

Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno Infantil –
Mestrado Acadêmico

**AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E
LABORATORIAIS COMO FATORES PREDITIVOS NO
PERÍODO DE INDUÇÃO DO TRATAMENTO DE PACIENTES
COM LEUCEMIAS AGUDAS**

Nivânia Lisboa Camelo

São Luís

2012

Nivânia Lisboa Camelo

**AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E
LABORATORIAIS COMO FATORES PREDITIVOS NO
PERÍODO DE INDUÇÃO DO TRATAMENTO DE PACIENTES
COM LEUCEMIAS AGUDAS**

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

Área de concentração:
Medicina II

Orientador:
Prof. Dr. Raimundo Antonio Gomes
Oliveira

Coordenadora:
Profa. Dra. Maria Bethânia da Costa
Chein

São Luís

2012

Nivânia Lisboa Camelo

**AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E
LABORATORIAIS COMO FATORES PREDITIVOS NO
PERÍODO DE INDUÇÃO DO TRATAMENTO DE PACIENTES
COM LEUCEMIAS AGUDAS**

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

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública considerou o candidato aprovado em ____/____/____.

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

Prof. Dr. Lidio Gonçalves Lima Neto (Examinador)
Universidade Ceuma – UNICEUMA

Prof. Dr. Manuel dos Santos Faria (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Profa. Dra. Elba Gomide Mochel (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

**São Luís
2012**

RESUMO

Introdução: Seguindo os conceitos da classificação da OMS para as leucemias agudas, vários estudos tentam identificar características clínicas, biológicas e laboratoriais que se correlacionam com o prognóstico, objetivando incorporá-las dentro do sistema de classificação de risco usado para definir a estratégia terapêutica. Este trabalho foi realizado posto não haver nenhum estudo em nosso estado correlacionando as características clínicas e laboratoriais específicas às variáveis imunológicas como fatores preditivos no tratamento de pacientes com leucemias agudas. **Objetivo:** Avaliar o valor preditivo de diferentes marcadores em SP (sangue periférico) e MO (medula óssea) no período de indução do tratamento e sobrevida livre de doença em pacientes com leucemias agudas. **Metodologia:** Foram avaliados 110 pacientes com diagnóstico de leucemia aguda por imunofenotipagem. Em SP foram analisados: o percentual de blastos, a contagem de leucócitos e plaquetas e dosagem de hemoglobina; e o percentual de blastos em MO, todos ao diagnóstico e após o tratamento, a fim de avaliar a resposta terapêutica. **Resultados:** Dos 110 pacientes 61,82% eram do sexo masculino. A maioria (80,9%) estava enquadrada na faixa etária infanto-juvenil. Quanto aos subgrupos de leucemias agudas 61,82% dos pacientes eram portadores de LLA tipo B, 12,73% de LLA tipo T e 25,45% de LMA. O percentual de blastos em MO e SP para cada um dos sub grupos de leucemia, no período de indução do tratamento não demonstrou diferença significativa, por outro lado, em estudo comparativo entre os sub grupos de leucemia, houve diferença no seu padrão de apresentação ao diagnóstico. Para as LLA -T a contagem de plaquetas no dia inicial do período de indução (D0) demonstrou diferença significativa para os pacientes que apresentaram recidiva após o período de indução. Em relação às LMA, os pacientes com menor dosagem de hemoglobina no D0 apresentaram significativa tendência à recidiva após o período de indução. A recuperação da contagem de plaqueta para LLA B no último dia do período de indução do tratamento a valores acima de 100.000/mm³ apontou para a não recidiva da doença no período de acompanhamento. **Conclusão:** O percentual de blastos em SP ou MO não demonstraram ter valor preditivo em relação à remissão de cada um destes grupos de leucemias na fase de indução do tratamento. A contagem de plaquetas abaixo de 100.000/mm³ nas LLA - T ao D0 parecem ter valor preditivo para recidiva da doença após o período de indução do tratamento. Para as LMA, os pacientes com menor dosagem de Hb no D0 apresentaram maior tendência à recidiva após o período de indução. A expressão do antígeno CD10 ao diagnóstico da doença deva ser um marcador de bom prognóstico para remissão da doença na fase de indução do tratamento. Para as LLA B, contagens de plaquetas acima de 100.000/mm³ ao D29 demonstraram valor preditivo para manutenção de não recidiva da doença após D29.

Palavras-chave: Leucemia Aguda; Valor Preditivo; Marcadores Hematológicos

ABSTRACT

Background: The recent WHO classification incorporates immunophenotypic and cytogenetic characteristics that have prognostic impact. Several studies have attempted to identify clinical, biological and laboratory findings that correlate with prognosis, in order to incorporate them within the risk classification system used to define the therapeutic strategy. This work was done since there is no study in our state correlating the clinical and laboratory variables to specific immunological as predictive factors in the treatment of patients with acute leukemia. **Objective:** To evaluate the predictive value of different markers in PB (peripheral blood) and BM (bone marrow) in the induction period of treatment and disease-free survival in patients with acute leukemia. **Methods:** We evaluated 110 patients diagnosed with acute leukemia by immunophenotyping. In PB were analyzed: the percentage of blasts, leukocyte count and platelets and hemoglobin, and percentage of blasts in BM, all at diagnosis and after treatment in order to evaluate the therapeutic response. **Results:** Of 110 patients 61.82% were male. Most (80.9%) was framed in the age group of children and adolescents. As for the subgroups of acute leukemias 61.82% of ALL patients had type B, 12.73% of ALL type T and 25.45% of AML. The percentage of blasts in BM and PB for each of the sub groups of leukemia during induction treatment showed no significant difference on the other hand, in a comparative study between the subgroups of leukemia, there was a difference in their standard of presentation to diagnosis. For T-ALL platelet count on the initial induction period (D0) showed significant difference for patients who relapsed after the induction period. Regarding AML, patients with lower hemoglobin on D0 showed a significant tendency to relapse after the induction period. The recovery of platelet count to LLA B at the last day of the induction period of the treatment to values above $100,000/\text{mm}^3$ is not pointed to the recurrence of the disease follow-up period. **Conclusion:** The percentage of blasts in BM and PB not shown to have predictive value in respect of reference of each of these groups of leukemia in the induction phase of treatment. Platelet counts below $100,000/\text{mm}^3$ in T-ALL seem to D0 have predictive value for recurrence of disease after the induction period of treatment. For AML, patients with lower Hb determination on D0 were more likely to relapse after the induction period. The CD10 antigen expression at diagnosis of the disease should be a marker of good prognosis for remission induction phase of treatment. For ALL B, platelet counts above $100,000/\text{mm}^3$ in the D29 demonstrated predictive value for maintenance of non-recurrence of disease after D29.

Keywords: Acute leukaemia; Predictive Value; Hematological Markers

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

BFM	Grupo Europeu Berlim - Frankfurt - Munique
CD	Cluster designations
CEPEC	Centro de Pesquisa Clínica
CMF	Citometria de Fluxo
D0	Dia zero
D15	Dia quinze
D29	Dia vinte e nove
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GBTLI	Grupo Brasileiro para Tratamento de Leucemias Linfóides Agudas
HUUFMA	Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
IMF	Imunofenotipagem
IMOAB	Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
LA	Leucemia Aguda
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LLA-B	Leucemia Linfóide Aguda tipo B
LLA-T	Leucemia Linfóide Aguda tipo T
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LPC-CEPEC	Laboratório de Pesquisa Clínica do Centro de Pesquisa Clínica
MPO	Antimieloperoxidase
RNA	Ácido Ribonucléico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TdT	Terminal Deoxinucleotidiltransferase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1. Percentual de blastos na medula óssea e sangue periférico entre os indivíduos portadores de leucemia linfóide aguda (B ou T) e mielóide aguda de acordo com a ocorrência de óbito durante o período de indução.....	19
Tabela 2. Distribuição dos marcadores hematológicos do dia inicial da terapia quimioterápica entre os indivíduos portadores de leucemia linfóide aguda (B ou T) e mielóide aguda de acordo com a ocorrência de recidiva durante o acompanhamento.	20
Tabela 3. Contagem de plaquetas no dia inicial do tratamento em pacientes com LLA T que recidivaram ou não no período de acompanhamento.....	21
Tabela 4: Concentração de hemoglobina no dia inicial do tratamento em pacientes com LMA que recidivaram ou não no período de acompanhamento.....	22
Tabela 5. Distribuição dos marcadores hematológicos do dia final da terapia quimioterápica entre os indivíduos portadores de leucemia linfóide aguda (B ou T) de acordo com a ocorrência de recidiva durante o acompanhamento.....	23
Tabela 6: Contagem de plaquetas no dia final do tratamento em pacientes com LLA B que recidivaram ou não no período de acompanhamento.....	24
Quadro 1: Classificação imunológica das leucemias linfóides agudas da linhagem B (EGIL, 1998)	12

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS	13
2.1 GERAL.....	13
2.2 ESPECÍFICOS	13
3 METODOLOGIA.....	14
3.1 LOCAL	14
3.2 CASUÍSTICA	14
3.2.1 Aspectos clínicos e laboratoriais	15
3.2.2 Diagnóstico das leucemias agudas por imunofenotipagem	16
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	17
3.4 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO	17
3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	17
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	17
3.7 ASPECTOS ÉTICOS	17
4 RESULTADOS.....	18
REFERÊNCIAS	25
APÊNDICE	29
ANEXOS	32
ARTIGO CIENTIFICO.....	35

1 INTRODUÇÃO

A leucemia aguda se caracteriza pela proliferação clonal da célula tronco hematopoética substituindo o tecido normal da medula óssea. A recente classificação da OMS incorpora características citogenéticas e imunofenotípicas que apresentam impacto prognóstico (CUNHA, 2005).

A LLA (Leucemia Linfóide Aguda) representa 75 - 80% de todos os casos de leucemia em crianças (RIBEIRO, 2001) e apenas 20% em adultos (BARRIOS, 2001). Pode ser definida como uma proliferação clonal maligna de células precursoras linfóides de etiologia desconhecida que leva à substituição da hematopoiese normal por células linfóides imaturas capazes de infiltrar linfonodos, baço, fígado e outros órgãos, freqüentemente seguida de neutropenia, anemia e plaquetopenia no SP (sangue periférico) (MARTINS, FALCÃO, 2000; PELLOSO, 2003).

A transformação maligna pode ocorrer durante qualquer estágio de diferenciação das células blásticas, o que explica a heterogeneidade da doença (BERG, 1992). Para um melhor diagnóstico e classificação são realizados estudos da morfologia, citoquímica, cariótipo e imunofenotipagem (CHANG, 2004). A LLA é considerada como modelo de sucesso em oncologia clínica e a primeira doença maligna disseminada a responder consistentemente à quimioterapia (MAUER, 1995).

A LMA (Leucemia Mielóide Aguda) caracteriza-se pelo crescimento descontrolado e exagerado das células indiferenciadas, chamadas "blastos", de característica mielóide. Na maioria dos casos desta doença não existe causa evidente. Sua incidência é de 1/150.000 na infância e adolescência. Apresenta-se com uma variedade de tipos de células que podem ser observadas no sangue periférico e medula óssea (HAMERSCHLAK, 2008).

Vários estudos tentam identificar características clínicas e biológicas que se correlacionam com o prognóstico, objetivando incorporá-las ao sistema de classificação de risco usado para definir a estratégia terapêutica (SMITH, 1996). Desta forma os pacientes considerados de baixo risco recebem tratamento menos intensivo, enquanto aqueles de maior risco de falha são tratados de modo mais agressivo (FRIEDMANN, 2000; PUI, 1995; PUI, 1998).

Nos últimos anos, avanços nos cuidados dos pacientes com neoplasias hematológicas têm resultado na melhoria da sobrevida e da qualidade de vida. Por outro lado, a maioria dos pacientes está sujeito a complicações graves e recebem modalidades de tratamento com potencial elevado de complicações (SOARES et al., 2005).

Diversas variáveis clínicas e laboratoriais como idade ao diagnóstico, gênero, contagem de leucócitos, de plaquetas, níveis de hemoglobina, expressão de determinados antígenos pelas células neoplásicas ou presença de translocações cromossômicas, têm valor prognóstico, são passíveis de avaliação no momento do diagnóstico 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 e TUCCI, 2008).

Nos últimos 10 anos, a IMF (imunofenotipagem) tem mantido sua posição como uma ferramenta indispensável de diagnóstico. Melhorias tecnológicas e a disponibilidade de uma gama de anticorpos e fluorocromos conduziu a uma fenotipagem mais precisa das células, levando a uma melhor identificação de populações anormais de células hematológicas (CRAIG et al., 2008).

A imunofenotipagem, realizada com a técnica de CMF (citometria de fluxo), é útil tanto no diagnóstico, classificação, prognóstico, estadiamento, monitoramento, como na caracterização fenotípica das células hematopoiéticas patológicas (BONJEAN et al., 2004; MARTINS e FALCÃO, 2000). A CMF é uma técnica multiparamétrica, que utiliza anti-corpos monoclonais marcados com fluorescência para analisar qualitativa e quantitativamente padrões de expressão de antígenos (clusters designations - CDs) em populações celulares de interesse (HARRIS et al., 1999). A metodologia permite a análise de 10^5 a 10^6 células por minuto, medindo simultaneamente as propriedades físicas e químicas de tais células (HARMENING, 1997). Essa técnica tem se desenvolvido rapidamente nos últimos anos e suas aplicações são amplas, tanto em laboratórios de pesquisa quanto nos laboratórios clínicos, oferecendo objetividade, sensibilidade, rapidez, especificidade e precisão na análise das características celulares, incluindo o conteúdo de DNA/RNA, a detecção e quantificação de antígenos celulares, o ensaio de resistência celular a drogas e o estudo de conteúdo citoplasmático, permitindo análises multiparamétricas de um grande número de células em pequeno intervalo de tempo (ORFAO et al., 1995 e ORFAO et al., 1999).

Em relação à microscopia convencional, a citometria de fluxo apresenta inúmeras vantagens para a análise de células hematopoiéticas, principalmente no que diz respeito às limitações de interpretação e resolução do microscopista. A distinção entre células hematopoiéticas patológicas e células normais presentes na amostra é baseada nos padrões fenotípicos que diferenciam tais populações celulares (ORFAO et al., 1999).

Células leucêmicas apresentam características imunofenotípicas de células normais, porém, bloqueadas em um estágio de maturação (JORDAN, 2002 e MCKENNA, 2000). Fenótipos aberrantes de células leucêmicas misturam determinantes antigênicos de linhagens celulares (mielóide/linfóide), assincronia de expressão gênica, fenótipos ectópicos e diferenciação anormal, dentre outras características. Estes fenótipos aberrantes traduzem as anormalidades genéticas presentes nestas células (ORFAO et al., 1995 e ORFAO et al., 1999).

Um consenso geral atesta a IMF como uma modalidade de diagnóstico primário para várias desordens hematopoiéticas, incluindo as linfoproliferativas crônicas, linfomas não-Hodgkin, leucemias agudas, crises blásticas, desordens mieloproliferativas crônicas e síndromes mielodisplásicas. (ARGÜELLES et al., 2005 e ORFAO et al., 1999). Nas neoplasias hematológicas, essa técnica é relevante tanto para o diagnóstico, a classificação, o prognóstico e o monitoramento; enquanto que nas desordens mieloproliferativas, apresenta valor somente para o monitoramento. De acordo com o Consenso da Segunda Conferência da América Latina para Imunofenotipagem de Malignidades Hematológicas por Citometria de Fluxo, ocorrida em 3 e 4 de maio de 2005, no México, os painéis de anticorpos monoclonais utilizados nesse método são montados de acordo com os sinais clínicos dos pacientes e os achados morfológicos e citoquímicos previamente analisados. Nas leucemias agudas, o painel utilizado deve ser capaz de distinguir entre leucemia linfóide aguda da linhagem T, leucemia linfóide aguda com células B precursoras, leucemia mielóide aguda e leucemia aguda bifenotípica (QUIXABEIRA e SADDI, 2008).

Em 1995, o Grupo Europeu de Estudos de Leucemias Agudas (EGIL) classificou imunologicamente as leucemias agudas em: mielóide, linfóide B e T. As leucemias de linhagem B foram divididas de acordo com os estágios de diferenciação normal dos progenitores B na medula óssea, classificando-se em: pró-B, pré-pré-B ou comum, pré-B e B-maduro (EGIL, 1995). (Quadro 1).

B-I (LLA pró-B)	CD19 e/ou citCD22 e/ou citCD79a, sem expressão de outros antígenos B de diferenciação
B-II (LLA B comum ou pré-pré-B)	CD10+ (cLLA+)
B-III (LLA pré-B)	IgM citoplasmática+
B-IV (LLA B madura)	K ou λ citoplasmática ou de membrana

Quadro 1: Classificação imunológica das leucemias linfoides agudas da linhagem B (EGIL, 1995)

Vários estudos apontam a importância da imunofenotipagem na diferenciação das leucemias linfóides B e T, sua resposta a tratamento, incluindo detecção de doença residual mínima (DIGIUSEPPE et al 2007; FIONA et al 2008). Além disso, alguns imunofenótipos específicos para as LLA, como a perda da expressão do CD10(-) ou do CD19(-), ou do CD9(-) ou a expressão parcial ou negativa do CD34 podem estar associadas a alterações citogenéticas e moleculares específicas de mau prognóstico (FIONA et al 2008). Nesse mesmo sentido, dados de CONSOLINI et al (1998) demonstram que a expressão do CD10(+) está associada a outros fatores de bom prognóstico nas LLA-B da infância, mas que não deve servir como variável independente de prognóstico, o que também é reportado por FIONA et al. (2008). De acordo com Farias et al (2004) a expressão do antígeno CD10, é de impacto favorável no prognóstico das LLA na infância (FARIAS et al., 2004).

Nosso trabalho se justifica, posto não haver nenhum estudo em nosso estado correlacionando as características clínicas e laboratoriais específicas às variáveis imunológicas como fatores preditivos no tratamento de pacientes com leucemias agudas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o valor preditivo de diferentes marcadores hematológicos em sangue periférico e medula óssea no período de indução do tratamento e sobrevida livre de doença em pacientes com leucemias agudas atendidos em Centro de Referência em Oncologia de São Luís-MA.

2.2 Específicos

- Relacionar os valores de leucócitos, hemoglobina e plaquetas no dia inicial do período de indução com a sobrevida livre de doença durante o período de acompanhamento;
- Relacionar os valores de leucócitos, hemoglobina e plaquetas no último dia do período de indução com a sobrevida livre de doença durante o período de acompanhamento;
- Comparar a contagem de blastos na medula óssea e sangue periférico ao diagnóstico com o desfecho clínico no período de indução para cada subtipo de leucemia aguda;
- Comparar a contagem de blastos na medula óssea e sangue periférico ao diagnóstico com o desfecho clínico no período de indução entre os diferentes subtipos de leucemia aguda;
- Verificar se há ou não relação entre a remissão após o período de indução e a fase maturativa das células neoplásicas nos diferentes subtipos imunológicos de leucemias.

3 METODOLOGIA

3.1 Local

O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa Clínica do Centro de Pesquisa Clínica (LPC-CEPEC) do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA) no município de São Luís, Maranhão.

3.2 Casuística

Foram avaliadas amostras de medula óssea e sangue periférico de 110 pacientes encaminhados pelo IMOAB (Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo) com suspeita clínica de leucemia aguda. Foram divididos de acordo com as faixas etárias adotadas pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva): infante-juvenil (0 a 19 anos) e adulto (20 a 59 anos) e idosos (acima de 60 anos) (INCA, 2009).

O diagnóstico da leucemia e sua sub-classificação foi firmado a partir do método de imunofenotipagem, de acordo com o Grupo Europeu de classificação imunológica das leucemias agudas (EGIL, 1995).

3.2.1 Aspectos clínicos e laboratoriais

Os dados clínicos foram obtidos através de revisão de prontuários médicos do IMOAB, sendo analisados a idade e gênero. Os dados laboratoriais são provenientes do Serviço de Imunofenotipagem do Laboratório de Pesquisa Clínica do CEPEC do Hospital Universitário da UFMA, o qual trabalha em parceria com o IMOAB em pesquisas oncohematológicas do qual este trabalho faz parte. Foram avaliados como dados laboratoriais em sangue periférico: o percentual de blastos, a contagem de leucócitos e plaquetas e dosagem de hemoglobina; e o percentual de blastos em medula óssea, todos ao diagnóstico e após o tratamento, a fim de avaliar a resposta terapêutica.

Como critério de análise de resposta terapêutica considerou-se como remissão uma medula óssea com menos de 5% de blastos após a primeira fase de indução do tratamento, segundo os protocolos de tratamento utilizados no IMOAB, o protocolo do GBTLI-99 (Grupo Brasileiro para Tratamento de Leucemias Linfóides Agudas) para LLA; enquanto que para LMA foi utilizado o protocolo do BFM-83 (Grupo Europeu Berlim-Frankfurt-Munique).

Para as LLA-B e T o protocolo terapêutico caracteriza o primeiro dia do período de indução do tratamento como D0 e o vigésimo nono dia da indução como final, o D29. Para as LMA também o dia inicial é descrito como D0, porém o dia final é o décimo quinto dia da indução, o D15.

O período de acompanhamento dos pacientes que remeteram na indução do tratamento estendeu-se até o mês de junho de 2012. Durante este período, as amostras dos pacientes com suspeita de recidiva foram novamente encaminhadas ao LPC-CEPEC com solicitação de nova imunofenotipagem e, caso apresentassem percentual imunofenotípico de blastos, foram caracterizados como recidiva.

A sobrevida livre de doença foi definida como o período de tempo após o tratamento, durante o qual o paciente sobreviveu sem sinais clínicos e laboratoriais da doença.

3.2.2 Diagnóstico das leucemias agudas por imunofenotipagem

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

3.3 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo, indivíduos com o diagnóstico imunofenotípico de LLA tipos B, T ou de LMA, diagnosticados pelo serviço de imunofenotipagem do Laboratório de Pesquisa Clínica do CEPEC entre agosto de 2008 a julho de 2011.

3.4 Critérios de não inclusão

Não foram inclusos na pesquisa os pacientes que apresentaram simultaneamente expressão de marcadores imunofenotípicos de diferentes sublinhagens (bifenotípicos), e aqueles que não apresentavam os dados laboratoriais no primeiro e último dia do período de indução do tratamento para as LLA e no primeiro dia de tratamento para as LMA, assim como os que se recusaram a participar do estudo.

3.5 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes que abandonaram o tratamento.

3.6 Análise estatística dos dados

Os dados foram tabulados na planilha eletrônica excel e posteriormente processados no epiinfo versão 6.0. Inicialmente foi testada a normalidade através do teste Shapiro-Wilk. Para comparar as variáveis do estudo entre os grupos, foram utilizados os testes t de student ou Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3.7 Aspectos éticos

Este estudo integra o Projeto “Estudo Imunofenotípico por Citometria de Fluxo das Leucemias Agudas na Infância no estado do Maranhão”, que foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e aprovado conforme as diretrizes descritas na Resolução de nº 196/96 e com Parecer Consubstanciado nº 115/2008 de 11 de março de 2008. Por se tratar de estudo envolvendo seres humanos, só participaram os pacientes

que, de livre e espontânea vontade, concordaram e assinaram o TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido) (ANEXO A). Todos os participantes foram esclarecidos a respeito do estudo e os que concordaram em participar da pesquisa assinaram o TCLE (APÊNDICE A). Os menores de 18 anos foram autorizados por seus responsáveis legais.

4 RESULTADOS

População leucêmica

Dos 110 pacientes estudados, 61,82% (n=68) foram do gênero masculino (M) versus 38,18% (n=42) do feminino (F), demonstrando uma proporção M:F de 1,62:1,0. Dessa população, 32,73% (n=36) foi a óbito durante o período de indução do tratamento. Do total de óbitos, 63,9% foram de homens e 36,1% de mulheres. O percentual de óbitos no subgrupo LLA-B foi de 28,9%(n=20), para LLA-T 33,3% (n=5) e 37,9%(n=11) para LMA.

No que se refere à faixa etária, 80,9% estavam enquadrados na faixa etária infanto-juvenil (até 19 anos) e 19,1% na faixa adulta (maior que 19 anos).

Quanto aos subgrupos de leucemias agudas 61,82% dos pacientes eram portadores de leucemia linfóide aguda (LLA) tipo B (LLA-B), 12,73% de leucemia linfóide aguda (LLA) tipo T (LLA-T) e 25,45% de leucemia mielóide aguda (LMA).

Parâmetros hematológicos

A porcentagem de blastos em medula óssea e sangue periférico no dia inicial do período de indução do tratamento (D0), assim como os níveis de hemoglobina, contagem de leucócitos e plaquetas nos dias inicial (D0) e final do tratamento (D29 para as LLA e D15 para as LMA), encontram-se dispostos nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

A tabela 1 mostra que no subtipo leucêmico LLA-B o grupo que não foi a óbito durante o período de indução do tratamento apresentou percentual médio de blastos no sangue periférico de 41,2% e na medula óssea de 74,6%. Para esse mesmo grupo de pacientes (sem terem ido a óbito), o subtipo leucêmico LLA-T, exibiu média percentual de blastos no sangue periférico de 68,1% e na medula óssea de 79,9%. Sob este mesmo critério, em relação às LMA os percentuais de blastos no sangue periférico e medula óssea foram de respectivamente 30,4% e 57,9%.

Os resultados da tabela 1 demonstram estatisticamente que em relação ao percentual de blastos em medula óssea no D0 para os pacientes que não foram a óbito durante o período de indução do tratamento, houve diferença significativa entre as LLA-B (74,6%) e LMA (57,9), com $p = 0,032$, bem como entre as LLA-T (79,9%) e

LMA (57,9%), com $p = 0,017$. Com relação ao percentual de blastos em sangue periférico no D0 para os pacientes que não foram a óbito durante o período de indução do tratamento, também houve diferença significativa entre as LLA-B (41,2%) e LLA-T (68,1%), com $p = 0,045$, e entre as LLA-T (68,1%) e LMA (30,4), com $p = 0,003$. Em suma, os pacientes com LMA apresentaram um percentual de blastos ao D0 em medula óssea menor que os com LLA-B e que os com LLA-T. Além disso, os pacientes com LLA-T apresentaram um maior percentual de blastos ao D0 no sangue periférico que aqueles com LLA-B e com LMA.

Fazendo referência ao grupo que foi a óbito durante o período de indução, as LLA B demonstraram percentual médio de blastos no sangue periférico de 44,4% e na medula óssea de 75,8%. Ainda neste grupo, os portadores de LLA-T indicaram como média percentual de blastos no sangue periférico 61,6% e na medula óssea média de 90,7%. Para as LMA, os percentuais de blastos no sangue periférico e medula óssea foram de respectivamente 32,7% e 63,2% (tabela 1).

O percentual de blastos em medula óssea e sangue periférico para cada um dos subgrupos de leucemia, no período de indução do tratamento não demonstrou diferença significativa, por outro lado, em estudo comparativo entre os subgrupos de leucemia, houve diferença no seu padrão de apresentação ao diagnóstico (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual de blastos na medula óssea e sangue periférico entre os indivíduos portadores de leucemia linfóide aguda (B ou T) e mielóide aguda de acordo com a ocorrência de óbito durante o período de indução.

Percentual de Blastos	Óbito durante o período de indução		Valor de p
	Não	Sim	
	Média±DP	Média±DP	
LLA-B (n=67)			
Blasto MO (%)	74,6 ^{a*} ±25,4	75,8±25,1	0,86
Blasto SP (%)	41,2 ^{b*} ±33,9	44,4±31,7	0,71
LLA-T (n=15)			
Blasto MO (%)	79,9 ^{a*} ±19,8	90,7±5,3	0,37
Blasto SP (%)	68,1 ^{b*} ±23,1	61,6±29,7	0,66
LMA (n=28)			
Blasto MO (%)	57,9 ^{a*} ±23,3	63,2±31,5	0,61
Blasto SP (%)	30,4 ^{b*} ±25,6	32,7±32,1	0,83

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Diferença estatisticamente significante: (^a $p=0,0117$; ^b $p=0,0103$).

±DP= desvio padrão.

Na tabela 2, em relação ao primeiro dia do período de indução do tratamento, os pacientes com LLA-B que não recidivaram durante o acompanhamento, apresentaram média de contagem de leucócitos de 19.116/mm³, contagem média de plaquetas de 53.709/mm³ e nível de hemoglobina de 7,66 g/dL. Já os que recidivaram durante o período de acompanhamento, mostraram média de contagem de leucócitos de 23.022/mm³, contagem média de plaquetas de 42.201/mm³ e dosagem média de hemoglobina de 8,6g/dL. Para as LLA-T no mesmo período, os pacientes que não apresentaram recidiva durante o acompanhamento demonstraram contagem média de leucócitos de 76.341/mm³, média na contagem de plaquetas de 88.642/mm³ e nível de hemoglobina de 9,10g/dL, enquanto aqueles que recidivaram exibiram contagem média de leucócitos e plaquetas respectivamente de 54.800/mm³ e 39.700/mm³ e dosagem média de hemoglobina de 8,23g/dL. Os pacientes com LMA que não recidivaram, mostraram contagem média de leucócitos de 18.206/mm³, para plaquetas de 62.960/mm³ e média na dosagem de hemoglobina de 8,13g/dL. Os que recidivaram da doença indicaram média de 76.800/mm³ para leucócitos, 34.733/mm³ para plaquetas e nível médio de hemoglobina de 6,33g/dL.

Tabela 2. Distribuição dos marcadores hematológicos do dia inicial da terapia quimioterápica entre os indivíduos portadores de leucemia linfóide aguda (B ou T) e mielóide aguda de acordo com a ocorrência de recidiva durante o acompanhamento.

Dia inicial (D 0)	Recidiva durante o acompanhamento		Valor de p
	Não Média±DP	Sim Média±DP	
LLA-B (n=47)			
Leucócitos (mm ³)	19.116±33.705	23.022±22.441	0,69
Hemoglobina (g/dl)	7,66±2,25	8,60±2,81	0,23
Plaquetas (mm ³)	53.709±67.340	42.201±45.716	0,56
LLA-T (n=10)			
Leucócitos (mm ³)	76.341±56.177	54.800±27.391	0,73
Hemoglobina (g/dl)	9,10±2,31	8,23±4,65	0,90
Plaquetas (mm ³)	88.642±48.458	39.700±7.594	0,04*
LMA (n=12)			
Leucócitos (mm ³)	18.206±23.165	76.800±121.535	0,92
Hemoglobina (g/dl)	8,13±1,91	6,33±1,38	0,02*
Plaquetas (mm ³)	62.960±83.428	34.733±22.293	0,50

* Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).
±DP= desvio padrão.

Para as LLA-T a contagem de plaquetas no dia inicial do período de indução (D0) demonstrou diferença significativa para os pacientes que apresentaram recidiva após o período de indução (Tabela 2). Entre os pacientes que recidivaram no período de acompanhamento (n=3), 100% apresentaram contagem de plaquetas menor que 100.000/mm³ no dia inicial do tratamento (Tabela 3), o que não foi observado na contagem de leucócitos e níveis de hemoglobina. (Tabela 2). Enquanto que, dos que apresentaram sobrevida livre de doença durante o período de acompanhamento (n=7), 28,57% exibiram contagem de plaquetas abaixo de 100.000/mm³ no dia inicial do tratamento (Tabela 3).

Tabela 3: Contagem de plaquetas no dia inicial do tratamento em pacientes com LLA T que recidivaram ou não no período de acompanhamento

Recidiva	Plaquetas no dia inicial do período de indução		
	Plaquetas <100.000/mm ³	Plaquetas >100.000/mm ³	Total
Sim	3	0	3
Não	2	5	7

Em relação às LMA, os pacientes com menores níveis de hemoglobina no dia inicial do tratamento apresentaram valores significativos para recidiva após o período de indução. Entre os pacientes que recidivaram no período de acompanhamento (n=8), 62,5% apresentaram níveis de hemoglobina menor que 8g/dL. Enquanto que, dos que apresentaram sobrevida livre de doença durante o período de acompanhamento (n=4), 100% exibiram níveis de hemoglobina maior ou igual a 8g/dL no dia inicial do tratamento (Tabela 4).

A maioria dos casos de remissão no período de indução dos pacientes com LLA-B se enquadraram na faixa etária infanto-juvenil (97,36%), das quais 94,54% foram LLA-BII ou LLA-BIII (que são CD10+), o que não ocorreu com as LLA-T cuja taxa de remissão foi bem mais baixa (53,33%).

Na LMA, a casuística foi mais heterogênea (44,82% infanto-juvenil), assim também como a resposta ao tratamento (58,62% de remissão no período de indução).

Tabela 4: Concentração de hemoglobina no dia inicial do tratamento em pacientes com LMA que recidivaram ou não no período de acompanhamento

Recidiva	Hemoglobina no dia inicial do período de indução		
	Hemoglobina < 8,0 g/dL	Hemoglobina ≥ 8,0 g/dL	Total
Sim	5	3	8
Não	0	4	4

Na tabela 5, com referência ao último dia do período de indução do tratamento, os pacientes com LLA B que não recidivaram durante o acompanhamento, apresentaram média de contagem de leucócitos de 4.087/mm³, contagem média de plaquetas de 249.608/mm³ e dosagem de hemoglobina de 8,60 g/dL. Já os que tiveram recidiva durante o período de acompanhamento, mostraram média de contagem de leucócitos de 4.863/mm³, contagem média de plaquetas de 171.692/mm³ e dosagem média de hemoglobina de 9,15 g/dL.

Para as LLA T no mesmo período, os pacientes que não apresentaram recidiva durante o acompanhamento demonstraram contagem média de leucócitos de 3.422/mm³, média na contagem de plaquetas de 207.080/mm³ e na dosagem de hemoglobina de 8,64g/dL, enquanto aqueles que recidivaram exibiram contagem média de leucócitos e plaquetas respectivamente de 7.336/mm³ e 461.333/mm³ e dosagem média de hemoglobina de 9,46 g/dL (Tabela 5). Os parâmetros hematológicos dos pacientes com LMA no último dia da indução, não foram analisados por falta de dados.

Tabela 5. Distribuição dos marcadores hematológicos do dia final da terapia quimioterápica entre os indivíduos portadores de leucemia linfóide aguda (B ou T) de acordo com a ocorrência de recidiva durante o acompanhamento.

Dia final (D 29)	Recidiva durante o acompanhamento		Valor de p
	Não	Sim	
	Média±DP	Média±DP	
LLA-B (n=47)			
Leucócitos (mm ³)	4.087±3.050	4.863±4.719	0,59
Hemoglobina (g/dl)	8,60±1,59	9,15±2,23	0,39
Plaquetas (mm ³)	249.608±113.591	171.692±111.922	0,05*
LLA-T (n=10)			
Leucócitos (mm ³)	3.422±1.917	7.336±6.805	0,25
Hemoglobina (g/dl)	8,64±1,57	9,46±2,13	0,54
Plaquetas (mm ³)	207.080±148.659	461.333±314.326	0,16

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).
 ±DP= desvio padrão.

De todos os pacientes do subgrupo da LLA B que apresentaram sobrevida livre de doença durante o período de acompanhamento (n=24), apenas 4,17% apresentaram contagem de plaquetas menor que 100.000/mm³ no último dia do período de indução do tratamento (Tabela 6), o que não ocorreu em referência à dosagem de hemoglobina e à contagem de leucócitos para o mesmo subgrupo.

Dos 13 pacientes que recidivaram no período de acompanhamento, 38,46% demonstraram contagem de plaquetas abaixo de 100.000/mm³ no último dia do período de indução do tratamento (Tabela 6), o que não ocorreu com relação à dosagem de hemoglobina e contagem de leucócitos para o mesmo subgrupo.

A recuperação da contagem de plaquetas para LLA B no último dia do período de indução do tratamento a valores acima de 100.000/mm³ apontou para a não recidiva da doença no período de acompanhamento.

Tabela 6: Contagem de plaquetas no dia final do tratamento em pacientes com LLA B que recidivaram ou não no período de acompanhamento

Recidiva	Plaquetas no dia final do período de indução		
	Plaquetas <100.000/mm ³	Plaquetas >100.000/mm ³	Total
Sim	5	8	13
Não	2	22	24

REFERÊNCIAS

ARGÜELLES AR, ESPINOZA LR, DUQUE RE. Report on the Second Latin American Consensus Conference for Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematological Malignancies. **Cytometry Part B**, 70B, 39-44, 2005.

BARRIOS, C.D.; LAKSA D. Leucemia Linfóide Aguda no Adulto. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI R. **Hematologia. Fundamentos e Práticas**. São Paulo: Ed. Atheneu, Cap. 45, p. 477 - 485, 2001.

BONJEAN B, et al. Development of a new strategy for minimal residual disease monitoring in children with B-precursor acute lymphoblastic. **Ann Biol Clin** v. 62, n. 4, p. 465-70, 2004.

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

CHESELLES JM. Recent advances in management of acute leucemia. **Arch Dis Childhood**. v. 82, p. 438-442, 2000.

CONSOLINI R et al. Clinical relevance of CD10 expression in childhood ALL. **Haematologica**. v. 83, p.967-973, 1998.

CRAIG FE, FOON KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood**, vol. 111, n. 8, p. 3941-3967, 2008.

CUNHA, F.G. **Painel racionalizado de anticorpos monoclonais para leucemias agudas: seu valor diagnóstico e prognóstico**. 2005. 82 f. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DIGIUSEPPE JA. Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and detection of minimal residual disease following therapy. **Clin Lab Med**. v.27, p. 533-549, 2007.

DIGIUSEPPE JA. Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and detection of minimal residual disease following therapy. **Clin Lab Med.** v.27, p. 533-549, 2007.

European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (EGIL), Proposal for the immunological classification of acute leukemias. **Leukemia**, v. 9, p. 1783-6, 1995.

European Group for the Immunological Classification of Leukemia (EGIL). The Value of c-kit in the diagnosis of bifenotypic acute leukemias. **Leukemia**, p. 2038-2039, 1998.

FARIAS MG, CASTRO SM. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfoides agudas. **J Bras Patol Med Lab.** V.40, n.2, p.91-98, 2004.

FRIEDMANN, A.; WEINSTEIN, H. J. The Role of Prognostic Features in the Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Oncologist.** v. 5, p. 321-328, 2000.

HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **J Pediatr.** v. 84, n. 4, p. 52-57, 2008.

HARMENING DM. **Clinical hematology and fundamentals of hemostasis**, 3 ed, USA, 740; cap. 24, p. 452-462; cap. 35, p. 683-695, 1997.

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.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil: Instituto Nacional de Câncer. - Rio de Janeiro: INCA, 2009. [acesso 2012 jan 10]. Disponível em: [<http://www.inca.gov.br>].

JORDAN CT. Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells. **Leukemia** v. 16, p. 559-562, 2002.

MARTINS, S.L.; FALCAO, R.P. Importance of immunophenotyping of leukemia myelocytic acute. **Rev Assoc Med Bras.** v. 46, p. 57-62, 2000.

MAUER, A. M. Acute Lymphocytic Leukemia. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLER, M. B. et al. **Williams Hematology.** 5a ed. United States of America: McGraw-Hill, 1995, 1668p. Cap. 105, p. 1004-1016.

MCKENNA RW. Multifaceted Approach to the Diagnosis and Classification of Acute Leukemias. **Clin. Chem.**, v. 46, n. 8, p. 1252-1259, 2000.

MELLO, M. R. B. **Avaliação Imunofenotípica, Estudo do Índice de DNA e de Alterações Moleculares em Células Blásticas de Pacientes Portadores de Leucemia Linfóide Aguda Diagnosticados na Fundação Hemope.** 2007. 68 f. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ORFAO A, et al. Flow cytometry: Its applications in Hematology. **Haematologica**, v. 80, p. 69-81, 1995.

ORFAO A, et al. Clinically Useful Information Provided by the Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematological Malignancies: Current Status and Future Directions. **Clin. Chem**, v. 45n. 10, p. 1708-1717, 1999.

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

PELLOSO, L.A. et al. [Karyotype in acute myeloid leukemia: importance and type of aberrations in 30 patients at diagnosis]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 49, p. 150-455, 2003.

PUI, C. H. Childhood Leukemias. Review Article. **N Engl J Med.** Memphis. v. 21, p.1618-1629, 1995.

PUI, C.; EVANS, W. Acute Lymphoblastic Leukemia. **N Engl J Med**, v. 339, n. 9, p. 605-615, 1998.

PUI CH. Et al. Mechanisms of Disease: acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**. v. 350, p. 1535-1548, 2004.

QUIXABEIRA VBL, SADDI VA. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. **RBAC**, v. 40, n. 3, p. 199-202, 2008.

RIBEIRO, R. Leucemia Linfóide Aguda na Infância e Adolescência. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia. Fundamentos e Práticas**. São Paulo: Ed.Atheneu. Cap. 46, p. 487-506, 2001.

SILVERMAN LB. et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leucemia: results of Dana-Farber Consortium Protocolo 91-01. **Blood**. V. 97, p.1211-1218, 2001.

SMITH, M. *et al.* Uniform Approach to Risk Classification and Treatment Assignment for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. **J. Clinical Oncology**, v. 14, n. 1, p. 18-24, 1996.

SOARES, M *et al.* Fatores Prognósticos em Pacientes com Neoplasias Hematológicas Gravemente Enfermos. **Rev. Br. Terap. Intensiva**. v. 17, n. 3, 2005.

TUCCI F, ARICO M. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**. v. 93, n. 8, p. 1124-1128, 2008.

ZEIDLER L et al. Low platelet counts after induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia are strongly associated with poor early response to treatment as measured by minimal residual disease and are prognostic for treatment outcome. **haematologica** v. 97, n. 3, p. 402 - 409, 2012.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE MATERNO-INFANTIL**

PROJETO: Estudo imunofenotípico, molecular e da proliferação celular 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 tipo de Leucemia (doença do sangue) 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. A medula óssea é um líquido gelatinoso que fica dentro do osso, precisa-se retirar uma quantidade de medula óssea e sangue suficiente para encher uma seringa pequena. Essas amostras serão coletadas por técnicos treinados e especializados, do Hospital Aldenora Belo, proporcionando segurança, com mínimo risco e desconforto. A coleta da medula óssea é um procedimento sem dor, pois se utiliza anestesia no local onde a agulha será introduzida para a retirada da amostra de medula. Já a coleta de sangue, sente-se apenas uma leve picada da agulha no braço.

Com essas amostras de sangue e medula óssea, iremos realizar os seguintes exames laboratoriais: Hemograma, Mielograma, Citoquímica, Imunofenotipagem, Proliferação Celular e Análise de Cromossomos por Biologia Molecular. Através

desses exames poderemos identificar, de forma bastante eficiente, 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: ___/___/___

Pesquisador Responsável

Pesquisador responsável:

Prof. Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (98) 8111-2027/ (98)21091293

Rua das Quaresmeiras q 8 casa 14, São Francisco

rago@usp.br

Pesquisadores participantes:

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

Patricia Ribeiro Azevedo - Telefone para contato: (98) 2109-1293

Heliana Trindade Marinho Telefone para contato: (inclusive ligações a cobrar):
(98)88263226/3245-3722

Thaiana da C. Lopes - Telefone para contato: (98) 2109-1293

Ligia Maria Mendes Gonçalves – Telefone para contato: (98) 9114-6755

Comitê de Ética em pesquisa-Hospital Universitário- UFMA

Rua Barão de Itapary, 227,Hospital Universitário 4º Andar, Centro

Telefone: 2109-1250

ANEXOS

ANEXO A: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão

	Universidade Federal do Maranhão Hospital Universitário Diretoria Adjunta de Ensino, Pesquisa e Ext Comitê de Ética em Pesquisa	
PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL Anti-projeto de pesquisa do Mestrado Materno infantil	Nº. do Parecer: 115/2008 Nº do Protocolo: 33104-2040/200 Data de Entrada no CEP: 13/12/2008 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, 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 em 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 Maranhão.

III- Sumário do projeto:

Trata-se de um anteprojecto de pesquisa apresentado ao Programa de Pós-graduação Materno Infantil, como pré-requisito do processo seletivo do Mestrado Acadêmico da UFMA, cujas partes são: folha de rosto, curriculum vitae dos pesquisadores, protocolo de pesquisa propriamente dito, sumário, introdução e justificativa, objetivos, casuística e métodos, orçamento previsto, cronograma, resultados e impactos esperados, equipe executora, referências bibliográficas, formulário de Consentimento Livre e Esclarecido.

Tipo de pesquisa: Estudo prospectivo randomizado em pacientes encaminhados para o Hospital Aldenora Belo e diagnosticados como portadores de leucemias agudas, no período de maio 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 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, imunofenotipagem por citometria de fluxo, do sangue periférico e medula óssea encaminhados ao Hospital Aldenora Belo do município de São Luís- Maranhão, para diagnóstico de leucemias agudas. Os critérios utilizados serão: de acordo com os conceitos morfo-citoquímicos de Bennett (1976; BENNETT, DANIEL et al, 1991) e imunofenotípicos da classificação EGIL (BENE et al, 1991).

Marcadores de proliferação celular: serão estudados os marcadores de proliferação celular CD71, bem como o DNA plasmídico por citometria de fluxo.

Análise estatística: serão usados a análise de variância, método de Kaplan-Meier, teste de Fisher, quando indicados.

ANEXO B: Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda do GBTLI-99

Fase de indução – Pacientes com Alto Risco, Risco Básico e Risco Básico Verdadeiro

Dexametasona (DEXA)	6mg/m ² por 28 dias
Vincristina	1,5mg/m ² em quatro doses
Daunorrubicina	25mg/m ² em quatro doses
Asparaginase	10.000U/m ² em oitodoses
Citarabina (ARAC)	AR: 750mg/m ² em seis doses com resgate de 6.000U/m ² de Asparaginase
	RBV/RB: 75 mg/m ² em oito doses
MTX/ARAC/DEXA – Intra-tecal	Duas aplicações *

Fase de intensificação - Pacientes com Alto Risco, Risco Básico e Risco Básico Verdadeiro

Metotrexate (MTX)	2000mg/m ² em quatro doses
Mercaptopurina	50mg/m ² em quatro semanas
MTX/ARAC/DEXA – Intra-tecal	Quatro aplicações

Fase de re-indução – Pacientes com Alto Risco, Risco Básico e Risco Básico Verdadeiro

Fase de re-indução – Pacientes com Alto Risco, Risco Básico e Risco Básico Verdadeiro

Dexametasona	6mg/m ² por 21 dias
Vincristina	1,5mg/m ² em quatro doses
Asparaginase	10.000U/m ² em quatro doses
Mercaptopurina	50mg/m ² por 14 dias
Citarabina	75mg/m ² em oito doses
MTX/ARAC/DEXA – Intra-tecal	Três aplicações **

Fase de manutenção – Paciente com Alto Risco (Semana 23 a 77)

Bloco A (6 ciclos)	
Citarabina	750mg/m ² de 12/12h (quatro doses)
Asparaginase	6000 U IM uma vez por ciclo
Bloco B (6 ciclos)	
Prednisona	40mg/m ² por duas semanas
Vincristina	1mg/m ² em três doses
Bloco C (6 ciclos)	
6-Mercaptopurina	75mg/m ² por 21 dias
MTX	40mg/m ² em três doses

Fase de manutenção – Paciente com Alto Risco (Após semana 77) e RB/RBV

Mercaptopurina	50mg/m ² dia
MTX	25mg/m ² semana
MTX/ARAC/DEXA – Intra-tecal	A cada oito semanas ***
Vincristina ****	1,5mg/m ² a cada oito semanas
Dexametasona ***	4mg/m ² a cada oito semanas

ANEXO C: PROTOCOLO BFM - 83

Fármaco	Dose	Dias
Indução I		
Vincristina	1,5 mg/ m ² IV	8, 5, 22, 29
Daunoblastina	40mg/ m ² IV	8, 15, 22, 29
L-asparaginase	10.000 U IM	19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40
Prednisona	60mg/ m ² VO	1 a 28
Methotrexate	12 mg IT	1, 8, 15, 22, 29
Dexametasona	2 mg IT	1, 8, 15, 22, 29
Indução II		
Ciclofosfamida	1g/ m ² IV	43 e 71
Citarabina	75mg/ m ² IV/IM	45 a 48, 52 a 55, 59 a 62, 66 a 69
6 mercaptopurina	30mg/ m ² VO	43 a 70
Methotrexate	12mg IT	45, 59
Dexametasona	2mg IT	45, 59
Consolidação		
6 mercaptopurina	25mg/ m ² VO	1 a 56
Methotrexate	3g/ m ² IV (4h)	8, 22, 36, 50
Ac. Folínico	50mg/ m ² IV	9, 23, 37, 51
Ac. Folínico	15mg/ m ² VO 6/6h	9, 10, 23, 24, 37, 38, 51,52
Metotrexato	12mg IT	8, 22, 36, 50
Dexametasona	2mg IT	8, 22, 36, 50
Re-indução II		
Vincristina	1,5mg/ m ² IV	8, 15, 22, 29
Adriamicina	30mg/ m ² IV	8, 15, 22, 29
L-asparaginase	10.000 U IM	8, 11, 15, 18
Dexametasona	10mg/ m ² VO	1 a 21
Ciclofosfamida	1g/ m ² IV	36
6 Tioguanina	60mg/ m ² VO	36 a 49
Citarabina	75mg/ m ² IV/IM	38 a 41, 45 a 48
Metotrexato	12mg IT	38,45
Dexametasona	2mg IT	38,45
Manutenção		
6 mercaptopurina	60mg/ m ² VO	18 meses
Metotrexato	20mg/ m ² IM/sem.	18 meses

ARTIGO CIENTÍFICO

Nome do Periódico com sua classificação na WEBQUALIS da CAPES (A1, A2, B1, B2 ou B3) na área de Avaliação Medicina II

Nome do Periódico: **São Paulo Medical Journal.**

Edited By: A. N. Atallah and P. M. P. Fernandes Impact Factor: 0.577

Online ISSN: 1516-3180

Qualificação QUALIS na área de MEDICINA II: B3

Instruções aos Autores

(Fonte: http://www.spmj.org.br/instrucoes_autor.asp?lang=pt-br)

Indexação e escopo

A Revista São Paulo Medical Journal/Evidence for Health Care foi fundada em 1932. Seus artigos estão indexados no Medline, Lilacs, SciELO, Science Citation Index Expanded, JournalCitationReports/Science Edition (ISI) e EBSCO Publishing. Publicação bimestral da Associação Paulista de Medicina (APM), a revista aceita artigos nas áreas científicas de saúde (clínica médica, ginecologia e obstetrícia, saúde mental, cirurgia, pediatria e saúde pública). Artigos serão aceitos na forma de artigos originais (estudos clínicos, de coorte, caso-controle, de prevalência ou incidência, acurácia, custo-efetividade e revisões sistemáticas com ou sem metanálise), revisões narrativas da literatura, relatos de caso, comunicações breves e cartas ao editor. Manuscritos com objetivo comercial ou estudos experimentais em animais não serão aceitos.

POLÍTICA E PROCEDIMENTOS DA REVISTA

Após o recebimento do artigo pelo Setor de Publicações Científicas, os autores receberão um número de protocolo. Este número serve para manter bom entendimento entre os autores e o Setor. Em seguida, o artigo será lido pelo editor, que vai verificar se está de acordo com a política e os interesses da revista, isto é, se a pesquisa ou revisão está dentro das áreas de saúde e saúde pública. Depois, o Setor de Publicações Científicas vai verificar se o texto cumpre as normas de publicação expressas nestas Instruções para Autores. Se o texto estiver incompleto ou se não estiver organizado como exigido, os autores deverão resolver os problemas e submetê-lo novamente. Quando o formato estiver aceitável, o Setor enviará o trabalho para a revisão por pares, na qual os revisores não assinarão seus veredictos e não conhecerão os nomes dos autores do trabalho. Cada manuscrito será avaliado por pelo menos três revisores: um especialista no assunto, um editor associado (que vai avaliar o artigo do ponto de vista do leitor) e um consultor editorial ad hoc (que vai avaliar aspectos metodológicos do trabalho).

Os autores então receberão a avaliação e será solicitado que resolvam os problemas apontados. Uma vez que o Setor de Publicações Científicas receba o texto novamente, o artigo será enviado ao editor científico e revisor de provas, que identificará problemas na construção de frases, ortografia, gramática, referências bibliográficas e outros. Os autores deverão providenciar todas as informações e correções solicitadas, que devem estar marcadas no texto, utilizando cores diferentes ou sistemas eletrônicos de marcação de alteração, de maneira que essas modificações fiquem evidentes.

Instruções para Autores

Diretriz geral: para todos os tipos de artigos

Textos devem ser submetidos exclusivamente pela internet. O sistema eletrônico de submissão está disponível em: <http://www.spmj.hemeroteca.com.br>.

O manuscrito deve ser submetido em inglês. Ainda assim, deve conter também um resumo e cinco palavras-chave em português (ou espanhol) e também em inglês. As palavras-chave devem ser selecionadas das listas DeCS e MeSH somente, conforme explicado em detalhes abaixo (nenhuma outra palavra-chave será aceita).

Artigos submetidos devem ser originais e todos os autores precisam declarar que o texto não foi e não será submetido para publicação em outra revista. Artigos envolvendo seres humanos (individual ou coletivamente, direta ou indiretamente, total ou parcialmente, incluindo o gerenciamento de informações e materiais) devem ser acompanhados de uma cópia da autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição onde o experimento foi realizado.

Todo artigo submetido deve cumprir os padrões editoriais estabelecidos na Convenção de Vancouver (Requerimentos Uniformes para Manuscritos Submetidos a Revistas Biomédicas),¹ e as diretrizes de qualidade para relatórios de estudos clínicos,² revisões sistemáticas (metanálises)³ e estudos observacionais.⁴ O estilo conhecido como "estilo Vancouver" deve ser usado não somente quanto ao formato de referências, mas para todo o texto. Os editores recomendam que os autores se familiarizem com esse estilo acessando www.icmje.org.

Abreviações não devem ser empregadas, mesmo as que são de uso comum. Drogas ou medicações devem ser citadas usando-se os nomes genéricos, evitando-se a menção desnecessária a marcas ou nomes comerciais. Qualquer produto citado no capítulo de Métodos, tal como equipamento diagnóstico, testes, reagentes, instrumentos, utensílios, próteses, órteses e dispositivos intraoperatórios devem ser descritos juntamente como o nome do fabricante e o local (cidade e país) de produção entre parênteses. Medicamentos administrados devem ser descritos pelo nome genérico (não a marca), seguidos da dosagem e posologia.

Bolsas, apoios e qualquer suporte financeiro a estudos devem ser mencionados separadamente na primeira página. Agradecimentos, se necessário, devem ser colocados após as referências bibliográficas.

Para qualquer tipo de estudo, todas as afirmações no texto que não sejam resultado da pesquisa apresentada para publicação à revista São Paulo Medical Journal/Evidence for

Health Care, mas sim dados de outras pesquisas já publicadas em outros locais devem ser acompanhadas de citações da literatura pertinente.

FORMATO

Primeira página (capa)

A primeira página deve conter:

- 1) o tipo de artigo (artigo original, de revisão ou atualização; comunicação breve ou carta ao editor);
- 2) o título do artigo em inglês e em português (ou espanhol), que deve ser curto, porém informativo;
- 3) o nome completo de cada autor (sem abreviações); seu título acadêmico mais alto e a instituição onde trabalha;
- 4) o lugar onde o trabalho foi desenvolvido.

Segunda página: resumo (inglês e português ou espanhol e palavras-chave)

A segunda página deve conter o título, um resumo (em inglês e português ou espanhol)5 estruturado em partes de acordo com a classificação do artigo (máximo de 250 palavras). Para artigos experimentais, há cinco itens:

- 1) contexto e objetivo;
- 2) design e local (onde o estudo se desenvolveu);
- 3) métodos (descritos em detalhes);
- 4) resultados e;
- 5) conclusões.

Cada resumo (em inglês e também em português e espanhol) deve conter cinco palavras-chave. As palavras em inglês devem ser escolhidas na lista Medical SubjectHeadings (MeSH), do Index Medicus, que está disponível na internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=mesh>).6 As palavras em português (ou espanhol) devem ser escolhidas a partir dos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), desenvolvidos pela Bireme, que estão disponíveis na internet (<http://decs.bvs.br/>).7

Referências

As referências bibliográficas (no estilo "Vancouver", como indicado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Biomédicas, ICMJE) devem ser dispostas na parte final do artigo e numeradas de acordo com a ordem de citação. Referências citadas nas legendas de tabelas e figuras devem manter a sequência com as referências citadas no texto. Todos os autores devem ser citados se houver menos de seis; se houver seis ou mais, os primeiros três

devem ser citados seguidos de “et al.” Para livros, a cidade de publicação e o nome da editora são indispensáveis. Para textos publicados na internet, a fonte localizadora completa (URL) ou endereço é necessário (não apenas a página principal ou link), de maneira que, copiando o endereço completo em seus programas para navegação na internet, os leitores possam ser levados diretamente ao documento citado, e não a um site geral. A seguir estão dispostos alguns exemplos dos tipos mais comuns de referências:

Artigo em periódico

- Lahita R, Kluger J, Drayer DE, Koffler D, Reidenber MM. Antibodiost nuclear antigens in patientstreatedwithprocainamideoracetlyprocainamide. N Engl J Med. 1979;301(25):1382-5.

Capítulo de livro

- Reppert SM. Circadianrhythms: basicaspectsandpediatricimplications. In: Styne DM, Brook CGD, editors. Currentconcepts in pediatricendocrinology. New York: Elsevier; 1987. p. 91-125.

Texto na internet

- Morse SS. Factors in theemergenceofinfectiousdiseases. Availablefrom: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>. Accessed in 1996 (Jun5).

Última página

A última página deve conter:

- 1) a data e o local do evento no qual o artigo foi apresentado, se aplicável, como congressos ou defesas de dissertações ou teses;
- 2) fontes de apoio na forma de suporte financeiro, equipamentos ou drogas e número do protocolo;
- 3) descrição de qualquer conflito de interesse por parte dos autores;
- 4) endereço completo, e-mail e telefone do autor a ser contatado quanto à publicação na revista.

Figuras e tabelas

As imagens devem ter boa resolução (mínimo de 300 DPI) e serem gravadas em formato “.jpg” ou “.tif”. Imagens não devem ser incluídas em documentos do Microsoft PowerPoint. Se as fotografias forem inseridas num documento Microsoft Word, as imagens também devem ser enviadas separadamente. Gráficos devem ser preparados com o Microsoft Excel (não devem ser enviados como imagem) e devem ser acompanhados das tabelas de dados a partir dos quais foram gerados. O número de ilustrações não deve exceder o número total de páginas menos um.

Todas as figuras e tabelas devem conter legendas ou títulos que descrevam precisamente seu conteúdo e o contexto ou amostra a partir da qual a informação foi obtida (por exemplo, quais

foram os resultados apresentados e qual foi o tipo de amostra e local). A legenda ou título devem ser curtos, mas compreensíveis e ser independentes da leitura do artigo.

São Paulo Medical Journal/Evidence for Health Care é atualmente publicada em preto e branco. Fotografias, fotomicrografias, gráficos de linha e barra e qualquer imagem publicada deve ser preparada considerando que não haverá diferenciação de cor (qualquer cor será descartada). Tons de cinza e padrões de impressão (pontos, listras e outras) devem ser usados, com bom contraste.

Artigos originais

Estudos clínicos, de coorte, caso-controle, de prevalência, incidência, acurácia e custo-efetividade e revisões sistemáticas com ou sem metanálise são considerados artigos originais.

A revista São Paulo Medical Journal/Evidence for Health Care apoia as políticas de registro de estudos clínicos da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do Comitê Internacional de Editores de Revistas Biomédicas, ICMJE) e reconhece a importância dessas iniciativas de registro e disseminação internacional de informações sobre estudos clínicos, com acesso aberto. Portanto, a partir de 2008, manuscritos sobre estudos clínicos são aceitos para publicação apenas se tiverem recebido um número de identificação de uma das bases de registro de estudos clínicos que foram validadas de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS e pelo ICMJE. Autores de estudos clínicos randomizados devem, portanto, registrar seus estudos antes de submetê-los para publicação na São Paulo Medical Journal/Evidence for Health Care. Os endereços para esses registros estão disponíveis a partir do site do ICMJE (www.icmje.org). O número de identificação deve ser declarado no final do resumo.

Artigos originais devem ser estruturados de maneira que contenham as seguintes partes: Introdução, Objetivo, Método, Resultados, Discussão e Conclusão. O texto não deve exceder 5.000 palavras (excluindo tabelas, figuras e referências), da introdução até o final da conclusão, e deve incluir um resumo estruturado com 250 palavras no máximo.⁵ “Resumo estruturado” significa que o resumo deve conter os seguintes itens: Contexto e objetivo, Tipo de estudo e local, Método, Resultados e Conclusão.

A estrutura do documento deve seguir o formato abaixo:

- 1) Título e resumo: deve ser mencionado no título e no resumo o desenho do estudo e/ou a maneira como seus participantes foram alocados para receberem intervenções, por exemplo: estudo "randomizado" ou "retrospectivo". O resumo deve prover uma síntese do que foi feito e do que foi encontrado.
- 2) Introdução: as razões para que o estudo fosse realizado devem ser explicitadas, descrevendo-se o atual estado da arte do assunto. Deve ser descrito o contexto, o que se sabe a respeito. Aqui não devem ser inseridos resultados ou conclusões do estudo. No último parágrafo, deve ser especificada a principal questão do estudo e a principal hipótese, se houver. Não se deve fazer discussões sobre a literatura na introdução; a seção de introdução deve ser curta.
- 3) Objetivo: deve ser descrito o principal objetivo do estudo, brevemente. Hipóteses pré-estabelecidas devem ser descritas claramente.

4) Métodos

4.1) Tipo de estudo: deve-se descrever o desenho do estudo e especificando, se apropriado, o tipo de randomização, cegamento, padrões de testes diagnósticos e a direção temporal (se retrospectivo ou prospectivo). Por exemplo: “estudo clínico randomizado”, “estudo clínico duplo-cego controlado por placebo”, “estudo de acurácia”.

4.2) Amostra, participantes ou pacientes: devem ser descritos os critérios de elegibilidade para os participantes (de inclusão e exclusão), as fontes e os procedimentos de seleção ou recrutamento. Em estudos de caso-controle, a lógica de distribuição de casos como casos e controles como controles deve ser descrita, assim como a forma de pareamento. O número de participantes no início e no final do estudo (após exclusões) deve ficar claro.

4.3) Local: deve ser indicado o local onde o estudo foi desenvolvido, o tipo de instituição: se primária ou terciária, se hospital público ou privado). Deve-se evitar o nome da instituição onde o estudo foi desenvolvido (para cegamento do texto para revisão): apenas o tipo de instituição deve ficar claro. Por exemplo: hospital universitário público.

4.4) Procedimentos (de intervenção, teste diagnóstico ou exposição): descrever quais as principais características da intervenção, incluindo o método, o período e a duração de sua administração ou de coleta de dados. Descrever as diferenças nas intervenções administradas a cada grupo (se a pesquisa é controlada).

4.5) Principais medidas, variáveis e desfecho: descrever o método de medida do principal resultado, da maneira pela qual foi planejado antes da coleta de dados. Afirmer quais são os desfechos primário e secundário esperados. Para cada variável de interesse, detalhar os métodos de avaliação. Se a hipótese do estudo foi formulada durante ou após a coleta de dados (não antes), isso deve ser declarado. Descrever os métodos utilizados para melhorar a qualidade das medidas (por exemplo, múltiplos observadores, treinamento etc.). Explicar como se lidou com as variáveis quantitativas na análise.

4.6) Tamanho de amostra e análise estatística: descrever o cálculo do tamanho da amostra, a análise estatística planejada, os testes utilizados e o nível de significância, e também qualquer análise post hoc. Descrever os métodos usados para o controle de variáveis e fatores de confusão, como se lidou com dados faltantes ("missing data") e como se lidou com casos cujo acompanhamento foi perdido ("lossfrom follow-up").

4.7) Randomização: descrever qual foi o método usado para implementação da alocação de sequência aleatória (por exemplo, envelopes selados contendo sequências aleatórias de números). Adicionalmente, descrever quem gerou a sequência aleatória, quem alocou participantes nos grupos (no caso de estudos controlados) e quem os recrutou.

5) Resultados: descrever os principais achados. Se possível, estes devem seguir de intervalos de confiança de 95% e o exato nível de significância estatística. Para estudos comparativos, o intervalo de confiança para as diferenças deve ser afirmado.

5.1) Fluxo de participantes: descreva o fluxo dos participantes em cada fase do estudo (inclusões e exclusões), o período de acompanhamento e o número de participantes que concluiu o estudo (ou com acompanhamento perdido). Considerar usar um fluxograma. Se houver análise do tipo "intenção de tratar", esta deve ser descrita.

5.2) Desvios: se houve qualquer desvio do protocolo, fora do que foi inicialmente planejado, ele deve ser descrito, assim como as razões para o acontecimento.

5.3) Efeitos adversos: devem ser descritos quaisquer efeitos ou eventos adversos ou complicações.

6) Discussão: fornecer interpretação dos resultados, levando em consideração as hipóteses do estudo e as conclusões. Enfatizar quais são os fatores novos e importantes encontrados no estudo, que farão parte das conclusões. Não repetir em detalhes dados apresentados na introdução ou resultados. Mencionar limitações dos achados que precisam ser notadas e possíveis implicações para pesquisas futuras. Descrever também potenciais vieses. Reportar achados relevantes de outros estudos. Afirmar (ou não) a generalização (validação externa) dos achados para populações.

7) Conclusões: especificar apenas as conclusões que podem ser sustentadas, junto com a significância clínica (evitando excessiva generalização). Tirar conclusões baseadas nos objetivos e hipóteses do estudo. A mesma ênfase deve ser dada a estudos com resultados negativos ou positivos.

Comunicações breves ou relatos de casos ou séries de casos

Comunicações breves e relatos de caso devem ter no máximo 3.000 palavras (da introdução ao final da conclusão). Comunicações breves devem ser estruturadas em Introdução, Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, como em artigos originais. Relatos de caso devem se constituir de Introdução, Relato de caso e Conclusão.

Tanto as comunicações breves como os relatos de caso devem ser submetidos com resumos e palavras-chave. Os resumos nas comunicações breves devem ser estruturados em Introdução, Métodos, Resultados, Discussão e Conclusões, como em artigos originais. Os resumos nos relatos de caso e séries de casos devem conter Contexto e Relato, com uma descrição do caso e discussão pertinente, e Conclusão.

São Paulo Medical Journal/Evidence for Health Care está interessada em publicar relatos de casos raros ou instrutivos, acompanhados por revisões sistemáticas da literatura, na qual estudos relevantes encontrados (com base em seu nível de evidência) sejam apresentados e discutidos.⁸

Artigos de revisão

São Paulo Medical Journal/Evidence for Health Care se interessa por publicar apenas revisões sistemáticas da literatura, incluindo bases de dados como a Biblioteca Cochrane, Pubmed, Embase e Lilacs. Artigos de revisão têm formato livre, cumprindo com as normas do estilo Vancouver.¹

Ainda assim, revisões sistemáticas ou metanálises devem cumprir com as mesmas normas de publicação estabelecidas para artigos originais.³ O texto não devem exceder 5.000 palavras (excluindo tabelas, figuras e referências).

Carta ao editor

Cartas ao editor devem versar sobre artigos publicados na São Paulo Medical Journal/Evidence for Health Care ou tratar de assuntos na área de saúde ou de interesse. Nesta categoria, o texto tem formato livre, mas não pode exceder 500 palavras e cinco referências.

Documentos citados

1. Uniform requirements for manuscript submitted to biomedical journals. International Committee of Medical Journal Editors. *Ann Intern Med.* 1997;126(1):36-47. Available from: <http://www.icmje.org>. Accessed in 2009 (Oct 30).
2. Begg C, Cho M, Eastwood S, et al. Improving the quality of reporting of randomized controlled trials. The CONSORT statement. *JAMA.* 1996;276(8):637-9. Available from: <http://www.consort-statement.org/consort-statement/>. Accessed in 2009 (Oct 30).
3. Moher D, Cook DJ, Eastwood S, Olkin I, Rennie D, Stroup DF. Improving the quality of reports of meta-analyses of randomised controlled trials: the QUOROM statement. *Quality of Reporting of Meta-analyses. Lancet.* 1999;354(9193):1896-900. Available from: <http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140673699041495/abstract> or <http://www.consort-statement.org/resources/downloads/other-instruments/quorum-statement-1999.pdf>. Accessed in 2009 (Sep 30).
4. STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of observational studies. Available from: http://www.strobe-statement.org/index.php?eID=tx_nawsecuredl&u=0&file=fileadmin/Strobe/uploads/checklists/STROBE_checklist_v4_combined.pdf&t=1257007091&hash=7713ea8f7f2662b288689b3dab40c1cb. Accessed in 2009 (October 30).
5. Haynes RB, Mulrow CD, Huth EJ, Altman DG, Gardner MJ. More informative abstracts revisited. *Ann Intern Med.* 1990;113(1): 69-76. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=retrieve&db=pubmed&dist_uids=2190518&dopt=abstract. Accessed in 2004 (Oct 20).
6. National Library of Medicine. Medical Subject Headings: annotated alphabetic list. Bethesda: NLM; 1998. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/query.fcgi?db=mesh>. Accessed in 2003 (Sep 12).
7. BVS Biblioteca Virtual em Saúde. Descritores em Ciências da Saúde. Available from: <http://decs.bvs.br/>. Accessed in 2003 (Sep 12).
8. Oxford Centre for Evidence-Based Medicine Levels of Evidence. Oxford Centre for Evidence-based Medicine Levels of Evidence (May 2001). Available from: <http://www.cebm.net/index.aspx?o=1047>. Assessed in 2010 (Feb 3).

Artigo original

Evaluation of Laboratory and Clinical Characteristics and Predictive Factors in the Induction Period of Treatment of Patients with Acute Leukemia

Avaliação de Características Clínicas e Laboratoriais como Fatores Preditivos no Período de Indução do Tratamento de Pacientes com Leucemias Agudas

Nivânia Lisboa Camelo¹; Thaiana da C. Lopes¹; Heliana Marinho Santana²; Patricia Ribeiro Azevedo³; Raimundo Antonio Gomes Oliveira⁴.

¹Mestranda, Saúde Materno-Infantil, Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno Infantil, Universidade Federal do Maranhão;

²Mestre, Saúde Materno-Infantil, Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno Infantil, Universidade Federal do Maranhão. Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão;

³Doutoranda, Rede Nordeste de Biotecnologia, Professora do Departamento de Enfermagem da Universidade Federal do Maranhão;

⁴Doutor, Análises Clínicas, Universidade de São Paulo. Professor do Departamento de Farmácia e Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário, da Universidade Federal do Maranhão.

Local de Realização da Pesquisa: Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão

ABSTRACT

Some clinical and laboratory variables have prognostic value and are used to stratify patients into risk groups leukemic. It was evaluate the predictive value of various hematological markers in SP (peripheral blood) and OM (bone marrow) in the induction treatment and disease-free survival in patients with acute leukemia. Venue: Clinical Research HUUFMA. Methodology: We evaluated the percentage of blasts, WBC and platelet counts and hemoglobin (Hb) in SP, and the percentage of blasts in BM at diagnosis and after treatment of 110 patients with acute leukemia. Results: Of 110 patients 61.82% were male and 80.9% were children and adolescents. 61.82% of patients had B-ALL, 12.73% of T-ALL and AML 25.45%. The percentage of blasts in BM and PB for each subgroup in the induction of leukemia, no significant difference. In the comparative study between the subgroups, there was a difference in their standard of presentation at diagnosis. For T-ALL platelet count in the initial days of induction (D0) showed significant difference for patients with relapsed after induction. In AML, patients with lower hemoglobin level in D0, values were significant for relapse after induction. ³ platelets above 100,000 in the last days of induction in B-ALL showed no recurrence at follow-up. Conclusion: The percentage of blasts in BM or SP showed no predictive value for remission of each group in the induction of leukemia. Platelet counts below 100.000/mm³ in T-ALL to D0 appears to have predictive value for relapse after induction. Patients with AML and lower Hb levels in D0, were more likely to relapse after induction. The expression of CD10 in D0 should be of good prognosis for remission induction. For ALL-B, platelet counts above the D29 100.000/mm³ demonstrated predictive value for maintenance of no recurrence after D29.

Keywords: Acute leukaemia; Predictive Value; Hematological Markers; Bone marrow; Peripheral blood.

RESUMO

Algumas variáveis clínicas e laboratoriais têm valor prognóstico e servem para estratificar os pacientes leucêmicos em grupos de risco. Foi avaliado o valor preditivo de diferentes marcadores hematológicos em SP (sangue periférico) e MO (medula óssea) na indução do tratamento e sobrevida livre de doença em pacientes com leucemias agudas. O local do estudo foi o CEPEC do HUUFMA. Foram avaliados o percentual de blastos, contagem de leucócitos e plaquetas e nível de hemoglobina (Hb) em SP; e o percentual de blastos em MO, ao diagnóstico e após o tratamento de 110 pacientes com leucemia aguda. Dos 110 pacientes 61,82% eram do sexo masculino e 80,9% era infanto-juvenil. 61,82% dos pacientes eram portadores de LLA-B, 12,73% de LLA-T e 25,45% de LMA. O percentual de blastos em MO e SP para cada subgrupo de leucemia na indução, não demonstrou diferença significativa. No estudo comparativo entre os subgrupos, houve diferença no seu padrão de apresentação ao diagnóstico. Para as LLA-T a contagem de plaquetas no dia inicial da indução (D0) demonstrou diferença significativa para os pacientes com recidiva após indução. Nas LMA, os pacientes com menor nível de Hb no D0, apresentaram valores significativos para recidiva após indução. Plaquetas acima de $100.000/\text{mm}^3$ no último dia da indução na LLA-B indicou não recidiva no período de acompanhamento. O percentual de blastos em SP ou MO não demonstrou valor preditivo para remissão de cada um dos grupos de leucemias na indução. A contagem de plaquetas abaixo de $100.000/\text{mm}^3$ nas LLA-T ao D0 parece ter valor preditivo para recidiva após a indução. Os pacientes com LMA e menor nível de Hb no D0, apresentaram maior probabilidade à recidiva após a indução. CD10+ no D0 indicou bom prognóstico para remissão na indução. Para as LLA-B, contagens de plaquetas acima de $100.000/\text{mm}^3$ ao D29 demonstraram valor preditivo para manutenção de não recidiva após D29.

Palavras-chave: Leucemia Aguda; Valor Preditivo; Marcadores Hematológicos; Medula óssea; Sangue periférico.

1 INTRODUÇÃO

As leucemias agudas se caracterizam pela proliferação clonal da célula tronco hematopoética substituindo o tecido normal da medula óssea. A recente classificação da OMS incorpora características citogenéticas e imunofenotípicas que apresentam impacto prognóstico (CUNHA, 2005).

A LLA (Leucemia Linfóide Aguda) representa 75 - 80% de todos os casos de leucemia em crianças (RIBEIRO, 2001) e apenas 20% em adultos (BARRIOS, 2001). Pode ser definida como uma proliferação clonal maligna de células precursoras linfóides de etiologia desconhecida que leva à substituição da hematopoiese normal por células linfóides imaturas capazes de infiltrar linfonodos, baço, fígado e outros órgãos, freqüentemente seguida de neutropenia, anemia e plaquetopenia no SP (sangue periférico) (MARTINS, FALCÃO, 2000; PELLOSO, 2003).

A transformação maligna pode ocorrer durante qualquer estágio de diferenciação das células blásticas, o que explica a heterogeneidade da doença (BERG, 1992). Para um melhor diagnóstico e classificação são realizados estudos da morfologia, citoquímica, cariótipo e imunofenotipagem (CHANG, 2004). A LLA é considerada como modelo de sucesso em oncologia clínica e a primeira doença maligna disseminada a responder consistentemente à quimioterapia (MAUER, 1995).

A LMA (Leucemia Mielóide Aguda) caracteriza-se pelo crescimento descontrolado e exagerado das células indiferenciadas, chamadas "blastos", de característica mielóide. Na maioria dos casos desta doença não existe causa evidente. Sua incidência é de 1/150.000 na infância e adolescência. Apresenta-se com uma variedade de tipos de células que podem ser observadas no sangue periférico e medula óssea (HAMERSCHLAK, 2008).

Vários estudos tentam identificar características clínicas e biológicas que se correlacionam com o prognóstico, objetivando incorporá-las ao sistema de classificação de risco usado para definir a estratégia terapêutica (SMITH, 1996). Desta forma os pacientes considerados de baixo risco recebem tratamento menos intensivo, enquanto aqueles de maior risco de falha são tratados de modo mais agressivo (FRIEDMANN, 2000; PUI, 1995; PUI, 1998).

Nos últimos anos, avanços nos cuidados dos pacientes com neoplasias hematológicas têm resultado na melhoria da sobrevida e da qualidade de vida. Por outro lado, a maioria dos pacientes está sujeito a complicações graves e recebem modalidades de tratamento com potencial elevado de complicações (SOARES et al., 2005).

Diversas variáveis clínicas e laboratoriais como idade ao diagnóstico, gênero, contagem de leucócitos, de plaquetas, níveis de hemoglobina, expressão de determinados antígenos pelas células neoplásicas ou presença de translocações cromossômicas, têm valor prognóstico, são passíveis de avaliação no momento do diagnóstico 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 e TUCCI, 2008).

Nos últimos 10 anos, a IMF (imunofenotipagem) tem mantido sua posição como uma ferramenta indispensável de diagnóstico. Melhorias tecnológicas e a disponibilidade de uma gama de anticorpos e fluorocromos conduziu a uma fenotipagem mais precisa das células, levando a uma melhor identificação de populações anormais de células hematológicas (CRAIG et al., 2008).

A imunofenotipagem, realizada com a técnica de CMF (citometria de fluxo), é útil tanto no diagnóstico, classificação, prognóstico, estadiamento, monitoramento, como na caracterização fenotípica das células hematopoiéticas patológicas (BONJEAN et al., 2004; MARTINS e FALCÃO, 2000). A CMF é uma técnica multiparamétrica, que utiliza anti-corpos monoclonais marcados com fluorescência para analisar qualitativa e quantitativamente padrões de expressão de antígenos (clusters designations - CDs) em populações celulares de interesse (HARRIS et al., 1999). A metodologia permite a análise de 10^5 a 10^6 células por minuto, medindo simultaneamente as propriedades físicas e químicas de tais células (HARMENING, 1997). Essa técnica tem se desenvolvido rapidamente nos últimos anos e suas aplicações são amplas, tanto em laboratórios de pesquisa quanto nos laboratórios clínicos, oferecendo objetividade, sensibilidade, rapidez, especificidade e precisão na análise das características celulares, incluindo o conteúdo de DNA/RNA, a detecção e quantificação de antígenos celulares, o ensaio de resistência celular a drogas e o estudo de conteúdo citoplasmático, permitindo análises multiparamétricas de um grande número de células em pequeno intervalo de tempo (ORFAO et al., 1995 e ORFAO et al., 1999).

Em relação à microscopia convencional, a citometria de fluxo apresenta inúmeras vantagens para a análise de células hematopoiéticas, principalmente no que diz respeito às limitações de interpretação e resolução do microscopista. A distinção entre células hematopoéticas patológicas e células normais presentes na amostra é baseada nos padrões fenotípicos que diferenciam tais populações celulares (ORFAO et al., 1999).

Células leucêmicas apresentam características imunofenotípicas de células normais, porém, bloqueadas em um estágio de maturação (JORDAN, 2002 e MCKENNA, 2000). Fenótipos aberrantes de células leucêmicas misturam determinantes antigênicos de linhagens celulares (mielóide/linfóide), assincronia de expressão gênica, fenótipos ectópicos e diferenciação anormal, dentre outras características. Estes fenótipos aberrantes traduzem as anormalidades genéticas presentes nestas células (ORFAO et al., 1995 e ORFAO et al., 1999).

Um consenso geral atesta a IMF como uma modalidade de diagnóstico primário para várias desordens hematopoiéticas, incluindo as linfoproliferativas crônicas, linfomas não-Hodgkin, leucemias agudas, crises blásticas, desordens mieloproliferativas crônicas e síndromes mielodisplásicas. (ARGÜELLES et al., 2005 e ORFAO et al., 1999). Nas neoplasias hematológicas, essa técnica é relevante tanto para o diagnóstico, a classificação, o prognóstico e o monitoramento; enquanto que nas desordens mieloproliferativas, apresenta valor somente para o monitoramento. De acordo com o Consenso da Segunda Conferência da América Latina para Imunofenotipagem de Malignidades Hematológicas por Citometria de Fluxo, ocorrida em 3 e 4 de maio de 2005, no México, os painéis de anticorpos monoclonais utilizados nesse método são montados de acordo com os sinais clínicos dos pacientes e os achados morfológicos e citoquímicos previamente analisados. Nas leucemias agudas, o painel utilizado deve ser capaz de distinguir entre leucemia linfóide aguda da linhagem T, leucemia linfóide aguda com células B precursoras, leucemia mielóide aguda e leucemia aguda bifenotípica (QUIXABEIRA e SADDI, 2008).

Em 1995, o Grupo Europeu de Estudos de Leucemias Agudas (EGIL) classificou imunologicamente as leucemias agudas em: mielóide, linfóide B e T. As leucemias de linhagem B foram divididas de acordo com os estágios de diferenciação normal dos progenitores B na medula óssea, classificando-se em: pró-B, pré-pré-B ou comum, pré-B e B-maduro (EGIL, 1995). (quadro 1).

B-I (LLA pró-B)	CD19 e/ou citCD22 e/ou citCD79a, sem expressão de outros antígenos B de diferenciação
B-II (LLA B comum ou pré-pré-B)	CD10+ (cLLA+)
B-III (LLA pré-B)	IgM citoplasmática+
B-IV (LLA B madura)	K ou λ citoplasmática ou de membrana

Quadro 1: Classificação imunológica das leucemias linfoides agudas da linhagem B (EGIL, 1995)

Vários estudos apontam a importância da imunofenotipagem na diferenciação das leucemias linfóides B e T, sua resposta a tratamento, incluindo detecção de doença residual mínima (DIGIUSEPPE et al 2007; FIONA et al 2008). Além disso, alguns imunofenótipos específicos para as LLA, como a perda da expressão do CD10(-) ou do CD19(-), ou do CD9(-) ou a expressão parcial ou negativa do CD34 podem estar associadas a alterações citogenéticas e moleculares específicas de mau prognóstico (FIONA et al 2008). Nesse mesmo sentido, dados de CONSOLINI et al (1998) demonstram que a expressão do CD10(+) está associada a outros fatores de bom prognóstico nas LLA-B da infância, mas que não deve servir como variável independente de prognóstico, o que também é reportado por FIONA et al. (2008). De acordo com Farias et al (2004) a expressão do antígeno CD10, é de impacto favorável no prognóstico das LLA na infância (FARIAS et al., 2004).

Nosso trabalho se justifica, posto não haver nenhum estudo em nosso estado correlacionado as características clínicas e laboratoriais específicas às variáveis imunológicas como fatores preditivos no tratamento de pacientes com leucemias agudas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o valor preditivo de diferentes marcadores hematológicos em sangue periférico e medula óssea no período de indução do tratamento e sobrevida livre de doença em pacientes com leucemias agudas atendidos em Centro de Referência em Oncologia de São Luís-MA.

2.2 Específicos

Relacionar os valores de leucócitos, hemoglobina e plaquetas no dia inicial do período de indução com a sobrevida livre de doença durante o período de acompanhamento;

Relacionar os valores de leucócitos, hemoglobina e plaquetas no último dia do período de indução com a sobrevida livre de doença durante o período de acompanhamento;

Comparar a contagem de blastos na medula óssea e sangue periférico ao diagnóstico com o desfecho clínico no período de indução para cada subtipo de leucemia aguda;

Comparar a contagem de blastos na medula óssea e sangue periférico ao diagnóstico com o desfecho clínico no período de indução entre os diferentes subtipos de leucemia aguda;

Verificar se há ou não relação entre a remissão após o período de indução e a fase maturativa das células neoplásicas nos diferentes subtipos imunológicos de leucemias.

3 METODOLOGIA

3.1 Local

O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa Clínica do Centro de Pesquisa Clínica (LPC-CEPEC) do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA) no município de São Luís, Maranhão.

3.2 Casuística

Foram avaliadas amostras de medula óssea e sangue periférico de 110 pacientes encaminhados pelo IMOAB (Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo) com suspeita clínica de leucemia aguda. Foram divididos de acordo com as faixas etárias adotadas pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva): infante-juvenil (0 a 19 anos) e adulto (20 a 59 anos) e idosos (acima de 60 anos) (INCA, 2009).

O diagnóstico da leucemia e sua sub-classificação foi firmado a partir do método de imunofenotipagem, de acordo com o Grupo Europeu de classificação imunológica das leucemias agudas (EGIL, 1995).

3.2.1 Aspectos clínicos e laboratoriais

Os dados clínicos foram obtidos através de revisão de prontuários médicos do IMOAB, sendo analisados a idade e gênero. Os dados laboratoriais são provenientes do Serviço de Imunofenotipagem do Laboratório de Pesquisa Clínica do CEPEC do Hospital Universitário da UFMA, o qual trabalha em parceria com o IMOAB em pesquisas oncohematológicas do qual este trabalho faz parte. Foram avaliados como dados laboratoriais em sangue periférico: o percentual de blastos, a contagem de leucócitos e plaquetas e dosagem de hemoglobina; e o percentual de blastos em medula óssea, todos ao diagnóstico e após o tratamento, a fim de avaliar a resposta terapêutica.

Como critério de análise de resposta terapêutica considerou-se como remissão uma medula óssea com menos de 5% de blastos após a primeira fase de

indução do tratamento, segundo os protocolos de tratamento utilizados no IMOAB, o protocolo do GBTLI-99 (Grupo Brasileiro para Tratamento de Leucemias Linfóides Agudas) para LLA; enquanto que para LMA foi utilizado o protocolo do BFM-83 (Grupo Europeu Berlim-Frankfurt-Munich).

Para as LLA-B e T o protocolo terapêutico caracteriza o primeiro dia do período de indução do tratamento como D0 e o vigésimo nono dia da indução como final, o D29. Para as LMA também o dia inicial é descrito como D0, porém o dia final é o décimo quinto dia da indução, o D15.

O período de acompanhamento dos pacientes que remeteram na indução do tratamento estendeu-se até o mês de junho de 2012. Durante este período, as amostras dos pacientes com suspeita de recidiva foram novamente encaminhadas ao LPC-CEPEC com solicitação de nova imunofenotipagem e, caso apresentassem percentual imunofenotípico de blastos, foram caracterizados como recidiva.

A sobrevida livre de doença foi definida como o período de tempo após o tratamento, durante o qual o paciente sobreviveu sem sinais clínicos e laboratoriais da doença.

3.2.2 Diagnóstico das leucemias agudas por imunofenotipagem

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

3.3 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo, indivíduos com o diagnóstico imunofenotípico de LLA tipos B, T ou de LMA, diagnosticados pelo serviço de imunofenotipagem do Laboratório de Pesquisa Clínica do CEPEC entre agosto de 2008 a julho de 2011.

3.4 Critérios de não inclusão

Não foram incluídos na pesquisa os pacientes que apresentaram simultaneamente expressão de marcadores imunofenotípicos de diferentes sublinhagens (bifenotípicos), e aqueles que não apresentavam os dados laboratoriais no primeiro e último dia do período de indução do tratamento para as LLA e no primeiro dia do tratamento para as LMA, assim como os que se recusaram a participar do estudo.

3.5 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes que abandonaram o tratamento.

3.6 Análise estatística dos dados

Os dados foram tabulados na planilha eletrônica excel e posteriormente processados no epiinfo versão 6.0. Inicialmente foi testada a normalidade através do teste Shapiro-Wilk. Para comparar as variáveis do estudo entre os grupos, foram utilizados os testes t de student ou Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3.7 Aspectos éticos

Este estudo integra o Projeto “Estudo Imunofenotípico por Citometria de Fluxo das Leucemias Agudas na Infância no estado do Maranhão”, que foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e aprovado conforme as diretrizes descritas na Resolução de nº 196/96 e com Parecer Consubstanciado nº 115/2008 de 11 de março de 2008. Por se tratar de estudo envolvendo seres humanos, só participaram os pacientes que, de

livre e espontânea vontade, concordaram e assinaram o TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido) (ANEXO A). Todos os participantes foram esclarecidos a respeito do estudo e os que concordaram em participar da pesquisa assinaram o TCLE (APÊNDICE A). Os menores de 18 anos foram autorizados por seus responsáveis legais.

4 RESULTADOS

População leucêmica

Dos 110 pacientes estudados, 61,82% (n=68) foram do gênero masculino (M) versus 38,18% (n=42) do feminino (F), demonstrando uma proporção M:F de 1,62:1,0. Dessa população, 32,73% (n=36) foi a óbito durante o período de indução do tratamento. Do total de óbitos, 63,9% foram de homens e 36,1% de mulheres. O percentual de óbitos no subgrupo LLA-B foi de 28,9%(n=20), para LLA-T 33,3% (n=5) e 37,9%(n=11) para LMA.

No que se refere à faixa etária, 80,9% estavam enquadrados na faixa etária infanto-juvenil (até 19 anos) e 19,1% na faixa adulta (maior que 19 anos).

Quanto aos subgrupos de leucemias agudas 61,82% dos pacientes eram portadores de leucemia linfóide aguda (LLA) tipo B (LLA-B), 12,73% de leucemia linfóide aguda (LLA) tipo T (LLA-T) e 25,45% de leucemia mielóide aguda (LMA).

Parâmetros hematológicos

A porcentagem de blastos em medula óssea e sangue periférico no dia inicial do período de indução do tratamento (D0), assim como os níveis de hemoglobina, contagem de leucócitos e plaquetas nos dias inicial (D0) e final do tratamento (D29 para as LLA e D15 para as LMA), encontram-se dispostos nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

A tabela 1 mostra que no subtipo leucêmico LLA-B o grupo que não foi a óbito durante o período de indução do tratamento apresentou percentual médio de blastos no sangue periférico de 41,2% e na medula óssea de 74,6%. Para esse mesmo grupo de pacientes (sem terem ido a óbito), o subtipo leucêmico LLA-T, exibiu média percentual de blastos no sangue periférico de 68,1% e na medula óssea de 79,9%. Sob este mesmo critério, em relação às LMA os percentuais de blastos no sangue periférico e medula óssea foram de respectivamente 30,4% e 57,9%.

Os resultados da tabela 1 demonstram estatisticamente que em relação ao percentual de blastos em medula óssea no D0 para os pacientes que não foram a óbito durante o período de indução do tratamento, houve diferença significativa entre as LLA-B (74,6%) e LMA (57,9), com $p = 0,032$, bem como entre as LLA-T (79,9%) e LMA (57,9%), com $p = 0,017$. Com relação ao percentual de blastos em sangue

periférico no D0 para os pacientes que não foram a óbito durante o período de indução do tratamento, também houve diferença significativa entre as LLA-B (41,2%) e LLA-T (68,1%), com $p = 0,045$, e entre as LLA-T (68,1%) e LMA (30,4), com $p = 0,003$. Em suma, os pacientes com LMA apresentaram um percentual de blastos ao D0 em medula óssea menor que os com LLA-B e que os com LLA-T. Além disso, os pacientes com LLA-T apresentaram um maior percentual de blastos ao D0 no sangue periférico que aqueles com LLA-B e com LMA.

Fazendo referência ao grupo que foi a óbito durante o período de indução, as LLA B demonstraram percentual médio de blastos no sangue periférico de 44,4% e na medula óssea de 75,8%. Ainda neste grupo, os portadores de LLA-T indicaram como média percentual de blastos no sangue periférico 61,6% e na medula óssea média de 90,7%. Para as LMA, os percentuais de blastos no sangue periférico e medula óssea foram de respectivamente 32,7% e 63,2% (tabela 1).

O percentual de blastos em medula óssea e sangue periférico para cada um dos subgrupos de leucemia, no período de indução do tratamento não demonstrou diferença significativa, por outro lado, em estudo comparativo entre os subgrupos de leucemia, houve diferença no seu padrão de apresentação ao diagnóstico (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual de blastos na medula óssea e sangue periférico entre os indivíduos portadores de leucemia linfóide aguda (B ou T) e mielóide aguda de acordo com a ocorrência de óbito durante o período de indução.

Percentual de Blastos	Óbito durante o período de indução		Valor de p
	Não Média±DP	Sim Média±DP	
LLA-B (n=67)			
Blasto MO (%)	74,6 ^a ±25,4	75,8±25,1	0,86
Blasto SP (%)	41,2 ^b ±33,9	44,4±31,7	0,71
LLA-T (n=15)			
Blasto MO (%)	79,9 ^a ±19,8	90,7±5,3	0,37
Blasto SP (%)	68,1 ^b ±23,1	61,6±29,7	0,66
LMA (n=28)			
Blasto MO (%)	57,9 ^a ±23,3	63,2±31,5	0,61
Blasto SP (%)	30,4 ^b ±25,6	32,7±32,1	0,83

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Diferença estatisticamente significativa: (^a $p=0,0117$; ^b $p=0,0103$).

±DP= desvio padrão.

Na tabela 2, em relação ao primeiro dia do período de indução do tratamento, os pacientes com LLA-B que não recidivaram durante o acompanhamento, apresentaram média de contagem de leucócitos de 19.116/mm³, contagem média de plaquetas de 53.709/mm³ e nível de hemoglobina de 7,66 g/dL. Já os que recidivaram durante o período de acompanhamento, mostraram média de contagem de leucócitos de 23.022/mm³, contagem média de plaquetas de 42.201/mm³ e dosagem média de hemoglobina de 8,6g/dL. Para as LLA-T no mesmo período, os pacientes que não apresentaram recidiva durante o acompanhamento demonstraram contagem média de leucócitos de 76.341/mm³, média na contagem de plaquetas de 88.642/mm³ e nível de hemoglobina de 9,10g/dL, enquanto aqueles que recidivaram exibiram contagem média de leucócitos e plaquetas respectivamente de 54.800/mm³ e 39.700/mm³ e dosagem média de hemoglobina de 8,23g/dL. Os pacientes com LMA que não recidivaram, mostraram contagem média de leucócitos de 18.206/mm³, para plaquetas de 62.960/mm³ e média na dosagem de hemoglobina de 8,13g/dL. Os que recidivaram da doença indicaram

média de 76.800/mm³ para leucócitos, 34.733/mm³ para plaquetas e nível médio de hemoglobina de 6,33g/dL.

Tabela 2. Distribuição dos marcadores hematológicos do dia inicial da terapia quimioterápica entre os indivíduos portadores de leucemia linfóide aguda (B ou T) e mielóide aguda de acordo com a ocorrência de recidiva durante o acompanhamento.

Dia inicial (D 0)	Recidiva durante o acompanhamento		Valor de p
	Não	Sim	
	Média±DP	Média±DP	
LLA-B (n=47)			
Leucócitos (mm ³)	19.116±33.705	23.022±22.441	0,69
Hemoglobina (g/dl)	7,66±2,25	8,60±2,81	0,23
Plaquetas (mm ³)	53.709±67.340	42.201±45.716	0,56
LLA-T (n=10)			
Leucócitos (mm ³)	76.341±56.177	54.800±27.391	0,73
Hemoglobina (g/dl)	9,10±2,31	8,23±4,65	0,90
Plaquetas (mm ³)	88.642±48.458	39.700±7.594	0,04*
LMA (n=12)			
Leucócitos (mm ³)	18.206±23.165	76.800±121.535	0,92
Hemoglobina (g/dl)	8,13±1,91	6,33±1,38	0,02*
Plaquetas (mm ³)	62.960±83.428	34.733±22.293	0,50

* Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).
±DP= desvio padrão.

Para as LLA-T a contagem de plaquetas no dia inicial do período de indução (D0) demonstrou diferença significativa para os pacientes que apresentaram recidiva após o período de indução (tabela 2). Entre os pacientes que recidivaram no período de acompanhamento (n=3), 100% apresentaram contagem de plaquetas menor que 100.000/mm³ no dia inicial do tratamento (tabela 3), o que não foi observado na contagem de leucócitos e níveis de hemoglobina. (tabela 2). Enquanto que, dos que apresentaram sobrevida livre de doença durante o período de acompanhamento (n=7), 28,57% exibiram contagem de plaquetas abaixo de 100.000/mm³ no dia inicial do tratamento (tabela 3).

Tabela 3: Contagem de plaquetas no dia inicial do tratamento em pacientes com LLA T que recidivaram ou não no período de acompanhamento

Recidiva	Plaquetas no dia inicial do período de indução		
	Plaquetas <100.000/mm ³	Plaquetas >100.000/mm ³	Total
Sim	3	0	3
Não	2	5	7

Em relação às LMA, os pacientes com menores níveis de hemoglobina no dia inicial do tratamento apresentaram valores significativos para recidiva após o período de indução. Entre os pacientes que recidivaram no período de acompanhamento (n=8), 62,5% apresentaram níveis de hemoglobina menor que 8g/dL. Enquanto que, dos que apresentaram sobrevida livre de doença durante o período de acompanhamento (n=4), 100% exibiram níveis de hemoglobina maior ou igual a 8g/dL no dia inicial do tratamento (Tabela 4).

A maioria dos casos de remissão no período de indução dos pacientes com LLA-B se enquadraram na faixa etária infanto-juvenil (97,36%), das quais 94,54% foram LLA-BII ou LLA-BIII (que são CD10+), o que não ocorreu com as LLA-T cuja taxa de remissão foi bem mais baixa (53,33%).

Na LMA, a casuística foi mais heterogênea (44,82% infanto-juvenil), assim também como a resposta ao tratamento (58,62% de remissão no período de indução).

Tabela 4: Concentração de hemoglobina no dia inicial do tratamento em pacientes com LMA que recidivaram ou não no período de acompanhamento

Recidiva	Hemoglobina no dia inicial do período de indução		
	Hemoglobina < 8,0 g/dL	Hemoglobina ≥ 8,0 g/dL	Total
Sim	5	3	8
Não	0	4	4

Na tabela 5, com referência ao último dia do período de indução do tratamento, os pacientes com LLA B que não recidivaram durante o acompanhamento, apresentaram média de contagem de leucócitos de 4.087/mm³, contagem média de plaquetas de 249.608/mm³ e dosagem de hemoglobina de 8,60 g/dL. Já os que tiveram recidiva durante o período de acompanhamento, mostraram média de contagem de leucócitos de 4.863/mm³, contagem média de plaquetas de 171.692/mm³ e dosagem média de hemoglobina de 9,15 g/dL.

Para as LLA T no mesmo período, os pacientes que não apresentaram recidiva durante o acompanhamento demonstraram contagem média de leucócitos de 3.422/mm³, média na contagem de plaquetas de 207.080/mm³ e na dosagem de hemoglobina de 8,64g/dL, enquanto aqueles que recidivaram exibiram contagem média de leucócitos e plaquetas respectivamente de 7.336/mm³ e 461.333/mm³ e dosagem média de hemoglobina de 9,46 g/dL (tabela 5). Os parâmetros hematológicos dos pacientes com LMA no último dia da indução, não foram analisados por falta de dados.

Tabela 5. Distribuição dos marcadores hematológicos do dia final da terapia quimioterápica entre os indivíduos portadores de leucemia linfóide aguda (B ou T) de acordo com a ocorrência de recidiva durante o acompanhamento.

Dia final (D 29)	Recidiva durante o acompanhamento		Valor de p
	Não	Sim	
	Média±DP	Média±DP	
LLA-B (n=47)			
Leucócitos (mm ³)	4.087±3.050	4.863±4.719	0,59
Hemoglobina (g/dl)	8,60±1,59	9,15±2,23	0,39
Plaquetas (mm ³)	249.608±113.591	171.692±111.922	0,05*
LLA-T (n=10)			
Leucócitos (mm ³)	3.422±1.917	7.336±6.805	0,25
Hemoglobina (g/dl)	8,64±1,57	9,46±2,13	0,54
Plaquetas (mm ³)	207.080±148.659	461.333±314.326	0,16

* Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).
±DP= desvio padrão.

De todos os pacientes do subgrupo da LLA B que apresentaram sobrevida livre de doença durante o período de acompanhamento (n=24), apenas 4,17% apresentaram contagem de plaquetas menor que 100.000/mm³ no último dia do período de indução do tratamento (tabela 6), o que não ocorreu em referência à dosagem de hemoglobina e à contagem de leucócitos para o mesmo subgrupo.

Dos 13 pacientes que recidivaram no período de acompanhamento, 38,46% demonstraram contagem de plaquetas abaixo de 100.000/mm³ no último dia do período de indução do tratamento (tabela 6), o que não ocorreu com relação à dosagem de hemoglobina e contagem de leucócitos para o mesmo subgrupo.

A recuperação da contagem de plaquetas para LLA B no último dia do período de indução do tratamento a valores acima de 100.000/mm³ apontou para a não recidiva da doença no período de acompanhamento.

Tabela 6: Contagem de plaquetas no dia final do tratamento em pacientes com LLA B que recidivaram ou não no período de acompanhamento

Recidiva	Plaquetas no dia final do período de indução		
	Plaquetas <100.000/mm ³	Plaquetas >100.000/mm ³	Total
Sim	5	8	13
Não	2	22	24

5 DISCUSSÃO

Os resultados de várias pesquisas confirmam o predomínio da leucemia aguda no gênero masculino (PAOLUCCI et al, 2001; SILVERMAN et al, 2001). Alguns investigadores evidenciaram que crianças do gênero masculino apresentaram pior prognóstico que do sexo feminino (CHESSELLS et al., 2000; PUI et al., 1995). Segundo Friedmann e Weinstein (2000), de modo semelhante, o gênero masculino tem sido considerado como uma característica prognóstica adversa. Por outro lado, segundo este mesmo autor, muitos trabalhos não têm mostrado o gênero como uma variável estatisticamente significativa, isto porque estas discrepâncias são tratamento-dependentes e mudam com os avanços da terapia. Estudos realizados por Silverman et al. (2001) e por Pui et al. (2004) evidenciaram que o gênero masculino deixou de ser considerado fator de pior prognóstico nestes estudos clínicos, com sobrevida livre de eventos, em cinco anos, de 80%, para meninos. Em nosso estudo, tal variável serviu apenas para a caracterização do gênero dos indivíduos que dele participaram.

Os pacientes com LMA apresentaram significativo percentual de blastos ao D0 em MO menor que os com LLA-B e os com LLA-T. Além disso, os pacientes com LLA-T apresentaram um maior percentual de blastos ao D0 no SP que aqueles com LLA-B e com LMA, o que sugere que as LLA-T devam possuir maior poder invasivo medular, com provável maior taxa de proliferação e mais rápido *turnover* dos blastos para o sangue periférico. Estas diferenças apontadas também sugerem que as neoplasias acima referidas se apresentam de maneiras distintas ao diagnóstico, entretanto, este modo diferenciado de apresentação não parece predizer seu desfecho no período de indução. Em suma, apesar de os dados apresentados na tabela 1 apontarem ter havido diferença no padrão de apresentação ao diagnóstico em relação ao percentual de blastos em MO e SP para cada um dos sub grupos de leucemia, não houve diferença significativa entre eles ao final do período de indução, o que sugere que este dado embora distinto à apresentação da doença (D0) não prediga o óbito no período de indução do tratamento. Dados da literatura (PUI, C. H, 1995) confirmam nossos resultados em relação à contagem de blastos ao diagnóstico (à apresentação) entre as diferentes leucemias agudas, porém, é bastante controversa na literatura a correlação entre o elevado percentual de blastos

ao diagnóstico como variável independente e um pior prognóstico em pacientes com leucemias agudas.

Os dados apresentados para as LLA -T (tabela 2) cuja contagem de plaquetas no D0 do período de indução demonstrou diferença significativa para os pacientes que apresentaram recidiva após indução (durante a fase de acompanhamento) direcionam para a necessidade de um estudo mais abrangente para avaliar se de fato contagens de plaquetas menores que $100.000/\text{mm}^3$ podem ser utilizadas como de valor preditivo para recidiva ou não desta patologia durante a fase de indução do tratamento.

Não houve diferença significativa para as contagens de leucócitos e dosagem de hemoglobina no D0 do período de indução em relação aos pacientes que apresentaram recidiva após indução para as LLA-T. Em consonância com nossos dados, estudos de OLIVER TEUFFEL (2008) não demonstraram associação entre o grau de anemia (nível de hemoglobina) e resposta a tratamento em pacientes com LLA-T. Por outro lado, dados de PAHLOOSYE ET AL (2011) apontam que elevadas contagens de leucócitos ao diagnóstico (em pacientes sem tratamento prévio), é um fator de prognóstico adverso na resposta ao tratamento em crianças do sexo masculino com LLA-T. Tal diferença em relação ao nosso estudo pode ter sido influenciada pelo fato de muitos pacientes terem feito uso paliativo de corticóides antes da coleta e envio de suas amostras ao nosso Serviço para diagnóstico, bem como pelo fato de nossa análise estatística não ter sido feita separadamente por gêneros bem como pela limitada casuística de nosso trabalho para as LLA-T.

Em relação às LMA, os pacientes com menor dosagem de Hb no D0 apresentaram maior tendência à recidiva após o período de indução, sugerindo que este marcador seja de valor preditivo para não remissão da doença durante a fase de indução. Dados de FRANCIS GILES et al (2005) estudando pacientes com LMA não encontraram associação entre os níveis de hemoglobina e remissão completa da doença. Para estes pesquisadores as contagens de plaquetas abaixo de $50.000/\text{mm}^3$ se apresentaram como um fator adverso independente para remissão completa da doença.

Os resultados apresentados na tabela 2 também demonstram que as LLA-T e as LMA são aparentemente doenças mais heterogêneas à sua apresentação e na resposta ao tratamento que as LLA B.

As LLAB que apresentaram remissão após fase de indução do tratamento se mostraram bem mais homogêneas em relação à idade (97,36% no grupo infante juvenil) e à fase maturativa das células neoplásicas (94,54% foram dos subtipos LLABII ou LLABIII, que são CD10+). Estes dados sugerem que a expressão do CD10 seja um marcador preditivo de bom prognóstico para remissão da doença em crianças com LLA-B. Nossos dados estão de acordo com os estudos de DIGIUSEPPE et al (2007) e FIONA et al (2008) em relação a expressão do CD10 e resposta ao tratamento, que consideraram que a não expressão do CD10 pode estar associadas a alterações citogenéticas e moleculares de mau prognóstico. Os dados de CONSOLINI et al (1998) e FARIAS et al (2004) também estão de acordo com nossos resultados e apontam que a expressão do CD10(+) está associada a outros fatores de bom prognóstico nas LLA-B da infância. Isto não ocorreu com as LLA T cuja taxa de remissão foi bem mais baixa (53,33%) nem com as LMA, cuja casuística foi mais heterogênea (44,82% infante-juvenil), assim também como a resposta ao tratamento (58,62% de remissão no período de indução).

Para o subgrupo das LLA B, de todos os pacientes que não recidivaram no período de acompanhamento, 95,83% apresentaram contagem de plaquetas maior que 100.000/mm³ no D29 do período de indução do tratamento, o que não ocorreu em referência à dosagem de hemoglobina a contagem de leucócitos para o mesmo subgrupo, tabela 3, demonstrando que as contagens de plaquetas acima de 100.000/mm³ tiveram valor preditivo positivo para remissão da doença. Acrescido a isso, os pacientes que apresentaram contagem de plaquetas abaixo de 100.000/mm³ no último dia do período de indução do tratamento não mantiveram remissão da doença. De todos os pacientes do subgrupo da LLA B que não recidivaram no período de acompanhamento, 95,83% apresentaram contagem de plaquetas maior que 100.000/mm³ no último dia do período de indução do tratamento (tabela 4). A recuperação da contagem de plaqueta para LLA B no último dia do período de indução do tratamento a valores acima de 100.000/mm³, demonstrou ter valor preditivo para a não recidiva da doença no período de acompanhamento. Os pacientes com LLA B que apresentaram contagem de plaquetas abaixo de 100.000/mm³ no último dia do período de indução do tratamento não mantiveram remissão da doença durante o acompanhamento clínico (tabela 4). Ter contagem de plaquetas menor que 100.000/mm³ no último dia do período de indução do tratamento mostrou-se mais favorável à recidiva e de valor preditivo

desfavorável à remissão ou sua manutenção. Nossos dados se encontram em consonância com os estudos de Oliver Teuffel (2008).

6 CONCLUSÃO

Apesar de as LMA terem apresentado ao D0 menor percentual de blastos em MO que as LLA-B e as LLA-T, e que as LLA-T maior percentual de blastos no SP que as LLA-B e LMA, o percentual de blastos em SP ou MO ao D0 não demonstrou ter valor preditivo em relação à remissão de cada um destes grupos de leucemias na fase de indução do tratamento.

A contagem de plaquetas abaixo de $100.000/\text{mm}^3$ nas LLA-T ao D0 parece ser de valor preditivo para recidiva da doença após o período de indução do tratamento, mas requer estudos complementares, com uma maior casuística.

As contagens de leucócitos e dosagem de hemoglobina ao D0 não demonstraram valor preditivo para recidiva da doença após o período de indução do tratamento nas LLA-T.

Para as LMA, os pacientes com menor dosagem de Hb no D0 apresentaram maior tendência à recidiva após o período de indução, sugerindo que este marcador seja de valor preditivo para não remissão da doença durante a fase de indução.

Para as LLA B, contagens de plaquetas acima de $100.000/\text{mm}^3$ ao D29 da indução demonstraram ter valor preditivo para manutenção de não recidiva da doença na fase de acompanhamento (após D29).

A expressão do CD10+ demonstrou ser um marcador de bom prognóstico para remissão das LLA-B na fase de indução do tratamento.

REFERÊNCIAS

ARGÜELLES AR, ESPINOZA LR, DUQUE RE. Report on the Second Latin American Consensus Conference for Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematological Malignancies. **Cytometry Part B**, 70B, 39-44, 2005.

BARRIOS, C.D.; LAKSA D. Leucemia Linfóide Aguda no Adulto. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI R. **Hematologia. Fundamentos e Práticas**. São Paulo: Ed. Atheneu, Cap. 45, p. 477 - 485, 2001.

BONJEAN B, et al. Development of a new strategy for minimal residual disease monitoring in children with B-precursor acute lymphoblastic. **Ann Biol Clin** v. 62, n. 4, p. 465-70, 2004.

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

CHESELLES JM. Recent advances in management of acute leucemia. **Arch Dis Childhood**. v. 82, p. 438-442, 2000.

CRAIG FE, FOON KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood**, vol. 111, n. 8, p. 3941-3967, 2008.

CUNHA, F.G. **Painel racionalizado de anticorpos monoclonais para leucemias agudas: seu valor diagnóstico e prognóstico**. 2005. 82 f. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (EGIL), Proposal for the immunological classification of acute leukemias. **Leukemia**, v. 9, p. 1783-6, 1995.

European Group for the Immunological Classification of Leukemia (EGIL). The Value of c-kit in the diagnosis of bifenotypic acute leukemias. **Leukemia**, p. 2038-2039, 1998.

FARIAS MG, CASTRO SM. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfoides agudas. **J Bras Patol Med Lab**. V.40, n.2, p.91-98, 2004.

FIONA E. et al. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood**. V. 111, n.8, p.3941-3967, 2001.

FRIEDMANN, A.; WEINSTEIN, H. J. The Role of Prognostic Features in the Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Oncologist**. v. 5, p. 321-328, 2000.

GILES F et al. Outcome of Patients with Acute Myelogenous Leukemia after Second Salvage Therapy. **Cancer**. v.4, n.3, p.548-555, 2005.

HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **J Pediatr**. v. 84, n. 4, p. 52-57, 2008.

HARMENING DM. **Clinical hematology and fundamentals of hemostasis**, 3 ed, USA, 740; cap. 24, p. 452-462; cap. 35, p. 683-695, 1997.

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.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil: Instituto Nacional de Câncer. - Rio de Janeiro: INCA, 2009. [acesso 2012 jan 10]. Disponível em: [<http://www.inca.gov.br>].

JORDAN CT. Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells. **Leukemia** v. 16, p. 559-562, 2002.

MARTINS, S.L.; FALCAO, R.P. Importance of immunophenotyping of leukemia myelocytic acute. **Rev Assoc Med Bras.** v. 46, p. 57-62, 2000.

MAUER, A. M. Acute Lymphocytic Leukemia. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLER, M. B. et al. **Williams Hematology.** 5a ed. United States of America: McGraw-Hill, 1995, 1668p. Cap. 105, p. 1004-1016.

MCKENNA RW. Multifaceted Approach to the Diagnosis and Classification of Acute Leukemias. **Clin. Chem.**, v. 46, n. 8, p. 1252-1259, 2000.

MELLO, M. R. B. **Avaliação Imunofenotípica, Estudo do Índice de DNA e de Alterações Moleculares em Células Blásticas de Pacientes Portadores de Leucemia Linfóide Aguda Diagnosticados na Fundação Hemope.** 2007. 68 f. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ORFAO A, et al. Flow cytometry: Its applications in Hematology. **Haematologica**, v. 80, p. 69-81, 1995.

ORFAO A, et al. Clinically Useful Information Provided by the Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematological Malignancies: Current Status and Future Directions. **Clin. Chem**, v. 45n. 10, p. 1708-1717, 1999.

PAHLOOSYE A et al. Presenting Clinical and Laboratory Data of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Iranian Journal of Pediatric Hematology oncology.** v.1, n.3, p.71-77.

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

PELLOSO, L.A. et al. [Karyotype in acute myeloid leukemia: importance and type of aberrations in 30 patients at diagnosis]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 49, p. 150-455, 2003.

PUI, C. H. Childhood Leukemias. Review Article. **N Engl J Med**. Memphis. v. 21, p.1618-1629, 1995.

PUI, C.; EVANS, W. Acute Lymphoblastic Leukemia. **N Engl J Med**, v. 339, n. 9, p. 605-615, 1998.

PUI CH. Et al. Mechanisms of Disease: acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**. v. 350, p. 1535-1548, 2004.

QUIXABEIRA VBL, SADDI VA. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. **RBAC**, v. 40, n. 3, p. 199-202, 2008.

RIBEIRO, R. Leucemia Linfóide Aguda na Infância e Adolescência. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia. Fundamentos e Práticas**. São Paulo: Ed.Atheneu. Cap. 46, p. 487-506, 2001.

SILVERMAN LB. et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leucemia: results of Dana-Farber Consortium Protocolo 91-01. **Blood**. V. 97, p.1211-1218, 2001.

SMITH, M. *et al.* Uniform Approach to Risk Classification and Treatment Assignment for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. **J. Clinical Oncology**, v. 14, n. 1, p. 18-24, 1996.

SOARES, M *et al.* Fatores Prognósticos em Pacientes com Neoplasias Hematológicas Gravemente Enfermos. *Rev. Br. Terap. Intensiva*. v. 17, n. 3, 2005.

TEUFFEL O et al. Anemia and survival in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**. v.93, n.11, p.1652-1656, 2008.

TUCCI F, ARICO M. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**. v. 93, n. 8, p. 1124-1128, 2008.

ZEIDLER L et al. Low platelet counts after induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia are strongly associated with poor early response to treatment as measured by minimal residual disease and are prognostic for treatment outcome. **haematologica** v. 97, n. 3, p. 402 - 409, 2012.