

**KARLA NADINNE DE SOUSA ANDRADE**

**EXPRESSÃO DOS MARCADORES CD56, CD16 E CD57 NA  
AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES COM  
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NO ESTADO DO MARANHÃO**

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

Área de concentração: Saúde da Criança

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira

Coordenadora: Profa. Dra. Maria Bethânia da Costa Chein

São Luís  
2012

Andrade, Karla Nadinne de Sousa.

Expressão dos marcadores CD56, CD16 e CD57 na avaliação prognóstica de pacientes com leucemia linfóide aguda no estado do Maranhão. / Karla Nadinne de Sousa Andrade. – 2012.

69 f;

Impresso por computador (Fotocópia).

Orientador: Raimundo Antônio G. Oliveira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós Graduação em Saúde Materno Infantil, 2012.

1. Leucemia 2. Leucemia linfóide aguda – Prognóstico 3. CD56. 4. CD57 5. CD16 I. Título

CDU 616.155.392

**KARLA NADINNE DE SOUSA ANDRADE**

**EXPRESSÃO DOS MARCADORES CD56, CD16 E CD57 NA  
AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES COM  
LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NO ESTADO DO MARANHÃO**

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

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou a candidata aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

---

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

---

Prof. Dra. Flávia Castello Branco Vidal (Examinadora)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. Lidio Gonçalves Lima Neto (Examinador)  
Universidade CEUMA

---

Prof. Dr. Raimundo Antônio da Silva (Examinador)  
Universidade Federal do Maranhão

Ao meu querido tio Jair Andrade,  
que nos deixou logo no início da  
realização deste trabalho, por quem  
sinto tanta admiração e saudades.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dá forças e por guiar e iluminar meus passos ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, Sebastião Andrade e Joana Maria, pela dedicação, pelo esforço, pelo amor e apoio, que nunca me faltaram ao longo de toda a minha educação.

Ao Prof. Raimundo Antônio Gomes Oliveira, pela orientação, pela oportunidade e por todo o conhecimento e experiência repassados.

Aos colegas do Laboratório do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da UFMA (CEPEC-HUUFMA), em especial à Thaiana Lopes, Elda Noronha, Heliana Marinho e Nivânia Camelo pela convivência agradável e por toda ajuda e apoio prestados.

Ao Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB), em especial ao diretor administrativo José Generoso da Silva, às médicas Geni Veras e Cíntia Assunção e aos profissionais do serviço de Arquivo, pela contribuição e parceria.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno Infantil pela oportunidade e por todo conhecimento adquirido.

Ao meu namorado, Gilson Martins, pelo amor, carinho e companheirismo e pela dedicação constante.

Às minhas irmãs Kécia Casé e Clea Casé e às minhas primas Gabriella Mendes e Nathalya Rayanne pela força e pelos momentos de descontração.

Aos eternos amigos, Paulo Barros, Franciele Spada, Viviane Arruda, Zellany Mascena e Ana Paula Abreu, pela amizade sempre tão gratificante, apesar da distância.

Aos colegas de turma do mestrado pela convivência e apoio.

*“Deus ao mar o perigo e o abismo deu, mas  
nele é que espelhou o céu.”*

Fernando Pessoa

## RESUMO

A Leucemia linfóide aguda (LLA) é caracterizada pela proliferação anormal de células linfóides imaturas e representa a neoplasia mais comum em crianças. A avaliação de fatores prognósticos em pacientes com LLA possibilita a implantação de abordagens terapêuticas diferenciadas. A expressão aberrante dos marcadores CD56, CD57 e CD16 pode ser uma forma de avaliar tal prognóstico. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os pacientes com LLA e avaliar a influência prognóstica da expressão aberrante dos marcadores CD56, CD16 e CD57 na LLA. Foram avaliados 40 pacientes, atendidos no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB), em São Luís – MA, no período de março de 2010 a outubro de 2011. Os pacientes foram diagnosticados com LLA, segundo os critérios morfo-citoquímicos e imunofenotípicos. A expressão dos marcadores foi determinada através da citometria de fluxo e os dados clínicos foram obtidos através da revisão de prontuários. Dois grupos foram divididos quanto à expressão ou não dos referidos marcadores e comparados em relação às variáveis prognósticas. A média de idade na amostra foi de 6,28 anos, sendo o sexo masculino predominante (60,0%). A média de blastos contados na medula óssea (MO) e sangue periférico (SP) foram de 77,0 e 39,6, respectivamente. A morfologia L1 dos blastos da MO foi a mais frequente (80,0%). O perfil do hemograma, ao diagnóstico, indicou: 24.061 leucócitos/mm<sup>3</sup>, 56.510 plaquetas/mm<sup>3</sup> e 8,0 g/dL de hemoglobina. De acordo com a classificação GBTLI-99, 60,0% dos pacientes se encontravam no grupo de baixo risco de recidiva e ao final da fase de indução do tratamento (D29), 70,0% dos pacientes alcançaram a remissão. Os pacientes portadores de LLA T apresentaram média de idade (10,6 anos; p= 0,0204) e leucometria (48.200/mm<sup>3</sup>; p= 0,0167) significativamente mais altas do que os pacientes com LLA B. 80,0% dos pacientes expressaram o marcador CD56 e nenhum paciente expressou o CD16 e/ou o CD57. Os pacientes que não expressaram o marcador CD56 tinham idade significativamente maior daqueles que o expressaram (9,3 anos; p= 0,0353). Para os pacientes portadores de LLA B, a média de blastos do SP dos pacientes que expressaram o marcador CD56 foi maior do que a média dos que não o expressaram (41,1; p= 0,0226). Conclui-se que a expressão do CD56 sugere um pior prognóstico para os pacientes com LLA B, em virtude de uma média significativamente maior de blastos contados no SP encontrada no nosso estudo, contudo, um maior número de casos e um maior tempo de observação seriam necessários para enfatizar melhor esta evidência.

Palavras-chave: Leucemia linfóide aguda. Prognóstico. CD56, CD57 e CD16.

## ABSTRACT

The acute lymphoblastic leukemia (ALL) is characterized by abnormal proliferation of immature lymphoid cells and represents the most common cancer in children. The evaluation of prognostic factors in patients with ALL enables the implantation of different therapeutic approaches. The aberrant expression of markers CD56, CD57 and CD16 may be a way to assess this prognosis. The objective of this study was to characterize patients with ALL and to evaluate the prognostic influence of aberrant expression of markers CD56, CD16 and CD57 in ALL. 44 patients treated at the Maranhense Oncology Institute Aldenora Bello in Sao Luis - MA were evaluated, from March 2010 to October 2011. Patients were diagnosed with ALL according to the morpho-cytochemical and immunophenotype criteria. The expression of markers was determined by flow cytometry and clinical data were obtained through chart review. Two groups were divided as the expression or not of these markers and compared in relation to prognostic variables. The average of age in the sample was 6,28 years, with a predominance of males (60,0%). The average of blasts counted in bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) was 77,0 and 39,6, respectively. The L1 morphology of the blasts from BM was the most frequent (80,0%). The profile of the blood count at diagnosis indicated: 24.061 leukocytes/mm<sup>3</sup>; 56.510 platelets/mm<sup>3</sup> and 8,0 g/dL hemoglobin. According to the classification GBTLI-99, 60,0% of the patients were in low risk of recurrence group and in the end of the induction phase of treatment (D29), 70,0% of the patients had remission. The patients with ALL T had mean of age (10,6 years;  $p = 0,0204$ ) and leukometry (48.200/mm<sup>3</sup>;  $p = 0,0167$ ) significantly higher than patients with ALL B. 80,0% of the patients expressed the CD56 marker and no patient expressed CD16 and/or CD57 markers. Patients who did not express the marker CD56 had age significantly higher those who expressed (9,3 years;  $p = 0,0353$ ). For patients with ALL B, the average of blasts from PB of patients who expressed the CD56 marker was higher than those not expressed (41,1;  $p = 0,0226$ ). It is concluded that CD56 expression characterizes a worse prognosis for patients with ALL B, due to a significantly higher average of blasts counted in PB found in our study. However, a greater number of cases and a longer observation time would be needed to better emphasize this evidence.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia. Prognosis. CD56, CD57 and CD16.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Análise do marcador CD56 por citometria de fluxo: a) *Dot plot* do tamanho (FSC) *versus* granularidade (SSC). (b) *Dot plot* do anticorpo anti-CD45 *versus* complexidade (SSC) no *gate* de blasto (R2). (c) Controle de membrana do anti-CD56 (tubo não marcado). d) *Dot plot* da dupla marcação do anticorpo anti-CD56 *versus* anti CD34..... 37

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Classificação das LLA B segundo a classificação EGIL.....	22
Quadro 2	Classificação das LLA T segundo a classificação EGIL.....	22
Tabela 1	Sexo, tipo de LLA, morfologia dos blastos, grupo de risco, D29 dos pacientes portadores de LLA do IMOAB (São Luis – MA), no período de março de 2010 a outubro de 2011.....	40
Tabela 2	Idade, concentração de hemoglobina, contagens de leucócitos e plaquetas, % de blastos na medula óssea e sangue dos pacientes portadores de LLA do IMOAB (São Luis – MA), no período de março de 2010 a outubro de 2011.....	40
Tabela 3	Sexo, morfologia dos blastos, grupo de risco, D29 dos pacientes do IMOAB (São Luis – MA), segundo tipo de LLA diagnosticada, no período de março de 2010 a outubro de 2011.....	41
Tabela 4	Idade, concentração de hemoglobina, contagens de leucócitos e plaquetas, % de blastos na medula óssea e sangue dos pacientes do IMOAB (São Luis – MA), segundo tipo de LLA diagnosticada, no período de março de 2010 a outubro de 2011.....	42
Tabela 5	Relação da expressão do marcador CD56 com sexo, tipo de leucemia, morfologia dos blastos, grupo de risco e D29 dos pacientes portadores de LLA do IMOAB (São Luis – MA), no período de março de 2010 a outubro de 2011.....	43
Tabela 6	Relação da expressão do marcador CD56 com idade, concentração de hemoglobina, contagens de leucócitos e plaquetas, % blastos em medula óssea e sangue periférico dos pacientes portadores de LLA do IMOAB (São Luis – MA), no período de março de 2010 a outubro de 2011.....	43
Tabela 7	Relação da expressão do marcador CD56 com sexo, morfologia dos blastos, grupo de risco e D29, segundo o tipo de LLA diagnosticada, do IMOAB (São Luis – MA), no período de março de 2010 a outubro de 2011.....	44
Tabela 8	Relação da expressão do marcador CD56 com idade, concentração de hemoglobina, contagens de leucócitos e plaquetas, % blastos em medula óssea e sangue periférico, segundo o tipo de LLA diagnosticada, do IMOAB (São Luis – MA), no período de março de 2010 a outubro de 2011.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR – Alto risco de recaída

BR – Baixo risco de recaída

CD – Cluster differentiation

Cit – Citoplasmático

dL – Decilitro

DNA – Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGIL – Grupo Europeu para Classificação Imunológica das Leucemias

FAB – Grupo Cooperativo Franco-Americano- Britânico para classificação das leucemias

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FSC – Forward scatter

g – Gramas

GBTLI – Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias na Infância

IMOAB – Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello

IMF – Imunofenotipagem

LLA – Leucemia linfóide aguda

LLC – Leucemia linfóide crônica

LMA – Leucemia mielóide aguda

LMC – Leucemia mielóide crônica

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

mm<sup>3</sup> – Milímetro cúbico

MO – Medula óssea

µL – Microlitro

MPO – Mieloperoxidase

NK – Natural killer (células exterminadoras naturais)

PBS – Tampão fosfato- salino

PE – Ficoeritrina

PerCP – Proteína piridina de clorofila

rpm – Rotações por minuto

S – Superfície

SNC – Sistema nervoso central

SP – Sangue periférico

SSC – Side scatter

WHO – World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Leucemias</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Leucemias linfóides agudas</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>Etiologia</b> .....	<b>19</b>
<b>2.4</b>	<b>Manifestações clínicas</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5</b>	<b>Diagnóstico e Classificação</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6</b>	<b>Tratamento</b> .....	<b>23</b>
<b>2.7</b>	<b>Imunofenotipagem</b> .....	<b>24</b>
<b>2.8</b>	<b>Expressão anômala X Prognóstico</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos</b> .....	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Casuística e tipo de estudo</b> .....	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Coleta de dados dos prontuários</b> .....	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Classificação em grupos de risco</b> .....	<b>32</b>
<b>4.4</b>	<b>Coleta das amostras</b> .....	<b>32</b>
<b>4.5</b>	<b>Diagnóstico das leucemias agudas</b> .....	<b>32</b>
<b>4.5.1</b>	<b>Hemograma</b> .....	<b>32</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Mielograma</b> .....	<b>32</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Citoquímica</b> .....	<b>33</b>
<b>4.5.4</b>	<b>Imunofenotipagem</b> .....	<b>33</b>
<b>4.5.5</b>	<b>Técnica de marcação dos monoclonais</b> .....	<b>34</b>
<b>4.5.6</b>	<b>Aquisição e análise das amostras por citometria de fluxo</b> .....	<b>35</b>
<b>4.6</b>	<b>Avaliação da expressão dos marcadores CD56, CD16 e CD57 e influência prognóstica</b> .....	<b>36</b>
<b>4.7</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>36</b>
<b>4.8</b>	<b>Aspectos éticos</b> .....	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>

<b>5.1</b>	<b>Caracterização da amostra.....</b>	<b>39</b>
<b>5.2</b>	<b>Correlação entre a expressão do CD56, a resposta ao tratamento e os achados laboratoriais.....</b>	<b>42</b>
<b>5.3</b>	<b>Relações entre a expressão do CD56, a resposta ao tratamento e os achados laboratoriais segundo o tipo de LLA.....</b>	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>53</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>55</b>
	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>56</b>

# 1. INTRODUÇÃO

---

As neoplasias mais comuns em crianças são as leucemias agudas, representando a terceira malignidade mais importante e a causa primária de câncer relacionado à mortalidade na infância (CHOWDHURY E BRADY, 2008). As leucemias agudas são um grupo heterogêneo de neoplasias primárias da medula óssea nas quais existe a substituição dos elementos medulares e sanguíneos normais por células imaturas denominadas blastos, bem como acúmulo destas células em outros tecidos (ZHANG et al., 2006).

As leucemias linfóides agudas (LLA) são neoplasias malignas, caracterizadas pela proliferação anormal de células linfóides imaturas denominadas linfoblastos e o consequente acúmulo destas na medula óssea e sangue periférico. Os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes resultam em graus variáveis de anemia, neutropenia, trombocitopenia e infiltração dos tecidos por células leucêmicas. (KEBRIAEI et al., 2003). São doenças neoplásicas mais comuns em indivíduos menores de quinze anos, com pico de incidência entre dois e cinco anos, correspondendo a 25% de todos os cânceres em crianças nessa faixa etária, existindo uma maior frequência em crianças brancas e do sexo masculino (FARHI E ROSENTHAL, 2000).

O diagnóstico atual das leucemias agudas não mais admite apenas critérios morfológicos como parâmetro de definição. A classificação WHO (Organização Mundial de Saúde), a mais recente e completa, incorpora critérios clínicos, morfológicos, imunológicos, citogenéticos e moleculares para definição do diagnóstico, prognóstico e a forma apropriada de terapia a ser utilizada (OLIVEIRA et al., 2004).

A citometria de fluxo surgiu como uma poderosa tecnologia capaz de fazer o diagnóstico diferencial preciso e exato de quase 99,0% dos subtipos de leucemias agudas, através da imunofenotipagem com os anticorpos monoclonais (JAFE et al., 2001).

Tão importante quanto diagnosticar é poder prognosticar e tomar decisões terapêuticas específicas para uma determinada doença. As leucemias agudas são hoje reconhecidas como entidades clínicas bastante heterogêneas, e que diferem sobremaneira em sua evolução e forma de tratamento. Além disso, uma doença mal diagnosticada terá boa propensão a ser mal conduzida terapêuticamente, o que por certo refletirá em seu prognóstico (OLIVEIRA E POLI-NETO, 2004).

Os marcadores CD56 (também conhecido como molécula de adesão celular neural), CD16 e CD57 são predominantemente expressos em células natural-killer (NK). Uma minoria da subpopulação de linfócitos T com atividade citotóxica pode expressar os marcadores CD16 e CD56. Enquanto os marcadores CD16 e CD57 nem sempre estão presentes nas células NK diferenciadas, o CD56 constitui um marcador imunológico importante destas células (ESTEVINHO, 2004).

Foi observado que a expressão de CD56 pode ser importante na avaliação do prognóstico de alguns casos de leucemia linfóide aguda de células T (MONTERO et al., 2003). Estudos demonstraram que a presença de CD56 e/ou CD16 na superfície dos blastos de pacientes com leucemia linfóide aguda de células T pode predispor um pior prognóstico, considerando principalmente a resposta ao tratamento e a média de sobrevivência geral, e diferenciar um subtipo específico de leucemia linfóide aguda de células T (DALMAZZO et al., 2008). Outros estudos sugerem a existência da associação da expressão de CD56 com leucemia extramedular e resistência a múltiplas drogas durante o tratamento (DRACH et al., 1992). Em alguns modelos animais, provou-se a intervenção do CD57 em fenômenos de adesão célula a célula, contudo as principais funções mediadas por este antígeno são ainda desconhecidas (OHKAWA et al., 2001).

No Maranhão, pesquisas científicas no âmbito da oncohematologia iniciaram no ano de 2008 com o diagnóstico imunofenotípico de leucemias, realizado no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (CEPEC/HUUFMA), dos pacientes encaminhados pelo Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB), centro de referência em oncologia neste estado. Anteriormente, o diagnóstico das leucemias agudas se baseava apenas em critérios morfológicos, o que não permitia o diagnóstico de determinados subtipos, detectáveis somente pelo diagnóstico imunofenotípico, e nem tampouco a identificação de características imunológicas que pudessem esclarecer o prognóstico dos pacientes portadores de leucemias.

A avaliação prognóstica, tão importante quanto o diagnóstico, possibilita a estratificação dos pacientes em diferentes grupos de risco e desta forma permite a implantação de abordagens terapêuticas diferenciadas e conseqüentemente a otimização dos tratamentos. Como há ausência de dados científicos sobre os diferentes parâmetros prognósticos de leucemias em nossa população, este trabalho poderá dar subsídios mais sólidos para conduta terapêutica diferenciada destes

pacientes no Maranhão. A implantação de novas técnicas que vão além do diagnóstico pode aumentar a qualidade de vida e diminuir a morbimortalidade da leucemia linfóide aguda.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

---

## 2.1 Leucemias

As leucemias são um grupo de doenças neoplásicas caracterizadas por proliferação clonal de células hematopoiéticas mielóides ou linfóides, as quais sofreram anormalidades em genes que controlam os mecanismos naturais de proliferação (mitose) e/ou diferenciação/maturação e/ou de morte celular programada (apoptose). A transformação leucêmica poderá ocorrer em um precursor linfóide, em um precursor mielóide ou em uma célula progenitora com capacidade pluripotente (*stem cell* pluripotente) e potencial de diferenciação tanto para linhagem mielóide quanto linfóide. São doenças bastante heterogêneas quanto à patogenia, etiologia, prognóstico e resposta ao tratamento (OLIVEIRA E POLI-NETO, 2004). Para o Brasil, em 2012, estimam-se 4.570 casos novos de leucemia em homens e 3.940 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5 casos novos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2012).

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

## 2.2 Leucemias linfóides agudas

Leucemias agudas são neoplasias primárias da medula óssea caracterizadas por pertencerem a um grupo heterogêneo de doenças, nas quais existe a substituição dos elementos medulares e sanguíneos normais por células imaturas ou indiferenciadas denominadas blastos, bem como acúmulo destas células em outros tecidos (TEIXEIRA et al., 2000). As leucemias linfóides agudas são neoplasias

resultantes da proliferação anormal de células linfóides imaturas que perderam sua capacidade maturativa, os linfoblastos (OLIVEIRA E POLI-NETO, 2004).

Incidem na população de 0 a 14 anos, em uma frequência de 1/25.000 novos indivíduos/ano e o risco de desenvolver a doença nos primeiros 10 anos é de 1/2.880 (PEDROSA E LINS, 2002). A LLA é o tipo de neoplasia mais comum na infância, representa aproximadamente 30% dos casos de câncer pediátrico e 80% das leucemias da infância e tem sua maior incidência em crianças entre 1 a 5 anos de idade (LUKENS, 2005; KINGSLEY E HOLMES, 2007; KOPPEM et al., 2010).

Ela é mais comum em caucasianos quando comparada a afro-americanos com uma relação de 1,5/100.000 na população branca e 0,8/100.000 na população negra. Existe uma maior frequência em países industrializados e em áreas urbanas, sendo uma doença mais comum no sexo masculino na proporção de 1,3:1 (FARHI E ROSENTHAL, 2000).

## **2.3 Etiologia**

Embora a causa da LLA seja desconhecida, é improvável que a transformação leucêmica seja resultante de evento único, mas sim do acúmulo de múltiplos processos envolvendo interações complexas entre a susceptibilidade do hospedeiro, danos cromossômicos secundários à exposição por agentes químicos ou físicos e à possível incorporação de informações genéticas virais transmitidas às células progenitoras susceptíveis (LEITE et al., 2007).

Apesar de síndromes genéticas acometerem pequena proporção de crianças com leucemias, certas doenças hereditárias foram associadas com aumento do risco em desenvolver leucemias, como anemia falciforme, Síndrome de Bloom, Síndrome de Down, Síndrome de Shwachman e neurofibromatose. Essas doenças são caracterizadas por defeito na reparação do DNA, anormalidade no número de cromossomos e translocações (BELSON et al., 2007).

## **2.4 Manifestações clínicas**

Os sintomas da LLA podem ser agudos ou lentamente progressivos. Resultam de uma insuficiência da medula óssea pela invasão medular por linfoblastos ou do envolvimento extramedular pela invasão linfoblástica em outros

órgãos, principalmente o fígado, baço, linfonodos, timo, meninges e as gônadas (BARBOSA, 2002; IKEUTI, 2006; PUI E JEHA, 2007). Dessa forma, são frequentes palidez, apatia, taquicardia (devido à diminuição da série vermelha), febres e infecções recorrentes (ocasionadas pela falência da série branca e consequente diminuição dos leucócitos normais). Além desses sintomas o paciente pode apresentar sangramento e petéquias disseminadas, causados pela falência da série megacariocítica (KEBRIAEL et al., 2003).

Um aspecto importante é que a maioria dos pacientes com leucemia apresenta doença disseminada ao diagnóstico, notando-se a presença de células blásticas leucêmicas no sangue periférico e o envolvimento de baço, fígado e linfonodos. As manifestações dolorosas em membros são frequentes, principalmente na forma de dores ósseas e artralgia, que podem acometer cerca de 40% dos casos. São causadas por infiltração leucêmica do perióstio ou das articulações ou por expansão da cavidade medular decorrente da presença de células leucêmicas. A presença de febre é um achado comum e pode ser decorrente de processo infeccioso, ou ser resultado da produção de citocinas pelas células normais ou leucêmicas. A hepatomegalia e/ou esplenomegalia estão presentes ao diagnóstico em cerca de 30% a 50% dos pacientes e geralmente não acarretam distúrbios fisiológicos. A linfadenomegalia também é um achado comum, ocorrendo em 30% a 50% dos casos (SILVERMAN E SALLAN, 2003).

## **2.5 Diagnóstico e Classificação**

Inicialmente, o diagnóstico das leucemias agudas era realizado apenas através da análise morfológica e de colorações especiais (citoquímica) do esfregaço de sangue periférico e da medula óssea. Posteriormente, surgiram novas técnicas (imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular) que hoje são indispensáveis para a adequada classificação e posterior definição do melhor esquema terapêutico a ser utilizado (HAFERLACH, 2007).

As leucemias agudas são definidas segundo a classificação World Health Organization (WHO), quando há a presença, na medula óssea, de 20% ou mais de blastos (VARDIMAN et al., 2009). De acordo com a morfologia, os blastos são classificados segundo os critérios da classificação FAB (Franco-Americano-Britânico), criada por um grupo internacional de investigadores no ano 1976, em três

subtipos (L1, L2 e L3) com base no diâmetro celular, na forma do núcleo, no número e na protuberância dos nucléolos e na quantidade e no aspecto relativo do citoplasma (FERNANDEZ, 2006).

O subtipo L1 é caracterizado pela presença de linfoblastos pequenos com núcleo regular, o subtipo L2 apresenta células maiores e heterogêneas, núcleo com formato irregular e quantidade de citoplasma moderadamente abundante e o subtipo L3 caracteriza-se pela presença de células grandes e homogêneas com núcleo grande com formato regular redondo ou oval e citoplasma moderadamente abundante e normalmente contendo vacúolos (FARIAS E CASTRO, 2004).

A citoquímica pode ser auxiliar na diferenciação entre LLA, sendo a mieloperoxidase e a esterase não específica as colorações mais úteis. A imunofenotipagem por citometria de fluxo permite a discriminação de diferentes populações de células baseando-se em seu tamanho, granulação e padrão de expressão de antígenos, utilizando anticorpos que reconhecem antígenos de superfície e citoplasmáticos presentes nas células hematopoiéticas normais e nas células leucêmicas (HAFERLACH, 2007).

Baseado na imunofenotipagem, o Grupo Europeu de Classificação Imunológica das Leucemias (EGIL) propõe a classificação imunológica das leucemias agudas. Essa classificação toma por base apenas critérios imunofenotípicos, a partir de painéis de marcadores monoclonais. Além de trazer melhores parâmetros de classificação das leucemias agudas em mielóides, linfóide B e linfóide T, pormenorizam estas últimas em seus vários estágios de diferenciação (BENE et al., 1995).

Cerca de 85% das LLA possuem blastos que expressam marcadores de células B, 15% dos casos são de células T (SUÁREZ et al., 2008; STARK, 2010). As LLA de origem B (LLA B) podem ser definidas por no mínimo a expressão de dois antígenos para esta linhagem, tais como CD79a cit, CD19 ou CD22, e de acordo com o estágio de maturação, pode ser subdividida em: pró B (B I), B comum (B II), pré B (B III) e B maduro (B IV) (BRUNNING, 2001). Baseado nas etapas de maturação e diferenciação dos antígenos o grupo EGIL propôs a classificação para LLA B mostrada no quadro 1 (BENE, 2005).

**Quadro 1** - Classificação das LLA B segundo a classificação EGIL.

<b>Marcadores</b> <b>Subtipos</b>	<b>CD79a</b> <b>cito,CD19,CD 22 s</b> <b>ou cito</b>	<b>CD10</b>	<b>Ig cito</b>	<b>Ig s</b>
<b>B I</b>	+	-	-	-
<b>B II</b>	+	+	-	-
<b>B III</b>	+	+	+	-
<b>B IV</b>	+	+	+	+

**Fonte:** Extraído de BENE, 2005.

A LLA do tipo pró-B representa 5% dos casos pediátricos e 10% dos casos de LLA em adultos. A LLA do tipo comum expressa CD10, o que causa um impacto favorável no prognóstico, e representa 75% dos casos da LLA infantil e 50% dos casos em adultos. A leucemia pré-B representa, aproximadamente, 15% das crianças com LLA e 10% dos casos em adultos. Finalmente, a LLA do tipo B maduro, presente em 2% a 5% de crianças e adultos, apresenta um fenótipo incomum, caracterizando-se pela expressão de cadeias leves de imunoglobulina na superfície de membrana (FALCÃO et al., 2002).

Baseadas na diferenciação tímica normal, as LLA T podem ser divididas em Pró-T (T I), Pré-T (T II), T cortical (T III) e T madura (T IV), como descrito no quadro 2 (BENE, 2005).

**Quadro 2** - Classificação das LLA T segundo a classificação EGIL

<b>Marcadores</b> <b>Subtipos</b>	<b>CD7</b>	<b>CD3 cito</b>	<b>CD2, CD5,</b> <b>CD8</b>	<b>CD1a</b>	<b>CD3 s</b>
<b>T I</b>	+	+	-	-	-
<b>T II</b>	+	+	+	-	-
<b>T III</b>	+	+	+	+	-
<b>T IV</b>	+	+	+	-	+

**Fonte:** Extraído de BENE, 2005.

O fenótipo T está presente em 25% dos adultos e 15% das crianças com LLA, e ocorre com grande frequência em indivíduos do sexo masculino, estando associado à elevada leucometria ao diagnóstico, massa mediastínica e envolvimento do sistema nervoso central (SNC). Crianças com LLA T têm um prognóstico pior que aquelas com LLA B e, requerem, portanto, regimes terapêuticos mais intensivos (OLIVEIRA, 2007).

## 2.6 Tratamento

Os bons resultados, obtidos por diversos protocolos de tratamento da LLA, dependem de uma variedade de fatores. As características biológicas das células leucêmicas, o tratamento poliquimioterápico e as variações individuais no metabolismo das drogas, são importantes fatores que influenciam estes resultados (PUI E EVANS, 1998).

No Brasil, na década de 1980, deu-se início ao primeiro protocolo brasileiro multicêntrico de tratamento da LLA infantil, formando-se assim o Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia na Infância. A partir dos resultados, observou-se uma crescente possibilidade de cura para a criança portadora de LLA no Brasil, com curvas de sobrevida livre de eventos para todos os grupos de risco que saíram de 50% no GBTLI-LLA-80 para índices de 70% no GBTLI-LLA-99 (LOPES E MENDES, 2000).

O tratamento da LLA é prolongado, variando de dois a três anos. Embora os esquemas terapêuticos possam mudar entre os diversos centros, os protocolos modernos invariavelmente são constituídos das seguintes fases: indução de remissão, intensificação-consolidação, reindução, prevenção da leucemia no sistema nervoso central e continuação ou manutenção de remissão (PEDROSA E LINS, 2002).

A fase de indução do tratamento tem por objetivo induzir uma remissão completa da doença, o que significa restaurar o funcionamento normal da medula óssea com o desaparecimento de toda a sintomatologia (OLIVEIRA et al., 2004). Uma vez obtida a remissão, os pacientes são submetidos a ciclos de quimioterapia pós-remissão (intensificação, reindução) e, posteriormente, passam a usar medicamentos quimioterápicos, geralmente via oral, como manutenção por 2 a 3 anos (HAMERSCHLAK, 2008).

Hoje, mais de 70% das crianças com LLA são curáveis, assim como cerca de 50% dos adultos jovens. No entanto, para melhores resultados, deve-se escolher adequadamente o esquema quimioterápico com base na idade, quadro clínico, resultados laboratoriais e resposta ao tratamento inicial (HAMERSCHLAK, 2008).

O objetivo da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as células normais, mas a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, causando danos tanto em células malignas quanto normais. Essa

destruição ocorre principalmente nas células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, o que explica os principais efeitos adversos da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções (ALMEIDA et al., 2005).

## 2.7 Imunofenotipagem

Com o aprimoramento de técnicas biológicas obtidas nestas últimas décadas no que se refere a marcadores imunológicos e citogenéticos, hoje é possível a identificação de diversos tipos de leucemias de acordo com linhagens celulares, estágios maturativos e caracterização de oncogenes envolvidos no processo neoplásico (ALMEIDA et al., 2005).

A imunofenotipagem (IMF) consiste na análise de antígenos celulares que são detectados através de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos, durante a passagem de milhares de células no citômetro de fluxo. Isto possibilita a medida do número e porcentagem de células positivas para os anticorpos marcados. A população de células e subpopulações em uma amostra podem ser determinadas pelo número e tipo do antígeno de superfície, intracitoplasmático ou mesmo intranuclear, o que propicia sua quantificação e classificação imunológica ontogênica, inclusive de um processo neoplásico. Os anticorpos monoclonais são agrupados de acordo com a origem e diferenciação celular e sob a denominação de CD (*cluster differentiation*). Desta forma, a imunofenotipagem avalia a presença ou ausência de antígenos específicos (fenótipo), permitindo a identificação de células de diferentes linhagens, a diferenciação de células maduras e imaturas e a detecção de células anormais através da identificação da expressão aberrante de determinados antígenos e assim, pode fornecer informações que podem ser de valor prognóstico (CRAIG E FOON, 2008).

A IMF pela técnica de citometria de fluxo é um processo de análise multiparamétrica mediante o qual as características físicas e/ou químicas das células são medidas enquanto circulam em uma corrente líquida alinhadas uma a uma em frente a um laser. O impacto do laser em cada célula produz sinais que representam diferentes parâmetros da célula e que depois são recolhidos por detectores. Estes detectores convertem os sinais recebidos em sinais eletrônicos que depois são

digitalizados e armazenados em um suporte informático. Os parâmetros medidos podem ser relacionados com características intrínsecas da célula, como tamanho e complexidade do núcleo e citoplasma, que são baseados em sinais de dispersão, ou parâmetros relacionados com propriedades antigênicas da célula, que se baseiam em sinais de fluorescência (MARTI et al., 2001).

O impacto da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico e manejo das leucemias agudas tem se expandido rapidamente (SCHABATH, 2003). O estudo do imunofenótipo das leucemias agudas é de grande importância para o diagnóstico, classificação, prognóstico, tratamento e investigação de doença residual mínima (DI BONA et al., 2002; RILEY et al., 2002; BENE, 2005).

## **2.8 Expressão anômala x Prognóstico**

A chance de cura na LLA em pacientes infanto-juvenis tem aumentado e aproxima-se de 80%, sendo este avanço decorrente da melhora no diagnóstico, identificação de fatores prognósticos e utilização de tratamentos adaptados ao grupo de risco de cada paciente (VILA et al., 2005).

Vários estudos tentam identificar características clínicas e biológicas que se correlacionam com o prognóstico com o objetivo de incorporá-las dentro do sistema de classificação de risco usado para definir a estratégia terapêutica (SMITH et al., 1996). Desta forma os pacientes considerados de baixo risco recebem tratamento menos intensivos, enquanto aqueles de maior risco de falha são tratados de modo mais agressivo. A avaliação atual das LLA baseia-se principalmente na identificação de achados relacionados com o prognóstico e que permitam a detecção precoce da recaída da doença (FRIEDMANN E WEINSTEIN, 2000).

Contagem elevada de leucócitos, idade menor que um ano e maior que nove anos, infiltração de sistema nervoso central ao diagnóstico, presença de mais de 5% de blastos na medula óssea no final do tratamento quimioterápico de indução, são fatores de pior prognóstico (GAJJAR et al, 2000).

A classificação adotada atualmente referente ao risco de recaída é dividida em alto risco (AR) e baixo risco (BR). Nos quatro estudos do GBTLI a idade e a contagem leucocitária ao diagnóstico, representaram os fatores de risco mais importantes para a estratificação dos grupos. Os doentes de baixo risco são aqueles que apresentarem ao diagnóstico idade acima de 1 ano e  $\leq 9$  anos e/ou leucometria

inicial inferior a  $50.000/\text{mm}^3$  e são considerados de alto risco os pacientes que apresentarem ao diagnóstico, idade inferior a 1 ano ou superior a 9 anos e/ou contagem leucocitária  $\geq 50.000/\text{mm}^3$  (SOBOPE, 2000).

Alguns marcadores específicos de determinada linhagem na hematopoiese normal são expressos de maneira aberrante nas leucemias agudas sem, no entanto, configurar leucemia bifenotípica. A determinação de fenótipos aberrantes por IMF constitui-se uma estratégia importante para o seguimento e detecção de doença residual mínima (REGO E SANTOS, 2009).

Além da identificação da linhagem e estágio de diferenciação dos blastos, diversos estudos tem investigado o peso do prognóstico de marcadores individuais, que não estão associados com a linhagem da célula blástica e não estão incluídos no painel de anticorpos para o diagnóstico e classificação das leucemias. A expressão de moléculas de adesão, potencialmente envolvidas em interações célula-célula, é frequentemente considerada em oncologia. Estas moléculas poderiam estar envolvidas no desencadeamento de sinais de morte celular ou na adesão celular citotóxica. Em leucemias agudas, várias moléculas de adesão têm sido investigadas pelo seu potencial valor prognóstico (BENE et al., 1999).

O CD56 é uma molécula de adesão celular envolvida no crescimento do nervo, além disso é utilizado como um indicador da linhagem de células NK, é também encontrado em células T, células dendríticas e alguns progenitores mielóides normais (CRAIG E FOON, 2008). As células NK compreendem cerca de 10% dos linfócitos do sangue periférico e são identificadas pela expressão de CD56, CD16 e CD57, são componentes importantes do sistema imune inato, que têm a capacidade de lisar células alvo, além de fornecer citocinas imunorregulatórias (FARAG et al., 2002; DINES et al., 2004 ). Enquanto os marcadores CD16 e CD57 nem sempre estão presentes nas células NK diferenciadas, o CD56 constitui um marcador imunológico importante destas células (ESTEVINHO, 2004).

Foi observado que a expressão de CD56 pode ser importante na avaliação do prognóstico de alguns casos de leucemia linfóide aguda de células T (MONTERO et al., 2003). Estudos demonstraram que a presença de CD56 e/ou CD16 na superfície dos blastos de pacientes com leucemia linfóide aguda de células T pode predispor um pior prognóstico, considerando principalmente a resposta ao tratamento e a média de sobrevivência geral, e diferenciar um subtipo específico de leucemia linfóide aguda de células T (DALMAZZO et al., 2008). Outros estudos sugerem a

existência da associação da expressão de CD56 com leucemia extramedular e resistência a múltiplas drogas durante o tratamento (DRACH, 1992). A expressão deste marcador pode estar associada à infiltração leucêmica extramedular, como lesões de pele, uma vez que se trata de uma molécula de adesão, a qual proporciona uma maior mobilidade para as células (CHANG et al., 2004). Em alguns modelos animais, provou-se a intervenção do CD57 em fenômenos de adesão célula a célula, contudo as principais funções mediadas por este antígeno são ainda desconhecidas (OHKAWA et al., 2001).

Vários estudos recentes que mostram a potencialidade do papel prognóstico do CD56 renovaram o interesse nesta molécula. Resultado clínico desfavorável tem sido associado com a positividade do CD56 na leucemia mielóide aguda (FERRARA et al., 2000; SUZUKI et al., 2000). Na LLA T, a expressão de CD56 tem sido relatada em um pequeno número de casos e uma associação com pior prognóstico já foi sugerida (RAVANDI et al., 2002; MONTERO et al., 2003).

Embora a LLA deva ser considerada uma doença grave, a identificação de vários fatores prognósticos permite a estratificação dos pacientes em grupos de risco, o que possibilita uma abordagem terapêutica diferenciada (FELIX et al., 2000). Atualmente, mais de 70% das crianças com LLA são curáveis, assim como cerca de 50% dos adultos jovens. No entanto, para melhores resultados, deve-se escolher adequadamente o esquema quimioterápico com base na idade, quadro clínico, resultados laboratoriais e resposta ao tratamento inicial (HAMERSCHLAK, 2008).

Os avanços na biologia molecular bem como na imunofenotipagem realizada com a técnica de citometria de fluxo, aumentaram significativamente a capacidade de diagnóstico das alterações neoplásicas em células hematopoiéticas, possibilitando a correlação entre diagnóstico, classificação, avaliação da remissão e prognóstico destas enfermidades.

### **3. OBJETIVOS**

---

### **3.1 Geral**

- Avaliar a influência da expressão dos marcadores celulares CD56, CD16 e CD57 no prognóstico de pacientes portadores de leucemia linfóide aguda (LLA).

### **3.2 Específicos**

- Caracterizar os pacientes com LLA em relação às variáveis clínicas e laboratoriais;
- Relacionar a expressão dos marcadores CD56, CD16 e CD57 com os diferentes parâmetros laboratoriais e a resposta terapêutica;
- Correlacionar a expressão dos marcadores CD56, CD16 e CD57 em relação aos parâmetros clínicos e laboratoriais para os diferentes tipos de LLA.

## **4. METODOLOGIA**

---

## **4.1 Casuística e tipo de estudo**

A presente pesquisa trata de um estudo prospectivo onde foram incluídos quarenta pacientes menores de 17 anos (INCA, 2012), atendidos no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB) e diagnosticados no Laboratório de Pesquisa Clínica do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (LPC-CEPEC/HUUFMA) como portadores de leucemia linfóide aguda, no período de março de 2010 a outubro de 2011. O grupo etário dos pacientes estudados levou em conta os critérios utilizados pelo INCA (Instituto Nacional do Câncer) que utiliza o protocolo de tratamento GBTLI-99 (Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância) e define como pacientes a serem submetidos ao tratamento de leucemia na infância indivíduos menores de 17 anos.

Não foram incluídos no estudo os pacientes diagnosticados com leucemias agudas secundárias a tratamento quimioterápico de outra malignidade, secundárias a mielodisplasias ou a doenças mieloproliferativas crônicas, pacientes em crise blástica de leucemia mielóide crônica e pacientes com leucemia linfóide aguda cujos prontuários não possuíam dados completos.

## **4.2 Coleta de dados**

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos através da revisão dos prontuários médicos do arquivo do IMOAB, sendo avaliados: sexo, idade e classificação do grupo de risco. Os parâmetros laboratoriais dos pacientes ao diagnóstico, que incluíram: concentração de hemoglobina, contagem global de leucócitos, contagem de plaquetas, % de blastos no sangue periférico e % de blastos na medula óssea, além da avaliação imunofenotípica da expressão anômala do CD16, CD56 e CD57 nas LLA, e resposta terapêutica no D29 (remissão ou recidiva), foram determinados no LPC-CEPEC/HUUFMA.

Para avaliação da resposta ao tratamento, considerou-se como critério de remissão da doença a presença de menos de 5% de blastos na medula óssea no dia 29 de tratamento da fase de indução de acordo com o protocolo de tratamento GBTLI-99 utilizado pelo IMOAB.

## **4.3 Classificação em grupos de risco**

A classificação dos pacientes em grupos de risco foi realizada baseada no protocolo GBTLI-99 (SOBOPE, 2000). Os pacientes da pesquisa foram considerados de baixo risco quando apresentavam ao diagnóstico idade entre 1 e 9 anos e/ou quando apresentavam número de leucócitos inferior a  $50.000/\text{mm}^3$  e foram classificados de alto risco quando apresentavam idade ao diagnóstico inferior a 1 ano ou superior a 9 anos e /ou contagem leucocitária maior ou igual a  $50.000/\text{mm}^3$ .

#### **4.4 Coleta das amostras**

Foram colhidas pelo Serviço de Oncologia do IMOAB, amostras de sangue periférico, através de punção venosa, para realização do hemograma e amostras do aspirado de medula óssea, através da punção da crista ilíaca posterior para maiores de 3 anos e da tíbia para menores de 3 anos, para realização da imunofenotipagem, provas citoquímicas e mielograma e para confecção de esfregaços. Ambas as amostras foram coletadas em tubos vacutainer de 5 mL (Vacuette) contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) como anticoagulante.

#### **4.5 Diagnóstico das leucemias agudas**

##### **4.5.1 Hemograma**

Os hemogramas foram realizados por sistema automatizado no aparelho ADVIA-2120 Hematology System (SIEMENS) para análise das concentrações de hemoglobina, contagem global de leucócitos e contagem de plaquetas. A microscopia complementar para contagem diferencial de leucócitos foi realizada a partir de esfregaços corados pelo May-Grünwald-Giemsa, onde foi determinado o percentual de blastos em sangue periférico.

##### **4.5.2 Mielograma**

Para a realização dos mielogramas, foram confeccionados esfregaços do aspirado de medula óssea que também foram corados pelo May-Grünwald-Giemsa para posterior contagem diferencial de 250 células e determinação do percentual de blastos na medula óssea. A LLA foi caracterizada quando identificados mais de 20% de blastos, de acordo com as recomendações da WHO (VARDIMAN et al., 2009). A morfologia dos blastos foi definida em L1, L2 e L3, segundo as recomendações da classificação morfológica das leucemias agudas do grupo FAB (BENNETT et al., 1976).

#### 4.5.3 Citoquímica

Os esfregaços de medula óssea também foram avaliados pela coloração citoquímica para mieloperoxidase (MPO), onde a LLA foi sugerida quando menos de 3% blastos apresentaram grânulos de coloração positiva para MPO. Estas amostras foram posteriormente confirmadas como de LLA pela imunofenotipagem.

#### 4.5.4 Imunofenotipagem

Para o diagnóstico das leucemias foi realizada a imunofenotipagem pela técnica de citometria de fluxo utilizando-se um painel de anticorpos monoclonais de três cores, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e proteína piridina de clorofila (PerCP) (Becton Dickinson, San José CA, USA), direcionado contra antígenos B relacionados (CD10, CD19, CD22, CD79a além de anticorpos policlonais anti-IgM e cadeias leves das imunoglobulinas kappa e lambda), antígenos T relacionados (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 e CD8), antígenos de diferenciação mielóide (CD13, CD14, CD33, CD64, CD117, anti-mieloperoxidase ou MPO), eritróide (alfa-glicoforina), plaquetário (CD61 e CD41a), antígeno pan-leucocitário (CD45) e antígenos de imaturidade celular (HLA-DR, CD34 e terminal deoxinucleotidil transferase ou TdT). Foi adicionada, ainda, ao painel de anticorpos monoclonais para diagnóstico das leucemias a seguinte combinação dos marcadores em estudo: CD56/CD16/CD45 e CD57/CD45 para avaliar a expressão ou não destes nas células blásticas dos pacientes.

#### 4.5.5 Técnica de marcação dos monoclonais

Inicialmente as células de medula óssea (MO) ou sangue periférico (SP) foram quantificadas no contador hematológico CC-530 CELM.

Para as marcações de membrana e intra-citoplasmática a suspensão celular foi ajustada na concentração  $10^6$  células/100 $\mu$ L por tubo. Para a marcação de membrana foram usados 100 $\mu$ L das amostras diluídas em cada tubo e incubados com 5  $\mu$ L de cada anticorpo por 20 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. À suspensão celular foi adicionado 1 mL de solução de lise (Becton Dickinson, FACS lysing solution, San José, CA, USA) previamente diluída 1:10 em água destilada, homogeneizando em vórtex e incubando por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm (rotações por minuto) por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 2 mL de tampão fosfato-salino (PBS 1%). Novamente a amostra foi centrifugada e, após descarte do sobrenadante, ao sedimento foi adicionado 500  $\mu$ L de paraformaldeído 1% (Paraformaldehyde, Sigma-Aldrich), preservando a temperatura de 4°C ao abrigo da luz até o momento da análise no citômetro de fluxo (Modificado de ZHENG et al., 2008).

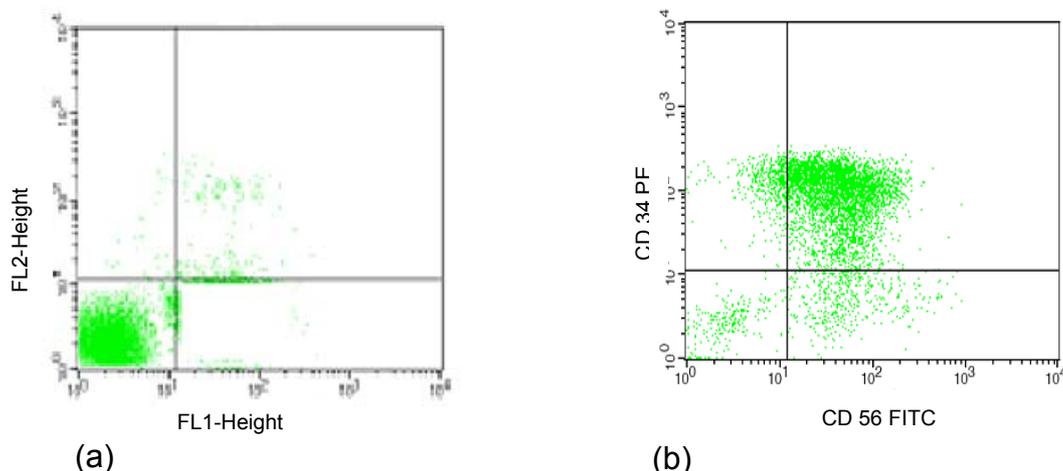
Para a marcação intracitoplasmática foram usados 100  $\mu$ L das amostras diluídas em cada tubo. À suspensão celular foi adicionado 1 mL de solução de lise (Becton Dickinson, FACS lysing solution, San José, CA, USA) diluída 1:10 em água destilada, com posterior incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período a amostra foi centrifugada por 3 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante foi descartado. As células foram, então, fixadas com 2 mL de paraformaldeído 4% por 3 minutos, centrifugadas e o sobrenadante descartado novamente. Em seguida permeabilizou-se com 200  $\mu$ L da solução FACSPermeabilizing da BD diluída (1:10) e então as células foram incubadas com 5 $\mu$ L de cada anticorpo por 20 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, realizou-se a lavagem com PBS 1% e centrifugação, descartando o sobrenadante. Ao sedimento foi adicionado 500  $\mu$ L de paraformaldeído 1% (Paraformaldehyde, Sigma-Aldrich), preservando a temperatura de 4°C ao abrigo da luz até o momento da análise no citômetro de fluxo (Modificado de ZHENG et al., 2008).

#### 4.5.6 Aquisição e análise das amostras por citometria de fluxo

Após a marcação dos anticorpos monoclonais, foram realizadas leituras e análises em citômetro de fluxo (FACS Calibur de Becton Dickinson, San José, CA, USA), utilizando-se o Cell Quest software, versão 3.1 (Cell Quest TM Software, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA), com aquisição de 30.000 eventos por tubo.

Na imunofenotipagem por citometria de fluxo, um gráfico de SSC (dispersão lateral da luz) x CD45 é habitualmente empregado para a identificação inicial dos blastos visto que estas células possuem baixa expressão de CD45 (baixa intensidade de fluorescência) e baixa SSC. O gráfico SSC x CD45 exhibe a marcação dos lugares dos linfócitos residuais, monócitos, polimorfonucleares e a posição específica das células blásticas, permitindo identificar a população dos blastos para análises com outros marcadores (BENE, 2005). Utilizou-se, portanto, um gráfico do tipo “dot plot” CD45 x Complexidade interna (pela SSC) para delimitar a área específica dos blastos e a partir de uma janela eletrônica (“gate”) estes foram identificados e selecionados.

Em seguida, foi utilizada a estratégia de “Back gate”, para identificar a população de blastos no gráfico de tamanho versus granulosidade (FSC X SSC) e este gráfico, com a população de células identificadas, foi usado para analisar todos os outros painéis (BAER et al., 1997). Os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas. O limiar para positividade foi baseado no controle negativo da amostra, sendo os marcadores considerados positivos quando expressados em mais de 20% das células do gate (BENE et al., 1995). A identificação da LLA e seus subtipos (B ou T) foi realizada de acordo com a classificação EGIL (BENE et al., 1995).



**Figura 1:** Análise do marcador CD56 por citometria de fluxo: a) Controle de membrana (tubo não marcado). b) *Dot plot* da dupla marcação do anticorpo anti-CD56 *versus* anti-CD34.

#### 4.6 Avaliação da expressão dos marcadores CD56, CD16 e CD57 e influência prognóstica

A positividade dos marcadores CD56, CD57 ou CD16 em estudo foi definida quando mais que 20% das células blásticas expressaram pelo menos um destes marcadores. Dois grupos foram então divididos quanto à expressão ou não dos referidos marcadores e, para a avaliação prognóstica, foram comparados em relação às variáveis: sexo, idade, morfologia dos blastos, concentração de hemoglobina, contagem de leucócitos e plaquetas, grupo de risco ao diagnóstico e evolução da doença até o D29 (remissão ou recidiva).

#### 4.7 Análise Estatística

Os cálculos realizados nesta análise foram executados pelos softwares Epi Info 7 e BioEstat 5.0. Para obtenção das medidas de ocorrência das características dos pacientes, dados laboratoriais, estratificação de risco e expressão dos marcadores em sangue periférico e medula óssea, foram calculadas as medidas de frequência para as variáveis qualitativas e as medidas de tendência central (médias, desvios padrões e medianas) para as variáveis quantitativas.

Na avaliação da distribuição dos dados (teste de normalidade), foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk, o qual evidenciou que as variáveis estudadas apresentaram distribuição assimétrica. Assim, foram utilizados testes não paramétricos para obtenção dos valores de significância estatística, sendo considerados

estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . O teste exato de Fisher foi utilizado na análise das variáveis qualitativas e o teste de Mann-Whitney/Kruskal Wallis na análise das variáveis quantitativas.

#### **4.8 Aspectos Éticos**

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão conforme as diretrizes descritas na Resolução de nº 196/96 e com parecer consubstanciado nº 148/10 (Anexo A). Os pais/responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A).

## **5. RESULTADOS**

---

## 5.1 Caracterização da amostra

Do total de 54 pacientes diagnosticados com leucemia linfóide aguda, provenientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, no período de março de 2010 a outubro de 2011, 40 fizeram parte da amostra, os restantes não foram incluídos, pois apresentaram dados incompletos ou ausentes nos seus prontuários. Dos pacientes estudados, 24 (60,0%) eram do sexo masculino e 16 (40,0%) do sexo feminino; 35 (87,5%) eram portadores de LLA do tipo B e 5 (12,5%) do tipo T (Tabela 1). Dos subtipos imunológicos de LLA B, 5,7% (2/35) dos pacientes eram portadores de LLA BI, 65,8% (23/35) de LLA BII, 28,5 % (10/35) de LLA BIII e nenhum paciente apresentou LLA BIV. Em relação aos subtipos imunológicos de LLA T, 80,0% (4/5) correspondia ao subtipo TII e 20,0% (1/5) ao subtipo TIII, nenhum paciente apresentou os subtipos TI e TIV.

Em relação aos grupos de risco segundo a classificação GBTLI-99: 40,0% (16) dos pacientes se encontravam no grupo de alto risco e 60,0% (24) no grupo de baixo risco. Ao final da fase de indução do tratamento (D29), 70,0% (28) dos pacientes alcançaram a remissão, enquanto 30,0% (12) não remitiram, destes somente um paciente não foi a óbito antes do D29 (Tabela 1).

Em relação à morfologia dos blastos contados na medula óssea, 80,0% (32) apresentaram morfologia do tipo L1 e 20,0% (8) apresentaram morfologia do tipo L2, nenhum paciente apresentou blastos com morfologia L3 (Tabela 1).

**Tabela 1** - Sexo, tipo de LLA, morfologia dos blastos, grupo de risco, D29 dos pacientes portadores de LLA do IMOAB (São Luis – MA), no período de março de 2010 a outubro de 2011.

<b>Variáveis</b>	<b>n (%)</b>
<b>Sexo</b>	
Feminino	16 (40,0%)
Masculino	24 (60,0%)
<b>Tipo de Leucemia</b>	
B	35 (87,5%)
T	5 (12,5%)
<b>Morfologia dos Blastos</b>	
L1	32 (80,0%)
L2	8 (20,0%)
<b>Grupo de Risco</b>	
Alto Risco	16 (40,0%)
Baixo Risco	24 (60,0%)
<b>D 29</b>	
Não Remissão	12 (30,0%)
Remissão	28 (70,0%)

n = número absoluto; % = porcentagem

A média de idade dos pacientes analisados foi de 6,2 anos. A média de blastos contados na medula óssea (MO) foi de 77,0 e a média dos blastos contados no sangue periférico (SP) foi de 39,6 (Tabela 2).

Em relação aos dados dos hemogramas, realizados ao diagnóstico, foram obtidas as seguintes médias para o total de pacientes analisados: 24.061 leucócitos/mm<sup>3</sup>, 56.510 plaquetas/mm<sup>3</sup> e 8,0 g/dL de hemoglobina (Tabela 2).

**Tabela 2** - Idade, concentração de hemoglobina, contagens de leucócitos e plaquetas, % de blastos na medula óssea e sangue dos pacientes portadores de LLA do IMOAB (São Luis – MA), no período de março de 2010 a outubro de 2011.

<b>Variáveis</b>	<b><math>\bar{x}</math> (intervalo)</b>
<b>Idade (anos)</b>	6,28 (2,0-17,0)
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	8,09 (2,4-13,6)
<b>Leucócitos (/mm<sup>3</sup>)</b>	24.061 (300-98.000)
<b>Plaquetas (/mm<sup>3</sup>)</b>	56.510 (6.920-313.000)
<b>Blastos no Sangue Periférico</b>	39,63 (0,0-98,0)
<b>Blastos na Medula Óssea</b>	77,00 (14,0-98,0)

$\bar{x}$  = média

Dos pacientes diagnosticados com LLA B, 65,7% (23) se encontravam no grupo de baixo risco de recidiva, enquanto 80% (4) dos pacientes com LLA T foram classificados como de alto risco. O percentual de remissão obtido foi de 71,4% para os pacientes portadores de LLA B e de 60% para aqueles com LLA T (Tabela 3).

**Tabela 3** - Sexo, morfologia dos blastos, grupo de risco, D29 dos pacientes do IMOAB (São Luis – MA), segundo tipo de LLA diagnosticada, no período de março de 2010 a outubro de 2011.

<b>Variáveis</b>	<b>LLA B (n = 35) n (%)</b>	<b>LLA T (n = 5) n (%)</b>	<b>p</b>
<b>Sexo</b>			
Feminino	15 (42,9%)	1 (20%)	0,3230
Masculino	20 (57,1%)	4 (80%)	
<b>Morfologia dos Blastos</b>			
L1	29 (82,9%)	3 (60%)	0,2568
L2	6 (17,1%)	2 (40%)	
<b>Grupo de Risco</b>			
Alto Risco	12 (34,3%)	4 (80%)	0,0730
Baixo Risco	23 (65,7%)	1 (20%)	
<b>D29</b>			
Não Remissão	10 (28,6%)	2 (40%)	0,4772
Remissão	25 (71,4%)	3 (60%)	

n = número absoluto; % = porcentagem

Os pacientes diagnosticados com LLA B obtiveram uma média de idade de 5,6 anos, já a média de idade dos pacientes com LLA T foi de 10,6 anos, havendo uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0204$ ) entre os subtipos imunológicos de LLA (Tabela 4).

Para os pacientes diagnosticados com LLA B, as médias encontradas referentes ao perfil dos hemogramas foram: 20.613 leucócitos/mm<sup>3</sup>, 57.801 plaquetas/mm<sup>3</sup> e 8,1 g/dL de hemoglobina. Já para os pacientes diagnosticados com LLA T, as médias encontradas foram: 48.200 leucócitos/mm<sup>3</sup>, 47.480 plaquetas/mm<sup>3</sup> e 7,8 g/dL de hemoglobina, havendo um resultado estatisticamente significativo ( $p = 0,0167$ ) para a contagem de leucócitos entre a LLA B e a LLA T (Tabela 4).

Para os pacientes diagnosticados com LLA B, a média de blastos na MO foi de 75,2 e de 89,8 para aqueles diagnosticados com LLA T, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os tipos de LLA. A média dos blastos encontrados no sangue periférico foi de 36,9 para a LLA B e de 58,8 para a LLA T, também sem diferença estatisticamente significativa entre os dois tipos de LLA (Tabela 4).

**Tabela 4** - Idade, concentração de hemoglobina, contagens de leucócitos e plaquetas, % de blastos na medula óssea e sangue dos pacientes do IMOAB (São Luis – MA), segundo tipo de LLA diagnosticada, no período de março de 2010 a outubro de 2011.

<b>Variáveis</b>	<b>LLA B (n = 35)</b> $\bar{x}$ (intervalo)	<b>LLA T (n = 5)</b> $\bar{x}$ (intervalo)	<b>p</b>
<b>Idade (anos)</b>	5,6 (2,0-16,0)	10,6 (6,0-17,0)	* 0,0204
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	8,1 (2,4-13,6)	7,8 (3,6-12,9)	0,7903
<b>Leucócitos (/mm<sup>3</sup>)</b>	20.613 (300-98.000)	48.200 (30.000-84.200)	* 0,0167
<b>Plaquetas (/mm<sup>3</sup>)</b>	57.801 (6.920-313.000)	47.480 (31.000-78.500)	0,3365
<b>Blastos no Sangue Periférico</b>	36,90 (0,0-97,0)	58,80 (40,0-98,0)	0,1198
<b>Blastos na Medula Óssea</b>	75,22 (14,0-98,0)	89,80 (83,0-95,0)	0,6970

$\bar{x}$  = média; \* Valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ); teste exato de Fisher (variáveis qualitativas); teste de Mann-Whitney/Kruskal Wallis (variáveis quantitativas)

## 5.2 Correlação entre a expressão do CD56, a resposta ao tratamento e os achados laboratoriais

Os marcadores CD16 e CD57 não foram expressos nas células leucêmicas de nenhum dos pacientes estudados. Deste modo, não foi possível realizar a análise estatística destes marcadores. Em relação ao CD56, 80,0% (32) dos pacientes expressaram o marcador nos blastos e 20,0% (8) não o expressaram.

Quando comparadas as variáveis em estudo e a expressão ou não do marcador CD56, foi observada diferença significativa somente para a idade ( $p = 0,0353$ ), com uma média de 5,5 anos para os pacientes CD56+ e de 9,3 anos para os pacientes CD56-. Os dados se encontram nas tabelas 5 e 6.

**Tabela 5** - Relação da expressão do marcador CD56 com sexo, tipo de leucemia, morfologia dos blastos, grupo de risco e D29 dos pacientes portadores de LLA do IMOAB (São Luis – MA), no período de março de 2010 a outubro de 2011.

<b>Variáveis</b>	<b>CD 56+</b> n (%)	<b>CD 56-</b> n (%)	<b>p</b>
<b>Sexo</b>			
Feminino	12 (37,5%)	4 (50,0%)	0,8087
Masculino	20 (62,5%)	4 (50,0%)	
<b>Tipo de Leucemia</b>			
LLA B	29 (90,6%)	6 (75,0%)	0,2568
LLA T	3 (9,4%)	2 (25,0%)	
<b>Morfologia dos Blastos</b>			
L1	25 (78,1%)	7 (87,5%)	0,4869
L2	7 (21,9%)	1 (12,5%)	
<b>Grupo de Risco</b>			
Alto Risco	11 (34,4%)	5 (62,5%)	0,1474
Baixo Risco	21 (65,6%)	3 (37,5%)	
<b>D29</b>			
Não Remissão	11 (34,4%)	1 (12,5%)	0,2252
Remissão	21 (65,6%)	7 (87,5%)	

n = número absoluto; % = porcentagem

**Tabela 6** - Relação da expressão do marcador CD56 com idade, concentração de hemoglobina, contagens de leucócitos e plaquetas, % blastos em medula óssea e sangue periférico dos pacientes portadores de LLA do IMOAB (São Luis – MA), no período de março de 2010 a outubro de 2011.

<b>Variáveis</b>	<b>CD 56+</b> $\bar{x}$ (intervalo)	<b>CD 56-</b> $\bar{x}$ (intervalo)	<b>p</b>
<b>Idade (anos)</b>	5,5 (2,0-15,0)	9,3 (3,0-17,0)	* 0,0353
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	8,3 (2,4-13,6)	7,1 (3,6-10,2)	0,2790
<b>Leucócitos (/mm<sup>3</sup>)</b>	21.183 (300-98.000)	35.575 (632-85.700)	0,7099
<b>Plaquetas (/mm<sup>3</sup>)</b>	59.688 (6.920-313.000)	43.800 (19.000-89.400)	0,7352
<b>Blastos no Sangue Periférico</b>	41,4 (0,0-97,0)	32,4 (0,0-98,0)	0,2640
<b>Blastos na Medula Óssea</b>	78,4 (14,0-98,0)	71,3 (27,0-97,0)	0,8389

$\bar{x}$  = média; \* Valor estatisticamente significativo (p < 0,05); teste exato de Fisher (variáveis qualitativas); teste de Mann-Whitney/Kruskal Wallis (variáveis quantitativas)

### 5.3 Relações entre a expressão do CD56, a resposta ao tratamento e os achados laboratoriais segundo o tipo de LLA

Na avaliação da resposta ao tratamento, através da realização do mielograma no dia 29 de tratamento da fase de indução, do total de 29 pacientes diagnosticados com LLA B que expressaram o marcador CD56, 31,0% (9) não remitiram; enquanto que do total de 6 pacientes diagnosticados com LLA B que não expressaram o marcador, 16,7% (1) não remitiu, porém sem diferença estatística (Tabela 7). Esta mesma análise para o grupo com LLA T não foi possível em virtude do pequeno número de pacientes avaliados.

**Tabela 7** - Relação da expressão do marcador CD56 com sexo, morfologia dos blastos, grupo de risco e D29, segundo o tipo de LLA diagnosticada, do IMOAB (São Luis – MA), no período de março de 2010 a outubro de 2011.

Variáveis	LLA B (n = 35)			LLA T (n = 5)		
	CD 56+	CD 56-	p	CD 56+	CD 56-	p
<b>Sexo</b>						
Feminino	12 (41,4%)	3 (50,0%)	0,5194	0 (0,0%)	1 (50,0%)	-
Masculino	17 (58,6%)	3 (50,0%)		3 (100,0%)	1 (50,0%)	
<b>Morfologia dos Blastos</b>						
L1	24 (82,8%)	5 (83,3%)	0,7073	1 (33,3%)	2 (100,0%)	-
L2	5 (17,2%)	1 (16,7%)		2 (66,7%)	0 (0,0%)	
<b>Grupo de Risco</b>						
Alto	9 (31,0%)	3 (50,0%)	0,3289	2 (66,7%)	2 (100,0%)	-
Baixo	20 (69,0%)	3 (50,0%)		1 (33,3%)	0 (0,0%)	
<b>D 29</b>						
Não Remissão	9 (31,0%)	1 (16,7%)	0,4364	2 (66,7%)	0 (0,0%)	-
Remissão	20 (69,0%)	5 (83,3%)		1 (33,3%)	2 (100,0%)	

n = número absoluto; % = porcentagem

Quando comparadas as contagens de leucócitos e plaquetas, bem como a concentração de hemoglobina em relação aos grupos CD56 + e CD56-, estratificando pelo tipo de leucemia linfóide aguda (B ou T), não foram encontrados resultados estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ). Os dados se encontram na tabela 8.

Em relação à média da quantidade de blastos no sangue periférico e medula óssea, foi obtido um resultado com diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0226$ ) entre os blastos contados no sangue periférico na LLA B, entre os grupos CD56+ e CD56-, em que a média de blastos para os pacientes que expressaram o

marcador foi de 41,1 em comparação com a média de 16,3 para os pacientes que não o expressaram (Tabela 8).

**Tabela 8** - Relação da expressão do marcador CD56 com idade, concentração de hemoglobina, contagens de leucócitos e plaquetas, % blastos em medula óssea e sangue periférico, segundo o tipo de LLA diagnosticada, do IMOAB (São Luis – MA), no período de março de 2010 a outubro de 2011.

Variáveis	LLA B (n = 35)			LLA T (n = 5)		
	$\bar{x}$ (intervalo)		p	$\bar{x}$ (intervalo)		p
	CD 56+	CD 56-		CD 56+	CD 56-	
Idade (anos)	5,1 (2,0-15,0)	8,5 (3,0-16,0)	0,0585	10,0 (8,0-11,0)	11,5 (6,0-17,0)	-
Hemoglobina (g/dL)	8,2 (2,4-13,6)	7,9 (6,5-10,2)	0,9302	9,7 (8,1-12,9)	4,9 (3,6-6,2)	-
Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	19.195 (300-98.000)	27467 (632-85.700)	0,6936	40.400 (30.000-50.200)	59.900 (35.600-84.200)	-
Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	61.452 (6.920-313.000)	40.150 (19.000-89.400)	0,8267	42.633 (39.800-45.000)	54.750 (31.000-78.500)	-
Blastos no Sangue Periférico	41,1 (0,0-97,0)	16,3 (0,0-92,0)	*0,0226	44,3 (40,0-51,0)	80,5 (63,0-98,0)	-
Blastos na Medula Óssea	77,4 (14,0-98,0)	64,5 (27,0-97,0)	0,8953	88,7 (83,0-95,0)	91,5 (91,0-92,0)	-

$\bar{x}$  = média; \* Valor estatisticamente significante (p < 0,05); teste exato de Fisher (variáveis qualitativas); teste de Mann-Whitney/Kruskal Wallis (variáveis quantitativas)

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V. L. et al. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction. **Quím Nova**, v. 28, n.1, p. 118-129, May 2005.
- BACHIR, F. et al. Characterization of acute lymphoblastic leukemia subtypes in Moroccan children. **Int J Pediatr**, July 2009.
- BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environ Health Perspect**, v.115, n.1, p.138-145, Jan 2007.
- BENE, M. C. et al. Proposal for the immunological classification of acute leukemias: European Group for the Immunological characterization of leukemia (EGIL). **Leukemia**, v. 9, n. 10, p.1783-1786, Oct. 1995.
- BENE, M. C. et al. Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias. **Haematologica**, v. 84, p. 1024-1034, Nov. 1999.
- BENE M.C. Immunophenotyping of acute leukaemias. **Immunol Lett**, v. 98, p. 9-21, Apr. 2005.
- BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukemias. **Br J Haematol**, v. 33, p. 451-458, Aug. 1976.
- BORIM, L. N. B. et al. Estado nutricional como fator prognóstico em crianças portadoras de Leucemia Linfocítica Aguda. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 22, n. 1, p. 47-53, Abr. 2000.
- BRANDALISE, S. et al. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda da Criança e do Adolescente GBTLI LLA-2009. ALL Brazilian Group. **Leukemia**, 2009.
- BRUNNING, R. D. et al. Precursor B-cell and T-cell neoplasms. In: JAFFE E.S. et al. **Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organization Classification of Tumours**. Lyon: IARC Press, 2001. p.111-117.
- CAREY, J. L; HANSON, C. A. Flow cytometric analysis of leukemia and lymphoma. In: KEREN, D. et al. **Flow Cytomet and Clin Diagnosis**, p. 197-243, 1994.
- CHANG, H. et al. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients acute myeloid leukemia. **Leuk Res**, v. 28, p. 43-48, Jan. 2004.
- CHOWDHURY, T.; BRADY, H. J. M. Insights from clinical studies into the role of the MLL gene in infant and childhood leukemia. **Blood Cells Mol Dis**, v.40, n. 2, p.192-199, Apr. 2008.
- COOPER, M. A.; FEHNIGER, T. A.; CALIGIURI, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. **Trends Immunol**, v. 22, n. 11, p. 633-640, Nov. 2001.

COSTA, F. R. et al. Identificação de Antígenos Aberrantes na Leucemia Linfóide Aguda: Frequência e Perfil do Hemograma. **NewsLab**, v. 104, p. 82-84, Mar 2011.

CRAIG, F. E.; FOON, K. A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 3941-3967, Apr. 2008.

DALMAZZO, L. F. et al. The presence of CD56/CD16 in T-cell acute lymphoblastic leukaemia correlates with the expression of cytotoxic molecules and is associated with worse response to treatment. **Br J of Haematology**, v. 144, n. 2, p. 223-229, Jan. 2008.

DI BONA, E. et al. Prognostic significance of CD56 antigen expression in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 87, p. 250-256, Mar. 2002.

DINES, I.; RUMJANEK, V. M.; PERSECHINE, P. M. What is going on with natural killer cells in HIV infection? **Int Arch Allergy Immunol**, v. 133, n. 4, p. 330-339, Apr. 2004.

DOLEZEL, J. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. In: LELLEY, T. **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Vienna: WUV-Universitätsverlag, 1997. p. 80-90.

DRACH, D. et al. Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype. **Blood Journal**, v. 80, n. 11, p. 2729-2734, 1992.

ESTEVINHO, A. P. R. **Estudo do Gene CD56 em Doentes com Leucemia Crónica de Células Natural Killer CD56 Negativas**. 2004. 112 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia) - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, Cidade do Porto, 2004.

FALCÃO, R. P. et al. Leucemia linfóide aguda em adultos e crianças: características morfológicas e imunofenotípicas. **Ser Monogr Esc Bras Hemat**, v. 9, p. 25-35, 2002.

FARAG, S. S. et al. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus leukemia effect. **Blood**, v. 100, n. 6, p. 1935-1947, Sep. 2002.

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

FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, n. 2, p. 91-98, Apr. 2004.

FELIX, C. A. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: challenges and controversies in 2000. **Hematology**, p. 285-302, Jan. 2000.

FERNANDEZ, L.R.F. La leucemia aguda linfoblástica, su diagnóstico y clasificación. **Gal Inter Bol**, Jun. 2006.

FERRARA, F. et al. CD56 expression is an indicator of poor clinical outcome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with simultaneous all-trans retinoic acid and chemotherapy. **J Clin Oncol**, v. 18, p.1295-1300, Mar. 2000.

FRIEDMANN, A.; WEINSTEIN, H. J. The role of prognostic features in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Oncologist**, v. 5, p. 321-328, June 2000.

FRÖHLING, S. et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4372-4380, Dec. 2002.

GAJJAR, A. et al. Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 96, p. 3381-3384, 2000.

GARCÍA VELA, J. A. et al. Aberrant Immunophenotypes detected by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 36, n. 3-4, p. 275-284, Jan. 2000.

HAFERLACH, T. et al. Diagnostic pathways in acute leukemias: a proposal for a multimodal approach. **Annals of Hematology**, v. 86, n. 5, p. 311-327, May 2007.

HAMERSCHLAK, N. Leucemia: fatores prognósticos e genéticos. **J Ped**, v. 84, p. 52-57, Aug. 2008.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2012. [acesso 2012 Set 25]. Disponível em: [ <http://www.inca.gov.br>].

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

KEBRIAEI, P.; ANASTASI, J.; LARSON, R. A. Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and classification. **Best Pract Res Clin Haematol**. v. 15, p. 597-621, Dec. 2003

KOPPEM, I. J. N.; HERMANS, F. J. R.; KASPERS, G. J. L. Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 148, p. 3-14, Sep. 2010.

KUREC, A. S. et al. Significance of Aberrant Immunophenotypes in Childhood Acute Lymphoid Leukemia. **Cancer**, v. 67, n. 12, p. 3081-3086, Jun. 1991.

LAMEGO, R. M. **Transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas com doador familiar HLA-idêntico para leucemias agudas: Análise dos dados do Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da UFMG**. 2008. 137 f. Dissertação (Curso de Pós-Graduação em Patologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

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

LICHTVAN, L. C. L. **Citogenética nas leucemias linfóides agudas**. 2007. 164 f. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

LOPES, L. F.; MENDES, W. L. Leucemias na infância. In: CAMARGO, B.; LOPES, L. F. **Pediatria oncológica**: noções fundamentais para pediatria. São Paulo: Lemar, 2000. p. 109-118.

LUKENS, J.N. Leucemias, policetemia vera e mielofibrose. **Manual Fleury de diagnóstico em hematologia**, Ago. 2005.

MANN, K. P. et al. Neural cell adhesion molecule (CD56)-positive acute myelogenous leukaemia and myelodysplastic and myeloproliferative syndromes. **Am J Clin Pathol**, v. 107, p. 653-560, Jun. 1997.

MARGOLIN, J. F.; POPLACK, D. G. Acute lymphoblastic leukemia. In: PIZZO P. A.; POPLACK, D. G. **Principles and practice of pediatric oncology**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p. 409-462.

MARTI, G. E. et al. Introduction to Flow Cytometry. **Seminars in Hematology**, v. 38, n. 2, p. 93-98, 2001.

MATTA, J. F. **Estudo da Sobrevida Média Relativa em Portadores de Leucemia Linfóide Aguda**. 2011. 44 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

MENDES, W. L. **Análise das características clínico-epidemiológicas e de sobrevida dos casos de câncer pediátrico do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer de São Paulo, 1988, 1991, 1994 & 1997**. 2002. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Fundação Antônio Prudente, São Paulo, 2002.

MONTERO, I. et al. CD56 in T-cell acute lymphoblastic leukaemia: a malignant transformation of an early myeloid-lymphoid progenitor? **Haematologica**, v. 88, n. 7, Jul. 2003.

MONTESINOS, P. et al. Clinical significance of CD56 expression in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based regimens. **Blood**, v. 117, n. 6, p. 1799-1805, Feb. 2011.

OHKAWA, T. et al. Systematic characterization of human CD8+ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8+ T cells. **Immunology**, v. 103, p. 281-290, Jul. 2001.

OLIVEIRA, B. M.; DINIZ, M. S.; VIANA, M. B. Leucemias agudas na infância. **Rev Med Minas Gerais**, v. 14, p. 33-39, 2004.

OLIVEIRA, R. A. G. **Hemograma**: como fazer e interpretar. São Paulo: Livraria Médica Paulista, 2007.

OLIVEIRA, R. A. G.; POLI-NETO, A. **Anemias e leucemias: conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais.** São Paulo: Roca, 2004.

OLIVEIRA, S. U. **Perfil Clínico-Epidemiológico das Crianças e Adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda (LLA) em um Hospital Pediátrico de Fortaleza - CE.** 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde da Criança e do Adolescente) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

PAES, C. A. et al. Direct association of socio-economic status with T-cell acute lymphoblastic leukaemia in children. **Leuk Res**, v. 27, n. 9, p. 789-794, Sep. 2003.

PEDROSA, F.; LINS, M. Leucemia linfóide aguda: uma doença curável. **Rev Bras Saúde Matern Infant.** v. 2, n. 1, p. 63-68, Abr. 2002.

PUI, C. H.; CAMPANA, D.; EVANS, W.E. Childhood acute lymphoblastic leukemia – current status and future perspectives. **Lancet Oncol**, v.2, p. 597-607, Sep. 2001.

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

PUI, C. H.; JEHA, S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Nature Reviews**, v. 6, p. 149-165, Feb. 2007.

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

RASPADORI, D. et al. CD56 and PGP expression in acute myeloid leukaemia: impact on clinical outcome. **Haematologica**, v. 87, p. 1135-1140, Nov. 2002.

RAVANDI, F. et al. CD56 expression predicts occurrence of CNS disease in acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res**, v. 26, n. 7, p. 643-649, Jul. 2002.

REGO, E. M.; SANTOS, G. A. S. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.31, n. 5, p. 367-374, Oct. 2009.

REGO, M. F. N. Acute leukemia in Piauí: Comparison with features observed in other regions of Brazil. **Br J of Med and Biolog Res**, v. 36, p. 331-337, 2003.

REGO, M. F. N. **Características das Leucemias Agudas em Teresina.** 2002. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

REPP, R. et al. Immunophenotyping is an independent factor for risk stratification in AML. **Cytometry**, v. 53, p. 9-11, May 2003.

RILEY, R. S. et al. Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 16, n. 2, p. 245-299, Apr. 2002.

ROWE, J. M. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 150, n. 4, p. 389-405, Aug. 2010.

SHUSTER, J. J. et al. Prognostic significance of sex in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: A Pediatric Oncology Group Study. **J Clin Oncol**, v. 16, n. 8, p. 2854-2863, Aug. 1998.

SILVERMAN, L. B.; SALLAN, S. E. Acute lymphoblastic leukemia. In: Nathan, D. G.; ORKIN, S. H.; GINSBURG, D.; LOOK, A. T. **Hematology of Infancy and childhood**. 6th ed. Philadelphia: Saunders, 2003. p. 1135-1166.

SMITH, M. et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 14, n.1, p. 4-6, Jan. 1996.

SOBOPE - SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA PEDIÁTRICA. GBTLI LLA-99: protocolo de tratamento da leucemia linfóide aguda em crianças. Campinas (SP); 2000.

STARK, B. et al. Long-term results of the Israeli National Studies in childhood acute lymphoblastic leukemia: INS 84, 89 and 98. **Leukemia**, v. 24, p. 419-424, Feb. 2010.

STONE, R. M. Prognostic factors in AML in relation to (ab)normal karyotype. **Best Prac & Res Clin Haematol**, v. 22, n. 4, p. 523-528, Dec. 2009.

SUÁREZ, V. M. et al. Relevancia biológica y clínica del inmunofenotipaje celular en la leucemia linfóide aguda del niño. **Institut de Hematolol e Inmunolog**, Jan. 2008.

SUZUKI, R. et al. Prognostic significance of CD56 expression for ALK positive and ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma of T/null cell phenotype. **Blood**, v. 96, n. 9, p. 2993-3000, Nov. 2000.

TALLMAN, M. S. et al. Granulocytic sarcoma is associated with the 8;21 translocation in acute myeloid leukemia. **J Clin Oncol**, v.11, n. 4, p. 690-697, Apr. 1993.

TEIXEIRA, R. A. P. et al. Câncer infantil. In: BARACAT, F. F.; FERNANDES, H. J. J.; SILVA, M. J. **Cancerologia atual: um enfoque multidisciplinar**. São Paulo: Rocca, 2000. p. 426-451.

TERSTAPPEN, L. W. et al. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part 1. Significance of light scattering properties. **Leukemia**, v. 5, n. 4, p. 315-321, Apr. 1991.

THOMAS, X. et al. Expression of N-CAM (CD56) on acute leukaemia cells: relationship with disease characteristics and outcome. **Leuk Lymphoma**, v. 1, p. 295-300, Oct. 1995.

UCKUN, F. M. et al. Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukaemia. **Blood**, v. 91, p. 735-746, Feb. 1998.

UDAYAKUMAR, A. M. et al. Cytogenetic profile of childhood acute lymphoblastic leukemia in Oman. **Arch Med Res**, v. 38, n. 3, p. 305-312, Apr. 2007.

VIDRIALES, M. B. et al. Expression of NK and lymphoid-associated antigens in blast cells of acute myeloblastic leukaemia. **Leukemia**, v. 7, p. 2026-2029, Dec. 1993.

VILA, P. B. et al. Leucemia mínima residual: nuevo concepto de remisión completa. **An Pediatr**, v. 63, p. 390-395, Nov. 2005.

VARDIMAN, J.M. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 947-951, Jul. 2009.

ZANROSSO, C. W. The role of methylenetetrahydrofolate reductase in acute lymphoblastic leukemia in a Brazilian mixed population. **Leuk Res**, v. 30, p. 477-481, Sep. 2005.

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

ZHENG, J. et al. A correlation study of immunophenotypic, cytogenetic, and clinical features of 180 AML patients in China. **Cytometry Part B**, v. 74, n. 1, p. 25-29, Jan. 2008.

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: EXPRESSÃO DOS MARCADORES CD56, CD16 E CD57 NA  
AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÓIDE  
AGUDA NO ESTADO DO MARANHÃO.**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado(a) Senhor(a),

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

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

Com essas amostras de sangue e medula óssea, iremos realizar os seguintes exames laboratoriais: Hemograma, Mielograma, Citoquímica e Imunofenotipagem. 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 estudar a possibilidade de saber como será o curso da doença, e assim, o médico indicará o tratamento mais adequado, melhorando desta forma a qualidade de vida e aumentando as chances de cura.

A autorização da participação do seu filho (a) ou menor sob sua responsabilidade deverá ser voluntária. Você não receberá nenhum valor em

dinheiro e também não terá despesas referentes à participação do seu filho (a) ou menor sob sua responsabilidade. Você poderá entrar em contato com a nossa equipe a qualquer momento para tirar dúvidas (nossos contatos se encontram a baixo).

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 assinadas pelo pesquisador responsável. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

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

Responsável: \_\_\_\_\_

Data do aceite: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Nomes dos Pesquisadores:**

**Pesquisador Responsável:** Raimundo Antonio Gomes Oliveira

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

**Pesquisadores participantes:**

Karla Nadinne de Sousa Andrade - Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (98)3255-0655 (98)91452538

Elda Pereira Noronha - Telefone para contato: (98) 3221-4729 (98) 8162-0427

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

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

**Comitê de Ética em pesquisa-Hospital Universitário- UFMA**

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

ANEXO A – Parecer consubstanciado



Universidade Federal do Maranhão  
Hospital Universitário  
Diretoria Adjunta de Ensino, Pesquisa e Extensão  
Comitê de Ética em Pesquisa



## PARECER CONSUBSTANCIADO

**Parecer N°** 148/10

**Registro do CEP:** 210/09 **Processo N°:** 005241/2009-90

**Pesquisador (a) Responsável:** Raimundo Antônio Gomes Oliveira

**Equipe executora:** Karla Nadinne de Sousa Andrade, Nivânia Lisboa Camelo, Elda Pereira Noronha, Heliana Trindade Marinho, Ênio Fernandes Aragão Soares, Ligia Maria Mendes Gonçalves, Sônia Maria Pereira Cruz

**Tipo de pesquisa:** PROJETO DE MESTRADO

**Instituição onde será desenvolvido:** Hospital Aldenora Belo

**Grupo:III**

**Situação:** APROVADO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Federal do Maranhão analisou na sessão do dia **19.02.10** o Processo N°: **005241/2009-90**, referente ao projeto de pesquisa: "**EXPRESSÃO DOS MARCADORES CD56, CD16 E CD57 NA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE CRIANÇAS COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA NO ESTADO DO MARANHÃO**", tendo como pesquisador (a) responsável: **Raimundo Antônio Gomes Oliveira**, cujo objetivo geral é "**O presente projeto tem como objetivo principal avaliar a expressão dos marcadores CD56, CD16 e CD57 nas células leucêmicas de crianças portadoras de leucemia linfóide aguda**".

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, somos de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos requisitos fundamentais da Resolução 196/96 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde / MS.

Solicita-se ao (à) pesquisador (a) o envio a este CEP, relatórios parciais sempre quando houver alguma alteração no projeto, bem como o relatório final gravado em CD-ROM.

São Luís, 10 de junho de 2010

  
Prof. Dr. João Inácio Lima de Souza  
Coordenador do CEP-HUUFMA  
Ethica homini habitat est

---

Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão

Rua Barão de Itapary, 227 Centro C.E.P. 65. 020-070 São Luís – Maranhão Tel: (98) 222-5508 / Fax: (98) 231-1161 e 231-4595  
E-mail: cep@huufma.br

Nome do Periódico: São Paulo Medical Journal

ISSN 1516-3180 (versão impressa)

Qualificação WEBQUALIS da CAPES na área de avaliação MEDICINA II: B3

### **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.

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. "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. Afirmar 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 ("loss from 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.

## **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, que deve ser curto, porém informativo;
- 3) o nome completo de cada autor (sem abreviações); sua titulação acadêmica, na ordem de obtenção (por exemplo: "MD, MSc, PhD" ou "BSc"), e os cargos atualmente detidos (por exemplo, estudante de doutorado, médico assistente, professor, chefe de departamento etc.), no departamento e instituição onde trabalha, cidade, estado e país;
- 4) o lugar onde o trabalho foi desenvolvido.

### **Segunda página: resumo (inglês e português e palavras-chave)**

A segunda página deve conter o título, um resumo (em inglês e português) 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) Tipo de estudo 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 deve conter cinco palavras-chave.

## **Referências**

A listagem de referências bibliográficas (no estilo "Vancouver", como indicado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Biomédicas, ICMJE) deve ser disposta na parte final do artigo e as referências, no texto, devem ser numeradas de acordo com a ordem de citação. Os números das citações devem ser inseridos após pontos finais ou vírgulas nas frases, e sobrescritos (sem parênteses ou colchetes). 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:

## **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.

2) Expressão dos marcadores CD56, CD16 e CD57 na avaliação prognóstica de pacientes com leucemia linfóide aguda

Expression of the markers CD56, CD16 and CD57 in the prognostic evaluation of patients with acute lymphoblastic leukemia

3) Karla Nadinne de Sousa Andrade<sup>1</sup>; Thaiana da Costa Lopes<sup>1</sup>; Gilson Martins Cavalcante<sup>2</sup>; Heliana Trindade Marinho<sup>3</sup>; Raimundo Antônio Gomes Oliveira<sup>4</sup>

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

2 - Graduado, Medicina; Universidade Federal do Maranhão;

3 - Mestre, Saúde Materno Infantil; Programa de Pós- Graduação em Saúde Materno Infantil, Universidade Federal do Maranhão;

4 - Doutor, Análises Clínicas, Universidade de São Paulo; Professor Adjunto do Departamento de Farmácia da UFMA; Coordenador do Laboratório do Centro de Pesquisa Clínica do HUUFMA

4) Laboratório de Pesquisa Clínica do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (LPC-CEPEC/HUUFMA); São Luis – MA.

**EXPRESSÃO DOS MARCADORES CD56, CD16 E CD57 NA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA**

## RESUMO

A Leucemia linfóide aguda (LLA) representa a neoplasia mais comum em crianças. A expressão aberrante dos marcadores CD56, CD57 e CD16 pode ser uma forma de avaliar o prognóstico destes pacientes e possibilitar a implantação de abordagens terapêuticas diferenciadas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar pacientes com LLA e avaliar a influência prognóstica da expressão do CD56, CD16 e CD57 na LLA. Foram avaliados 40 pacientes diagnosticados com LLA. Os dados laboratoriais foram obtidos em laboratório de pesquisa clínica de um hospital universitário, e os clínicos a partir dos prontuários médicos de um hospital de referência em oncologia. Dois grupos foram divididos quanto à expressão ou não dos marcadores para análise das variáveis prognósticas. A média de idade foi 6,28 anos, sendo predominante o sexo masculino (60,0%) e a morfologia L1 dos blastos (80,0%). 60,0% dos pacientes encontravam-se no grupo de baixo risco e 70,0% alcançaram a remissão no D29. Os pacientes com LLAT apresentaram média de idade (10,6 anos;  $p= 0,0204$ ) e leucometria ( $48.200/\text{mm}^3$ ;  $p= 0,0167$ ) significativamente mais altas daqueles com LLAB. 80,0% expressaram CD56 e nenhum CD16 e/ou CD57. Os pacientes CD56 negativo tinham idade significativamente maior (9,3 anos;  $p= 0,0353$ ). Os pacientes com LLAB e CD56 positivo obtiveram uma média de blastos do SP significativamente maior (41,1;  $p= 0,0226$ ). Conclui-se que a expressão do CD56 sugere um pior prognóstico para os pacientes com LLAB, em virtude da maior contagem de blastos no SP, contudo, um maior número de casos e mais tempo de observação seriam necessários para enfatizar esta evidência.

Palavras-chave: Leucemia linfóide aguda. Prognóstico. CD56, CD57 e CD16.

## EXPRESSION OF THE MARKERS CD56, CD16 AND CD57 IN THE PROGNOSTIC EVALUATION OF PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

### ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer in children. The aberrant expression of CD56, CD57 and CD16 markers may be a way to assess the prognosis of these patients and enable deployment of differentiated therapeutic approaches. The aim of this study was to characterize patients with ALL and evaluate the prognostic influence of the expression of CD56, CD16 and CD57 in ALL. 40 patients diagnosed with ALL were evaluated. Laboratory data were obtained in clinical research laboratory of a university hospital, and clinicians data from the medical records of a referral hospital in oncology. Two groups were divided as to whether or not the expression of markers for analysis of prognostic variables. The average of age was 6,28 years, with a predominance of males (60,0%) and L1 morphology of blasts (80,0%). 60,0% of patients were in the low risk group and 70,0% achieved remission at D29. Patients with T ALL had a mean of age (10,6 years,  $p=0,0204$ ) and leukocyte counts ( $48.200/\text{mm}^3$ ,  $p = 0,0167$ ) significantly higher with those with B ALL. 80,0% have expressed CD56 and none CD16 and/or CD57. The CD56 negative patients had significantly higher age (9,3 years;  $p=0,0353$ ). Patients with B ALL and CD56 positive have obtained an average of blasts from PB significantly higher (41,1;  $p=0,0226$ ). It is concluded that CD56 expression suggests a poor prognosis for patients with B ALL, because of the higher counting blasts in PB. However, a greater number of cases and more observation time would be needed to emphasize this evidence.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia. Prognosis. CD56, CD57 and CD16.

## INTRODUÇÃO

As neoplasias mais comuns em crianças são as leucemias agudas, representando a terceira malignidade mais importante e a causa primária de câncer relacionado à mortalidade na infância<sup>1</sup>. As leucemias linfóides agudas (LLA) são neoplasias resultantes da proliferação anormal de células linfóides imaturas que perderam sua capacidade maturativa, os linfoblastos<sup>2</sup>. São doenças mais comuns em menores de quinze anos, com pico de incidência entre dois e cinco anos<sup>3</sup>.

A chance de cura na LLA tem aumentado e aproxima-se de 80%, sendo este avanço decorrente da melhora no diagnóstico, identificação de fatores prognósticos e utilização de tratamentos adaptados ao grupo de risco de cada paciente<sup>4</sup>. Alguns marcadores específicos de determinada linhagem na hematopoiese normal são expressos de maneira aberrante nas leucemias agudas sem, no entanto, configurar leucemia bifenotípica<sup>5</sup>. O conhecimento de determinados marcadores imunofenotípicos expressos de forma aberrante pode ser preditivo para o prognóstico<sup>6</sup>.

Os marcadores CD56, CD16 e CD57 são expressos nas células NK que compreendem cerca de 10% dos linfócitos do sangue periférico<sup>7,8</sup>. Estudos demonstraram que a presença de CD56 e/ou CD16 em pacientes com leucemia linfóide aguda pode predispor um pior prognóstico, considerando principalmente a resposta ao tratamento e a média de sobrevivência geral<sup>9,10,11,12</sup>.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência prognóstica da expressão dos marcadores CD56, CD16 e CD57 em pacientes com LLA acompanhados em um hospital de referência em oncologia do estado do Maranhão, a partir de dados clínicos e laboratoriais.

## **MÉTODOS**

Estudo prospectivo com quarenta pacientes menores de 17 anos, atendidos em um hospital de referência em oncologia e diagnosticados com LLA em um laboratório de pesquisa clínica de um hospital universitário no período de março de 2010 a setembro de 2011. Não foram incluídos no estudo os pacientes diagnosticados com leucemias agudas secundárias a tratamento quimioterápico de outra malignidade, pacientes em crise blástica de leucemia mielóide crônica e pacientes cujos prontuários não possuíam dados completos. Os diagnósticos morfológico/citoquímico e imunofenotípico foram baseados nos critérios FAB<sup>13</sup> e EGIL<sup>14</sup>, respectivamente. A técnica de imunofenotipagem e análise por citometria de fluxo baseou-se em metodologia já preconizada<sup>15</sup>.

Foram avaliados dados na data do diagnóstico referentes à idade, dosagem de hemoglobina, contagem de leucócitos e plaquetas, percentual de blastos no sangue periférico (SP) e em medula óssea (MO). Ao D29 (final da fase de indução do tratamento), foi considerada remissão, sob critérios morfológicos e imunofenotípicos, quando os pacientes apresentaram menos de 5% de blastos na medula óssea e não remissão quando apresentaram mais de 5%. Os óbitos foram incluídos no grupo de pacientes que não remitiram. A classificação em grupos de risco ao diagnóstico baseou-se no protocolo GBTLI-99<sup>16</sup>.

A expressão aberrante dos marcadores CD56, CD57 ou CD16 em estudo foi definida quando mais que 20% das células blásticas expressaram pelo menos um destes marcadores. Dois grupos foram então divididos quanto à expressão ou não dos referidos marcadores e, para a avaliação prognóstica, foram comparados em relação às variáveis laboratoriais e clínicas citadas.

A análise estatística foi executada pelos softwares Epi Info 7 e BioEstat 5.0, onde foram utilizados os testes Exato de Fischer e Mann-Whitney/Kruskal Wallis. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do hospital universitário onde o estudo foi realizado sob parecer consubstanciado nº 148/10. Os pais ou responsáveis dos participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

## **RESULTADOS**

Dos 54 pacientes diagnosticados com LLA no presente estudo, 40 fizeram parte da amostra, os restantes não foram incluídos, pois apresentaram dados ais incompletos nos seus prontuários. Dos pacientes estudados, 60,0% (24) eram do sexo masculino e 40,0% (16) do sexo feminino; 87,5% (35) eram portadores de LLA do tipo B e 12,5% (5) do tipo T; 80,0% (32) apresentaram blastos com morfologia do tipo L1 e 20,0% (8) do tipo L2. A média de idade do total de pacientes analisados foi de 6,2 anos. Em relação aos grupos de risco segundo a classificação GBTLI-99: 40,0% (16) dos pacientes se encontravam no grupo de alto risco de recaída e 60,0% (24) no grupo de baixo risco. Ao final da fase de indução do tratamento (D29), 70,0% (28) dos pacientes alcançaram a remissão, enquanto 30,0% (12) não remitiram, destes somente um paciente não foi a óbito antes do D29 (Tabelas 1 e 2).

Os pacientes diagnosticados com LLA T apresentaram uma média de idade (10,6 anos;  $p = 0,0204$ ), e leucometria significativamente mais elevadas ( $48.200/\text{mm}^3$ ;  $p = 0,0167$ ) do que os pacientes com LLA B (Tabela 4).

Quanto à expressão dos marcadores estudados, não foi possível realizar a análise estatística dos marcadores CD16 e CD57, pois estes não foram expressos nas células leucêmicas de nenhum dos pacientes analisados. Em relação ao CD56, 80,0% (32) dos pacientes apresentaram a expressão do marcador nos blastos e 20,0% (8) não expressaram. Quando comparadas as variáveis em estudo e a expressão ou não do marcador CD56, foi observada diferença significativa somente para a idade ( $p = 0,0353$ ), com uma média de 5,5 anos para os pacientes CD56+ e de 9,3 anos para os pacientes CD56-. As demais variáveis não apresentaram resultados significativos (Tabelas 5 e 6).

Quando foram comparadas as variáveis analisadas, em relação aos grupos CD56 + e CD56-, estratificando pelo tipo de leucemia linfóide aguda (B ou T), encontramos resultado estatisticamente significativo ( $p = 0,0226$ ) somente para os blastos contados no sangue periférico na LLA B, onde a média de blastos para os pacientes que expressaram o marcador foi maior (41,1) em comparação com a média dos pacientes (16,3) que não o expressaram (Tabelas 7 e 8).

Na avaliação da resposta ao tratamento, através da realização do mielograma no dia 29 de tratamento da fase de indução, do total de 29 pacientes diagnosticados com LLA B que expressaram o marcador, 31,0% (9) não remitiram; enquanto que do total de 6 pacientes diagnosticados com LLA B que não expressaram o marcador, 16,7% (1) não remitiu, porém sem diferença estatística (Tabela 7). Esta mesma

análise para o grupo com LLA T não foi possível em virtude do pequeno número de pacientes avaliados.

## **DISCUSSÃO**

No presente estudo, os pacientes apresentaram uma média de idade de 6,2 anos, resultado este semelhante ao obtido por alguns autores<sup>17</sup>, porém considerado superior a demais estudos<sup>18,19,20</sup>. Na amostra estudada houve um predomínio de pacientes do sexo masculino (60,0%), dado este concordante com outros estudos que também relatam uma maior predominância do sexo masculino<sup>17,18</sup>. Dos blastos contados na medula óssea, segundo a classificação FAB, houve uma maior frequência de blastos L1, o que já é descrito na literatura<sup>21</sup>. Porém a classificação morfológica da LLA nos subtipos L1, L2 e L3 é de pequeno valor no tratamento dos pacientes, estudos que correlacionam a classificação FAB com o prognóstico nas LLA são bastante contraditórios<sup>22</sup>.

A maior parte dos pacientes estudados eram portadores de LLA do tipo B (87,5%). Nossos dados corroboram com a literatura nacional e internacional que refere que cerca de 85% das LLA possuem blastos que expressam marcadores de células B e cerca de 15% dos casos são de células T<sup>2,23,24,25,26</sup>. No presente estudo observamos que os pacientes portadores de LLA T apresentaram uma média de idade significativamente mais alta (10,6 anos;  $p = 0,0204$ ), e cursaram com uma leucometria também significativamente mais elevada ( $48.200/\text{mm}^3$ ;  $p = 0,0167$ ) em relação aos pacientes com LLA B. De fato, estes achados já são esperados nas leucemias T, o que faz com que sejam consideradas doenças de pior prognóstico e mais agressivas que as LLA B<sup>22</sup>.

O conhecimento de determinados marcadores imunofenotípicos expressos de forma aberrante pode ser preditivo para o prognóstico<sup>6</sup>. Na avaliação da expressão dos marcadores nenhum dos pacientes analisados expressou os marcadores CD57 e CD16 nas células leucêmicas e 80,0% dos pacientes apresentaram a expressão do marcador CD56, frequência esta considerada alta se comparada a outros autores que referenciam que cerca de 28,0% das células leucêmicas expressaram o CD56<sup>9</sup>.

Na literatura, são raros os trabalhos que avaliam a relação da expressão aberrante do CD56 na LLA com as variáveis prognósticas analisadas no presente estudo. As variáveis: sexo, morfologia FAB dos blastos, classificação em grupos de riscos, o perfil da medula óssea no final da fase de indução (D29), as contagens de plaquetas e leucócitos, bem como a dosagem de hemoglobina e as contagens de blastos na medula óssea e no sangue periférico não foram significativas entre os pacientes com e sem expressão do CD56, assim como resultados encontrados na literatura<sup>9,27</sup>. Uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada apenas na

variável idade ( $p = 0,0353$ ), os pacientes que não expressaram o marcador tinham idade significativamente maior (9,3 anos) daqueles que o expressaram, o que discorda com outros resultados que encontraram uma média de idade maior para o grupo que expressou o marcador CD56<sup>9</sup>.

Quando foram comparadas as variáveis analisadas, em relação aos grupos CD56+ e CD56-, estratificando pelo tipo de leucemia linfóide aguda (B ou T), encontramos resultado estatisticamente significativo ( $p = 0,0226$ ) somente para os blastos contados no sangue periférico na LLA B, onde a média de blastos para os pacientes que expressaram o marcador foi maior (41,1%) em comparação com a média dos pacientes que não o expressaram (16,3%), o que poderia sugerir um pior prognóstico para os pacientes que expressaram o CD56, pois, de acordo com a literatura, quanto maior o número de blastos no sangue periférico, maior o poder de expansão do clone leucêmico e, a princípio, pior o prognóstico<sup>22</sup>. Além disso, em outros estudos, uma média maior de blastos em SP já foi observada em pacientes que foram a óbito<sup>19</sup>.

Alguns estudos na literatura relacionam a expressão do CD56 a um prognóstico desfavorável em pacientes adultos com LLA<sup>28</sup>, onde foi observado que a presença de CD56 nas células leucêmicas foi fator de risco para presença de leucemia no sistema nervoso central ao diagnóstico e a recidivas. Outros estudos<sup>29</sup> também relatam que a expressão do CD56 em pacientes com LLA está associada ao desenvolvimento de sarcoma granulocítico, o que a caracteriza como de prognóstico ruim. Uma associação da positividade do CD56 com um maior índice de recaídas e uma maior contagem leucocitária também já foi descrita em pacientes com leucemia promielocítica aguda<sup>30</sup>.

Na avaliação da resposta ao tratamento, através da realização do mielograma no dia 29 de tratamento da fase de indução, do total de pacientes diagnosticados com LLA B, houve um maior percentual de pacientes que não remitiram (31,0%) no grupo que expressou o marcador em comparação ao grupo que não expressou (16,7%), porém esta diferença não foi significativa estatisticamente. Da mesma forma na LLA T houve um maior percentual de pacientes que não remitiram no grupo que expressou o marcador CD56, porém a análise estatística neste grupo não foi realizada em virtude do pequeno número de pacientes com LLA T.

Avaliando-se estes parâmetros, a grande maioria dos trabalhos encontrados é referente à pacientes portadores de LMA, no qual a positividade do CD56 está

relacionada a uma redução significativa na taxa de remissão completa e uma curta sobrevivência no grupo e, ainda, uma forte correlação com cariótipo desfavorável<sup>31</sup>. Outros estudos também observaram que pacientes com LMA e CD56 positivo tiveram uma menor sobrevida livre de eventos<sup>11,32</sup>. Contudo, seu valor prognóstico ainda continua incerto<sup>33</sup>.

A principal limitação encontrada no estudo foi a dificuldade de revisão dos prontuários médicos, que, não raro, apresentavam informações ausentes ou incompletas, limitando desta forma, o número de pacientes no estudo. Portanto, seria necessário aumentar o número de casos e o tempo de observação para se estudar melhor os parâmetros analisados no prognóstico dos pacientes com LLA. Para enfatizar a evidência de que a expressão do CD56 poderia sugerir um pior prognóstico para os pacientes com LLA B, são necessários, ainda, estudos moleculares a fim de identificar fatores genéticos que possam influenciar a contagem de blastos em indivíduos com e sem expressão aberrante do CD56.

## **CONCLUSÃO**

A expressão do marcador CD56 se mostrou relativamente comum nos pacientes com LLA, enquanto os marcadores CD16 e CD57 não foram expressos em nenhum dos pacientes com LLA analisados. A expressão do CD56 poderia sugerir um pior prognóstico para os pacientes com LLA B que o expressaram, em virtude de uma média significativamente maior de blastos contados no sangue periférico encontrada no nosso estudo. Contudo, seria necessário aumentar o número de casos e o tempo de observação para enfatizar melhor esta evidência.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello.

REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> Chowdhury T, Brady HJM. Insights from clinical studies into the role of the MLL gene in infant and childhood leukemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2008 Apr;40:192-199.
- <sup>2</sup> Oliveira RAG, Poli-Neto A. Anemias e leucemias: conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais. São Paulo: Roca, 2004.
- <sup>3</sup> Mauer AM. Acute lymphocytic leukemia. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller MB. *Williams Hematology*. McGraw-Hill; 1995. p. 1004-1016.
- <sup>4</sup> Vila PB, Garcia CP, Riera MS, Aramburu JJ, Cordina JS. Leucemia mínima residual: nuevo concepto de remisión completa. *An Pediatr*. 2005 Nov;63:390-395.
- <sup>5</sup> Rego EM, Santos GAS. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009 Oct;31(5):367-374.
- <sup>6</sup> Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008 Apr;111(8):3941-3967.
- <sup>7</sup> Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, et al. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus leukemia effect. *Blood*. 2002 Sep;100(6):1935-1947.
- <sup>8</sup> Dines I, Rumjanek VM, Persechini PM. What is going on with natural killer cells in HIV infection? *Int Arch Allergy Immunol*. 2004 Apr;133(4):330-339.
- <sup>9</sup> Dalmazzo LF, Jácomo RH, Marinato AF, et al. The presence of CD56/CD16 in T-cell acute lymphoblastic leukaemia correlates with the expression of cytotoxic molecules and is associated with worse response to treatment. *Br J of Haematology*; 2008 Jan;144(2):223-229.
- <sup>10</sup> Montero I, Rios E, Parody R, Perez-Hurtado JM, Martin-Noya A, Rodriguez JM. CD56 in T-cell acute lymphoblastic leukaemia: a malignant transformation of an early myeloid-lymphoid progenitor? *Haematologica*. 2003 Jul;88(7).
- <sup>11</sup> Chang H, Salma F, Yi QL, Patterson B, Brien B, Minden MD. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2004 Jan;28:43-48.
- <sup>12</sup> Ohkawa T, Seki S, Dobashi H, Koike Y, Habu Y, Ami K. Systematic characterization of human CD8+ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8+ T cells. *Immunology*. 2001 Jul;103:281-290.
- <sup>13</sup> [Bennett JM](#), [Catovsky D](#), [Daniel MT](#), et al. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol*. 1976 Aug;33:451-458.
- <sup>14</sup> [Bene MC](#), [Castoldi G](#), [Knapp W](#), [Ludwig WD](#), [Matutes E](#), [Orfao A](#). Proposal for the immunological classification of acute leukemias: European Group for the Immunological characterization of leukemia (EGIL). *Leukemia*. 1995 Oct;9(10):1783-1786.

- <sup>15</sup> [Zheng J](#), [Wang X](#), [Hu Y](#), et al. A correlation study of immunophenotypic, cytogenetic, and clinical features of 180 AML patients in China. *Cytometry Part B*. 2008 Jan;74(1):25-29.
- <sup>16</sup> Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica. GBTLI LLA-99: protocolo de tratamento da leucemia linfóide aguda em crianças. [Campinas], 2000.
- <sup>17</sup> Matta JF. Estudo da sobrevida média relativa em portadores de leucemia linfóide aguda.[dissertação].Campo Grande (MS):Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2011. 44 p.
- <sup>18</sup> Silva DB, Povaluk P. Epidemiologia das leucemias em crianças de um centro de referencia estadual. *Arquiv Catarinenses de Medicin*. 2000;29.
- <sup>19</sup> Lichtvan LCL. Citogenética nas leucemias linfóides agudas.[dissertação].Curitiba (PR):Universidade Federal do Paraná;2007. 164 p.
- <sup>20</sup> Brandalise S. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda da Criança e do Adolescente GBTLI LLA-2009. ALL Brazilian Group. *Leukemia*. 2009.
- <sup>21</sup> Rech A, Brunetto AL. Avaliação epidemiológica dos pacientes com Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) no Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). *Rev do Hosp de Clín de Porto Alegre*. 2004 Set;24.
- <sup>22</sup> Oliveira RAG. Hemograma: como fazer e interpretar. São Paulo: Livraria Médica Paulista, 2007.
- <sup>23</sup> Paes CA, Viana MB, Freire RV, Martins-Filho OA, Taboada DC, Rocha VG. Direct association of socio-economic status with T-cell acute lymphoblastic leukaemia in children. *Leuk Res*. 2003 Sep;27(9):789-794.
- <sup>24</sup> Udayakumar AM, Bashir WA, Pathare AV, et al. Cytogenetic profile of childhood acute lymphoblastic leukemia in Oman. *Arch Med Res*. 2007 Apr;38(3):305-312.
- <sup>25</sup> Suárez VM, Abraham CM, Jiménez LRR, et al. Relevancia biológica y clínica del inmunofenotipaje celular en la leucemia linfóide aguda del niño. *Institut de Hematolol e Inmunolog*. 2008 Jan.
- <sup>26</sup> Stark B, Nirel R, Avrahamiet G, et al. Long-term results of the Israeli National Studies in childhood acute lymphoblastic leukemia: INS 84, 89 and 98. *Leukemia*. 2010 Feb;24:419-424.
- <sup>27</sup> Costa FR, Santos ALC, Larrazábal BR, et al. Identificação de Antígenos Aberrantes na Leucemia Linfóide Aguda: Frequência e Perfil do Hemograma. *NewsLab*. 2011 Mar;104:82-84.
- <sup>28</sup> Ravandi F, Cortes J, Estrov Z, et al. CD56 expression predicts occurrence of CNS disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2002 Jul;26(7):643-649.

- <sup>29</sup> Tallman MS, Hakimian D, Shaw JM, Lissner GS, Russell EJ, Variakojis D. Granulocytic sarcoma is associated with the 8;21 translocation in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 1993 Apr;11(4):690-697.
- <sup>30</sup> Montesinos P, Rayón C, Vellenga E, et al. Clinical significance of CD56 expression in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-*trans* retinoic acid and anthracycline-based regimens. *Blood*. 2011 Feb;117(6):1799-1805.
- <sup>31</sup> Raspadori D, Damiani D, Lenoci M, et al. CD56 antigenic expression in acute myeloid leukemia identifies patients with poor clinical prognosis. *Leukemia*. 2001 Aug;15:1161-1164.
- <sup>32</sup> Ciolli S, Leoni F, Nozzoli C, et al. Prognostic impact of CD56 in 141 cases of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2001;86.
- <sup>33</sup> Di Bona E, Sartori R, Zambello R, Guercini N, Madeo D, Rodeghiero F. Prognostic significance of CD56 antigen expression in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2002 Mar;87:250-256.

## TABELAS

**Tabela 1** - Sexo, tipo de LLA, morfologia dos blastos, grupo de risco, D29 de pacientes portadores de LLA.

Variáveis	n (%)
<b>Sexo</b>	
Feminino	16 (40,0%)
Masculino	24 (60,0%)
<b>Tipo de Leucemia</b>	
B	35 (87,5%)
T	5 (12,5%)
<b>Morfologia dos Blastos</b>	
L1	32 (80,0%)
L2	8 (20,0%)
<b>Grupo de Risco</b>	
Alto Risco	16 (40,0%)
Baixo Risco	24 (60,0%)
<b>D 29</b>	
Não Remissão	12 (30,0%)
Remissão	28 (70,0%)

n = número absoluto; % = porcentagem

**Tabela 2** - Idade, concentração de hemoglobina, contagens de leucócitos e plaquetas, % de blastos na medula óssea e sangue periférico de pacientes portadores de LLA.

Variáveis	$\bar{x}$ (intervalo)
Idade (anos)	6,28 (2,0-17,0)
Hemoglobina (g/dL)	8,09 (2,4-13,6)
Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	24.061 (300-98.000)
Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	56.510 (6.920-313.000)
Blastos no Sangue Periférico	39,63 (0,0-98,0)
Blastos na Medula Óssea	77,00 (14,0-98,0)

$\bar{x}$  = média

**Tabela 3** - Sexo, morfologia dos blastos, grupo de risco, D29 de pacientes com LLA, segundo tipo de LLA diagnosticada.

Variáveis	LLA B (n = 35) n (%)	LLA T (n = 5) n (%)	p
-----------	----------------------------	---------------------------	---

<b>Sexo</b>			
Feminino	15 (42,9%)	1 (20%)	0,3230
Masculino	20 (57,1%)	4 (80%)	
<b>Morfologia dos Blastos</b>			
L1	29 (82,9%)	3 (60%)	0,2568
L2	6 (17,1%)	2 (40%)	
<b>Grupo de Risco</b>			
Alto Risco	12 (34,3%)	4 (80%)	0,0730
Baixo Risco	23 (65,7%)	1 (20%)	
<b>D29</b>			
Não Remissão	10 (28,6%)	2 (40%)	0,4772
Remissão	25 (71,4%)	3 (60%)	

n = número absoluto; % = porcentagem

**Tabela 4** - Idade, concentração de hemoglobina, contagens de leucócitos e plaquetas, % de blastos na medula óssea e sangue de pacientes com LLA, segundo tipo de LLA diagnosticada.

Variáveis	LLA B (n = 35) $\bar{x}$ (intervalo)	LLA T (n = 5) $\bar{x}$ (intervalo)	p
<b>Idade (anos)</b>	5,6 (2,0-16,0)	10,6 (6,0-17,0)	* 0,0204
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	8,1 (2,4-13,6)	7,8 (3,6-12,9)	0,7903
<b>Leucócitos (/mm<sup>3</sup>)</b>	20.613 (300-98.000)	48.200 (30.000-84.200)	* 0,0167
<b>Plaquetas (/mm<sup>3</sup>)</b>	57.801 (6.920-313.000)	47.480 (31.000-78.500)	0,3365
<b>Blastos no Sangue Periférico</b>	36,9 (0,0-97,0)	58,8 (40,0-98,0)	0,1198
<b>Blastos na Medula Óssea</b>	75,2 (14,0-98,0)	89,8 (83,0-95,0)	0,6970

$\bar{x}$  = média; \* Valor estatisticamente significativo (p < 0,05); teste exato de Fisher (variáveis qualitativas); teste de Mann-Whitney/Kruskal Wallis (variáveis quantitativas)

**Tabela 5** - Relação da expressão do marcador CD56 com sexo, tipo de leucemia, morfologia dos blastos, grupo de risco e D29 de pacientes portadores de LLA.

Variáveis	CD 56+ n (%)	CD 56- n (%)	p
<b>Sexo</b>			

Feminino	12 (37,5%)	4 (50,0%)	0,8087
Masculino	20 (62,5%)	4 (50,0%)	
<b>Tipo de Leucemia</b>			
LLA B	29 (90,6%)	6 (75,0%)	0,2568
LLA T	3 (9,4%)	2 (25,0%)	
<b>Morfologia dos Blastos</b>			
L1	25 (78,1%)	7 (87,5%)	0,4869
L2	7 (21,9%)	1 (12,5%)	
<b>Grupo de Risco</b>			
Alto Risco	11 (34,4%)	5 (62,5%)	0,1474
Baixo Risco	21 (65,6%)	3 (37,5%)	
<b>D29</b>			
Não Remissão	11 (34,4%)	1 (12,5%)	0,2252
Remissão	21 (65,6%)	7 (87,5%)	

n = número absoluto; % = porcentagem

**Tabela 6** - Relação da expressão do marcador CD56 com idade, concentração de hemoglobina, contagens de leucócitos e plaquetas, % blastos em medula óssea e sangue periférico de pacientes portadores de LLA.

<b>Variáveis</b>	<b>CD 56+</b> $\bar{x}$ (intervalo)	<b>CD 56-</b> $\bar{x}$ (intervalo)	<b>p</b>
<b>Idade (anos)</b>	5,5 (2,0-15,0)	9,3 (3,0-17,0)	* 0,0353
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	8,3 (2,4-13,6)	7,1 (3,6-10,2)	0,2790
<b>Leucócitos (/mm<sup>3</sup>)</b>	21.183 (300-98.000)	35.575 (632-85.700)	0,7099
<b>Plaquetas (/mm<sup>3</sup>)</b>	59.688 (6.920-313.000)	43.800 (19.000-89.400)	0,7352
<b>Blastos no Sangue Periférico</b>	41,4 (0,0-97,0)	32,4 (0,0-98,0)	0,2640
<b>Blastos na Medula Óssea</b>	78,4 (14,0-98,0)	71,3 (27,0-97,0)	0,8389

$\bar{x}$  = média; \* Valor estatisticamente significativo (p < 0,05); teste exato de Fisher (variáveis qualitativas); teste de Mann-Whitney/Kruskal Wallis (variáveis quantitativas)

**Tabela 7** - Relação da expressão do marcador CD56 com sexo, morfologia dos blastos, grupo de risco e D29 de pacientes com LLA, segundo o tipo de LLA diagnosticada.

<b>Variáveis</b>	<b>LLA B (n = 35)</b> n (%)	<b>LLA T (n = 5)</b> n (%)
------------------	--------------------------------	-------------------------------

	CD 56+	CD 56-	p	CD 56+	CD 56-	p
<b>Sexo</b>						
Feminino	12 (41,4%)	3 (50,0%)	0,5194	0 (0,0%)	1 (50,0%)	-
Masculino	17 (58,6%)	3 (50,0%)		3 (100,0%)	1 (50,0%)	
<b>Morfologia dos Blastos</b>						
L1	24 (82,8%)	5 (83,3%)	0,7073	1 (33,3%)	2 (100,0%)	-
L2	5 (17,2%)	1 (16,7%)		2 (66,7%)	0 (0,0%)	
<b>Grupo de Risco</b>						
Alto	9 (31,0%)	3 (50,0%)	0,3289	2 (66,7%)	2 (100,0%)	-
Baixo	20 (69,0%)	3 (50,0%)		1 (33,3%)	0 (0,0%)	
<b>D 29</b>						
Não Remissão	9 (31,0%)	1 (16,7%)	0,4364	2 (66,7%)	0 (0,0%)	-
Remissão	20 (69,0%)	5 (83,3%)		1 (33,3%)	2 (100,0%)	

n = número absoluto; % = porcentagem

**Tabela 8** - Relação da expressão do marcador CD56 com idade, concentração de hemoglobina, contagens de leucócitos e plaquetas, % blastos em medula óssea e sangue periférico de pacientes com LLA, segundo o tipo de LLA diagnosticada.

Variáveis	LLA B (n = 35)			LLA T (n = 5)		
	CD 56+	CD 56-	p	CD 56+	CD 56-	p
<b>Idade (anos)</b>	5,1 (2,0-15,0)	8,5 (3,0-16,0)	0,0585	10,0 (8,0-11,0)	11,5 (6,0-17,0)	-
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	8,2 (2,4-13,6)	7,9 (6,5-10,2)	0,9302	9,7 (8,1-12,9)	4,9 (3,6-6,2)	-
<b>Leucócitos (/mm<sup>3</sup>)</b>	19.195 (300-98.000)	27467 (632-85.700)	0,6936	40.400 (30.000-50.200)	59.900 (35.600-84.200)	-
<b>Plaquetas (/mm<sup>3</sup>)</b>	61.452 (6.920-313.000)	40.150 (19.000-89.400)	0,8267	42.633 (39.800-45.000)	54.750 (31.000-78.500)	-
<b>Blastos no Sangue Periférico</b>	41,1 (0,0-97,0)	16,3 (0,0-92,0)	*0,0226	44,3 (40,0-51,0)	80,5 (63,0-98,0)	-
<b>Blastos na Medula Óssea</b>	77,4 (14,0-98,0)	64,5 (27,0-97,0)	0,8953	88,7 (83,0-95,0)	91,5 (91,0-92,0)	-

$\bar{x}$  = média; \* Valor estatisticamente significativo (p < 0,05); teste exato de Fisher (variáveis qualitativas); teste de Mann-Whitney/Kruskal Wallis (variáveis quantitativas)

1) Defesa de Dissertação de Mestrado em Saúde Materno Infantil; Programa de Pós- Graduação em Saúde Materno Infantil, Universidade Federal do Maranhão.

2) Fundo de Amparo à Pesquisa do Maranhão- FAPEMA

3) Nada a declarar

4) Karla Nadinne de Sousa Andrade:

Avenida Bahia, Condomínio Gran Village III, casa 56, Chácara Brasil, Turu, São Luis  
– MA, CEP: 65066-659

Tel.: (98) 3255-0655/ (98) 9145-2538

Email: karlanadinne@hotmail.com