥ 18 anos) e crianças (< 18 anos), diagnosticados com leucemia aguda “*de novo*” no período de setembro de 2008 a janeiro de 2010 tratados no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB), São Luís, MA. Foram excluídos os pacientes que se recusaram ou que os responsáveis não permitiram a entrada no estudo ($n=1$) e os casos de crise blástica de leucemia mielóide crônica ($n=2$). Os pacientes foram divididos em adultos (maiores de 18 anos) e crianças (menores de 18 anos)

4.2. Avaliação Clínica

Foram coletados os seguintes dados dos pacientes: sexo, idade, e a ocorrência de óbitos antes do final da fase de indução de crianças com LLA. Para avaliação da resposta ao tratamento de pacientes menores de 18 anos com LLA 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 ($n=10$) foram considerados como pacientes que não entraram em remissão.

4.3. Diagnóstico das leucemias agudas

Foram feitos com base no hemograma, mielograma, provas citoquímicas e imunofenotipagem por citometria de fluxo, do sangue periférico e medula óssea de pacientes encaminhados ao IMOAB, para diagnóstico diferencial de leucemias agudas. Os critérios utilizados foram de acordo com os conceitos morfo-citoquímicos FAB (BENNETT et al., 1976, 1985, 1991) e imunofenotípicos da classificação EGIL (BENE et al., 1995).

4.3.1. Coletas

Foram colhidas amostras de medula óssea dos pacientes através da punção da crista ilíaca em tubos Vacutainer de 4 mL (Vacurette) contendo EDTA. As amostras de sangue

total foram colhidas, através de venopunção em tubos Vacutainer de 4 mL (Vacuette) contendo EDTA para imunofenotipagem. As amostras foram manipuladas em até 24h após a coleta.

4.3.2. Hemogramas

Os hemogramas foram realizados de forma automatizados em aparelho ADVIA-120 Hematology System (BAYER, 1998) para análise das dosagens de hemoglobina, contagem de leucócitos e plaquetas. Foi feito a análise morfológica, por microscopia, dos esfregaços corados com o meio May-Grünwald-Giemsa para contagem diferencial de leucócitos e determinação da porcentagem de blasto em sangue periférico.

4.3.3. Mielograma

Foram realizados através da contagem diferencial de 250 células no esfregaço da medula óssea, corado com o meio May-Grünwald-Giemsa. A análise foi feita por dois hematologistas. Cada caso foi classificado de acordo com as recomendações do grupo FAB.

4.3.4. Citoquímica

Utilizou-se como prova citoquímica a peroxidase (MPO), a α -naftil acetato esterase (ANAE) (Sigma –Aldrich, Kit 91A) e o ácido periódico de Schiff (PAS) (Sigma –Aldrich, Kit 3958B). A MPO foi feita de acordo com técnica descrita por Graham e Knoll (1973), a ANAE e o PAS foram feitos de acordo com o recomendado pelo fabricante.

Para MPO a positividade foi definida quando 3% ou mais dos blastos apresentaram grânulos de coloração positiva.

Na esterase inespecífica a positividade em mais de 20% dos blastos define o tipo FAB M4 ou M5.

Para o PAS a reação positiva apresenta um anel concêntrico de grânulos grosseiros ou “blocos” contra um fundo citoplasmático negativo, considerou-se que este padrão é mais importante do que a porcentagem de células positivas (POMBO-DE-OLIVEIRA, 2008).

4.3.5. Pannel de monoclonais para imunofenotipagem

Para o diagnóstico imunofenotípico das leucemias agudas utilizou-se anticorpos monoclonais (AcMo) marcados com dois ou três fluorocromos por tubo: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e proteína piridina de clorofila (PerCP).

Utilizou-se anticorpos monoclonais (Becton Dickinson, San José CA, USA) contra antígenos T (CD1a, CD2, citCD3, CD4, CD5, CD7 e CD8), antígenos B (CD10, CD19, citCD22, citCD79a e IgM (citoplasma e membrana), antígenos de diferenciação mielóide (CD13, CD33, CD117 e MPO), monocítica (CD14 e CD64), eritróide (alfa-glicoforina), plaquetária (CD61 e CD41a), antígeno de linhagem não específica (CD45) e antígenos de células precursoras (CD34, HLA-DR).

O painel de triagem foi feito com a seguinte combinação de marcadores CD19 FITC/ CD34 PE/ CD45 PerCP, CD7 FITC/ CD13 PE/ CD45 PerCP, HLA-DR FITC/ CD10 PE, CD2 FITC/ CD33 PE, citMPO FITC/ citCD79a PE/ citCD3 PerCP. A escolha desses anticorpos foi feita com o objetivo de fazer uma triagem das linhagens e estudar os fenótipos aberrantes (expressões anômalas) mais comuns. Conforme a linhagem apontada pelo painel de triagem, três painéis secundários foram propostos. Para LLA B fez-se a complementação do painel utilizando os monoclonais CD22 e IgM, para LLA T utilizou-se os marcadores CD1a, CD4, CD5, CD8; e para LMA utilizou-se CD117, CD61, CD41a, alfa-glicoforina, CD14 e CD64.

4.3.6. Preparação das amostras para imunofenotipagem

O número de leucócitos de MO ou SP foram quantificadas no contador hematológico CC-530 CELM. Em seguida as amostras de medula óssea ou sangue periférico foram diluídas em tampão fosfato (PBS) 1x (pH = 7,4) para concentração de 1×10^6 leucócitos/100µL. Para as marcações de membrana e intra-citoplasmática utilizou-se 1×10^6 leucócitos em cada tubo.

Para a marcação de membrana, 100µL das amostras diluídas foram incubadas com 5 µL de cada anticorpo por 20 minutos, no escuro e a temperatura ambiente (TA). Em seguida adicionou-se 2 mL da solução de lise FacsLysing da BD diluída 1:10 em água Milli-Q e incubou-se por 10 minutos a TA. As células foram centrifugadas a 3000 RPM por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 2 mL de tampão fosfato (PBS) 1x (pH =

7,4), então foram centrifugadas novamente e os pellets ressuspensos em 500µL de paraformaldeído a 1% em PBS (Modificado de ZHENG et al.,2008).

Para a marcação intracitoplasmática foram usados 100 µL das amostras diluídas em cada tubo. Adicionou-se 2 mL da solução de lise FacsLysing da BD diluída 1:10 em água Milli-Q e incubou-se por 10 minutos a TA. As células foram centrifugadas a 3000 RPM por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado. As células foram fixadas com 2mL de paraformaldeído 4% por 3 minutos, então foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Em seguida permeabilizou-se com 500 µL da solução FacsPermeabilizing da BD diluída (1:10) e então as células foram incubadas com 5µL de cada anticorpo por 20 minutos a TA. e depois foram lavadas 1 vez com PBS 1x e ressuspensas em 500µL de paraformaldeído 1% em PBS. Estando prontas para leitura no citômetro de fluxo (Modificado de ZHENG et al.,2008).

4.3.7. Aquisição e análise das amostras por citometria de fluxo

A aquisição e análise das amostras foram feitas no citômetro de fluxo FacsCalibur™ da Becton Dickinson – San Jose – Califórnia – USA, usando o programa CellQuest™ (BD), após calibração do citômetro com o kit Calibrite beads (BD), através do programa FacsComp™ (BD).

Utilizou-se o *plot* CD45 x Complexidade (SSC) (Fig. 1) para delimitar a área específica dos blastos, este *plot* discrimina as células blásticas leucêmicas das células precursoras normais, os blastos localizam-se na região de baixa complexidade e fraca intensidade de expressão do CD45, os linfócitos apresentam intensidade forte do CD45, precursores eritróides são essencialmente negativos para o CD45, precursores neutrofílicos e eosinófilos tem maior complexidade interna, e monócitos maior complexidade interna e intensidade forte do CD45 (LACOMBE et al., 1997; CRAIG; FOON, 2008).

Usando o *dot plot* CD45 x SSC (Figura1) os blastos foram identificados e então selecionados através de uma janela eletrônica (“gate”).

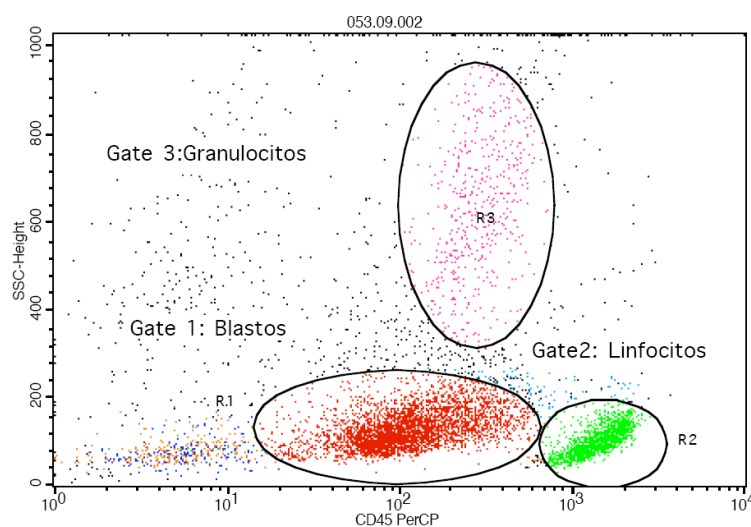


Figura 1: Dot plot CD45 x SSC com gate (R1) nos blastos, representado pela população de células em vermelho.

Em seguida, foi utilizada a estratégia de *back gate*, para identificar a população de blastos no gráfico de tamanho *versus* granulosidade (FSC X SSC) (Figura 2), que serviu de base para analisar todos os outros painéis (BAER et al., 2001). Os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas. O limiar para positividade foi baseado no controle negativo da amostra (Figura 3), sendo os marcadores considerados positivos quando expressados em mais de 20% das células do gate (Figura 4) (BENE et al., 1995). Para o marcador CD34, além da porcentagem de células positivas, avaliou-se a intensidade média de fluorescência (IMF) das células blásticas identificadas no dot plot CD45 X SSC (Figura 5).

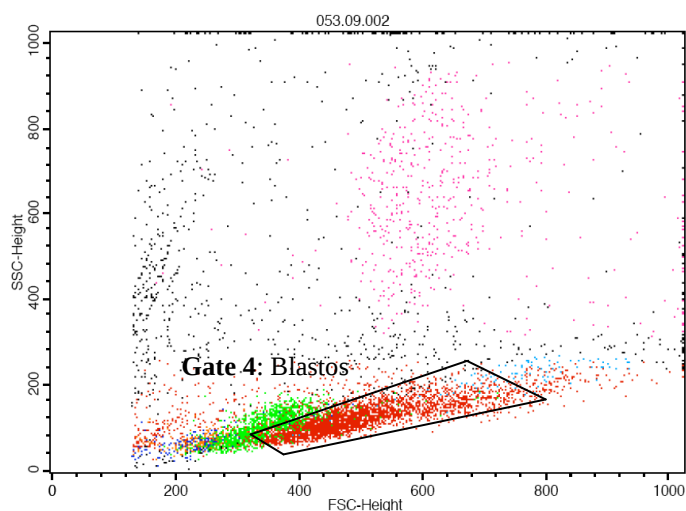


Figura 2: Gate 4 mostra a localização da população de blastos, representada em vermelho, no dot plot FSC X SSC.

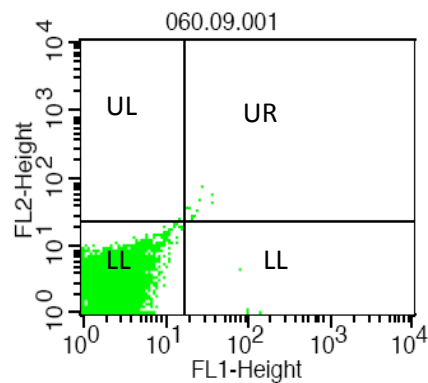


Figura 3: Dot plot do tubo controle negativo da amostra (sem anticorpos monoclonais), com a delimitação dos quadrantes considerados positivos (UL,UR e LL).

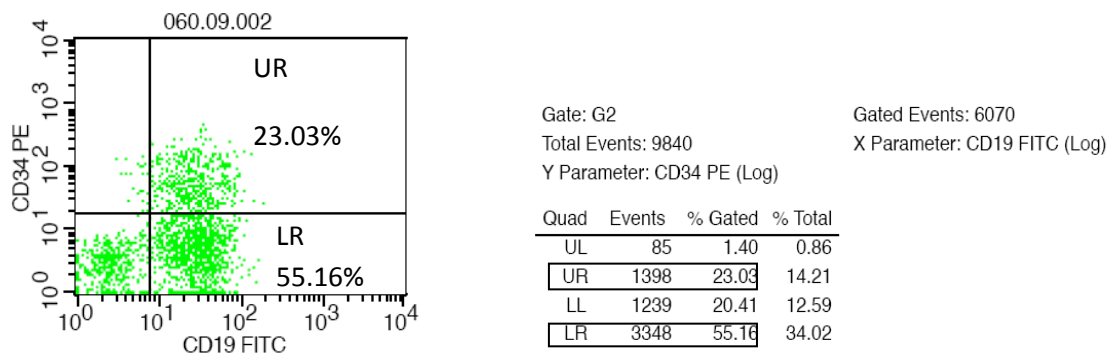
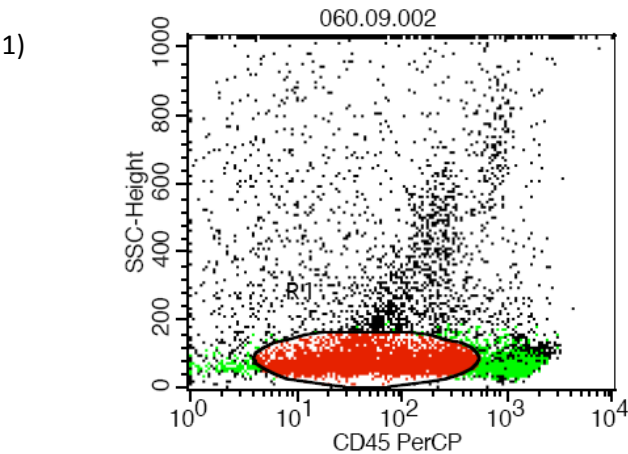


Figura 4: Dot plot com células positivas para o CD19 FITC (23.03% + 55.16% = 78.19%) e CD34 PE (23.03%). Apenas 23.03% das células, que estão no quadrante UR são positivas tanto para o CD34 quanto para o CD19.



2)

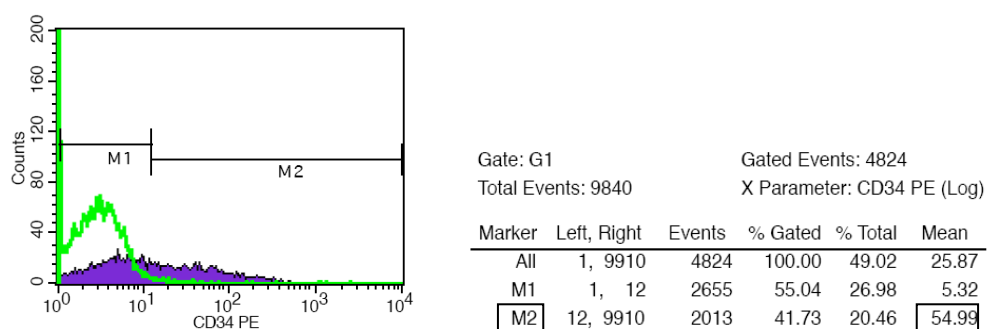


Figura 5: Modelo de análise da IMF do CD34. 1) *Dot plot* CD45 X SSC com população de blastos identificadas pelo *gate* 1. 2) Histogramas da expressão do CD34 (em roxo) e com overlay (em verde) do tubo controle. Os valores da IMF de cada marcador estão mostrados em M2 (*mean*).

Realizou-se a compensação dos fluorocromos através de linfócitos marcados com CD4 FITC/ CD8 PE/ CD3 PerCP, eliminando as sobreposições antes da aquisição dos dados (VELA et al., 2000). Foram adquiridos 10.000 eventos no “gate” de interesse em todos os casos.

4.4. Tratamento realizado

Crianças com LLA foram tratados com base no protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Infantis, GBTLI/99 (CAZÉ; BUENO; SATOS, 2010). Pacientes com LLA B foram tratados na fase de indução com: Dexametasona ($6\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$), 3 doses diárias durante 4 semanas; Vincristina ($1,5\text{ mg}/\text{m}^2/\text{sem}$) e Daunorrubicina ($25\text{ mg}/\text{m}^2/\text{semana}$) nos dias 0,7,14 e 21; L-asparaginase ($5000\text{ UI}/\text{m}^2/\text{dia}$), 9 doses iniciando entre os dia 3 a 5 e administradas 3 vezes por semana; e MADIT (combinação de metotrexato, citarabina e dexametasona administrada intratecalmente), com doses ajustadas de acordo com a idade do paciente, foram administradas nos dia 0, 14 e 28. Pacientes com LLA T foram tratados com as mesmas drogas descritas anteriormente, mas com as seguintes modificações: Daunorrubicina ($35\text{ mg}/\text{m}^2/\text{dose}$) nos dias 0, 28 e 42 e Metotrexato ($1\text{ g}/\text{m}^2/\text{dose}$) nos dias 7 e 21.

4.5. Análise estatística dos dados

Os dados foram coletados e digitados na planilha eletrônica Microsoft Excel e posteriormente, conferidos e transferidos para o software de estatística STATA versão, 9.0. Foi feita a análise exploratória e descritiva inicial dos dados, estimando-se medianas para as variáveis quantitativas e frequências absolutas e relativas para as qualitativas. Utilizou-se o teste de Shapiro Wilk para testar a normalidade da distribuição das variáveis quantitativas. As variáveis estudadas apresentaram distribuição assimétrica, assim, utilizaram-se testes não-paramétricos.

A correlação da expressão do CD34 com parâmetros hematológicos (leucócitos, hemoglobina, plaquetas, blastos) e resposta após a fase de indução foi realizada pelo teste de correlação de Spearman.

A comparação de parâmetros hematológicos entre o grupo de pacientes CD34 positivo e CD34 negativo, assim como os pacientes com e sem expressão anômala, foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para a avaliação da distribuição da variável nominal, resposta a indução, entre as categorias das co-variáveis; e para avaliação da frequência da expressão anômala entre LLAB e LLAT bem como entre LLA e LMA foram aplicados os testes Exato de Fisher e Qui-Quadrado.

Para todos os testes foi considerado o nível mínimo de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.6. Aspectos éticos

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, parecer consubstanciado número 115/2008, em anexos, e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido, em apêndice.

5.0. RESULTADOS

5.1. Caracterização da amostra

Foram estudados 70 pacientes diagnosticados com leucemia aguda dos quais, 22 (31,4%) eram adultos e 48 (68,6%) eram crianças (tabela 5). Nas crianças, 77,1% (37/48) dos casos foram diagnosticados como LLA, 18,7% (9/48) como LMA e 4,2% (2/48) como BAL. Nos adultos, 77,3% (17/22) foram diagnosticados como LMA e 22,7% (5/22) como LLA (tabela 5).

Tabela 5: Frequência dos tipos de leucemias agudas em adultos e crianças atendidos no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA, no período de setembro de 2008 a janeiro de 2010.

Tipos de Leucemias Agudas	Total casos <i>n</i> =70	Crianças <i>n</i> =48 (68,6%)	Adultos <i>n</i> =22 (31,4%)
Leucemia Linfóide Aguda (LLA)	42 (60%)	37 (77,1%)	5 (22,8%)
Leucemia Mielóide Aguda (LMA)	26 (37,1%)	9 (18,7%)	17 (77,3%)
Leucemia Bifenotípica Aguda (BAL)	2 (2,9%)	2 (4,2%)	-

5.2. LLA

Do total de pacientes estudados, quarenta e dois casos foram diagnosticados como LLA (42/70; 60,0%), sendo a maioria dos casos 88,1% (37/42) em crianças. Trinta e um casos foram classificados como LLA B (31/42; 73,8%) e onze casos como LLAT (11/42; 26,2%) (tabela 6). A LLA B representou 73% (27/37) dos casos de LLA, em crianças, e a LLA T 27% (10/37) dos casos (tabela 6).

Entre as LLA B, o subtipo imunológico LLA BII (B comum, pré-pré-B) foi o mais frequente 51,6% (16/31), seguido pelo subtipo LLA BIII (pré-B) 29% (9/31). Foram diagnosticados ainda 3 casos (9,7%) de LLA BI (pro-B) e 2 casos (6,5%) de LLA BIV (B madura). Apenas um caso não foi possível realizar a complementação do painel e determinar a fase maturativa das células leucêmicas devido à escassez da amostra enviada para o nosso laboratório (tabela 6).

Tabela 6: Distribuição dos subtipos de LLA e sexo de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Subtipos imunológicos de LLA	SEXO M/F	Total de casos	Crianças	Adultos
LLA B	23/8	31 (73,8%)	27 (73%)	4 (80%)
LLA BI*	3/0	3 (9,7%)	3 (11,2%)	-
LLA BII*	10/6	16 (51,6%)	14(51,8%)	2(50%)
LLA BIII*	7/2	9 (29%)	8 (29,6%)	1(25%)
LLA BIV*	2/0	2(6,5%)	2 (7,4%)	-
LLA B**	1/0	1 (3,2%)	-	1(25%)
LLAT	8/3	11 (26,2%)	10 (27%)	1 (20%)
LLA Total	31/11	42 (100%)	37(100%)	5 (100%)

* o valor se refere à porcentagem de cada subtipo, calculado com base no total de número de casos de LLA B de cada faixa etária.

** um caso não pôde ser sub-classificado de acordo com a fase maturativa pela escassez do material avaliado.

A mediana da idade de crianças com LLAB foi de 4 anos (variação de 1-16 anos) e na LLA T a mediana foi de 8 anos (variação de 2-17 anos). O pico de incidência da LLA foi entre a idade de um e quatro anos, representando 40,5% (22/37) dos casos de LLA diagnosticados em crianças (Figura 6). Nos adultos a mediana de idade da LLA foi 24 anos (variação de 19-56 anos).

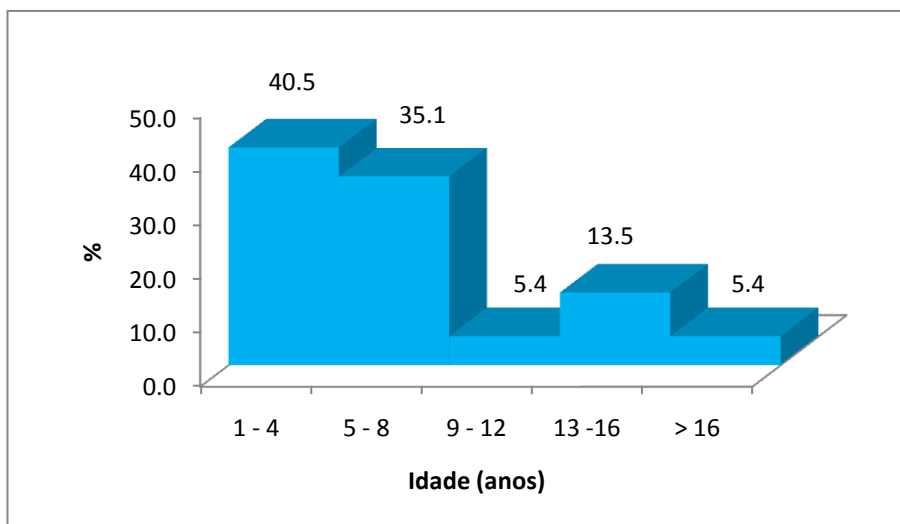


Figura 6: Distribuição dos casos de leucemia linfóide aguda quanto a idade, de crianças atendidas no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

A proporção dos casos do sexo masculino para o feminino em crianças com LLA foi de 3,1:1,0. Para as LLAB e LLAT, isoladamente, a proporção foi de 3,5:1,0 e 2,3:1,0, respectivamente.

A tabela 7 mostra as características hematológicas dos subtipos de LLA ao diagnóstico. Observa-se que a LLAT apresentou leucometria mais elevada com mediana acima de $50 \times 10^3/\mu\text{L}$. Em relação à dosagem de hemoglobina, a LLA BI foi que apresentou menor mediana (6,4 g/dl). Todos os subtipos apresentaram plaquetopenia, com mediana menor que $50 \times 10^3/\mu\text{L}$.

Tabela 7: Parâmetros hematológicos do hemograma, ao diagnóstico, dos subtipos de leucemia linfóide aguda de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Parâmetros Hematológicos	Subtipos de LLA				
	LLA BI	LLA BII	LLA BIII	LLA BIV	LLA T
Leucócitos x 10³/μL	23,2 (2,35-102)	19,5 (1,44-157)	3,1 (1,13-135)	4,6 (2,3-6,9)	81,0 (9,1-591)
Hemoglobina g/dl	6,4 (6,0-6,6)	8,3 (3,4-12,9)	8,8 (7,0-10,9)	11 (9,3-12,7)	9,4 (6,5-12,5)
Plaquetas x 10³/μL	12,0 (12-13)	18,0 (6,0-111)	45,0 (22-160)	33,5 (29-38,1)	39,0 (14-157)
% de blastos	70,0 (46-96)	65 (0-97)	21,0 (0-99)	5 (4-6)	88 (4-98)

Valores em mediana (variação)

5.2.1. Perfil Imunofenotípico das LLA B

Na tabela 8 observa-se o perfil da expressão, em porcentagem, dos marcadores para as LLA B.

Tabela 8: Perfil da expressão dos marcadores nas LLA B, de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Marcador	Total de casos analisados	Casos negativos	Casos positivos	Mediana (min-max)	*Taxa de positividade
CD45	31	4	27	69,0 %(22-98)	87%
CD34	31	12	19	69,0% (20-97)	61,2%
HLA-DR	23	1	22	77,5%(40-97)	95,6%
CD10	30	5	25	70,0%(25-96)	83,3%
CD19	30	4	26	68,0 %(20-96)	86,6%
citCD22	23	0	23	83,0%(22-99)	100%
citCD79a	24	0	24	77,0% (25-94)	100%
citIgM	30	20	9	73,0%(51-92)	30%
CD 13	29	15	14	64,5% (22-93)	48,2%
CD33	30	27	3	35,0% (32-53)	10%

*Taxa de positividade: número de pacientes positivos/numero testado.

Dentre os marcadores utilizados na caracterização da LLA B (tabela 8), o CD79a e CD22, em citoplasma, apresentaram maior taxa de positividade (100%), seguido pelo CD19 (86,6%). O CD10 e o marcador de células imaturas HLA-DR apresentaram taxa de positividade de 83,3% e 95%, respectivamente. A expressão da IgM em citoplasma (citIgM) teve uma taxa de positividade de 30%, sendo positiva em nove casos, os quais foram classificadas como LLA BIII. O marcador de células imaturas CD34 foi expresso em 61,2% dos casos e o CD45 em 87%.

Houve expressão anômala em 48,4% dos casos de LLA B diagnosticados (tabela 10), sendo que o CD13 foi o marcador expresso com maior frequência (48,2%) 14/29. O CD33 foi expresso em apenas 10% (3/30) dos casos, sendo que dois casos dos três que apresentaram a expressão anômala do CD33 também apresentaram a expressão do CD13

A figura 7 mostra um exemplo de LLA B.

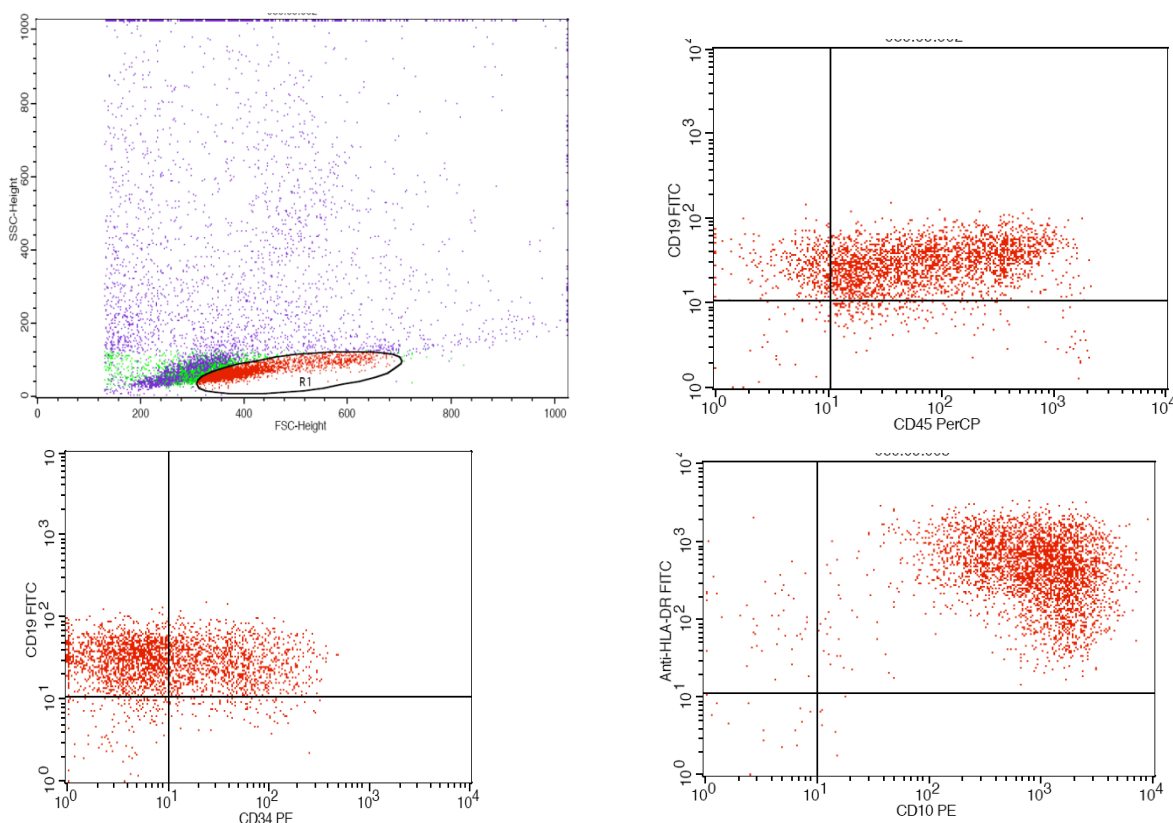


Figura 7: LLA B, com CD45, HLA-DR, CD19, CD10 positivos e expressão variável do CD34.

5.2.2. Perfil Imunofenotípico das LLA T

Na tabela 9 observa-se o perfil da expressão, em porcentagem, dos marcadores para as LLA T.

Tabela 9: Perfil da expressão dos marcadores nas LLA T de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Marcador	Total de casos analisados	Casos negativos	Casos positivos	Mediana (min-max)	*Taxa de positividade
CD45	11	0	11	87,0% (47-97)	100%
CD34	11	5	6	53,0% (22-88)	54,5%
HLA-DR	10	9	1	96,0%	10%
CD10	11	10	1	35,0%	9,1%
CD1a	7	3	4	36,0% (24-53)	57,1%
CD2	7	1	6	77,5% (37-96)	85,7%
citCD3	11	0	11	72,0% (34-98)	100%
CD4	10	6	4	63,5% (61-81)	40%
CD5	6	0	6	84,5% (65-97)	100%
CD8	10	0	10	55,0% (21-85)	100%
CD7	9	0	9	82,0% (53-98)	100%
CD 13	11	7	4	71,0% (43-79)	36,3%
CD33	11	9	2	61,0%(56-66)	18,2%

*Taxa de positividade: número de pacientes positivos/numero testado.

Na caracterização imunofenotípica das LLA T, os marcadores citCD3, CD5, CD7 e CD8 apresentaram taxa de positividade de 100%. O marcador CD2, CD1a e, CD4 apresentaram taxa de positividade de 85,7%, 57,1%, 40%, respectivamente.

O HLA-DR e CD10 apresentaram-se com a menor taxa de positividade (10%) e (9,1%) respectivamente, com apenas um caso positivo, para as LLAs T.

O CD34 foi expresso em 54,5% dos casos e o CD45 em todos os casos. Houve expressão anômala em 36,4% dos casos de LLA T diagnosticados (tabela 10). O CD13 foi o marcador mielóide mais freqüente (36,3%). O CD33 foi expresso em apenas 18% (2/11) dos casos, sendo que os dois casos que apresentaram a expressão anômala do CD33 também apresentaram a expressão do CD13 (tabela 9).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre LLAB e LLAT em relação à freqüência da expressão anômala ($p=0,726$) (tabela 10).

Tabela 10: Frequência da expressão anômala na LLAB e LLAT de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Subtipo de LLA	Expressão anômala		Total
	Ausente	Presente	
LLAB	16 (51,6%)	15 (48,4%)	31
LLAT	7 (63,6%)	4 (36,4%)	11
Total	23	19	42

Aplicou-se o teste Exato de Fisher; p = 0,726

A figura 8 mostra um exemplo de LLA T com expressão anômala do CD13.

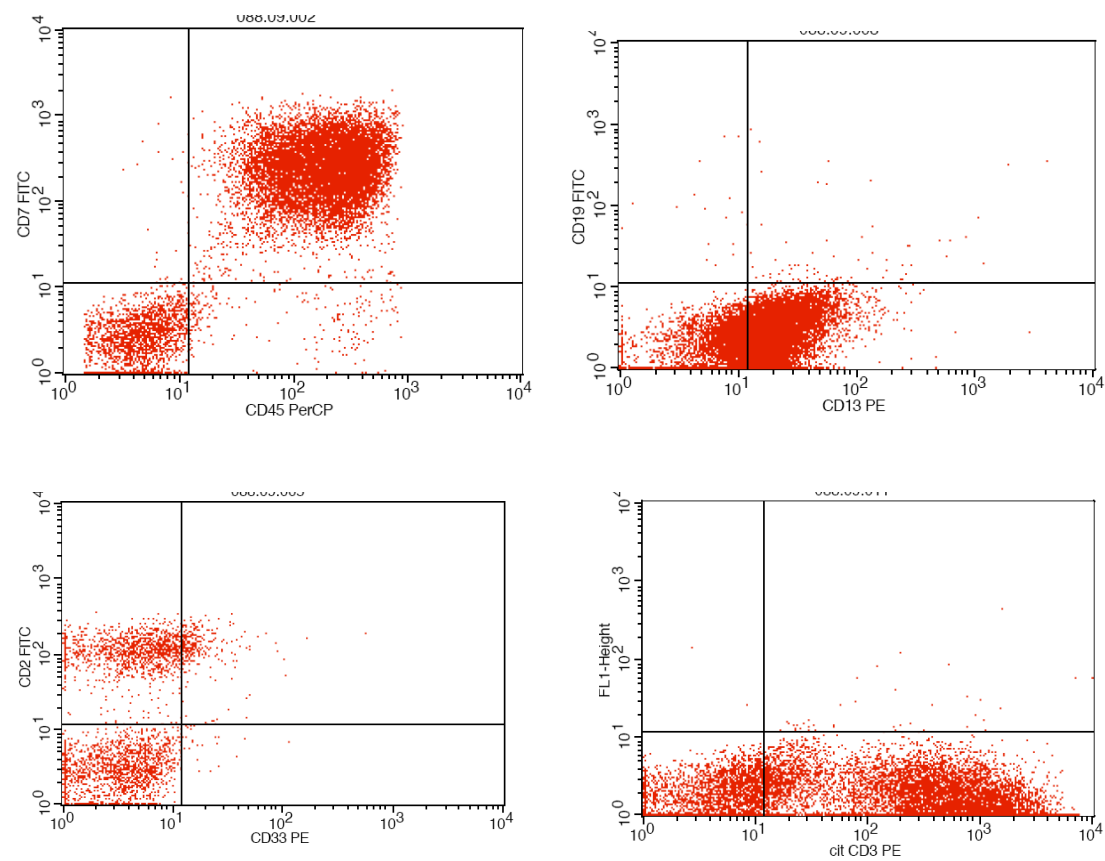


Figura 8: LLA T, com CD45, CD7, CD13, CD2 e citCD3 positivos, com expressão variável do CD34 e negativa para CD19 e CD33

5.3. LMA

Vinte seis casos do total de leucemias agudas (26/70; 37,1%) foram classificados como LMA, sendo 17 casos em adultos (17/26; 65,4%) e 9 casos em crianças (9/26; 34,6%). Pela morfologia, citoquímica e imunofenotipagem tivemos 6 casos (23,1%) de LMA M0, 4 casos (15,4%) de LMA M1, 5 casos (19,2%) de LMA M2, 5 casos (19,2%) de LMA M4, 5 casos (19,2%) de leucemia promielocítica (LMA M3); e um caso (3,9%) de leucemia eritróide (LMA M6) (tabela 11). O subtipo LMA M4 (3/9; 33,4%) seguido do subtipo LMA M1(2/9; 22,2%) foram os mais freqüente em crianças. Nos adultos, o subtipo predominante foi o LMA M0 (5/17; 29,4%), seguido dos subtipos LMA M2 (4/17; 23,5%) e LMA M3 (4/17; 23,5%) (tabela 11).

Tabela 11: Frequência quanto aos subtipos FAB e sexos dos pacientes com LMA do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Subtipos FAB de LMA	SEXO M/F	Total de casos	Crianças	Adultos
LMA M0	5/1	6 (23,1%)	1 (11,1%)	5 (29,4%)
LMA M1	0/4	4 (15,4%)	2 (22,2%)	2 (11,8%)
LMA M2	3/2	5 (19,2%)	1(11,1%)	4 (23,5%)
LMA M3	1/4	5 (19,2%)	1 (11,1%)	4 (23,5%)
LMA M4	5/0	5 (19,2%)	3 (33,4%)	2 (11,8%)
LMA M6	1/0	1(3,9%)	1 (11,1%)	-
Total	15/11	26 (100%)	9 (100%)	17(100%)

Os adultos apresentaram mediana de idade de 35 anos (variação 19 - 67 anos) e as crianças, mediana de idade de 8 anos (variação 1 - 15 anos). A proporção do sexo masculino para o feminino nas LMA foi de 1,3 : 1.

A tabela 12 mostra as características hematológicas dos subtipos de LMA ao diagnóstico. Observa-se que a LMA M1 apresentou contagem de leucócito mais elevada com mediana de $50,5 \times 10^3/\mu\text{L}$. Em relação à dosagem de hemoglobina os subtipos de leucemias apresentaram medianas com valores muito próximos, variando de 7,1 g/dL (LMA M0) a 8,5 g/dL (LMA M1). Todos os subtipos apresentaram plaquetopenia.

Tabela 12: Parâmetros hematológicos do hemograma, ao diagnóstico, dos subtipos de LMA de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Parâmetros Hematológicos	Subtipos de LMA				
	M0	M1	M2	M3	M4
Leucócitos x 10³/μL	6,4 (1,2-189,0)	50,5 (3,1-266,0)	3,2 (2,2- 8,3)	14,4 (2,1-55,9)	24,2 (2,1-100,0)
Hemoglobina g/dL	7,1 (5,8-15,1)	8,5 (8,0-9,2)	7,8 (4,3-11,1)	7,3 (1,6-10,0)	7,8 (3,5-11,6)
Plaquetas x10³/μL	63,0 (8,0-129,0)	40,0 (4,0-253,0)	29,0 (5,0-77,6)	12,0 (10,0-26,0)	62,0 (12,0-257,0)
% de blastos	82,5 (60,0-93,0)	68,5 (23,0-97,0)	16,5 (13,0-20,0)	31,0 (2,0-98,0)	14,0 (5,0 -73,0)

Valores em mediana (variação)

As características hematológicas do paciente com LMA M6 estão em apêndice (Apêndice 3).

5.3.1. Perfil imunofenotípico das LMA

Na tabela 13 está descrito o perfil da expressão, em porcentagem, dos marcadores para as LMA.

Tabela 13: Perfil da expressão dos marcadores nas LMA, de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Marcador	Total de casos analisados	Casos negativos	Casos positivos	Mediana (variação)	*Taxa de positividade
CD45	26	2	24	81,5% (33-100)	92,3%
CD34	26	8	18	71,5% (23-98)	69,2%
HLA-DR	19	7	12	69,5% (28-94)	63%
CD10	17	15	2	43,0% (30-56)	11,7%
CD19	24	22	2	91,5% (88-95)	8,3%
CD7	21	16	5	86,0% (34-92)	23,8%
CD117	22	0	22	85,0%(26-99)	100%
MPO	23	6	17	80,0% (20-100)	73,9%
CD 13	26	0	26	74,0% (33-100)	100%
CD33	26	1	25	78,0% (30-100)	96,1%
CD14	24	17	7	49,0% (40-79)	29,1%
CD64	12	8	4	39,0% (25-89)	33,3%
α-glicoforina	8	7	1	97,0%	12,5%

*Taxa de positividade: número de pacientes positivos/numero testado.

Dos marcadores utilizados na caracterização das LMA (tabela 13), o CD117 e o CD13 foram os que apresentaram maior taxa de positividade (100%), seguidos pelo CD33 (96,1%). A MPO apresentou taxa de positividade de 73,9%, sendo negativa nos casos de LMA M0 e no caso da LMA M6. O CD14 e o CD64 apresentaram as menores taxas de positividade 29,1% e 33,3%, respectivamente. Os marcadores de células imaturas CD34, HLA-DR e CD117 tiveram taxa e positividade de 69,2%, 63% e 100% respectivamente. Apenas um, dos cinco casos diagnosticados como LMA M3 expressou o CD34, nenhum expressou HLA-DR. O CD45 foi expresso em 92,3% dos casos.

O marcador alfa-glicoforina foi positivo em apenas um caso, sendo este, classificado como LMA M6. Os marcadores de linhagem plaquetária CD41a e CD61 não foram positivos em nenhum dos casos testados.

Houve expressão anômala em 26,9% dos casos diagnosticados, sendo a expressão do CD7 a mais freqüente (19,2%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre LLA e LMA em relação à freqüência da expressão anômala ($p = 0,199$) (tabela 14).

Tabela 14: Freqüência da expressão anômala na LLA e LMA de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Subtipo de LLA	Expressão anômala		Total
	Ausente	Presente	
LLA	23 (54,7%)	19 (45,3%)	42
LMA	19 (73%)	7 (27%)	26
Total	42	26	68

Aplicou-se o teste Qui-Quadrado; $p = 0,199$

A figura 9 mostra um exemplo, em medula óssea, de LMA subtipo FAB M2.

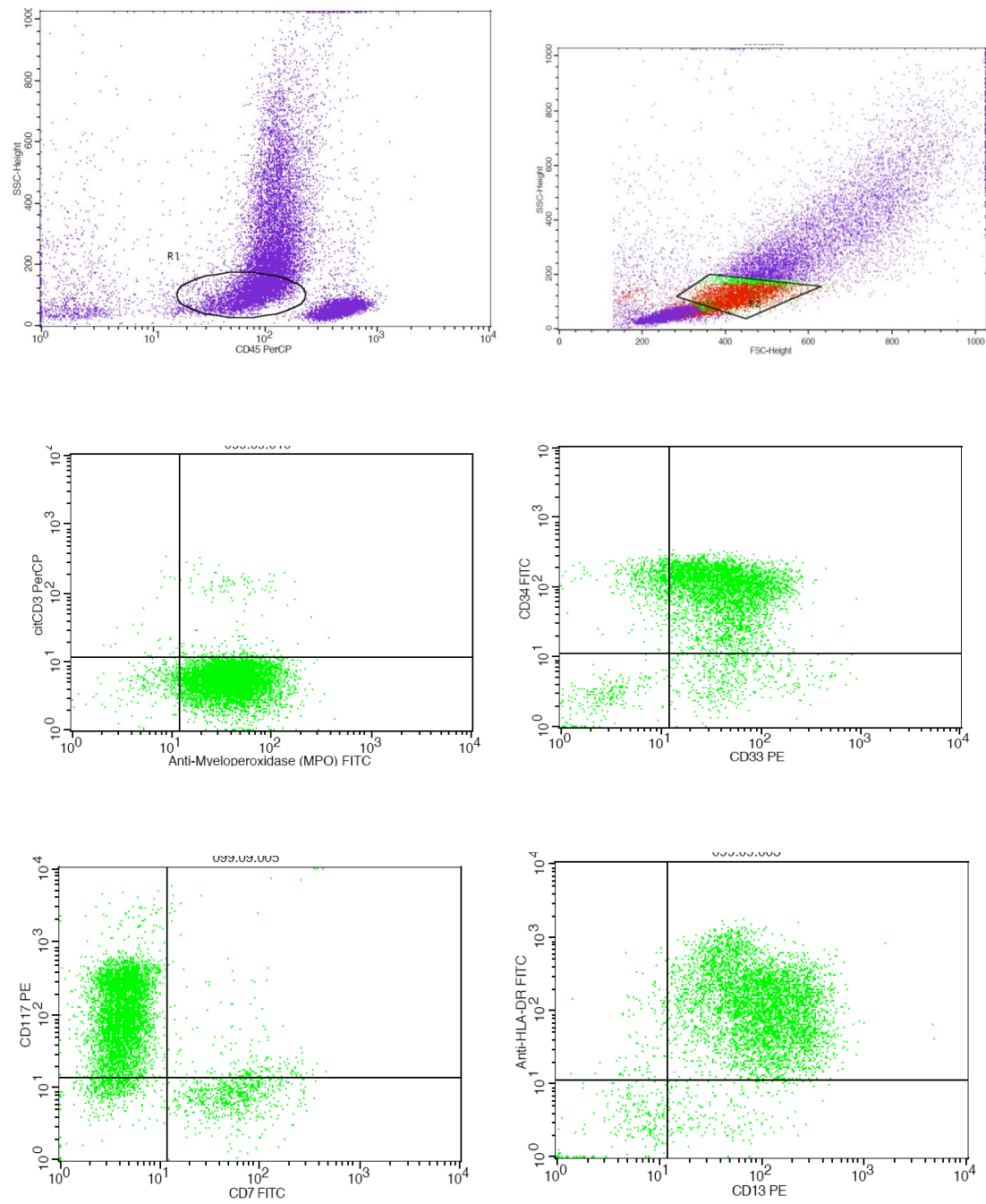


Figura 9: LMA M2 com CD34, CD33, CD13, HLA-DR, MPO e CD117 positivos, e negativa para citCD3 e CD7 (< 20%).

5.4. BAL

No presente estudo foram diagnosticados dois casos de leucemia bifenotípica (BAL) 4,2% (2/48), em crianças. Na tabela 15 segue as características clínicas destes pacientes.

Tabela 15: Características clínicas dos pacientes com leucemia bifenotípica aguda (BAL) do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Paciente	Sexo	Idade	Leucócitos $\times 10^3/\mu\text{L}$	Hemoglobina g/dl	Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{L}$	%Blastos
1	M	5	18	7,5	17,0	80%
2	F	3	51,7	9,9	21,0	96%

O paciente 1 apresentou positividade para os marcadores: CD34 (84%), CD45 (90%), CD19 (90%), CD10 (74%), citCD22 (91%), citCD3 (90%), CD13 (92%), CD33 (30%) e CD 117 (82%). O paciente 2, por sua vez, demonstrou positividade para o CD34 (35%), CD45 (86%), CD19 (20%), CD10 (74%), citCD79a (41%), citCD22 (96%), CD7 (25%), CD13(84%), CD33 (79%), CD14 (25%).

5.5. Avaliação da expressão anômala na LLA em crianças

Não se encontrou diferença estatisticamente significativa, nos parâmetros hematológicos e na resposta a indução, nas LLAs em crianças com e sem expressão anômala, (tabela 16), embora o número de pacientes que alcançaram a remissão tenha sido maior no grupo com expressão anômala (LLA My^+) (80%) em comparação ao grupo sem expressão anômala (LLA My^-)(62%).

Tabela 16: Avaliação da expressão anômala na LLA em relação aos parâmetros hematológicos e resposta a indução, em crianças atendidas no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Parâmetros hematológicos e clínicos	P	LLA My⁺ n=15	LLA My⁻ n=22
Leucócitos x 10 ³ /μL [□]	p = 0,361	41,2 (1,13-591,0)	13,65 (1,44-172,0)
Hemoglobina x g/dl [□]	p = 0,757	9,1 (5,6 -11,0)	8,35 (5,1-12,9)
Plaquetas x 10 ³ /μL [□]	p = 0,938	22,0 (6,0-160,0)	32,5 (8,0-137,0)
% Blastos em sangue periférico [□]	p = 0,268	70,0 (2-99)	60,0 (0-96)
Pacientes em remissão/pacientes sem remissão [■]	p = 0,295	12/3	13/8*

Parâmetros hematológicos: valores expressos em mediana (variação)

LLA My⁺ : Leucemia linfóide aguda com expressão anômala mielóide

LLA My⁻ : Leucemia linfóide aguda sem expressão anômala mielóide

[□] Aplicou-se teste de Mann-Whitney

[■] Aplicou-se o teste Exato de Fisher

* um paciente abandonou o tratamento antes do final da indução

5.6. Avaliação da expressão do CD34 na LLA em crianças

Foi feita a correlação da IMF do CD34 com parâmetros hematológicos e resposta a indução nas LLA B e T e no total destas, sendo esta correlação negativa e estatisticamente significativa no total de LLA em relação ao número de leucócitos (p = 0,007 ; r = - 0,430) e à porcentagem de blastos em sangue periférico (p = 0,000; r = - 0,677). Na LLA B, isoladamente, a porcentagem de blasto também teve correlação negativa e estatisticamente significativa (p=0,000; r = - 0,604) (tabela 17). Os gráficos de dispersão estão em apêndice (Apêndice 4).

Tabela 17: Correlações da IMF CD34 com parâmetros hematológicos e resposta a indução na LLA em crianças atendidas no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Parâmetros hematológicos e clínicos	LLA B (n = 27)		LLA T (n = 10)		LLA (n = 37)	
	r	p	r	p	r	p
Leucócitos x 10³/μL	-0,330	0,091	-0,139	0,700	-0,430	0,007*
Hemoglobina g/dl	0,183	0,352	-0,151	0,676	0,073	0,680
Plaquetas x 10³/μL	0,331	0,092	-0,498	0,142	0,055	0,754
% Blastos	-0,604	0,000*	-0,493	0,176	-0,677	0,000*
Resposta ao tratamento	0,081	0,687	0,124	0,731	0,069	0,696

r - coeficiente de spearman; *p valor < 0,05

A LLA B apresentou 40% (10/25) de casos negativos para o CD34 e a LLA T 50% (5/10). Na comparação entre pacientes CD34 positivos e CD34 negativos (tabela 18) não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos parâmetros avaliados. Por outro lado, verifica-se que na LLAB o grupo de pacientes CD34 positivo apresenta menor número de leucócitos ($5,09 \times 10^3/\mu\text{L}$), maior dosagem de hemoglobina (9,0 g/dl), maior contagem de plaquetas ($33,0 \times 10^3/\mu\text{L}$), menor porcentagem de blastos em sangue periférico (60%), e maior porcentagem de pacientes que responderam a primeira fase da indução (80%; 12/15), em contraste com os pacientes CD34 negativos que apresentam maior número de leucócitos ($26,42 \times 10^3/\mu\text{L}$), menor dosagem de hemoglobina (8,2 g/dl), menor número de plaquetas ($15,5 \times 10^3/\mu\text{L}$), maior porcentagem de blastos em sangue periférico (76,5%) e menor porcentagem de pacientes que responderam a primeira fase da indução (70%; 7/10).

Na LLA T observa-se que o grupo de pacientes CD34 positivo apresenta características contrárias ao grupo de pacientes CD34 positivo da LLAB, com maior número de leucócitos ($163 \times 10^3/\mu\text{L}$), menor dosagem de hemoglobina (8,6 g/dl), menor número de plaquetas ($33,0 \times 10^3/\mu\text{L}$), maior porcentagem de blastos em sangue periférico (91,5%) e menor porcentagem de pacientes que responderam a primeira fase da indução (50%; 2/4). Da mesma forma, o grupo de pacientes CD34 negativo da LLA T apresenta características oposta

do grupo de paciente CD34 negativo da LLAB, com menor número de leucócitos ($41,2 \times 10^3/\mu\text{L}$), maior dosagem de hemoglobina (9,4 g/dl), maior contagem de plaquetas ($100,0 \times 10^3/\mu\text{L}$), menor porcentagem de blastos em sangue periférico (88%), e maior porcentagem de pacientes que responderam a primeira fase da indução (80%; 4/5).

Tabela 18: Avaliação de crianças CD34⁺ e CD34⁻ com LLA B e LLAT em relação a parâmetros hematológicos e resposta a indução.

Parâmetros Hematológicos e clínicos	LLA B			LLAT		
	CD34 ⁺	CD34 ⁻	p	CD34 ⁺	CD34 ⁻	p
Leucócitos x $10^3/\mu\text{L}$ [□]	5,0 (1,13-139,8)	26,4 (1,7-157,0)	0,304	163,0 (9,1-591,0)	41,2 (12,8-145,0)	0,250
Hemoglobina g/dl [□]	9,0 (5,1-11,0)	8,2 (5,6-12,9)	0,598	8,6 (6,5-12,5)	9,4 (7,1-10,6)	0,754
Plaquetas x $10^3/\mu\text{L}$ [□]	33,0 (6-160)	15,5 (7-45)	0,101	33,0 (14-54)	100,0 (16-157)	0,210
%Blastos em SP [□]	60,0 (2-99)	76,5 (0-97)	0,233	91,5 (40-98)*	88,0 (52-98)	0,902
Pacientes em remissão/ pacientes sem remissão [■]	12/3	7/3	0,653	2/2**	4/1	0,523

Parâmetros hematológicos: valores expressos em mediana (variação)

*não se teve informação da porcentagem de blasto em sangue periférico de um paciente

** um paciente abandonou o tratamento antes do final da indução

□ Aplicou-se teste de Mann-Whitney

■ Aplicou-se o teste Exato de Fisher

6.0. DISCUSSÃO

O presente estudo é a primeira pesquisa realizada no Maranhão na caracterização do perfil imunofenotípico das leucemias agudas, determinando assim os diversos subtipos imunológicos destas patologias.

Neste estudo foram analisados 70 casos de leucemias agudas, referentes ao período de um ano e cinco meses, tratados no Instituto Maranhense de Oncologia Hospital Aldenora Bello na cidade de São Luís-Maranhão. O Hospital Aldenora Bello é o único hospital do Maranhão credenciado pelo SUS para prestar assistência e tratamento à pacientes com leucemias.

A maioria dos casos de LLA (88,1%) avaliados em nossa pesquisa foi diagnosticado em crianças, o que condiz com os dados epidemiológicos já descritos, os quais reportam que a frequência desta neoplasia é muito mais baixa em adultos (REGO et al., 2003; KNOX-MACAULAY; BROW, 2000). No presente estudo as LLA em adultos representaram apenas 22,7% do total de casos de leucemias agudas desta faixa etária.

A mediana de idade da LLA B foi de 4 anos, semelhante à mediana de idade em países em desenvolvimento (EDEN, 2010). A mediana de idade para a LLAT foi de 8 anos, mesmo valor encontrado em crianças egípcias (SIDHOM et al., 2008). É descrito na literatura que crianças com LLA T possuem uma maior idade (UCKUN et al., 1997a), três quartos dos pacientes com LLA T apresentam idade superior a 9 anos (JEHA;PUI, 2009).

A incidência da LLA é maior no sexo masculino do que no feminino, independentemente da faixa etária (PLASSCHAERT et al., 2004). Em pesquisa envolvendo crianças do Rio de Janeiro, Distrito Federal e Bahia foi verificado uma proporção do sexo masculino para o feminino de 1,2:1 (POMBO-DE-OLIVEIRA et al., 2005). Em Pernambuco essa proporção foi de 1,7:1 (LEITE et al., 2007), em Ribeirão Preto foi de 1,8:1 para o total de LLA, e com uma proporção ainda maior do sexo masculino para a LLA T 4,2:1 (REGO et al., 1996). No presente estudo, para o total das LLA encontrou-se uma proporção do sexo masculino maior (3,1:1) do que descrito em outros estados brasileiros, sendo a proporção do sexo masculino para o feminino maior na LLA B (3,5:1) do que na LLA T (2,3:1).

Em relação aos subtipos de LLA, este trabalho revelou que 73,8% foram classificados como LLAB e 26,2% casos como LLAT. Nos subtipos de LLAB demonstrou-se que a LLAB-II (B comum) foi o subtipo mais frequente. Estes resultados são semelhantes a outras pesquisas, exceto pela alta frequência da LLA T, em crianças, que na população

maranhense se apresentou com uma maior frequência (27%), do que normalmente é descrito na literatura (7% a 16%) (REGO et al., 1996; POMBO-DE-OLIVEIRA et al., 2005; UDAYAKUMAR et al., 2007; POMBO-DE-OLIVEIRA et al., 2009). Entretanto, em outros estudos como em crianças Marroquinas, Bachir et al. (2009) encontraram uma frequência de 21,1% de LLA T, e em estudo realizado na Índia, por Rajalekshmy et al. (1997) a frequência foi de 45,9% para LLAT em crianças. Em Recife essa frequência foi de 18,5% (LEITE et al., 2007), semelhante a Minas Gerais (18%) (PAES et al., 2003).

A elevada frequência da LLA T está associada à condição sócio-econômica desfavorável (baixa renda *per capita*) como evidenciado em trabalho realizado no Brasil (PAES et al., 2003). Outro fator associado à elevada frequência da LLA T é em relação à raça, onde os não-brancos possuem uma maior frequência do fenótipo T (POMBO-DE-OLIVEIRA, et al., 2005). Levando-se em consideração que o Maranhão é o segundo Estado mais pobre do Brasil, e com um predomínio de população não branca, estes fatos podem justificar a alta incidência da LLA T encontrada na presente pesquisa.

Em relação às LMA, pôde-se observar nesta pesquisa que esta doença foi muito mais frequente em adultos (65,4%) do que em crianças (34,6%), estando de acordo com o que é descrito na literatura (ESTEY; DÖHNER, 2006).

Sob outro aspecto, ao se analisar o total de pacientes estudados, nossos resultados apontam que as LMA apresentaram-se com uma frequência muito menor (37,1%) do que as LLA (60%). Resultado semelhante foi descrito por REGO et al. (2003), em Teresina-PI, onde a frequência de LLA foi o dobro de LMA.

Em relação à idade dos pacientes com LMA, pode-se constatar na população estudada que a mediana obtida foi mais baixa que a de pacientes com LMA em países desenvolvidos (CHANGA et al., 2004; AL-MAWALI et al., 2008), mas semelhante a outros estudos realizados no Brasil (PULCHERI et al., 1995; BITTENCOURT et al., 2003; REGO et al., 2003). Isto se justifica pelo fato de que os países desenvolvidos têm uma maior concentração de população idosa e elevada expectativa de vida, diferente do Brasil, em especial no Nordeste, que tem baixa expectativa de vida e, conseqüentemente, o número da população idosa é bem menor, como também constatado pelo trabalho de REGO et al., 2003. Como a maior incidência de LMA é em maiores de 60 anos (ESTEY; DÖHNER, 2006), justifica-se assim a baixa incidência da doença na população maranhense.

Em relação à distribuição dos subtipos FAB, houve o predomínio da LMA M4 seguido do subtipo LMA M1 em crianças. Resultado semelhante foi encontrado em pesquisa realizada em São Paulo (ZANICHELLI et al., 2006). Já em Minas Gerais foi encontrada uma

maior frequência dos subtipos M2 e M3 (VIANA et al., 2003). Em estudo do grupo Berlim-Frankfurt-Münster (BFM) na Alemanha, constatou-se uma maior frequência do tipo M4 e M5 (CREUTZIG et al., 1995).

Nos adultos o subtipo M0 foi o que apresentou maior frequência, seguido dos subtipos M2 e M3 que tiveram frequência igual. Excetuando-se o tipo M0 que é considerado um tipo menos comum de leucemia, constituindo aproximadamente 2 a 3% das leucemias mielóides (KOTYLO et al., 2000), os subtipos M2 e M3 são bem frequentes na população brasileira (PULCHERI et al., 1995; BITTENCOURT et al., 2003; REGO et al., 2003; CALLERA et al., 2006). De acordo com Rego et al (2003), a distribuição dos subtipos FAB não é tão regular, demonstrando grandes variações geográficas, possivelmente devido a fatores étnicos e ambientais.

Em outros estudos realizados no Brasil pode-se verificar que há diferenças quanto à distribuição dos subtipos morfológicos das leucemias agudas. Entre Campinas-SP e Teresina-PI constataram que o subtipo mais comum em Teresina foi o M2, seguido por M4 e M5 que tiveram frequências iguais, ao passo que em Campinas-SP constatou-se uma maior frequência do subtipo M4 seguido pelo subtipo M3. (REGO et al., 2003). Em São José dos Campos – SP constatou-se uma maior prevalência do subtipo M1 seguido do M2. (CALLERA et al., 2006). No Rio de Janeiro encontraram maior frequência de M2, seguido de M3 e M4 com distribuição igual (PULCHERI et al., 1995), e no Rio Grande do Sul encontrou-se uma maior frequência de M2 seguido de M1 (BITTENCOURT et al., 2003).

No presente estudo a elevada incidência do subtipo FAB M0 é baseada em amostras obtidas de uma única instituição e deve-se enfatizar que o número de pacientes estudados pode não ser representativo de toda a região. Observam-se problemas similares em outros estudos. (BITTENCOURT et al., 2003; PULCHERI et al., 1995; CALLERA et al., 2006). Além disso, a maioria desses estudos (BITTENCOURT et al., 2003; PULCHERI et al., 1995; REGO et al., 2003), que demonstram a distribuição dos subtipos morfológicos FAB, são estudos retrospectivos realizados através de análise de prontuários, e muitos deles, não incluem a imunofenotipagem como diagnóstico para LMA, ou o diagnóstico imunofenotípico foi implantado muito tempo depois do início da coleta de dados, isto provavelmente pode subestimar a frequência dos subtipos FAB M0 na população brasileira.

Diversos estudos em países desenvolvidos, utilizando além da morfologia e citoquímica, a imunofenotipagem, encontraram frequências relativamente maiores dos subtipos M0 dentre as LMA, como os trabalhos Suárez et al. (2004) na Europa, de Kaleem et

al., (2003) nos EUA e Changa et al., (2004) no Canadá, que encontraram, respectivamente 15%, 17,6% e 9,5%.

Em relação ao perfil dos marcadores podemos constatar que com o painel primário foi possível definir a linhagem celular de todas as LLAs B. Constatou-se que o marcador CD79a, em citoplasma, foi mais sensível, com taxa de positividade de 100%, do que o CD19 (taxa de positividade de 86,6%), onde quatro casos foram considerados negativos. Em algumas pesquisas o CD19 foi negativo em três ou mais casos de LLA B (BOROWITZ et al., 1990; BOROWITZ et al., 1997; KALEEM et al., 2003). Desta forma pode-se constatar que o CD79a é um bom marcador, para compor um painel primário de triagem para a identificação de linhagem B. O CD19, embora seja raro, pode se apresentar negativo nas LLA, além de ser expresso de forma aberrante, com certa frequência nas LMAs.

A utilização do marcador IgM e CD10 foi útil para classificação das LLAs B quanto ao grau de maturação. O CD10 apresentou-se positivo na maioria dos casos de LLA B semelhante ao descrito na literatura (PUI et al., 1993a; POMBO-DE-OLIVEIRA et al., 2005; BACHIR et al., 2009).

Em relação à LLAT, dentre os marcadores pan T utilizados no diagnóstico das LLAs, pode-se constatar que os mais frequentes foram o CD3 de citoplasma, CD5, CD7, (RILEY et al., 2002) com taxa de positividade de 100% , muito embora, apenas o citCD3 tenha sido testado em todos os casos. O CD2 apresentou-se negativo em um caso, correspondendo a 85,7% de taxa de positividade. O CD10 apresentou-se positivo em apenas 9,1% dos casos semelhante ao descrito por Pombo-de-Oliveira et al. (2005), que também achou frequência inferior a 10%, porém em outras pesquisas a expressão do CD10 na LLAT apresentou-se com uma maior frequência como 18,1% (CONSOLINI et al., 1998) e 33,3% (SIDHOM et al., 2008).

O marcador CD8 apresentou-se mais frequente, com taxa de positividade de 100% em comparação ao CD4 que teve uma frequência muito menor, com taxa de positividade de 40%. O CD1a, caracterizado como antígeno cortical tímico, e outros antígenos de células T como CD4 e CD8, podem ser expressos com padrões variáveis e têm sido usados em conjunto com outros marcadores de células T, para subclassificar as LLA T (DIGIUSEPPE, 2007).

Não foi possível realizar, no presente estudo, a classificação das LLAT quanto ao grau de maturação, em função do marcador CD1a não poder ter sido usado em todos os casos de LLA T.

Entre os marcadores estudados nas LMAs pode-se constatar que o CD13, CD117 e CD33, que são considerados os primeiros antígenos detectados durante a diferenciação de

precursores hematopoiéticos da linhagem mielóides (ORFAO et al., 2004) foram expressos com alta taxa de positividade, 100%, 100% e 96,1%, respectivamente, estando de acordo com estudos realizados por Maynadié et al. (2002) e Webber; Cushing e Li. (2008). O marcador MPO também considerado como um dos mais freqüentes na LMA, e com elevada taxa de positividade, no presente estudo apresentou-se com uma taxa de positividade de 73,9%, sendo inferior às do CD13, CD33 e CD117. Este resultado obtido para o marcador MPO encontra respaldo, pois de modo semelhante ao descrito por Zheng et al. (2008), foi negativo em todos os casos de LMA M0 em que foi testado, em um caso de LMA M4 e no caso diagnosticado como LMA M6.

Os marcadores CD14 e CD64 utilizados para auxiliar no diagnóstico dos subtipos FAB associados à linhagem monocítica (LMA M4 e M5), foram os que tiveram menor taxa de positividade nas LMA 29,1% e 33,3% (tabela 10), respectivamente. Estes marcadores são descritos na literatura como pouca contribuição para designação da linhagem mielóide (LEE; KIM; KIM, 2006). Suas freqüências são relativamente baixas, até mesmo no subtipo LMA M4 apresentando-se positivo em menos de 60% dos casos (KALEEM et al., 2003).

Em relação ao marcador de linhagem-não específica e de células precursoras, HLA-DR, verificou-se que foi muito mais freqüente na LLA B do que na LLA resultado semelhante é descrito por Pombo-de-Oliveira et al. (2005) e DiGiuseppe (2007). A expressão do HLA-DR nas LMA foi bem freqüente, porém apresentando-se negativo na maioria dos casos de LMA M3, estando de acordo com Orfao et al. (1999) e Kaleem et al. (2003).

A positividade do HLA-DR é muito comum na LLA B, e na maioria das leucemias mielocíticas, fato que ocorre em apenas uma minoria das LLA T. Deste modo, para o diagnóstico diferencial de uma leucemia aguda, a negatividade do HLA-DR na LLA T é mais informativa do que a sua positividade na LLA B (RILEY et al., 2002), ou seja, no diagnóstico de uma leucemia aguda, um HLA-DR negativo fala mais a favor de uma LLA T que um HLA-DR positivo para uma LLA-B.

O CD45 é um marcador pan leucocitário. Sua principal justificativa na composição de um painel para diagnóstico das leucemias agudas é o seu padrão de positividade distinto nas diferentes linhagens celulares, bem como sua fraca expressão na população das células leucêmicas imaturas. Isto serve como estratégia para localização dos blastos, através do gráfico SSC (granulosidade) X CD45, que exibe a posição específica destas células, em relação aos linfócitos residuais, monócitos e polimorfonucleares, permitindo identificar com acurácia a área delimitada para análise (*gate*) da população dos blastos para estudo (BENE, 2005). O painel ideal seria com a utilização do CD45 como

terceira cor em combinação com todos os monoclonais, porém a utilização dessa estratégia encarece muito os custos da pesquisa.

O CD45 foi expresso em 87% dos casos de LLA B, com perda da expressão em 13% dos casos, resultados semelhante foi descrito por Ratei et al. (1998) e Behm et al. (1992). O CD45 foi expresso em 100% dos casos de LLAT, de acordo com Behm et al. (1992).

O marcador de células imaturas CD34 é descrito na literatura com importância prognóstica nas leucemias agudas. A presente pesquisa avaliou a expressão desses marcadores, além da porcentagem de células positivas, através da intensidade média de fluorescência (IMF) que é uma nova abordagem, onde se pode ter uma melhor noção de como e quanto os antígenos são expressos pelas células e ainda conseguimos encontrar fatores prognósticos que não encontramos pela porcentagem tanto nas leucemias linfóides quanto mielóides (CUNHA, 2005).

O marcador de linhagem não específica e de células imatura CD34 apresentou-se com taxa de positividade de 61,2% para LLA B e 54,5% para LLA T, tendo um grande número de casos considerados negativos para esse marcador na LLA. A expressão desse marcador na LLA é associada a fatores prognósticos (BOROWITZ et al, 1990; PUI et al, 1993b; CASCAVILLA et al., 1997).

No presente estudo a intensidade média de fluorescência (IMF) do CD34 teve correlação negativa com o número de leucócitos e porcentagem de blastos em sangue periférico na LLA. Na comparação entre os grupos de pacientes CD34 positivos e CD34 negativos, em crianças com LLA, não se encontrou diferença estatisticamente significativa nos parâmetros hematológicos e nem na resposta a indução, porém pode-se observar que a expressão do CD34 nas LLA B apresenta uma tendência a ter características de melhor prognóstico, o contrário se verifica no grupo de pacientes CD34 positivo da LLA de linhagem T, resultado semelhante é descrito por Pui et al. (1993b).

Na LLA de linhagem B, em crianças, a expressão do CD34 está associada a fatores prognósticos favoráveis, tais como, idade entre um ano e dez anos, hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos, ausência de envolvimento de SNC e maior sobrevida livre de eventos (BOROWITZ et al.,1990; PUI et al., 1993b). Estudos realizados por Thomas et al. (1995) e Cascavilla et al. (1997) constaram que a expressão do CD34 foi identificado como um fator prognóstico adverso na LLA do adulto. Não foi possível avaliar, no presente estudo, a expressão do CD34 na LLA do adulto em função da pequena quantidade de casos.

Na LMA o CD34 foi expresso com bastante frequência exceto no subtipo M3 de acordo com Kaleen et al. (2003).

A frequência da expressão anormal de um antígeno de uma determinada linhagem em outra (expressão anômala) é bastante variável nas leucemias agudas. Neste estudo, 45,2% dos casos de LLA tiveram expressão anômala, sendo o marcador CD13 o mais freqüente, resultado semelhante foi descrito por Putti et al. (1998), Den Boer et al. (1999), Suggs et al. (2007) e Bachir et al. (2009). A frequência da co-expressão mielóide foi maior na LLA B (48,4%) do que na LLA T (36,4%), porém sem diferença significativa. Den Boer et al. (1999) e Abdelhaleem (2007) acharam também uma maior frequência na LLA B, porém apenas o último achou diferença significativa na comparação das duas.

Na LMA houve expressão anômala em 26,9% dos casos, sendo o marcador CD7 mais freqüente, estando de acordo com Bahia et al. (2001) e Zheng et al. (2008).

Fatores prognósticos associados à expressão anômala na LLA, em crianças, são controversos. Putti et al. (1998), Uckun et al. (1997b) e Pui et al. (1990) não encontraram associação significativa com fatores prognósticos adversos, já Silva et al. (2004) encontraram que no grupo de pacientes com expressão anômala não ocorreram recidivas. Riley et al. (2002) descreveu que a expressão anômala nas LLA, tanto em adultos quanto em crianças, é associada significativamente com uma curta sobrevida livre de eventos, curta duração da primeira remissão, e altas taxas de recaída na fase de tratamento.

Na presente pesquisa não se encontrou diferença, na LLA em crianças, entre pacientes com e sem expressão anômala, em relação a fatores prognósticos, embora o número de pacientes que alcançaram a remissão foi maior no grupo com expressão anômala, estes resultados são semelhantes aos encontrado por Bhushan et al. (2010).

A literatura reporta grande variação de dados em relação à frequência das expressões anômalas nas leucemias agudas. Talvez isso possa justificar o porquê de não serem encontrados dados consistentes a respeito do valor prognóstico das expressões anômalas nas leucemias agudas. Essas variações podem ter diversas explicações, entre elas pode-se citar a utilização de diferentes fluorocromos, diferentes tipos de clones dos anticorpos monoclonais, as características das amostras, a técnica e análise utilizadas, o número e as características dos pacientes, bem como o protocolo de tratamento utilizado.

Seria necessário aumentar o tempo de observação e o número de pacientes para se estudar melhor parâmetros avaliados nessa pesquisa, como a expressão anômala e do marcador CD34, bem como os subtipos de leucemias na sobrevida dos pacientes.

Em relação ao perfil dos marcadores podemos constatar que o nosso painel de triagem e de complementação foi eficiente no diagnóstico e classificação dos subtipos de

leucemias agudas, sendo inclusive tomado por base o critério da classificação imunológica das leucemias agudas, Classificação EGIL (BENE et al., 1995).

A implantação do serviço de imunofenotipagem em nosso Estado permitiu diagnosticar casos de leucemias mielóides agudas minimamente diferenciadas (LMA M0) e as LLAT, ocorridos com elevada frequência em nossa população, sugerindo que podem haver diferenças na prevalência dos subtipos FAB da LMA, assim como dos subtipos de LLA, em diferentes regiões do Brasil. Além disso, todos estes casos, sem a análise imunofenotípica poderiam comprometer o diagnóstico e, por conseguinte, a escolha mais apropriada de tratamento.

7.0. CONCLUSÃO

- A LLA foi o tipo de leucemia aguda mais comum em crianças e a LMA foi mais freqüente na faixa etária adulta.
- Os anticorpos utilizados foram suficientes para classificar imunologicamente os casos de leucemias agudas e o perfil da expressão dos marcadores foi semelhante ao descrito na literatura.
- Entre os subtipos imunológicos de LLA pode-se constatar que a o subtipo imunológico mais freqüente foi LLA BII (B comum). A LLA T teve elevada freqüência (27%) em crianças.
- A distribuição das LMA em subtipos FAB mostrou maior freqüência do subtipo LMA M4, em crianças, e do subtipo LMA M0 em adultos.
- Nas LLA teve-se a expressão anômala em 45,2% dos casos, com o marcador de linhagem mielóide CD13 mais freqüente. Nas LMA a freqüência da expressão anômala foi de 26,9%, com o marcador linfóide T CD7 mais freqüente.
- Na LLA em crianças não se encontrou diferença estatisticamente significativa, entre os grupos com e sem expressão anômala, em relação a fatores prognósticos, embora se tenha observado que um maior número de pacientes com expressão anômala tenha alcançado remissão na primeira fase de tratamento.
- A expressão do CD34 apresentou-se com correlação com o número de leucócitos e porcentagem de blastos em sangue periférico, sendo sua expressão associada a fatores prognósticos favoráveis na LLA B.

REFERÊNCIAS

- ABDELHALEEM, M. Frequent but nonrandom expression of myeloid markers on *de novo* childhood acute lymphoblastic leukemia. **Exp Mol Pathol**, v.83, p.138-141, 2007.
- AL-SERAIHY, A.S. et al. Clinical characteristics and outcome of biphenotypic acute leukemia in children. **Haematologica**. v.94, n.12, p.1682-1690, 2009.
- AL-MAWALI, A. et al. Incidence, Sensitivity, and Specificity of Leukemia-Associated Phenotypes in Acute Myeloid Leukemia Using Specific Five-Color Multiparameter Flow Cytometry. **Am J Clin Pathol**, v.129, p.934-945, 2008.
- BACHIR, F. et al. Characterization of Acute Lymphoblastic Leukemia Subtypes in Moroccan Children. **Int J Pediatr**, 2009; 674801. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20041009>. Acesso em 12 de jan. 2010.
- BAER, M.R. et al. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). **Blood**, v. 97, n. 11, p.3574-3580, 2001.
- BAHIA, D.M.M et al. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and clinical significance. **Haematologica** , v.86, p.801-806, 2001.
- BEHM, F. G. et al. Lack of CD45 antigen on blast cells childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with chromosomal hyperdiploidy and other favorable prognostic features. **Blood**, v. 79, p. 1011-16, 1992.
- BENE, M.C. et al. Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias. **Haematologica**, v. 84, p.1024-1034,1999.
- BENE, M. C. Immunophenotyping of acute leukaemias. **Immunol Lett**, v.98, p.9-21, 2005.
- 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. Proposals for the classification of the acute leukemias. **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. **Ann of Intern Med**. 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.

BHUSHAN, B. et al. Aberrant phenotypes in childhood and adult acute leukemia and its association with adverse prognostic factors and clinical outcome. **Clin Exp Med**, v.10, p.33-40, 2010.

BIONDI, A. et al. Biological and therapeutic aspects of infant Leukemia. **Blood**, v.96, p.24-33, 2000.

BITTENCOURT, R. et al. Acute Myelogenous Leukemia: two decades overview - hematology Service Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS. **Rev Bras Hematol Hemoter**. v.25, n., p.17-24, 2003.

BOROWITZ, M.J. et al. Prognostic Significance of CD34 Expression in Childhood B-Precursor Acute Lymphocytic Leukemia: A Pediatric Oncology Group Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 8, n. 8, p.1389-1398, 1990.

BOROWITZ, M. J. et al . Prognostic significance of fluorescence intensity of surface marker expression in childhood B-precursor ALL. A Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v. 89, p. 3960-3966, 1997.

BOROWITZ, M.J. et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. **Blood**, v.111, n.12, p.5477-5485, 2008.

BRUNNING, R. D. et al. Precursor B-cell and T-cell neoplasms. In: JAFFE E.S. et al. **Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organization Classification of Tumours**. Lyon: IARC Press, 2001. p.111-117.

BUCCHERI, V.; LORENZI T.F. Patologia dos leucócitos: doenças proliferativas linfadenopatias reacionais. In: LORENZI, T.F. **Atlas de hematologia: clínica hematológica ilustrada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.351-398.

CALLERA, F. et al. High prevalence of morphological subtype FAB M1 in adults with *de novo* acute myeloid leukemia in São José dos Campos, São Paulo. **Sao Paulo Med J**, v.124, n.1, p. 45-47, 2006.

CAMARGO, B. et al. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14 population-based cancer registries. **Int J Cancer**, v. 126, n.3, p.715-720, 2010.

CAMPANA, D.; BEHM, F.G. Immunophenotyping of Leukemia. **J Immunol Methods**, v. 243, p. 59-75, 2000.

CASCAVILLA, N et al. Adult and Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinicobiological Differences Based on CD34 Antigen Expression. **Haematologica**, v.82, p.31-37, 1997.

CAZÉ, M.O.; BUENO, D.; SANTOS, M.E.F. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. **Rev HCPA**, v.30, p.5-12, 2010.

CHANGA, H. et al. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. **Leuk Res**, v. 28, p.43-48, 2004.

CONSOLINI, R. et al. Clinical relevance of CD10 expression in childhood ALL. The Italian Association for Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP). **Haematologica**, v. 83, p. 967–973, 1998.

CORTES, J.E; KANTARJIAN, H.M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review with emphasis on biology and therapy. **Cancer**, v.76, p. 2393-409,1995.

CRAIG, F.E.; FOON, K. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood**, v.111, p.3941-3967, 2008.

CREUTZIG, U. et al. Clinical significance of surface antigen expression in children with acute myeloid leukemia: results of study AML-BFM-87. **Blood**, v. 86, n.8 , p. 3097-310, 1995.

CUNHA,F.G.P. **Painel racionalizado de anticorpos monoclonais para leucemias agudas: seu valor diagnóstico e prognóstico**. 2005.73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, São Paulo.

CZUCZMAN, M.S, et al. Value of immunophenotype in intensively treated adult acute lymphoblastic leukemia: cancer and leukemia Group B study 8364. **Blood**, v. 93, p. 3931–3939, 1999.

DEN BOER, M. L. et al. Myeloid antigen co-expression in childhood acute lymphoblastic leukaemia: relationship with in vitro drug resistance. **Br J Haematol**. v. 105, p. 876-882, 1999.

DIGIUSEPPE, J. A. Acute Lymphoblastic Leukemia: Diagnosis and Detection of Minimal Residual Disease Following Therapy. **Clin Lab Med**, v. 27, p. 533–549, 2007.

DOWNING, J.R; SHANNON, K.M. Acute leukemia: a pediatric perspective. **Cancer cell**, v. 2, p.437-445, 2002.

DWORZAK, M.N. et al. Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase- positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. **Blood** , v.92, p.3203–3209, 1998.

EDEN, T. Aetiology of childhood leukaemia. **Cancer Treatment Reviews**, *in press*, 2010.

EMERENCIANO, M. et al. Frequência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.50, p.183-189, 2004.

ESTEY, E.; DÖHNER, H. Acute myeloid leukaemia. **Lancet** v.368, p.1894–907, 2006.

European Group for the Immunological classification of Leukaemias (EGIL). The value of c-kit in the diagnosis of biphenotypic acute leukemia. **Leukemia**, v.12, p.2038, 1998.

FARHI, D.C.; ROSENTHAL, N.S. Acute lymphoblastic leukemia. **Clin Lab Med**, v. 20, p. 17-28, 2000.

GILES, F.J. et al. Acute Myeloid Leukemia. **Hematology (American Society of hematology)**, p.73-110, 2002.

GRAHAM, G.S.; KNOLL, W. Peroxidase reaction for general differentiation. In: Sandoz. Basle, E. Undritz (eds). **Atlas of Haematology**. 2 ed, 1973.

GROVES, F.D.; LINET, M.S.; DEVESSA, S.S. Patterns of occurrence of the leukaemias. **Eur J Cancer**, v. 31, p. 941-949, 1995.

HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **J Pediatr**, v. 84, p. 52-57, 2008.

HARRIS, N.L. et al. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting. **J Clin Oncol**, v.17, n.12, p.3835-3849, 1999.

HILDEN, J.M. et al. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. **Blood**, v.108, p. 441-451, 2006.

HOMANS, A.C.; WILLIAMS, N.; METCALF, D. Aplastic presentation of acute lymphoblastic leukemia: Evidence for cellular inhibition of normal hematopoietic progenitors. **Am J Pediatr Hematol Oncol**, v.11, p.456-62, 1989.

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.

JAFFE, E.S et al. **Pathology and Genetics, Tumor of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon : IARC Press, 2001.

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

KALEEM, Z. et al. Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data. **Arch Pathol Lab Med**. v. 127, n. 1, p. 42-48, 2003.

KHALIDI, H.S et al. The immunophenotype of adult acute myeloid leukemia: high frequency of lymphoid antigen expression and comparison of immunophenotype, French-American-

British classification and karyotypic abnormalities. **Am J Clin Pathol** , v. 109, p.211–220, 1998.

KHALIDI, H.S. et al. Acute Lymphoblastic Leukemia. Survey of Immunophenotype, French-American-British Classification, Frequency of Myeloid Antigen Expression, and Karyotypic Abnormalities in 210 Pediatric and Adult Cases. **Hematopathology**, v.111, p. 467-76, 1999.

KEBRIAIEI, P.; LARSON, R.A. Progress and challenges in the therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Curr Opin Hematol**,v. 10, n.4, p. 284-289, 2003.

KILLICK, S. et al. Outcome of biphenotypic acute leukemia. **Haematologica**, v. 84, n.8, p. 699-706, 1999.

KNOX-MACAULAY, H.H.; BROWN, L.C. Descriptive epidemiology of de novo acute leukaemia in the Sultanate of Oman. **Leuk Res**, v.24, p. 589–594, 2000.

KOTYLO, P.K. et al. Flow Cytometric Immunophenotypic Characterization of Pediatric and Adult Minimally Differentiated Acute Myeloid Leukemia (AML-M0). **Am J Clin Pathol**, v.113, p. 193-200, 2000.

LACOMBE, F. et al. Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v.11, p.1878-1886, 1997.

LEE, P. S. et al. Acute leukemia with myeloid, B, and natural killer cell differentiation. **Arch Pathol Lab Med**, v.127, n.2, p.93-95, 2003.

LEE, S ; KIM, H.;KIM, S. Defining an Optimal Number of Immunophenotypic Markers for Lineage Assignment of Acute Leukemias Based on EGIL Scoring System. **Korean J Lab Med**. v. 26, p.393-399, 2006.

LEITE, E.P et al. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant**, v.7, n.4, p. 413-421, 2007.

LINABERY, A.M.; ROSS, J.A. Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992-2004). **Am. Cancer Society**, v. 112, n.2, p.416-32, 2008.

LIGHTFOOT, T. Aetiology of childhood leukemia. **Bioelectromagnetics**, v.26, n.7, p 5-11, 2005.

LUDWIG, W.D. et al. Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics, and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukemia: results of the German multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89. **Blood**, v. 92, p.1898–1909, 1998.

LUDWIG, W.D. et al. Incidence and prognostic significance of immunophenotypic subgroups in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience of the BFM study 86. **Recent Results Cancer Res**, v.131, p. 269–282,1993.

LUDWIG, W.D.; HAFERLACH, T.; SCHOCH, C. Classification of acute leukemias: perspective I. In: PUI, C.H. (ed.). **Treatment of Acute Leukemias: New Directions for Clinical Research**. Totowa, NJ: Humana press Inc, 2003, p.3-41.

MACEDO, A. et al. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. **Ann Hematol**, v. 70, p.189–194, 1995.

MATUTES, E. et al. Definition of acute biphenotypic leukemia. **Haematologica**, v.82, p. 64–66, 1997.

MAYNADIÉ, M. et al. Clinical value of the quantitative expression of the three epitopes of CD34 in 300 cases of acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v.87, p.795-803, 2002.

MELLO, MRB. **Avaliação imunofenotípica, Estudo do índice de DNA e de alterações moleculares em células blásticas de pacientes portadores de leucemia aguda diagnosticados na Fundação Hemope**. 2007.69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, São Paulo.

MOORE, M.A.S.; WILLIAMS, N.; METCALF, D. In vitro formations by normal and leukemic human hematopoietic cells: Interaction between colony-forming and colonystimulating cells. **J Natl Cancer Inst**, v. 50, p.591-602, 1973.

ONCIU, M. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematol Oncol Clin N Am**, v. 23, p.655–674, 2009.

ORFAO, A. et al. The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-RARa gene rearrangements. **Haematologica**, v. 84, p.405-412, 1999.

ORFAO, A. et al. Contribucion del inmunofenotipo al estudio de los síndromes mielodisplasicos. **Haematologica**, v.88, p.269 –275, 2003.

ORFAO, A et al. Immunophenotyping of Acute Leukemias and Myelodysplastic Syndromes. **Cytometry Part A**, v. 58A, p.62–71, 2004.

OLIVEIRA, B. M.; DINIZ, M. S.; VIANA, M. B. Leucemias Agudas na Infância. **Rev. Med. Minas Gerais**, v.14, p.33-9, 2004.

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

OWAIDAH, T.M. et al. Cytogenetics, molecular and ultrastructural characteristics of biphenotypic acute leukemia identified by the EGIL scoring system. **Leukemia**, v. 20, p. 620-626, 2006.

PAES, C.A. et al. Direct association of socio-economic status with T-cell acutelymphoblastic leukaemia in children. **Leuk Res**, v. 27, p.789–794, 2003.

PARK, J.A. et al. Stem cell transplant in the treatment of childhood biphenotypic acute leukemia. **Pediatr Blood Cancer**, v.53, n.3, p.444-452, 2009.

PLASSCHAERT, S.L.A. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: a question of maturation? **Cancer Treatment Reviews**, v.30, p. 37–51, 2004.

PIETERS, R. et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. **Lancet**, v.370, p. 240–50, 2007.

PIETERS, R.; CARROLL, W.L. Biology and Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematol Oncol Clin N Am**, v. 24, p.1–18, 2010.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S. et al. Biological diversity variations of pediatric acute leukemia in Brazil: contribution of immunophenotypic profiles to epidemiological studies. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v.27, n.1, p. 21-26, 2005.

POMBO- DE- OLIVEIRA, M.S. **Leucemias Infantis: Abordagem Imuno-molecular no Diagnóstico e nas Pesquisas**. Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 2008.

POMBO –DE- OLIVEIRA, M.S. et al. Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. **Blood Cells Mol Dis**, v. 42, n.2, p.121–125, 2009.

PUI, C. H. et al. Myeloid-associated antigen expression lacks prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukemia treated with intensive multiagent chemotherapy. **Blood**, v. 75, p. 198-202, 1990.

PUI, C.H.; BEHM, F.G.; CRIST, W.M. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.82, p. 342-59, 1993a.

PUI, C.H. et al. Clinical Significance of CD34 Expression in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**, v. 82, n. 3, p. 889-894, 1993b.

PUI, C.H. Acute lymphocytic leukemia. **Pediatr Clin North Am**, v.44, n.4, p. 831–846,1997.

PUI, C-H. Central nervous system disease in acute lymphoblastic leukemia: prophylaxis and treatment. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** , p.142–46, 2006.

PUI ,C-H.; CAMPANA, D.; EVANS, W.E. Childhood acute lymphoblastic leukaemia: current status and future perspectives. **Lancet Oncol**, v. 2, p.597–60, 2001.

PUI, C-H.; EVANS, W.E. Acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 339, p. 605–615, 1998.

PUI, C.H., ROBISON, L.; LOOK, A.T. Acute Lymphoblastic Leukaemia. **The Lancet**, v. 37, p. 1030-1043, 2008.

PULCHERI, W. et al. The treatment of acute myeloid leukemia in Brazil: Progress and obstacles. **Haematologica**, v.80, p.130-135, 1995.

PULLEN, J. et al. Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphocytic leukemia (ALL), as compared to those with B-precursor ALL. A Pediatric Oncology Group (POG) study. **Leukemia**, v.13, p.1696–1707,1999.

PUTTI, M.C. et al. Expression of myeloid markers lacks prognostic impact in children treated for acute lymphoblastic leukemia: Italian experience in AIEOP-ALL 88-91 studies. **Blood**, v. 92, p. 795-801,1998.

RAJALEKSHMY, K.R. et al. Immunophenotypic analysis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia in Madras, India. **Leuk Res**, v. 21, n. 2, p. 119-124, 1997.

RATEI, R. et al. Immunophenotype and clinical characteristics of CD45-negative and CD45-positive childhood acute lymphoblastic leukemia. **Ann Hematol**, v. 77, p.107–114,1998.

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

REGO, M. F. N. et al. Acute leukemias in Piauí: comparison with features observed in other regions of Brazil. **Braz J Med Biol**, v.36, n. 3, p. 331-337, 2003.

REIFFERS, J. et al. Comparison of allogeneic or autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in patients with acute myeloid leukaemia in first remission: a prospective controlled trial. **Br J Haematol**, v.72, p. 57-63, 1989.

REIS, R.S; SANTOS, M.O.; THULER, L.C.S. Incidência de tumores pediátricos no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.1, p.5-15, 2007.

RIBEIRO, R. Leucemia linfóide aguda na infância e adolescência. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. (eds.) **Hematologia. Fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001. p.487-518.

RILEY, R. S. et al. Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, v.16, p.245-299, 2002.

RUBNITZ, J.E. et al. Acute mixed lineage leukemia in children: The experience of St. Jude Children's Research Hospital. **Blood** ,v.113, n.21, p.5083-5089, 2009.

RUBNITZ, J.E.; GIBSON, B.; SMITH, F.O. Acute Myeloid Leukemia. **Hematol Oncol Clin N Am**, v. 24, p.35–63, 2010.

RUDIN, C.M; THOMPSON, C. B. B-cell development and maturation. **Semin Oncol**, v. 25, p. 435–446, 1998.

SIDHOM, I. et al. Clinical Significance of Immunophenotypic Markers in Pediatric T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of the Egyptian Nat Cancer Inst**, v. 20, n. 2, p. 111-120, 2008.

SILVA, I. Z. et al. Expressão dos marcadores mielóides e prognóstico das leucemias linfóides agudas. **Pediatria (São Paulo)**, v. 26, p. 97-103, 2004.

STANULLA, M; SCHRAUDER, A. Bridging the gap between the north and south of the world: the case of treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v.94, n.6, p.748-752, 2009.

SCHULTZ, K.R. et al. Risk and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia:a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children´s Cancer Group (CCG). **Blood**, v.109, p.926-935, 2007.

SUÁREZ, L. et al. CD34 Cells from Acute Myeloid Leukemia, Myelodysplastic Syndromes, and Normal Bone Marrow Display Different Apoptosis and Drug Resistance–Associated Phenotypes. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 7599–7606, 2004.

SUGGS, J.L. et al. Aberrant myeloid marker expression in precursor B-cell and T-cell leukemias. **Exp Mol Pathol**, v. 83, p. 471–473, 2007.

SZCZEPANSKI, T.; VAN DER VELDEN, V. H.; VAN DONGEN, J. J. Classification systems for acute and chronic leukaemias. **Best Pract Res Clin Haematol**, v.16, p.561-82, 2003.

TAKETANI, T. et al. FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with Hyperdiploidy. **Blood**, v.103, p.1085-1088, 2004.

TERSTAPPEN, L.W. et al. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. **J Leukoc Biol**, v.48, p.138–148, 1990.

THOMAS, X. et al. CD34 expression is associated with major adverse prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v.9, n. 249–253, 1995.

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

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

UCKUN, F.M. et al. Clinical features and treatment outcome of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia according to the apparent maturational stage of T-lineage leukemic blasts: a Children´s Cancer Group study. **J Clin Oncol**, v.15, n.6, p. 2214-2221, 1997a.

UCKUN, F. M. et al. Clinical features and treatment outcome of children with myeloid antigen positive acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. **Blood**, v. 90, p. 28-35,1997b.

VELA, J.A.G, et al. Aberrant Immunophenotypes detected by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia. **Leuk and lymphoma**, v. 36, p.275-284, 2000.

VIANA, M.B. et al. Acute myeloid leukemia in childhood: a fifteen-year experience in a single institution. **J Pediatr**, v.79, n.6, p.489-96, 2003.

XU X-Q. et al. Clinical and biological characteristics of adult biphenotypic acute leukemia in comparison with that of acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a case series of a Chinese population. **Haematologica**, v. 94, p.919-927, 2009.

WEBBER, B.A.; CUSHING, M.M.; LI, S. Prognostic Significance of Flow Cytometric Immunophenotyping in acute myeloid leukemia. **Int J Clin Exp Pathol**, v.1, p.124-133, 2008.

WELLS, D.A.; LOKEN, M.R. Normal antigen expression in hematopoiesis. In: STEWART, C.C.; NICHOLSON, J.K.A. (eds.) **Immunophenotyping**. New York: John Wiley & Sons Inc, 2000. p 133–160.

WOOD, B. L. Myeloid Malignancies: Myelodysplastic Syndromes, Myeloproliferative Disorders, and Acute Myeloid Leukemia, **Clin Lab Med**, v.27, p.551-575, 2007.

ZANICHELLI, M. A. et al. Pediatric acute myeloid leukemia outcomes after conventional treatment. **Rev. bras. hematol. hemoter.** v.28, n.4, p. 246-252, 2006.

ZEMPLIN, M. et al. Regulation and chance in the ontogeny of B and T cell antigen receptor repertoires. **Immunol Res**, v. 26, p. 265-278, 2002.

ZHENG, J. et al. A correlation study of immunophenotypic, cytogenetic, and clinical features of 180 AML patients in China. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 74B, p. 25–29, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - 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: ____/____/____

APÊNDICE 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido (aos pais ou responsáveis)

**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: ____/____/____

APÊNDICE 3 – Parâmetros hematológicos de paciente com LMA M6

Tabela 19: Parâmetros hematológicos do hemograma, ao diagnóstico, do paciente com LMA M6.

Paciente	Subtipo de LA	Leucócitos x 10 ³ /µL	Hemoglobina g/dl	Plaquetas x 10 ³ /µL	% de blastos
1	LMA M6	3,3	7,5	9,0	63%

APÊNDICE 4 - Gráficos de dispersão da intensidade média de fluorescência (IMF) do CD34 *versus* contagem de leucócito e porcentagem de blasto em sangue periférico.

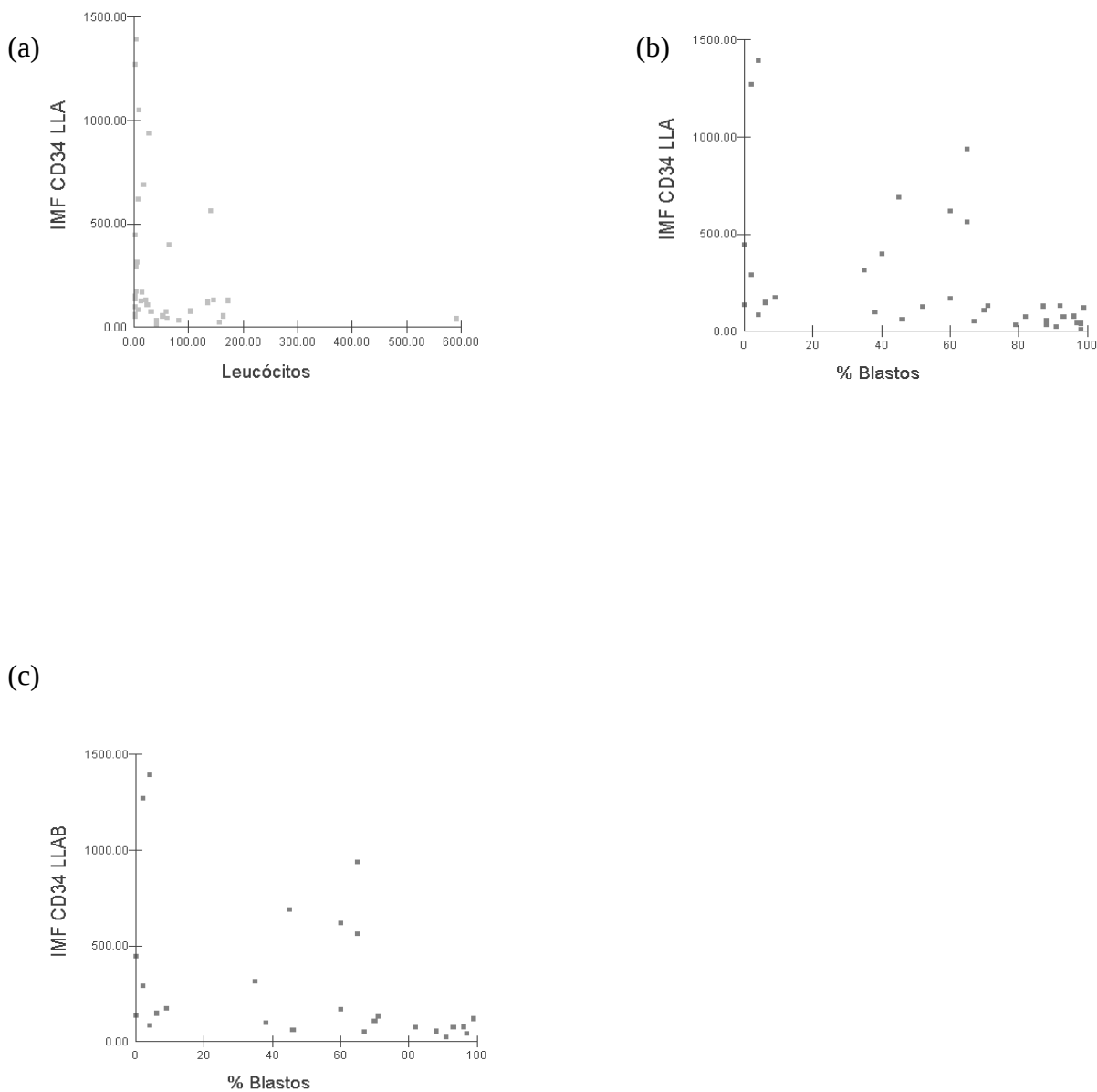


Figura 10: Gráficos de dispersão da intensidade de fluorescência (IMF) do CD34 *versus* número de leucócito e porcentagem de blastos em sangue periférico de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA. (a) Gráfico de dispersão da IMFCD34 *versus* número de leucócitos de pacientes com LLA. (b) Gráfico de dispersão da IMFCD34 *versus* porcentagem de blastos em sangue periférico de pacientes com LLA. (c) Gráfico de dispersão da IMFCD34 *versus* porcentagem de blastos em sangue periférico de pacientes com LLA B.

APÊNCICE 5 – Artigo Científico

Título original: Caracterização Imunofenotípica das Leucemias Agudas em Centro Oncológico de Referência no Nordeste do Brasil.

E. P. Noronha^{1,3}, H. T. Marinho^{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: Caracterização Imunofenotípica de Leucemias Agudas

Palavras chaves: Leucemia Linfóide Aguda, Leucemia Mielóide Aguda, Imunofenotipagem, Expressão anômala, Prognóstico.

Agradecimentos: Pesquisa apoiada pela Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) e CAPES. E. P. Noronha e H.T Marinho 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: eldanoronha@yahoo.com.br; rago@usp.com.br

Resumo

A avaliação da incidência dos subtipos de leucemias agudas (LA) no mundo tem mostrado variações importantes em relação à distribuição geográfica. A presente pesquisa objetivou determinar o perfil imunofenotípico dos subtipos de LA no centro oncológico de referencia do Estado do Maranhão e relacionar a expressão de fenótipos aberrantes em crianças com Leucemia Linfóide Aguda (LLA) com fatores prognósticos. Diagnosticou-se 70 casos de LA, com base no hemograma, mielograma, citoquímica e imunofenotipagem. Entre os pacientes adultos (n=22), 22,7% foram diagnosticados como LLA e 77,3% como leucemia mielóide aguda (LMA), sendo o subtipo LMA M0 mais freqüente. Em crianças (n = 48), 77,1% dos pacientes foram diagnosticados como LLA, 18,7% como LMA, sendo mais freqüente o subtipo LMA M4 e 4,2% como leucemia bifenotípica aguda (BAL). Entre as LLA, em crianças, a LLAB representou 73% dos casos e a LLA T 27%. O pico de incidência da LLA foi entre 1 e 4 anos. Na LLA e LMA houve expressão anômala em 45,2% e 26,9% dos casos, respectivamente. Na LLA, em crianças, não se encontrou diferença estatisticamente significativa, entre os grupos com e sem expressão anômala, em relação aos parâmetros hematológicos e resposta ao tratamento. A utilização da imunofenotipagem para o diagnóstico de LA em nosso estado permitiu diagnosticar casos de LMA minimamente diferenciadas (LMA M0), bem como as LLAT ocorridas com elevada freqüência em nossa população, sugerindo que podem haver diferenças na prevalência dos subtipos FAB da LMA, assim como dos subtipos de LLA, em diferentes regiões do Brasil.

Introdução

As leucemias agudas compreendem um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas pela rápida e descontrolada expansão clonal de células progenitoras do sistema hematopoiético (1). São as neoplasias mais comuns na infância, variando de 15 a 45% de todas as doenças malignas diagnosticadas em crianças (2).

As leucemias agudas são classificadas, de acordo com a linhagem celular, em dois grandes grupos: leucemias linfóides agudas (LLA) e leucemias mielóides agudas (LMA). Um pequeno número de pacientes cujos blastos apresentam simultaneamente antígenos das linhagens mielóide e linfóide, são caracterizados como portadores de leucemias mistas, híbridas ou bifenótípicas agudas (BAL) (3,4). As LMA e LLA cujos blastos possuem um ou dois antígenos de outra linhagem, mas sem critério de pontuação para uma leucemia bifenotípica aguda, são denominadas respectivamente como leucemias mielóides com expressão anômala linfóide e leucemias linfóides agudas com expressão anômala mielóide (5,6). A ocorrência de expressão anômala (ou fenótipos aberrantes) é reportada com variada frequência e seu valor prognóstico é controverso entre vários estudos (7).

A avaliação da incidência dos subtipos de leucemias no mundo tem mostrado variações importantes em relação à distribuição geográfica, sexo, idade, raça e condições sociais, sugerindo que possam existir diferentes fatores etiológicos (8,9). Portanto, é de grande importância estudos adicionais da frequência dos diferentes subtipos de leucemias agudas em diferentes regiões, com diferentes características socioeconômicas, como no Nordeste do Brasil, onde esses dados são escassos.

O presente estudo propõe-se a determinar o perfil imunofenotípico dos subtipos de leucemias agudas de pacientes atendidos em centro oncológico de referência no Estado do

Maranhão para o tratamento de leucemias agudas e relacionar a expressão de fenótipos aberrantes em crianças com Leucemia Linfóide Aguda (LLA) com fatores prognósticos.

Pacientes e Métodos

Foram incluídos 70 pacientes, adultos (≥ 18 anos) e crianças (< 18 anos), diagnosticados com leucemia aguda *de novo* no período de setembro de 2008 a janeiro de 2010 tratados no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB), São Luís, Maranhão, Brasil. Foram excluídos os pacientes que se recusaram ou que os responsáveis não permitiram a entrada no estudo (n=1) e os casos de crise blástica de leucemia mielóide crônica (n=2).

Coletaram-se os seguintes dados dos pacientes: sexo, idade e a ocorrência de óbitos antes do final da fase de indução de crianças com LLA. Para avaliação da resposta ao tratamento de crianças com LLA 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=10) foram considerados como pacientes que não entraram em remissão. Crianças com LLA foram tratados com base no protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Infantis, GBTLI/99¹⁰, onde pacientes com LLAB foram tratados na fase de indução com Dexametasona ($6\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$), 3 doses diárias por 4 semanas; Vincristina ($1,5\text{ mg}/\text{m}^2/\text{sem}$) e Daunorrubicina ($25\text{ mg}/\text{m}^2/\text{semana}$) nos dias 0,7,14 e 21; L-asparaginase ($5000\text{ UI}/\text{m}^2/\text{dia}$), 9 doses entre os dias 3 a 5 e administradas 3 vezes por semana; e MADIT (combinação de metotrexato, citarabina e dexametasona administrada intratecalmente) com doses ajustadas de acordo com a idade do paciente foram administradas nos dias 0,14 e 28¹⁰. Pacientes com LLA T foram tratados com as mesmas drogas descritas anteriormente, mas com as seguintes modificações: Daunorrubicina ($35\text{ mg}/\text{m}^2/\text{dose}$) nos dias 0, 28 e 42 e Metotrexato ($1\text{ g}/\text{m}^2/\text{dose}$) nos dias 7 e 21.

O diagnóstico das leucemias agudas foi feito com base no hemograma, mielograma, provas citoquímicas (mieloperoxidase, α -naftil acetato esterase e ácido periódico de Schiff) e imunofenotipagem por citometria de fluxo. As LMA foram classificadas de acordo com os critérios da classificação Franco-Americana-Brirânica (FAB) (11-13) e do Grupo Europeu para Caracterização Imunológica das Leucemias (EGIL) (5). A classificação das LLA foi feita com base nos conceitos do grupo EGIL (5).

Para a imunofenotipagem utilizou-se amostras de sangue periférico ou medula óssea colhidos em EDTA. As amostras foram processadas em até quatro horas após a coleta.

Para o diagnóstico imunofenotípico das leucemias agudas utilizou-se anticorpos monoclonais (AcMo) marcados com dois ou três fluorocromos por tubo: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e proteína piridina de clorofila (PerCP).

Utilizou-se anticorpos monoclonais (Becton Dickinson, San José CA, USA) contra antígenos T (CD1a, CD2, CD3 (citoplasma), CD4, CD5, CD7 e CD8), antígenos B (CD10, CD19, CD22(citoplasma), CD79a (citoplasma) e IgM (citoplasma e membrana), antígenos de diferenciação mielóide (CD13, CD33, CD117 e MPO), monocítica (CD14 e CD64), eritróide (alfa-glicoforina), plaquetária (CD61 e CD41a), antígeno de linhagem não específica (CD45) e antígenos de células precursoras (CD34, HLA-DR).

Para as marcações de membrana e intracitoplasmática utilizaram-se uma concentração de 1×10^6 células/100 μ L. Para a marcação em membrana as amostras foram incubadas com 5 μ L de cada anticorpo por 20 minutos. As hemácias foram lisadas com 2 mL da solução de lise FacsLysing da BD diluída 1:10, em seguida foram lavadas com 2 mL de tampão fosfato (PBS) 1x (pH = 7,4). Para a marcação intracitoplasmática, utilizou-se a solução FACSPermeabilizing (Becton Dickinson-BD) de acordo com o recomendado pelo fabricante.

A aquisição e análise das amostras foram feitas no citômetro de fluxo FACSCalibur™ da Becton Dickinson – San Jose – Califórnia – USA, usando o programa CellQuest™ (BD), após calibração do citômetro com o kit Calibrite beads (BD), através do programa FacsComp™ (BD).

Realizou-se a compensação dos fluorocromos através de linfócitos marcados com CD4 FITC/CD8 PE/CD3PerCP, eliminando as sobreposições antes da aquisição dos dados. Foram adquiridos 10.000 eventos no *gate* de blastos em todos os casos.

Utilizou-se o *dot plot* CD45 x Complexidade (SSC) para delimitar a área específica dos blastos. Em seguida, foi utilizada a estratégia de *back gate*, para identificar a população de blastos no gráfico de tamanho *versus* granulosidade (FSC X SSC), que serviu de base para analisar todos os outros painéis. Os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas. O limiar para positividade foi baseado no controle negativo da amostra, sendo os marcadores considerados positivos quando expressados em mais de 20% das células do *gate*. A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão.

Análise estatística

Foi feita a análise exploratória e descritiva inicial dos dados. Utilizou-se o teste de Shapiro Wilk para testar a normalidade da distribuição das variáveis quantitativas. As variáveis estudadas apresentaram distribuição assimétrica, assim, utilizaram-se testes não-paramétricos.

A comparação de parâmetros hematológicos entre o grupo de pacientes com e sem expressão anômala, foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para a avaliação da distribuição da variável nominal, resposta a indução, entre as categorias das co-variáveis; e para avaliação da frequência da expressão anômala entre LLAB

e LLAT bem como entre LLA e LMA foram aplicados os testes Exato de Fisher e Qui-Quadrado.

Para todos os testes foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Foram estudados 70 pacientes com leucemia aguda *de novo*, a tabela 1 mostra a incidência dos tipos de leucemias na população estudada.

A LLA B representou 73% (27/37) dos casos de LLA em crianças, e a LLA T 27% (10/37) dos casos. Entre as LLA B, o subtipo imunológico LLA BII (B comum) foi o mais freqüente 51,6% (16/31) (tabela 2).

A mediana da idade de crianças com LLAB foi de 4 anos (variação de 1-16 anos) e na LLA T a mediana foi de 8 anos (variação de 2-17 anos). O pico de incidência da LLA em crianças foi entre a idade de um e quatro anos, representando 40,5% (22/37) dos casos de LLA diagnosticados em crianças. Nos adultos a mediana de idade da LLA foi 24 anos (variação de 19-56 anos). A proporção dos casos do sexo masculino para o feminino em crianças com LLA foi de 3,1:1,0. Para as LLAB e LLAT, isoladamente, a proporção foi de 3,5:1,0 e 2,3:1,0, respectivamente.

A tabela 3 mostra as características hematológicas dos subtipos de LLA. Observa-se que a LLAT apresentou leucometria mais elevada com mediana acima de $50 \times 10^3/\mu\text{L}$. Em relação à dosagem de hemoglobina, a LLA BI foi que apresentou menor mediana (6,4 g/dl). Todos os subtipos apresentaram plaquetopenia, com mediana menor que $50 \times 10^3/\mu\text{L}$.

Dentre os marcadores utilizados na caracterização da LLA B, o CD79a e CD22, em citoplasma, apresentaram maior taxa de positividade (100%), seguido pelo CD19 (86,6%). O CD10 e o marcador de células imaturas HLA-DR apresentaram taxa de positividade de 83,3% e 95%, respectivamente. A expressão da IgM em citoplasma (citIgM) teve uma taxa de

positividade de 33%, sendo positiva em nove casos, os quais foram classificadas como LLA BIII (pré-B). O marcador de células imaturas CD34 foi expresso em 61,2% dos casos e o CD45 em 87%. Dos marcadores mielóides, o CD13 foi o mais freqüente (48,2%).

Na caracterização imunofenotípica das LLA T, os marcadores citCD3, CD5, CD7 e CD8 apresentaram taxa de positividade de 100%. O marcador CD2, CD1a, CD4, HLA-DR e CD10 apresentaram taxa de positividade de 85,7%, 57,1%, 40%, 10% e 9,1%, respectivamente. O CD34 foi expresso em 54,5% dos casos e o CD45 em todos os casos. O CD13 foi o marcador mielóide mais freqüente (36,3%).

Houve expressão anômala em 48,4% dos casos das LLAB (15/31) e 36,4% (4/11) das LLAT. Não houve diferença estatisticamente significativa entre LLAB e LLAT em relação à freqüência da expressão anômala (tabela 4).

Não se encontrou diferença estatisticamente significativa, nos parâmetros hematológicos e na resposta a indução, nas LLAs em crianças com e sem expressão anômala, (tabela 5), embora o número de pacientes que alcançaram a remissão tenha sido maior no grupo com expressão anômala (LLA My⁺) (80%) em comparação ao grupo sem expressão anômala (LLA My⁻) (62%).

A distribuição das LMA de acordo com os critérios FAB demonstrou que o subtipo LMA M4 (3/9; 33,4%) foi o mais freqüente em crianças. Em adultos, o subtipo predominante foi o LMA M0 (5/17; 29,4%) (tabela 6).

Os pacientes adultos apresentaram mediana de idade de 35 anos (variação 19 - 67 anos), e crianças mediana de idade de 8 anos (variação 1 - 15 anos). A proporção do sexo masculino para o feminino nas LMA foi de 1,3: 1.

A tabela 7 mostra as características hematológicas dos subtipos de LMA. Observa-se que a LMA M1 apresentou contagem de leucócito mais elevada com mediana de $50,5 \times 10^3/\mu\text{L}$. Em relação à dosagem de hemoglobina os subtipos de leucemias apresentaram

medianas com valores muito próximos, variando de 7,1 g/dL (LMA M0) a 8,5 g/dL (LMA M1). Todos os subtipos apresentaram plaquetopenia.

Dos marcadores utilizados na caracterização das LMA, o CD117 e o CD13 foram os que apresentaram maior taxa de positividade (100%), seguidos pelo CD33 (96,1%). A MPO apresentou taxa de positividade de 73,9%. O CD14 e o CD64 apresentaram taxa de positividade de 29,1% e 33,3%, respectivamente. Os marcadores de células imaturas CD34, HLA-DR e CD117 tiveram taxa e positividade de 69,2%, 63% e 100% respectivamente. Apenas um, dos cinco casos diagnosticados como LMAM3 expressou o CD34, nenhum expressou HLA-DR. O CD45 foi expresso em 92,3% dos casos.

Houve expressão anômala em 27% dos casos diagnosticados, sendo a expressão do CD7 a mais freqüente (19,2%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre LLA e LMA em relação à freqüência da expressão anômala (tabela 8).

Discussão

O presente estudo é a primeira pesquisa realizada no Maranhão na caracterização do perfil imunofenotípico das leucemias agudas, determinando assim os diversos subtipos imunológicos destas patologias.

A maioria dos casos de LLA (88,1%) avaliados em nossa pesquisa foi diagnosticada em crianças, o que condiz com os dados epidemiológicos já descritos, os quais reportam que a freqüência desta neoplasia é muito mais baixa em adultos (14,15). No presente estudo as LLA em adultos representaram apenas 22,7% do total de casos de leucemias agudas desta faixa etária.

A incidência da LLA é maior no sexo masculino do que no feminino, independentemente da faixa etária. Em pesquisa envolvendo crianças do Rio de Janeiro, Distrito Federal e Bahia foi verificado uma proporção do sexo masculino para o feminino de 1,2:1 (9). Em Pernambuco essa proporção foi de 1,7:1 (16), em Ribeirão Preto foi de 1,8:1

para o total de LLA, e com uma proporção ainda maior do sexo masculino para a LLA T 4,2:1 (17). No presente estudo, para o total das LLA encontrou-se uma proporção do sexo masculino maior (3,1:1) do que descrito em outros estados brasileiros, sendo a proporção do sexo masculino para o feminino maior na LLA B (3,5:1) do que na LLA T (2,3:1).

Em relação aos subtipos de LLA, este trabalho revelou que 73,8% foram classificados como LLAB e 26,2% casos como LLAT. Nos subtipos de LLAB demonstrou-se que a LLAB-II (B comum) foi o subtipo mais freqüente. Estes resultados são semelhantes a outras pesquisas, exceto pela alta freqüência da LLA T, em crianças, que na população maranhense se apresentou com uma maior freqüência (27%), do que normalmente é descrito na literatura (7,3% a 16%) (9,17,18). Entretanto, em outros estudos como em crianças Marroquinas, Bachir et al. (19) encontraram uma freqüência de 21,1% de LLA T, e em estudo realizado na Índia, por Rajalekshmy et al. (20) a freqüência foi de 45,9% para LLAT em crianças. Em Recife essa freqüência foi de 18,5% (16), semelhante a Minas Gerais (18%) (21).

A elevada freqüência da LLA T está associada à condição sócio-econômica desfavorável (baixa renda *per capita*) como evidenciado em trabalho realizado no Brasil (21). Outro fator associado à elevada freqüência da LLA T é em relação à raça, onde os não-brancos possuem uma maior freqüência do fenótipo T (9). Levando-se em consideração que o Estado do Maranhão é o segundo Estado mais pobre do Brasil, e com um predomínio de população não branca, estes fatos podem justificar a alta incidência da LLA T encontrada na presente pesquisa.

Em relação às LMA, pôde-se observar nesta pesquisa que esta doença foi muito mais freqüente em adultos (65,4%) do que em crianças (34,6%), estando de acordo com o que é descrito na literatura (22).

Sob outro aspecto, ao se analisar o total de pacientes estudados, nossos resultados apontam que as LMA apresentaram-se com uma frequência muito menor (37,1%) do que as LLA (60%). Resultado semelhante foi descrito por REGO et al. (14), no Estado do Piauí onde a frequência de LLA foi o dobro de LMA.

Em relação à idade dos pacientes com LMA, pode-se constatar na população estudada que a mediana obtida foi mais baixa que a de pacientes com LMA em países desenvolvidos (23,24), mas semelhante a outros estudos realizados no Brasil (14, 25,26). Isto se justifica pelo fato de que os países desenvolvidos têm uma maior concentração de população idosa e elevada expectativa de vida, diferente do Brasil, em especial no Nordeste, que tem baixa expectativa de vida e, conseqüentemente, o número da população idosa é bem menor, como também constatado pelo trabalho de REGO et al.(14). Como a maior incidência de LMA é em maiores de 60 anos (21), justifica-se assim a baixa incidência da doença na população maranhense.

Em relação à distribuição dos subtipos FAB, houve o predomínio da LMA M4 seguido do subtipo LMA M1 em crianças. Resultado semelhante foi encontrado em pesquisa realizada em São Paulo (27). Já em Minas Gerais foi encontrada uma maior frequência dos subtipos M2 e M3 (28). Em estudo do grupo Berlim-Frankfurt-Münster (BFM) na Alemanha, constatou-se uma maior frequência do tipo M4 e M5 (29).

Nos adultos o subtipo M0 foi o que apresentou maior frequência, seguido dos subtipos M2 e M3 que tiveram frequência igual. Excetuando-se o tipo M0 que é considerado um tipo menos comum de leucemia, constituindo aproximadamente 2 a 3% das leucemias mielóides (30), os subtipos M2 e M3 são bem freqüentes na população brasileira (14, 25, 26,31). De acordo com Rego et al (14), a distribuição dos subtipos FAB não é tão regular, demonstrando grandes variações geográficas, possivelmente devido a fatores étnicos e ambientais.

Em outros estudos realizados no Brasil pode-se verificar que há diferenças quanto à distribuição dos subtipos morfológicos das leucemias agudas. Entre Campinas-SP e Teresina-PI constataram que o subtipo mais comum em Teresina foi o M2, seguido por M4 e M5 que tiveram frequências iguais, ao passo que em Campinas-SP constatou-se uma maior frequência do subtipo M4 seguido pelo subtipo M3. (14). Em São José dos Campos – SP constatou-se uma maior prevalência do subtipo M1 seguido do M2. (31). No Rio de Janeiro encontraram maior frequência de M2, seguido de M3 e M4 com distribuição igual (25), e no Rio Grande do Sul encontrou-se uma maior frequência de M2 seguido de M1 (26).

No presente estudo a elevada incidência do subtipo FAB M0 é baseada em amostras obtidas de uma única instituição e deve-se enfatizar que o número de pacientes estudados pode não ser representativo de toda a região. Observa-se problemas similares em outros estudos (25, 26,31). Além disso, a maioria desses estudos (14, 25, 26) que demonstram a distribuição dos subtipos morfológicos FAB são estudos retrospectivos, realizados através de análise de prontuários, e muitos deles, não incluem a imunofenotipagem como diagnóstico para LMA, ou o diagnóstico imunofenotípico foi implantado muito tempo depois do início da coleta de dados, isto provavelmente pode subestimar a frequência dos subtipos FAB M0 na população brasileira.

Diversos estudos em países desenvolvidos, utilizando além da morfologia e citoquímica, a imunofenotipagem, encontraram frequências relativamente maiores dos subtipos M0 dentre as LMA, como os trabalhos de Suárez et al. (32) na Europa, de Kaleem et al., (33) nos EUA e Chang et al., (23) no Canadá, que encontraram, respectivamente 15%, 17,6% e 9,5%.

Em relação ao perfil dos marcadores utilizados podemos constatar que foram eficiente no diagnóstico e classificação dos subtipos de leucemias agudas, sendo inclusive

tomado por base o critério da classificação imunológica das leucemias agudas, Classificação EGIL (BENE et al., 1995).

Neste estudo, 45,2% dos casos de LLA tiveram expressão anômala, sendo o marcador CD13 o mais freqüente, resultado semelhante foi descrito por Putti et al. (34), Den Boer et al. (35), e Bachir et al. (19). A freqüência da co-expressão mielóide foi maior na LLA B (48,4%) do que na LLA T (36,4%), porém sem diferença significativa. Den Boer et al. (25) e Abdelhaleem (36) acharam também uma maior freqüência na LLA B, porém apenas o último achou diferença significativa na comparação entre as duas. Na LMA houve expressão anômala em 26,9% dos casos, sendo o marcador CD7 mais freqüente, estando de acordo com Zheng et al. (37).

Fatores prognósticos associados à expressão anômala na LLA, em crianças, são controversos. Putti et al. (34), e Pui et al. (38) não encontraram associação significativa com fatores prognósticos adversos. Riley et al. (39) descreveu que a expressão anômala nas LLA, tanto em adultos quanto em crianças, é associada significativamente com uma curta sobrevida livre de eventos, curta duração da primeira remissão, e altas taxas de recaída na fase de tratamento.

Na presente pesquisa não se encontrou diferença, na LLA em crianças, entre pacientes com e sem expressão anômala, em relação a fatores prognósticos, embora o número de pacientes que alcançaram a remissão foi maior no grupo com expressão anômala, estes resultados são semelhantes aos encontrado por Bhushan et al. (7).

A literatura reporta grande variação de dados em relação à freqüência das expressões anômalas nas leucemias agudas. Talvez isso possa justificar o porquê de não serem encontrados dados consistentes a respeito do valor prognóstico das expressões anômalas nas leucemias agudas. Essas variações podem ter diversas explicações, entre elas pode-se citar a utilização de diferentes fluorocromos, diferentes tipos de clones dos anticorpos

monoclonais, as características das amostras, a técnica e análise utilizadas, o número e as características dos pacientes, bem como o protocolo de tratamento utilizado.

Seria necessário aumentar o tempo de observação e o número de pacientes para se estudar melhor parâmetros avaliados nessa pesquisa, como a expressão anômala e do marcador CD34, bem como os subtipos de leucemias na sobrevida dos pacientes.

A implantação do serviço de imunofenotipagem em nosso estado permitiu diagnosticar casos de leucemias mielóides agudas minimamente diferenciadas (LMA M0), bem como as LLA T ocorridos com elevada frequência em nossa população, sugerindo que podem haver diferenças na prevalência dos subtipos FAB da LMA, assim como dos subtipos de LLA, em diferentes regiões do Brasil. Além disso todos estes casos, sem a análise imunofenotípica poderiam comprometer o diagnóstico e, por conseguinte, a escolha mais apropriada de tratamento.

Referencias

1. McCulloch EA. Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis (Henry Stratton Lecture, 1982). *Blood* 1983; 62:1-13.
2. Reis RS, Santos MO, Thuler LCS. Incidência de tumores pediátricos no Brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007; 53:5-15.
3. Killick S, Matutes E, Powles RL, Hamblin M, Swansbury J, Treleaven JG, et al. Outcome of biphenotypic acute leukemia. *Haematologica* 1999; 84: 699-706.
4. Lee PS, Lin CN, Liu C, Huang CT, Hwang WS. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127:93-95.
5. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposal for the immunological classification of acute leukemias: European Group for the Immunological characterization of leukemia (EGIL). *Leukemia* 1995 ; 9 :1783-1786.
6. European Group for the Immunological classification of Leukaemias (EGIL). The value of c-kit in the diagnosis of biphenotypic acute leukemia. *Leukemia* 1998;12:2038.
7. Bhushan B, Chauhan PS, Saluja S, Verma S, Mishra AK, Siddiqui S, et al. Aberrant phenotypes in childhood and adult acute leukemia and its association with adverse prognostic factors and clinical outcome. *Clin Exp Med* 2010;10:33-40.
8. Groves FD, Linet MS, Devessa SS. Patterns of occurrence of the leukaemias. *Eur J Cancer* 1995; 31: 941-949.
9. Pombo-de-Oliveira MS, Cordoba JC, Alencar D M, Campos MM, Carriço K, Dobbin J, et al. Biological diversity variations of pediatric acute leukemia in Brazil: contribution of immunophenotypic profiles to epidemiological studies. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 2005; 27: 21-26.
10. Cazé MO, Bueno D, Santos MEF. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. *Rev HCPA* 2010; 30:5-12.

11. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol* 1976;33:451-458.
12. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Group. *Ann of Intern Med* 1985;103:620-625.
13. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML M0). *Br J Haematol* 1991;78:325-329.
14. Rego MFN, Pinheiro, GS, Metze K, Lorand-Metze. Acute leukemias in Piauí: comparison with features observed in other regions of Brazil. *Braz J Med Biol* 2003; 36: 331-337.
15. Knox-Macaulay HH, Brown LC. Descriptive epidemiology of de novo acute leukaemia in the Sultanate of Oman. *Leuk Res* 2000; 24:589–594.
16. Leite EP, Muniz MTC, Azevedo ACAC, Souto FR, Maia ACL, Gondim CMF, et al. Prognostic factors in children and adolescents with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant* 2007; 7: 413-421.
17. Rego EM, Garcia AB, Viana SR, Falcão RP. Characterization of acute lymphoblastic leukemia subtypes in Brazilian patients. *Leuk Res* 1996; 20: 349-355.
18. Pombo de Oliveira MS, Koifman S, Vasconcelos GM, Emerenciano M, de Oliveira Novaes C. Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 2009; 42: 121–125.
19. Bachir F, Bennani S, Lahjouji A, Cherkaoui S, Harif M, Khattab M, et al. Characterization of Acute Lymphoblastic Leukemia Subtypes in Moroccan Children. *Int J Pediatr*, 2009; 674801 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20041009>. Acesso junho 21, 2010.

20. Rajalekshmy KR, Abitha AR, Pramila R, Gnanasagar T, Shanta V. Immunophenotypic analysis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia in Madras, India. *Leuk Res* 1997; 21:119-124.
21. Paes CA, Viana MB, Freire RV, Martins-Filho OA, Taboada DC, Rocha VG. Direct association of socio-economic status with T-cell acutelymphoblastic leukaemia in children. *Leuk Res* 2003; 27:789–794.
22. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006; 368:1894–907.
23. Changa H, Salmaa F, Yib Q, Pattersona B, Brienac B, Mindenc MD et al. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2004; 28: 43–48.
24. Al-Mawali A, Gillis D, Hissaria P, Lewis I. Incidence, Sensitivity, and Specificity of Leukemia-Associated Phenotypes in Acute Myeloid Leukemia Using Specific Five-Color Multiparameter Flow Cytometry. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 934-945.
25. **Pulcheri W, Spector N, Nucci M, de Moraes JC, Pimenta G, de Oliveira HP.** The treatment of acute myeloid leukemia in Brazil: Progress and obstacles. *Haematologica* 1995;80:130-135.
26. Bittencourt R, Fogliato L, Daudt L, Bittencourt HNS, Friederich JR; Flavo Fernandes, et al. Acute Myelogenous Leukemia: two decades overview - hematology Service Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2003; 25: 17-24.
27. Zanichelli MA, Cristófani LM, Almeida MTA; Maluf Júnior PT, Filho VO et al. Pediatric acute myeloid leukemia outcomes after conventional treatment. *Rev bras hematol hemoter* 2006; 28:246-252.
28. Viana MB, Cunha KCCMS, Ramos G, Murao, M. Acute myeloid leukemia in childhood: a fifteen-year experience in a single institution. *J Pediatr* 2003;79:489-96.

29. Creutzig U, Harbott J, Sperling C, Ritter J, Zimmermann M, Löffler H, et al. Clinical significance of surface antigen expression in children with acute myeloid leukemia: results of study AML-BFM-87. *Blood* 1995;86:3097-310.
30. Kotylo PK, Seo I, Smith FO, Heerema NA, Fineberg NS, Miller K, et al. Flow Cytometric Immunophenotypic Characterization of Pediatric and Adult Minimally Differentiated Acute Myeloid Leukemia (AML-M0). *Am J Clin Pathol* 2000;113:193-200.
31. Callera F, Mulin CC, Rosa E S, Melo D B, Melo CMT. High prevalence of morphological subtype FAB M1 in adults with *de novo* acute myeloid leukemia in São José dos Campos, São Paulo. *Sao Paulo Med J* 2006;124:45-47.
32. Suárez L, Vidriales MB, García-Laraña J, Sanz G, Moreno MJ, López A, et al. CD34+ Cells from Acute Myeloid Leukemia, Myelodysplastic Syndromes, and Normal Bone Marrow Display Different Apoptosis and Drug Resistance–Associated Phenotypes. *Clin Cancer Res* 2004;10:7599–7606.
33. Kaleem Z, Crawford E, Pathan MH, Jasper L, Covinsky MA, Johnson LR, et al. Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:42-48.
34. Putti MC, Rondelli R, Cocito MG, Aricó M, Sainati L, Conter V, et al. Expression of myeloid markers lacks prognostic impact in children treated for acute lymphoblastic leukemia: Italian experience in AIEOP-ALL 88-91 studies. *Blood* 1998;92:795-801.
35. Den Boer ML, Kapaun P, Pieters R, Kazemier KM, Janka-Schaub GE, Veerman AJ. et al. Myeloid antigen co-expression in childhood acute lymphoblastic leukaemia: relationship with in vitro drug resistance. *Br J Haematol* 1999;105: 876-882.
36. Abdelhaleem, M. Frequent but nonrandom expression of myeloid markers on *de novo* childhood acute lymphoblastic leukemia. *Exp Mol Pathol* 2007;83:138-141.

37. Zheng J, Wang X, Hu Y, Yang J, Liu J, He Y, et al. A correlation study of immunophenotypic, cytogenetic, and clinical features of 180 AML patients in China. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74B:25–29.
38. Pui CH, Behm FG, Singh B, Rivera GK, Schell MJ, Roberts WM, et al. Myeloid-associated antigen expression lacks prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukemia treated with intensive multiagent chemotherapy. *Blood* 1990;75:198-202.
39. Riley RS, Massey D, Jackson-Cook C, Idowu M, Romagnoli G. Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002;16:245-299.

Tabela 1: Frequência quanto ao tipo de leucemia aguda (LA), por faixa etária, de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA, no período de setembro de 2008 a janeiro de 2010.

Tipo de Leucemia Aguda	Total de casos	Crianças	Adultos
	<i>n</i> = 70	<i>n</i> = 48 (68,6%)	<i>n</i> = 22 (31,4%)
Leucemia Linfóide Aguda (LLA)	42 (60%)	37 (77,1%)	5 (22,8%)
Leucemia Mielóide Aguda (LMA)	26 (37,1%)	9 (18,7%)	17 (77,3%)
Leucemia Bifenotípica Aguda (BAL)	2 (2,9%)	2 (4,2%)	-

Tabela 2: Distribuição dos subtipos de LLA e sexo de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Subtipos	SEXO	Total de casos	Crianças	Adultos
imunológicos de LLA	M/F			
LLA B	23/8	31 (73,8%)	27 (73%)	4 (80%)
LLA BI*	3/0	3 (9,7%)	3 (11,2%)	-
LLA BII*	10/6	16 (51,6%)	14(51,8%)	2(50%)
LLA BIII*	7/2	9 (29%)	8 (29,6%)	1(25%)
LLA BIV*	2/0	2(6,5%)	2 (7,4%)	-
LLA B**	1/0	1 (3,2%)	-	1(25%)
LLAT	8/3	11 (26,2%)	10 (27%)	1 (20%)
LLA Total	31/11	42 (100%)	37(100%)	5 (100%)

*o valor se refere à porcentagem de cada subtipo, calculado com base no total de número de casos de LLA B de cada faixa etária.

M-masculino ; F-feminino

**um caso não pôde ser sub-classificado de acordo com a fase maturativa pela escassez do material avaliado.

Tabela 3: Parâmetros hematológicos do hemograma dos subtipos de leucemia linfóide aguda ao diagnóstico, de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Parâmetros	Subtipos de LLA				
Hematológicos	LLA BI	LLA BII	LLA BIII	LLA BIV	LLA T
Leucócitos x 10³/μL	23,2 (2,35-102)	19,5 (1,44-157)	3,1 (1,13-135)	4,6 (2,3-6,9)	81,0 (9,1-591)
Hemoglobina g/dl	6,4 (6,0-6,6)	8,3 (3,4-12,9)	8,8 (7,0-10,9)	11 (9,3-12,7)	9,4 (6,5-12,5)
Plaquetas x 10³/μL	12,0 (12-13)	18,0 (6,0-111)	45,0 (22-160)	33,5 (29-38,1)	39,0 (14-157)
% de blastos	70,0 (46-96)	65 (0-97)	21,0 (0-99)	5 (4-6)	88 (4-98)

Valores em mediana (variação)

Tabela 4: Frequência da expressão anômala na LLAB e LLAT de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Subtipo de LLA	Expressão anômala		Total
	ausente	presente	
LLAB	16 (51,6%)	15 (48,4%)	31
LLAT	7 (63,6%)	4 (36,4%)	11
Total	23	19	42

Aplicou-se o teste Exato de Fisher; $p = 0,726$

Tabela 5: Avaliação da expressão anômala nas LLA em relação aos parâmetros hematológicos e resposta a indução, em crianças do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Parâmetros hematológicos e clínicos	<i>p</i>	LLA My⁺ n=15	LLA My⁻ n=22
Leucócitos x 10³/μL[□]	<i>p</i> = 0,361	41,2 (1,13-591,0)	13,65 (1,44-172,0)
Hemoglobina x g/dl[□]	<i>p</i> = 0,757	9,1 (5,6 -11,0)	8,35 (5,1-12,9)
Plaquetas x 10³/μL[□]	<i>p</i> = 0,938	22,0 (6,0-160,0)	32,5 (8,0-137,0)
% Blastos em sangue periférico[□]	<i>p</i> = 0,268	70,0 (2-99)	60,0 (0-96)
Pacientes em remissão/ pacientes sem remissão[■]	<i>p</i> = 0,295	12/3	13/8*

Parâmetros Hematológicos: valores expressos em mediana (variação)

LLA My⁺ : Leucemia linfóide aguda com expressão anômala mielóide

LLA My⁻ : Leucemia linfóide aguda sem expressão anômala mielóide

[□] Aplicou-se teste de Mann-Whitney

[■] Aplicou-se o teste Exato de Fisher

* um paciente abandonou o tratamento antes do final da indução

Tabela 6: Frequência quanto aos subtipos FAB e sexos dos pacientes com LMA do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Subtipos FAB de LMA	SEXO M/F	Total de casos	Crianças	Adultos
LMA M0	5/1	6 (23,1%)	1 (11,1%)	5 (29,4%)
LMA M1	0/4	4 (15,4%)	2 (22,2%)	2 (11,8%)
LMA M2	3/2	5 (19,2%)	1(11,1%)	4 (23,5%)
LMA M3	1/4	5 (19,2%)	1 (11,1%)	4 (23,5%)
LMA M4	5/0	5 (19,2%)	3 (33,4%)	2 (11,8%)
LMA M6	1/0	1(3,9%)	1 (11,1%)	-
Total	15/11	26 (100%)	9 (100%)	17(100%)

M – masculino; F- feminino

Tabela 7: Parâmetros hematológicos do hemograma nos subtipos de leucemia mielóide aguda de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Parâmetros	Subtipos de LMA				
Hematológicos	M0	M1	M2	M3	M4
Leucócitosx10³/μL	6,4 (1,2-189,0)	50,5 (3,1-266,0)	3,2 (2,2- 8,3)	14,4 (2,1-55,9)	24,2 (2,1-100,0)
Hemoglobina g/dL	7,1 (5,8-15,1)	8,5 (8,0-9,2)	7,8 (4,3-11,1)	7,3 (1,6-10,0)	7,8 (3,5-11,6)
Plaquetas x10³/μL	63,0 (8,0-129,0)	40,0 (4,0-253,0)	29,0 (5,0-77,6)	12,0 (10,0-26,0)	62,0 (12,0-257,0)
% de blastos	82,5 (60,0-93,0)	68,5 (23,0-97,0)	16,5 (13,0-20,0)	31,0 (2,0-98,0)	14,0 (5,0 -73,0)

Valores em mediana (variação)

Tabela 8: Frequência da expressão anômala na LLA e LMA de pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA.

Subtipo de LLA	Expressão anômala		Total
	ausente	presente	
LLA	23 (54,7%)	19 (45,3%)	42
LMA	19 (73%)	7(27%)	26
Total	42	26	68

Aplicou-se o teste Qui-Quadrado; $p= 0,199$

ANEXO

ANEXO A – 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, Elda 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		
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 anteprojeto 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 Bello do município de São Luís- 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 de fluxo.

Análise estatística: serão usados a análise de variância, método de Kaplan-Meier, teste de log-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 Batista 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; Enio Fernandes Aragão Soares; Nivânia Lisboa Camelo; Sonia Maria Pereira Cruz; Ligia 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

ANEXO B - Classificação do Qualis do Periódico na área de Medicina II e normas editoriais

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

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Trabalho completo (full-length paper). Deve especificar claramente um objetivo ou hipótese, o projeto experimental e métodos (inclusive o local de origem do estudo e o período de realização, pacientes ou participantes com critérios de inclusão e exclusão, ou fontes de dados e como eles foram selecionados para o estudo). Deve fornecer os dados essenciais de quaisquer intervenções, os resultados mais importantes do estudo, as avaliações mais importantes dos resultados, uma seção de comentários colocando os resultados no contexto da literatura existente e as conclusões. Esses trabalhos devem conter:

- resumo (não mais de 250 palavras)
- palavras chaves (não mais que 6)
- título resumido a ser usado no topo das páginas, não deve exceder 60 letras e espaços
- o texto **deve** ser dividido em sessões (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion), sem separação específica para conclusões.
- não mais que 40 referências
- autores devem especificar na carta de submissão que o trabalho está sendo submetido como full paper.

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.