

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**DISTINÇÃO ENTRE HEMATOGÔNIAS E BLASTOS  
EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA  
LINFOCÍTICA AGUDA DE CÉLULAS B**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aline Bicca Wohlfahrt**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**DISTINÇÃO ENTRE HEMATOGÔNIAS E BLASTOS  
EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA  
LINFOCÍTICA AGUDA DE CÉLULAS B**

**Aline Bicca Wohlfahrt**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**Orientador: Prof. José Edson Paz da Silva**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**DISTINÇÃO ENTRE HEMATOGÔNIAS E BLASTOS  
EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA  
LINFOCÍTICA AGUDA DE CÉLULAS B**

elaborada por  
**Aline Bicca Wohlfahrt**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**José Edson Paz da Silva, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Dr. (ULBRA)**

**Sandra Trevisan Beck, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 12 de dezembro de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Eugênia e Lauro, pela vontade e esforços realizados no sentido de tornar o meu sonho possível, pelo apoio incondicional, amor, incentivo e compreensão em todas as horas.

Ao professor Dr. José Edson Paz da Silva pela orientação, oportunidade, confiança e ajuda na realização deste trabalho.

À Liliane Zimmermann de Oliveira pela coorientação do projeto, colaboração nas análises das amostras e generosidade nos ensinamentos transmitidos em todos os momentos da execução deste estudo.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do curso de Farmácia e todos os outros professores que de alguma maneira colaboraram nessa longa caminhada.

A todos os farmacêuticos, médicos e funcionários do Serviço de Hematologia e Oncologia do HUSM, especialmente, à Valússia, Cláudia, Carine, Maria do Carmo, Luiz Gustavo, Dr. Ederson, Dr. Mauber e à Dr. Virgínia.

A todos os pacientes que colaboraram com este estudo, tornando possível a busca de maiores conhecimentos.

Ao Pablo pelo carinho, ajuda e grande incentivo, principalmente, nas horas mais difíceis.

Aos meus irmãos Alessandro e Augusto e à minha família pelo afeto e constante estímulo.

Aos colegas e amigos que, ao longo de tanto tempo, contribuíram para esta ocasião.

Enfim, a todos que em algum momento fizeram parte deste caminho.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **DISTINÇÃO ENTRE HEMATOGÔNIAS E BLASTOS EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA DE CÉLULAS B**

AUTORA: ALINE BICCA WOHLFAHRT

ORIENTADOR: JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de dezembro de 2013.

As hematogônias são células jovens linfoides de linhagem B normalmente encontradas na medula óssea. A leucemia linfocítica aguda de células B (LLA-B) é uma neoplasia de precursores linfocíticos com conseqüente acúmulo de células imaturas denominadas linfoblastos na medula. O aumento das hematogônias após o tratamento para LLA-B ou um transplante medular pode causar dúvidas quanto ao prognóstico, devido às semelhanças morfológicas e imunofenotípicas entre essas células jovens normais e malignas. O objetivo deste trabalho foi diferenciar subpopulações de hematogônias e linfoblastos B por imunofenotipagem através da citometria de fluxo, buscando identificar o perfil laboratorial hematológico ao diagnóstico e os fatores ambientais que caracterizam os pacientes de LLA-B. O grupo 1 foi constituído de controles sadios isentos de neoplasia hematológica e o grupo 2 constou de pacientes pediátricos recém-diagnosticados com LLA-B antes do início do tratamento quimioterápico, ambos em amostras de medula óssea. Foi utilizado um painel de anticorpos monoclonais composto por: CD45, CD10, CD19, CD34 e mIgM (membrana), que possibilitaram a distinção do grau de maturação das células. Apesar das semelhanças morfológicas e imunofenotípicas, hematogônias e linfoblastos B foram diferenciados por citometria de fluxo através da distribuição e expressão contínua dos anticorpos diante da associação de CD45 x CD10 e mIgM x CD34 na população B. Esta técnica permitiu uma melhor caracterização das hematogônias nos pacientes sadios, apresentando um padrão maturacional progressivo dentro da mesma população celular, com células imaturas, intermediárias e maduras. Os linfoblastos B exibiram um espectro maturacional incompleto representado por única população com características de imaturidade. Entre os pacientes com leucemia avaliados, 100% eram de raça branca, com predomínio de crianças menores de 10 anos (73%) e do sexo feminino (64%). Estes pacientes apresentaram valores reduzidos de hemoglobina (91% dos casos), plaquetas (82%) e leucócitos (45,45%), com leucometria elevada em 27,3% dos indivíduos. Os sinais e sintomas predominantes foram: palidez, astenia, presença de petéquias ou equimoses e febre. A mesma proporção de pacientes leucêmicos residia nas zonas rural e urbana. Os pacientes que moram na área rural apresentaram características que podem justificar a etiologia da LLA, como a ligação profissional dos pais ao contato com produtos tóxicos. A revisão morfológica combinada com a imunofenotipagem permitiu a correta identificação celular e a distinção entre as subpopulações fenotípicas das hematogônias e dos linfoblastos B, contribuindo para um preciso prognóstico laboratorial. Devido ao número de portadores de LLA-B deste estudo, pesquisas adicionais são sugeridas para correlacionar a exposição de pais e pacientes com leucemia aos fatores ambientais potencialmente oncogênicos, com o objetivo de prevenir essa neoplasia.

**Palavras-chave:** Hematogônias. Leucemia Linfocítica Aguda de células B. Citometria de Fluxo. Perfil Laboratorial Hematológico. Fatores Ambientais.

## **ABSTRACT**

Master's Degree Dissertation  
Posgraduate Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria

### **DISTINCTION BETWEEN HEMATOGENES AND BLASTS IN PATIENTS WITH B-CELL ACUTE LYMPHOCYtic LEUKEMIA**

**AUTHOR: ALINE BICCA WOHLFAHRT**

**ADVISER: JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA**

Presentation date: Santa Maria, December 12<sup>th</sup> 2013.

Hematogones are B-lineage lymphoid precursors cells normally found in bone marrow. The B-cell Acute Lymphocytic Leukemia (B-ALL) is a lymphocytic precursors neoplasia with consequent accumulation of immature cells called lymphoblasts in bone marrow. The increase of hematogones after treatment for B-ALL or marrow transplantation may cause doubt to the prognosis due to morphological and immunophenotypic similarities between these normal and malignant precursors cells. The aim of this study was to differentiate subpopulations of hematogones and B lymphoblasts by immunophenotyping using flow cytometry, attempting to identify the hematological laboratory profile at diagnosis and the environmental factors that characterize patients with B-ALL. Group 1 consisted of healthy controls free of hematologic malignancy and group 2 consisted of pediatric patients recently diagnosed with B-ALL before the start of chemotherapy, both in bone marrow samples. Antibodies directed against CD45, CD10, CD19, CD34 and mIgM (membrane) were used, which enabled us to distinguish the degree of cell maturation. Despite of the morphological and immunophenotypic similarities, hematogones and B lymphoblasts were differentiated by flow cytometry through distribution and continuous expression of antibodies on the association of CD45 x CD10 and mIgM x CD34 in B population. This technique allowed a better characterization of hematogones in healthy patients, with a progressive maturational pattern within the same cell population, with immature, intermediate and mature cells. The B lymphoblasts exhibited an incomplete maturation spectrum represented by a single population with immaturity characteristics. Among leukemia patients evaluated, 100% were white, with a predominance of children under 10 years (73%) and female sex (64%). These patients had lower hemoglobin levels (91% of cases), platelets (82%) and leukocytes (45.45%), with elevated leukocyte count in 27.3% of subjects. Predominant signs and symptoms were pallor, weakness, petechiae or bruising presence and fever. The same proportion of leukemic patients resided in both rural and urban zones. Patients living in rural area had features that can justify the etiology of ALL, as the professional connection of their parents to contact with toxic products. Morphological revision combined with immunophenotyping has allowed the correct cell identification and distinction between phenotypic subpopulations of hematogones and B lymphoblasts, contributing to an accurate laboratorial prognostic. Due to number of patients with B-ALL of this study, further researches are suggested to correlate the exposure of parents and leukemia patients to potentially oncogenic environmental factors, with the objective of preventing this neoplasia.

**Keywords:** Hematogones. B-cell Acute Lymphocytic Leukemia. Flow Cytometry. Profile Laboratory Hematology. Environmental Factors.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Perfil de maturação das células da MO apresentado por todas as amostras do grupo controle .....	32
Figura 2 – Perfil de maturação das células da MO apresentado pelos pacientes com LLA-B .....	32
Figura 3 – Perfil de maturação das células da MO apresentado por todas as amostras dos indivíduos sadios .....	34
Figura 4 – Perfil de maturação de células da MO de portadores de LLA-B .....	34
Figura 5 – Perfil de maturação de células da MO de portadores de LLA-B .....	34
Figura 6 – Perfil de maturação das células da MO de um indivíduo portador de LLA-B em tratamento quimioterápico com recidiva testicular sem envolvimento medular .....	36
Figura 7 – Perfil de maturação das células da MO de um indivíduo portador de LLA-B em tratamento quimioterápico com recidiva testicular sem envolvimento medular .....	36
Figura 8 – Cidades de procedência dos pacientes pediátricos portadores de LLA-B .....	37
Figura 9 – Percentual de pacientes de LLA-B que residiram na zona urbana ou rural .....	44
Figura 10 – Percentual de exposição a substâncias tóxicas ou radiação entre os pais dos portadores de LLA-B .....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Marca e características dos anticorpos monoclonais humanos com seus respectivos fluorocromos conjugados .....	28
Tabela 2 – Dados laboratoriais de pacientes pediátricos ao diagnóstico de LLA-B em amostras de SP .....	39
Tabela 3 – Variação no número de leucócitos e plaquetas, e na dosagem de hemoglobina em amostras de SP de pacientes com LLA-B ao diagnóstico.....	40
Tabela 4 – Caracterização dos pacientes pediátricos de LLA-B quanto à presença de sinais e sintomas ao diagnóstico .....	42
Tabela 5 – Exposição dos pais aos tipos de substâncias tóxicas ou radiação .....	45
Tabela 6 – Substâncias e quantidades utilizadas para o preparo do PBS puro .....	62
Tabela 7 – Substâncias e quantidades utilizadas para o preparo do PBS azida .....	63



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CF	Citometria de fluxo
DEPE	Direção de Ensino, Pesquisa e Extensão
dL	Decilitro
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g / dL	Gramas / decilitro
HGs	Hematogônias
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
LAs	Leucemias agudas
LLA	Leucemia linfocítica aguda
LLA-B	Leucemia linfocítica aguda de células B
mg	Miligrama
mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
MO	Medula óssea
NK	<i>Natural Killer</i>
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína da clorofila peridinina
PBS	Tampão fosfato-salino
SD	Síndrome de Down
SNC	Sistema nervoso central
SP	Sangue periférico
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
µm	Micrometro

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A – Termo de consentimento livre e esclarecido .....</b>	<b>58</b>
<b>Anexo B – Termo de confidencialidade .....</b>	<b>59</b>
<b>Anexo C – Preparação do corante May-Grunwald-Giemsa .....</b>	<b>60</b>
<b>Anexo D – Preparação das amostras para imunofenotipagem .....</b>	<b>62</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>1.1 Objetivos</b> .....	14
1.1.1 Objetivo geral .....	14
1.1.2 Objetivos específicos .....	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
<b>2.1 Ontogenia dos linfócitos B</b> .....	15
<b>2.2 Citometria de fluxo</b> .....	17
<b>2.3 Leucemia linfocítica aguda</b> .....	19
<b>2.4 Hematogônias</b> .....	21
<b>2.5 Perfil das hematogônias e linfoblastos B</b> .....	23
<b>2.6 Tratamento da LLA</b> .....	24
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	26
<b>3.1 Desenho do estudo</b> .....	26
<b>3.2 Amostra e local da pesquisa</b> .....	26
<b>3.3 Período do estudo</b> .....	26
<b>3.4 Aspectos éticos</b> .....	27
<b>3.5 Coleta de material, acondicionamento e transporte</b> .....	27
<b>3.6 Estudo morfológico</b> .....	28
<b>3.7 Preparação das amostras biológicas para imunofenotipagem</b> .....	28
<b>3.8 Diagnóstico laboratorial dos pacientes de LLA-B</b> .....	29
<b>3.9 Dados clínicos e laboratoriais</b> .....	29
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>4.1 Perfil dos pacientes de LLA-B estudados</b> .....	37
<b>4.2 Fatores ambientais como potenciais desencadeantes de LLA-B</b> .....	44
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48
<b>ANEXOS</b> .....	58

# 1 INTRODUÇÃO

O sistema hematopoiético funciona como um excelente modelo altamente organizado de produção das células sanguíneas, sendo responsável pela regulação da proliferação, diferenciação em várias linhagens e maturação celular. As células-tronco hematopoiéticas possuem uma grande capacidade de auto-renovação e potencial proliferativo, a qual gera todas as células desse sistema, dentre elas, as progenitoras da linhagem linfóide, que têm a propriedade de amadurecer e diferenciarem-se em linfócitos B, T e *Natural Killer* (NK) (FRANCÉS, 2002; JOBIM; JOBIM, 2008; KEE, 2011; VIVIER et al., 2011).

A medula óssea (MO) possui uma função relevante na hematopoiese por ser o órgão primário da produção e diferenciação das células precursoras linfóides de linhagem B em distintos estágios de maturação. Inicialmente, os linfócitos B imaturos sofrem uma série de alterações estruturais e funcionais até atingirem formas intermediárias e, posteriormente, a completa maturidade (KEE, 2011; LOKEN et al., 1987).

Um bloqueio da produção normal de qualquer tipo de célula sanguínea na MO promove a desregulação do sistema hematopoiético, com o acúmulo de células imaturas. Este processo resulta em graves doenças, incluindo deficiências imunológicas e leucemias (CRAIG; FOON, 2008; HAMERSCHLAK, 2008; KEE, 2011; LOKEN et al., 1987).

A proliferação anormal das células primordiais sanguíneas é representada pela leucemia, neoplasia maligna de natureza clonal que não segue o processo normal de diferenciação e morte subsequente. Esta é classificada conforme o tipo celular envolvido em linfóide ou mieloide, e de acordo com a rapidez do desenvolvimento e progressão da doença, em agudas ou crônicas (ELMAN; SILVA, 2007; FOON; TODD, 1986; NOVOA, 2013).

As leucemias agudas (LAs) são caracterizadas pela proliferação de células precursoras clonais acompanhada de bloqueio maturativo e representam um grupo heterogêneo de enfermidades hematológicas quanto aos aspectos morfológicos, fenotípicos, citogenéticos e clínicos, o que possibilita a existência de diferentes subtipos de leucemia. Esta classificação possui grande importância principalmente para definir a terapêutica a ser empregada, pois sabendo da origem, se linfóide ou mieloide e os seus subtipos, a conduta terapêutica será completamente diferente (ELMAN; SILVA, 2007; FOON; TODD, 1986; KERSEY, 1997; NOVOA, 2013).

A leucemia linfocítica aguda (LLA) é uma neoplasia de precursores linfoides que se diferencia em subtipos B ou T, com consequente acúmulo de células imaturas denominadas linfoblastos na MO. Quando o clone da célula maligna se multiplica infiltrando a medula e a circulação periférica, os sintomas clínicos começam a se manifestar, como: anemia, fadiga, astenia, infecções, sangramentos, febre, linfadenopatia, hepato e/ou esplenomegalia (ECKER et al., 2009).

A LLA de células B (LLA-B) tem origem medular e sua etiologia permanece desconhecida, embora, possíveis fatores de risco sejam enfatizados, como: efeitos da radiação, Síndrome de Down (SD), exposições a vírus e a produtos tóxicos, aborto prévio e comportamento materno. Este último inclui o uso de medicamentos, consumo de álcool, maconha e drogas alucinógenas (KOKOUVA et al., 2011; NAUMBURG, 2002; SLATER et al., 2011; ZEN et al., 2009). Os sinais ou sintomas dessa neoplasia surgem, geralmente, de maneira súbita (OLIVEIRA et al., 2005; WIEMELS, 1999).

Muitos são os fatores indutores de LLA, entre eles destacam-se os agrotóxicos, inseticidas e afins, que são produtos de processos físicos, químicos ou biológicos que alteram a flora ou a fauna com o objetivo de preservá-las dos danos provocados pelos seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 2002). Os pesquisadores Curvo, Pignati e Pignatti (2013) apresentaram resultados que indicam que a exposição aos agrotóxicos está associada à elevada incidência de câncer em crianças e adolescentes.

A intoxicação por agrotóxicos e gases tóxicos é considerada de notificação compulsória, devendo sempre ser informada aos órgãos de vigilância. Porém, outros tipos de exposições a substâncias tóxicas nem sempre são relatadas, impossibilitando a avaliação e a investigação da sua real origem (CAZARIN; AUGUSTO; MELO, 2007).

Cabral et al (2012) confirmaram a relação existente entre a exposição à radiação ionizante e casos de leucemia em crianças. Porém, as chances de desencadear essa neoplasia dependem da dose de radiação, da duração da exposição e da idade do indivíduo no momento desse contato, esta varia desde a pré-concepção até o período após o nascimento (BELSON; KINGSLEY; HOLMES, 2007; CABRAL et al., 2012).

A maioria dos conhecimentos sobre a ontogenia da linhagem linfoide iniciou com estudos realizados em células de pacientes com leucemias linfocíticas. Conforme os avanços nas metodologias, as pesquisas se concentraram na MO de indivíduos saudáveis, sendo possível identificar subpopulações celulares pouco representadas e conhecer distintos estágios de maturação dessas células (CAMPANA; PUI, 1995; LOKEN et al., 1987; NADLER et al., 1984; VAN LOCHEM et al., 2004).

As hematogônias (HG) são células jovens linfoides de linhagem B normalmente encontradas na MO, a qual estão presentes em indivíduos de todas as faixas etárias sem apresentar diferença entre sexo. Usualmente, essas células são detectadas em pequeno número na MO de indivíduos sadios (FRANCÉS, 2002; MCKENNA et al., 2001; STEKHOVEN et al., 1986; TSAO et al., 2005).

A morfologia das hematogônias se assemelha a pequenas células de origem linfoide. As HGs mais maduras são semelhantes a linfócitos maduros, entretanto, a análise morfológica das imaturas apresenta características comuns com os blastos da LLA e, em alguns casos, parecem indistinguíveis (MCKENNA et al., 2001; RIMSZA et al., 2000; SEVILLA et al., 2010).

Em um estudo realizado com crianças portadoras de LLA, as HGs apresentaram a morfologia de uma célula linfocítica em regeneração ou em proliferação ativa na MO, sendo inicialmente denominadas de células linfoides pós-quimioterapia (STEKHOVEN et al., 1986). Além disso, a presença elevada dessas células pode ocorrer no paciente portador de citopenia auto-imune ou congênita, púrpura idiopática trombocitopênica, anemia por deficiência de ferro, síndrome da imunodeficiência adquirida, neoplasias infiltrativas, após uma infecção viral ou um transplante medular (LONGACRE et al., 1989; MCKENNA et al., 2001; RIMSZA et al., 2000; SEVILLA et al., 2010).

O aumento do número de HGs na MO pode conduzir a um erro de interpretação quanto à caracterização das células jovens residuais e/ou de regeneração na MO de pacientes portadores de LLA-B após a quimioterapia, devido às semelhanças morfológicas entre os precursores linfoides (HASSANEIN et al., 2009; HURFORD et al., 2008). Apesar das HGs apresentarem características de células imaturas, estas não devem ser chamadas de linfoblastos (LONGACRE et al., 1989).

Para ajudar nessa diferenciação morfológica laboratorial, frequentemente, é requerida a análise dessas células por imunofenotipagem. Esta técnica permite identificar o tipo exato de célula que compõe um determinado tecido, através da ligação entre anticorpos monoclonais e antígenos presentes na membrana celular, no citoplasma ou intranuclear (DEL VECCHIO et al., 2004; GINER; ORFAO, 2002; LONGACRE et al., 1989).

A imunofenotipagem através da citometria de fluxo (CF) permite identificar a linhagem celular (B ou T), verificar o estágio de maturação da célula e realizar a distinção entre os precursores linfoides (BÉNÉ et al., 1999; HAYCOCKS et al., 2011; LONGACRE et al., 1989; SILVEIRA; ARRAES, 2008). Através da análise de vários parâmetros simultaneamente, essa técnica proporciona uma rapidez na obtenção dos resultados e oferece

uma definição específica da população celular presente na MO e no sangue periférico (SP) (DEL VECCHIO et al., 2004; GINER; ORFAO, 2002; HAYCOCKS et al., 2011; SILVEIRA; ARRAES, 2008).

A análise morfológica, juntamente, com um perfil imunofenotípico completo das células da MO ao diagnóstico e após a quimioterapia, podem ajudar na distinção entre HGs e linfoblastos B. Uma discriminação precisa entre as subpopulações desses precursores linfoides é fundamental para o prognóstico laboratorial e seguimento do tratamento do paciente com leucemia, uma vez que a presença de HGs pode refletir a qualidade de regeneração medular em resposta ao tratamento (HASSANEIN et al., 2009; LONGACRE et al., 1989; RIMSZA et al., 2000; SEVILLA et al., 2010).

## **1.1 Objetivos**

### 1.1.1 Objetivo geral

Diferenciar subpopulações de hematogônias e blastos da leucemia linfocítica aguda de células B.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Determinar a presença de hematogônias em pacientes com e sem diagnóstico de LLA-B, isentos de tratamento quimioterápico.

Identificar nos pacientes com LLA-B o perfil laboratorial hematológico e clínico, juntamente, com os fatores ambientais potencialmente oncogênicos.

Determinar as características familiares vinculadas ao paciente leucêmico.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Ontogenia dos linfócitos B**

A hemopoiese ou hematopoiese é definida como o processo responsável pela formação das diversas células sanguíneas que se relaciona com a origem, proliferação e diferenciação dessas células primordiais. A célula-tronco é responsável por diferenciar estas células progenitoras em várias linhagens e por reconstituir a população hematopoiética a partir de uma única célula (LORENZI et al., 2003; METCALF, 1993).

As primeiras células sanguíneas do homem surgem no período embrionário, por volta da sétima ou oitava semana de vida no saco vitelino. Após este período, tem papel relevante na hematopoiese durante o desenvolvimento fetal, órgãos como o fígado, o baço e os linfonodos e, posteriormente, inicia-se a fase medular. No período pré-natal e ao nascimento, existe medula óssea formadora de células em quase todos os ossos, podendo ser colhido material medular no terço superior da tíbia, por exemplo, em recém-nascidos e lactentes com até 6 meses de idade (LORENZI et al., 2003).

No adulto, a MO se situa nos ossos do esterno, ilíacos e costelas, formando um órgão de grande porte com peso, aproximado, de 1500 gramas. Representando o órgão central formador das células precursoras, a MO apresenta constante e intensa atividade reprodutiva e maturativa, garantindo a manutenção do número de células maduras na circulação (LORENZI et al., 2003; METCALF, 1993).

Na medula óssea de um indivíduo adulto, encontram-se várias linhagens celulares com diferentes maturações, as quais se originam de uma única célula-mãe, denominada célula-tronco. A porção celular do sangue é composta por três séries diferentes de células: os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas (LOKEN et al., 1987; LORENZI et al., 2003; METCALF, 1993; OGAWA, 1993).

Na linhagem leucocitária, os linfócitos B, T e NK são gerados a partir de um progenitor de linhagem linfoide. Essas células possuem características morfológicas e citoquímicas diferentes, as quais são essenciais para o seu reconhecimento (FRANCÉS, 2002; JOBIM; JOBIM, 2008; KOEHN et al., 2012; OGAWA, 1993).



Os linfócitos B e T apresentam-se como células pequenas (6-10 µm de diâmetro) com alta razão núcleo-citoplasma, entretanto, as células NK são maiores do que esses linfócitos e possuem o citoplasma granular. A maturação das células B e NK ocorre na MO, já os linfócitos T, possuem diferenciação e maturação intratímica (FRANCÉS, 2002; JOBIM; JOBIM, 2008; KOEHN et al., 2012; LORENZI et al., 2003).

A transição maturacional entre as subpopulações de células precursoras normais de linhagem B ocorre em torno dos 15 anos de idade. As crianças apresentam um elevado número de células B mais imaturas na MO, podendo representar até 70% da população. À medida que aumenta a faixa etária, predominam as subpopulações mais maduras na medula, representando em torno de 70% do total de células B nos adultos (LUCIO et al., 1999).

A determinação de vários tipos celulares por imunofenotipagem é realizada utilizando um conjunto de moléculas de superfície celular que marcam as células, denominadas de grupamento de diferenciação (CD). Os primeiros antígenos de linhagem linfóide B a serem expressados na MO normal, os CD22 foram conhecidos devido a técnica de citometria de fluxo (LUCIO et al., 1999).

Os antígenos CD22 apresentam expressão após o CD34 (precursor hematopoiético) e precedem a expressão de CD19 (marcador de células B) e CD10 (precursor linfóide B e de linfoblastos B). Assim, o antígeno CD19 estaria ausente nos progenitores B mais imaturos, porém, com expressão positiva para os antígenos CD34, TdT (Terminal-deoxinucleotidil-transferase, marcador de células linfóides imaturas B e T) e CD22 (JORGE et al., 2006; LUCIO et al., 1999; RIMSZA et al., 2000).

Logo após, o precursor B intensificaria a expressão de TdT e coexpressaria em sequência CD10 e CD19 (VIDRIALES et al., 2002). Posteriormente, a perda do TdT e do CD10 marcam a maturação dos linfócitos B, que adquirem imunoglobulinas da classe M (IgM) de membrana (MCGINNES; LETARTE; PAIGE, 1991; VIDRIALES et al., 2002).

Nas populações T e NK, na MO normal, a frequência de células imaturas coexpressando CD7 e CD34 ou CD7 e TdT é muito baixa. A proporção de células com expressão do CD7 aumenta com a idade em indivíduos saudáveis, assim, esse antígeno tem sido considerado o primeiro marcador associado de células T que apresenta reatividade durante a maturação dessas células (BENDER et al., 1991; PORWIT-MACDONALD et al., 2000).

Coletas de amostras de MO raramente são realizadas em indivíduos saudáveis, por isso, torna-se difícil estabelecer valores de referências normais para grupos de pessoas com diferentes faixas etárias (MAFTOUN-BANANKHAH et al., 2008). Apesar da MO ser o órgão

responsável pela função hematopoiética em adultos, durante a evolução de certas doenças proliferativas, o baço e o fígado podem reassumir a produção de células sanguíneas (LORENZI et al., 2003).

## 2.2 Citometria de fluxo

As células possuem proteínas específicas em suas membranas que podem ser reconhecidas por reativos sintetizados em laboratórios, os anticorpos monoclonais. Para esses anticorpos, as proteínas de membrana de células blásticas, linfócitos, monócitos, entre outras células, são identificadas como antígenos celulares (NAOUM, 2001).

A identificação imunofenotípica dos diferentes marcadores celulares pela citometria de fluxo é realizada através da reação antígeno-anticorpo, utilizando anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos. Estes anticorpos podem reconhecer uma enorme quantidade de diferentes proteínas que podem estar dentro da célula (antígenos citoplasmáticos e nucleares) ou na sua superfície (VASCONCELOS, 2007; WOOD et al., 2007).

O citômetro de fluxo é constituído por cinco sistemas principais: uma fonte de radiação (geralmente um laser), uma câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos para gerar e coletar os sinais de luz, fotodiodos ou fotomultiplicadores para detecção sensível e processamento dos sinais e uma unidade computadorizada. Assim, as características celulares são medidas por um sistema óptico e o sinal de luz gerado é registrado em um sistema eletrônico (LORENZI et al., 2003; SILVA et al., 2004).

O computador acoplado ao citômetro possui a função de processamento dos dados através da aquisição, do armazenamento e da análise das informações obtidas utilizando programas (softwares) especiais (LORENZI et al., 2003). Os fluorocromos ou corantes utilizados para identificar as células necessitam ser compatíveis com o laser do citômetro, sendo comumente utilizado na área clínica o de argônio (SILVA et al., 2004).

Através de uma focalização hidrodinâmica, as células passam uma a uma em frente de um feixe de laser (detector) no citômetro. Esta técnica permite a obtenção simultânea de várias informações sobre o perfil das células em análise, confirmando a presença de um ou mais fluorocromos dentro da célula ou ligado à membrana na superfície celular, através da utilização dos anticorpos monoclonais (FAILACE, 2009; LORENZI et al., 2003; ORFAO et al., 1995; SILVA et al., 2004).

Os parâmetros das células podem ser relacionados com a dispersão da luz, determinando o tamanho das células analisadas (dispersão frontal) e a complexidade intracelular (dispersão lateral). Quando a dispersão de luz é medida em ângulos pequenos do ponto no qual o feixe de luz do laser cruza a célula, é chamada de dispersão frontal (forward scatter – FSC). Entretanto, no momento em que essa dispersão for medida em ângulo reto em direção ao feixe de luz, será denominada de dispersão lateral (side scatter – SSC) (LORENZI et al., 2003; ORFAO et al., 1995).

Para analisar um grupo celular com características semelhantes, utilizamos uma janela eletrônica (gate) para isolar essas células, separando-as conforme o seu tamanho e complexidade (SILVA et al., 2004). A determinação do número de moléculas presentes em uma célula específica é realizada através da intensidade de fluorescência (densidade de antígenos) de uma determinada população. Isto é possível, devido ao uso de microesferas que possuem uma capacidade de ligação antigênica conhecida, as quais fornecem curvas-padrão de fluorescência que ao serem comparadas, proporcionam a quantificação da fluorescência na amostra (LORENZI et al., 2003).

A CF é uma técnica exata com um processo analítico que detecta a expressão dos antígenos celulares e identifica cada tipo de célula, é capaz de fornecer uma análise sensível e específica das células normais ou neoplásicas, com resultados objetivos e de alta precisão. Esta técnica apresenta relevância ao avaliar a quantificação da expressão de cada antígeno em análise, levando em conta a intensidade média de fluorescência e o padrão de reatividade (homogêneo ou heterogêneo), determinando o seu estágio de desenvolvimento num sistema altamente controlado (SILVEIRA; ARRAES, 2008; NAOUM, 2001; ORFAO et al., 1999; TABERNEIRO et al., 2001; VASCONCELOS, 2007).

A utilização da análise multiparamétrica por CF na rotina laboratorial está aumentando (CHANTEPIE et al., 2011; MATOS; JORGE; QUEIROZ, 2007; ORFAO et al., 1999; TABERNEIRO et al., 2001). O surgimento dessa técnica permitiu a identificação de hematogônias como precursores de células B na MO e o reconhecimento do seu padrão maturacional. A combinação de parâmetros do antígeno CD45 versus dispersão lateral é uma ferramenta poderosa para a identificação dessas células, permitindo uma melhor discriminação entre as populações anormais e ajudando na avaliação da qualidade do preparo das amostras (SEVILLA et al., 2010; WOOD et al., 2007).

A análise imunofenotípica das populações celulares através da CF contribuiu para o diagnóstico, classificação, estágio de maturação da célula, prognóstico e no monitoramento da terapia do paciente portador de neoplasia hematológica (CRAIG; FOON, 2008; HASSANEIN

et al., 2009; HAYCOCKS et al., 2011). É uma técnica simples, rápida e adequada para procedimentos de triagem clínica, permitindo reconhecer aberrações fenotípicas, mesmo quando presentes em pequenas proporções nas células analisadas (CHANTEPIE et al., 2011; CRAIG; FOON, 2008; TSAO et al., 2005).

### **2.3 Leucemia linfocítica aguda**

A leucemia é considerada a neoplasia com maior incidência na maioria das populações (25% a 35%). Foram estimados para 2012 no Brasil, 4570 novos casos dessa malignidade em homens e 3940 em mulheres (BRASIL, 2011).

A leucemia aguda é caracterizada pela proliferação ou expansão incontrolada de células hematopoiéticas anormais na MO, no sangue, no baço e outros órgãos. Essa patologia promove um bloqueio da produção normal de qualquer tipo de célula sanguínea, como hemácias, leucócitos e plaquetas, prejudicando as funções destas e promovendo, um acúmulo de células imaturas na MO podendo ocorrer a sua disseminação para o SP e/ou infiltração em outros tecidos do corpo, como no fígado e nos linfonodos (CRAIG; FOON, 2008; ELMAN; SILVA, 2007; HAMERSCHLAK, 2008).

A leucemia linfocítica aguda é representada pela proliferação incontrolada de células jovens linfoides imaturas, os linfoblastos, de linhagem celular B ou T. Geralmente, a origem dessa malignidade hematológica não é evidente, pois o paciente pode ser assintomático (LEBIEN, 2000). O diagnóstico dessa neoplasia é confirmado pela presença de 20% ou mais de linfoblastos do total de células nucleadas na MO (NORONHA et al., 2011).

Comum em crianças e adolescentes, a LLA surge com maior frequência entre pacientes de 0 a 14 anos. Os pacientes pediátricos, indivíduos menores de 18 anos, por apresentarem características próprias da neoplasia são submetidos à terapia através da adesão a protocolos de tratamento específicos para a sua faixa etária (BRASIL, 2011; OLIVEIRA et al., 2005).

Os pacientes pediátricos de LLA, geralmente, apresentam um curto período de latência da doença, a qual se manifesta de forma mais agressiva e com um crescimento rápido, entretanto, esses pacientes respondem melhor ao tratamento apresentando um bom resultado. Alguns fatores prognósticos favoráveis dessa neoplasia utilizados na triagem clínica e laboratorial consistem em crianças com idade entre 1 e 9 anos, contagem leucocitária menor

que  $50 \times 10^9 / L$  e a presença de precursores normais de células B (BRASIL, 2011; STOCK, 2010).

O quadro clínico em crianças e adolescentes portadores de LLA pode iniciar sem sintomas ou culminar com sinais de fase aguda da doença, com a presença de febre, anemia intensa, sangramento nas mucosas e infecções (CONTER et al., 2004). Failace (2009) relatou que a anemia, geralmente presente, torna-se mais intensa à medida que a dosagem de hemoglobina diminui, mostrando sinais como palidez evidente, taquicardia, dispnéia e fadiga aos menores esforços. Em casos graves, pode ocorrer sinais de sopro anêmico, insuficiência cardíaca e perda de atividade física.

Segundo a classificação morfológica do grupo Franco-Americano-Britânico (FAB), a LLA é dividida em três subtipos: L1, L2 e L3. Estes grupos são classificados de acordo com o tamanho da célula, o estado da cromatina, a forma nuclear, as características do nucléolo, a quantidade de citoplasma, a presença de vacúolos e a basofilia citoplasmáticos (BENNETT et al., 1976).

De acordo com a caracterização imunológica, a LLA-B é classificada em quatro classes: LLA PRÓ-B, CALLA (antígeno comum da LLA), leucemia PRÉ-B e leucemia B madura. Estas classes foram ordenadas de acordo com o grau de maturação da célula leucêmica em comparação com o caminho da diferenciação linfocítica normal (CONSOLINI et al., 1998; FARIAS; CASTRO, 2004; MATOS; JORGE; QUEIROZ, 2007).

A Organização Mundial da Saúde apresentou um conjunto de parâmetros clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e genéticos utilizados por patologistas, hematologistas e oncologistas na caracterização de neoplasias malignas (ZERBINI et al., 2011). Avaliando os resultados desses critérios, os pacientes de LLA-B vêm sendo submetidos à terapia de acordo com protocolos de tratamentos específicos.

A LLA-B é caracterizada pela expressão de antígenos específicos de células B, como o CD19 (marcador de células B) e o CD10 (precursor linfoide B e de linfoblastos B). Também ocorre a expressão de CD45 (antígeno leucocitário comum) e do antígeno CD34 (precursor hematopoiético), ambos presentes em blastos leucêmicos. A análise imunofenotípica do linfoblasto maligno de linhagem B mostra um típico desvio do processo normal de maturação, com uma maior proporção de células imaturas e pouca ou nenhuma madura, com a presença de marcadores aberrantes não observados em precursores B normais (FRANCÉS, 2002; HURFORD et al., 2008; ONCIU, 2009; SEVILLA et al., 2010).

Na imunofenotipagem, os pacientes portadores de LLA-B exibem um espectro maturacional incompleto representado por uma única população de linfoblastos B com

características de imaturidade. Este resultado é confirmado através da CF, que mostra regiões de CD10 de alta intensidade, com baixa ou nula intensidade de expressão do antígeno CD45, presença do CD34 forte e negatividade para o IgM (marcador de células B maduras) de membrana (JORGE et al., 2006; SEVILLA et al., 2010).

## 2.4 Hematogônias

A morfologia das HGs apresenta células linfoides de pequeno tamanho, com diâmetro alterando conforme a sua fase de maturação, apresentando de 10 a 12µm na fase imatura e de 17 a 20µm em células intermediárias e maduras (LONGACRE et al., 1989). A classificação citológica dessas células é melhor caracterizada nos esfregaços do aspirado da MO (MCKENNA et al., 2001; SEVILLA et al., 2010).

As HGs são encontradas em pequeno número na MO de indivíduos saudáveis, sendo esses precursores linfoides B raramente identificados no SP através de exame morfológico, exceto em recém-nascidos (BRADY; ATWATER; LOWELL, 1999; SEVILLA et al., 2010). Um estudo realizado com amostras de MO de 12 pacientes pediátricos sem neoplasia apresentou um número elevado de HGs, porém, entre estes, apenas uma criança foi identificada com a presença dessas células no SP, sendo este resultado considerado pelo autor como praticamente ausente (LONGACRE et al., 1989).

Moreno-Madrid et al (2008) relatou em sua pesquisa a presença de 13% de HGs somente na MO de um lactente. Um número elevado dessas células precursoras foi encontrado na MO de crianças e adolescentes, apresentando um declínio significativo com o aumento da idade (MCKENNA et al., 2001; REGO et al., 1998; RIMSZA et al., 2000; SEVILLA et al., 2010).

As amostras de aspirados medulares são obtidas, geralmente, de pacientes com suspeita de neoplasias ou anomalias hematológicas. Não há valores de referência geralmente aceitos para as HGs; pois, raramente, o exame de MO é realizado em indivíduos sadios. Porém, um grupo de pesquisadores designou como número elevado de HGs o valor igual ou superior a 5%, pois nesta quantidade essas células são visíveis em esfregaços de medula (MCKENNA et al., 2001; SEVILLA et al., 2010).

Crianças com citopenias imunes e tumores sólidos apresentaram um número elevado desses precursores linfoides na MO, sendo a etiologia e a função biológica dessa proliferação

celular de importante interesse clínico (MAFTOUN-BANANKHAH et al., 2008; MCKENNA et al., 2001). Longacre et al (1989) sugeriu que em alguns pacientes, essas células possuem um papel crítico na hematopoiese e resposta imune.

A função das HGs pode estar relacionada com a regulação da produção celular sanguínea, participando do início da ontogenia de células B, sendo que a intensa proliferação dessas células pode representar uma reação do sistema imune, permitindo uma restauração ou regeneração celular (INTERMESOLI et al., 2007; LONGACRE et al., 1989; MCKENNA et al., 2001; STEKHOVEN et al., 1986).

Sutton, Vusirikala e Chen (2009) relataram o aumento de hematogônias em pacientes portadores de deficiência de cobre. Maftoun-Banankhah et al (2008) mostrou um declínio na população de HGs durante uma maior infiltração neoplásica na MO e também na Síndrome Mielodisplásica. Esta síndrome é responsável pelo comprometimento dos precursores celulares promovendo uma hematopoiese ineficaz.

As alterações encontradas no número de HGs mostraram relevância na distinção entre Síndrome Mielodisplásica e citopenias de causa não clonal, como na insuficiência de cobre. Com o objetivo de ajudar no diagnóstico dessas patologias, o número de células precursoras linfoides normais pode servir como um biomarcador (MAFTOUN-BANANKHAH et al., 2008; MCKENNA et al., 2001).

Na análise morfológica, geralmente, as HGs possuem o citoplasma escasso, mas quando presente, caracteriza-se por uma forte ou moderada basofilia, sem inclusões, grânulos ou vacúolos. O núcleo é redondo ou oval e apresenta uma ou mais cavidades ou fendas superficiais. A cromatina nuclear é densa, homogênea e, em alguns casos, possui pequenos nucléolos indistintos (JORGE et al., 2006; MCKENNA et al., 2001; SEVILLA et al., 2010).

Loken et al (1987) utilizou a citometria de fluxo multiparamétrica para definir a progressão normal e heterogênea das células linfoides B presentes na MO. Posteriormente, a caracterização imunofenotípica realizada por Jorge et al (2006) confirmou o padrão maturacional contínuo e completo das HGs dentro da mesma população celular, com a expressão de antígenos típica de células precursoras de linhagem B em todas as fases de maturação.

Conforme esse padrão de maturação progressivo, alguns pesquisadores apresentaram as HGs divididas em fases, de acordo com a intensidade de expressão de antígenos nas células. Os padrões fenotípicos dessas células precursoras se dividem em três estágios de maturação: imaturas, intermediárias e maduras (FUDA; KARANDIKAR; CHEN, 2009; JORGE et al., 2006; LOKEN et al., 1987; MCKENNA et al., 2001; SEVILLA et al., 2010).

As HGs imaturas expressam CD34 de alta intensidade, expressão baixa de CD19, elevada intensidade de CD10 e CD45 de baixa intensidade. Na transição de imaturas para intermediárias, essas células jovens reduzem a expressão de CD34, enquanto, diminuem a intensidade de CD10 e aumentam a de CD45 a níveis intermediários, com aumento da intensidade de CD19. Durante a fase madura, essas células adquirem positividade de IgM na membrana celular e apresentam CD45 de alta e CD10 de baixa intensidade (FUDA; KARANDIKAR; CHEN, 2009; JORGE et al., 2006; LUCIO et al., 1999; MCKENNA et al., 2001; SEVILLA et al., 2010).

## **2.5 Perfil das hematogônias e linfoblastos B**

O tamanho e as características citológicas das hematogônias mais maduras são, em alguns casos, semelhantes aos linfócitos maduros. Em algumas condições clínicas, células precursoras normais e linfoblastos B exibem, na morfologia, características indistinguíveis (AGARWAL et al., 2010; MCKENNA et al., 2001; RIMSZA et al., 2000).

A técnica de coloração de May-Grunwald-Giemsa utilizada para analisar a morfologia das HGs resulta na semelhança entre essas células jovens e os blastos da LLA. Diferenciar morfologicamente um mínimo envolvimento de linfoblastos B residuais ou recorrentes na MO de uma pequena população de células progenitoras normais é desafiador, apesar dos padrões de maturação das HGs serem bem caracterizados, é necessária a análise imunofenotípica (SEVILLA et al., 2009). Uma discriminação precisa dessas células é essencial ao atendimento do paciente de LLA-B (RIMSZA et al., 2000).

Dúvidas quanto ao prognóstico podem surgir, devido à morfologia das células na fase de regeneração na medula de crianças e adolescentes (INTERMESOLI et al., 2007; SEVILLA et al., 2010). Longacre et al (1989) encontraram resultados entre 8 a 55% no percentual de HGs na MO, sendo comum esse aumento após o tratamento para LLA-B ou um transplante medular (MCKENNA et al., 2001).

Em algumas doenças não hematológicas, como o neuroblastoma, as HGs podem representar em torno de 50% das células da MO; podendo causar um potencial risco no diagnóstico diferencial com LLA ou linfoma linfocítico. O acompanhamento clínico desse paciente é crucial para garantir os cuidados apropriados e uma terapia eficiente (FRANCÉS, 2002; LONGACRE et al., 1989; MORENO-MADRID et al., 2008).



Antigamente, acreditava-se que a LLA tinha origem de um bloqueio em alguma fase de diferenciação das células hematopoiéticas normais. Esse conceito foi anulado devido ao conhecimento das características imunofenotípicas das células leucêmicas, como a presença de fenótipos aberrantes (LUCIO et al., 2001).

A caracterização imunofenotípica das HGs apresenta um padrão maturacional contínuo e completo. Estas populações de células precursoras mostram a expressão de antígenos do desenvolvimento normal da célula B, sem expressão de antígeno aberrante ou assincronia (LUCIO et al., 1999; HURFORD et al., 2008; KROFT et al., 2004; MCKENNA et al., 2001; SEVILLA et al., 2010).

Pesquisadores apresentaram uma análise de aspirados de MO por citometria de fluxo, com HGs e blastos leucêmicos apresentando positividade na região do antígeno CD45 de baixa intensidade. As HGs mostraram uma baixa dispersão lateral (complexidade intracelular) e um padrão de distribuição contínuo na região dos linfócitos maduros, porém, os linfoblastos B apresentaram uma maior dispersão lateral (SEVILLA et al., 2010).

## **2.6 Tratamento da LLA**

Antes de iniciar o tratamento das crianças e adolescentes portadores de LLA com quimioterápicos, os exames realizados para avaliar a situação de cada paciente são: sinais e sintomas clínicos, análise citomorfológica e citoquímica, estudo de imunofenotipagem, análise de biologia molecular e citogenética. O paciente necessita iniciar a terapia assim que o diagnóstico é confirmado (HAMERSCHLAK, 2008).

O paciente portador de LLA que consentir com o tratamento deverá seguir cinco fases. Primeiro ocorre a terapia de indução da remissão da doença, com o objetivo de restaurar a hematopoiese normal de glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas, atingindo menos de 5% de blastos do total de células nucleadas em aspirados de MO (LAKS et al., 2003; MUZZAFAR et al., 2009; VAN WERING et al., 2000).

Logo após, inicia-se a fase de consolidação da remissão e a seguir, o ajuste da intensidade do esquema terapêutico conforme o risco de recaída do paciente. Após, é realizada a terapia de consolidação tardia e a última etapa corresponde à fase de manutenção do tratamento com a finalidade de erradicar as células leucêmicas residuais (ECKER et al., 2009; LAKS et al., 2003).

A sobrevida livre da doença pode ser conseguida em até 80% das crianças (ECKER et al., 2009; LAKS et al., 2003). Terapias com quimioterápicos podem debilitar o organismo do hospedeiro, aumentando o risco de comprometimento imunológico e nutricional, podendo ocasionar danos a resposta terapêutica. Pacientes pós-tratamento perdem as características iniciais de sua doença, tornando impossível a revisão de seus achados iniciais (HAMERSCHLAK, 2008).

Indivíduos portadores de LLA podem ter um aumento de células jovens linfocíticas na MO com características blásticas, as HGs, após a quimioterapia ou transplante medular. Essas células normais podem sugerir um estado regenerativo desse órgão, sem que necessariamente represente uma falha terapêutica ou recidiva da doença (MCKENNA et al., 2001).

## **3 METODOLOGIA**

### **3.1 Desenho do estudo**

Prospectivo transversal.

### **3.2 Amostra e local da pesquisa**

O estudo foi realizado em amostras de medula óssea de pacientes atendidos no Serviço de Hematologia e Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) pertencente a rede de saúde pública do estado do Rio Grande do Sul. Os pacientes foram distribuídos em dois grupos:

- Grupo 1: Constituído de amostras de MO de 6 indivíduos sadios sem diagnóstico de neoplasia hematológica. Entre estes, foram analisadas amostras biológicas obtidas de dois pacientes pediátricos (5 e 14 anos) e de quatro indivíduos adultos doadores de hemocomponentes (com idade entre 30 e 54 anos).

- Grupo 2: Foram analisadas amostras medulares de 11 pacientes pediátricos com idade entre 2 e 16 anos recém-diagnosticados com LLA-B, isentos de tratamento quimioterápico.

Foram excluídos do estudo os pacientes que fizeram uso prévio de qualquer dose de corticosteróides antes do diagnóstico, os portadores de LLA-B com idade maior de 18 anos, pacientes com população rara de células CD19 positivas e aqueles cujos pais ou responsáveis não autorizaram a inclusão na pesquisa.

### **3.3 Período do estudo**

A pesquisa iniciou no mês de janeiro de 2013 e estendeu-se até o dia 5 de novembro do referido ano.

### **3.4 Aspectos éticos**

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Direção de Ensino, Pesquisa e Extensão (DEPE) do HUSM no dia 16 de fevereiro de 2012 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria no dia 28 de março de 2012 (CAAE: 01112412.4.0000.5346).

Os pacientes incluídos neste estudo, juntamente, com os pais ou representantes legais das crianças e adolescentes, foram devidamente esclarecidos sobre os propósitos da pesquisa e após terem concordado assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A).

Os pesquisadores participantes assinaram o Termo de Confidencialidade com relação aos dados da pesquisa (Anexo B).

### **3.5 Coleta de material, acondicionamento e transporte**

As amostras de medula óssea foram coletadas pelos médicos do Serviço de Hematologia e Oncologia do HUSM, responsáveis pelo atendimento dos pacientes. O material biológico dos pacientes pediátricos foram colhidos ao diagnóstico de acordo com o Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda da Criança e do Adolescente (GBTLLA-2009).

A coleta das amostras biológicas faz parte do protocolo de exames de rotina para diagnóstico e tratamento das leucemias agudas e outros tipos de câncer. Entretanto, a coleta da amostra de MO nos indivíduos doadores de hemocomponentes foi realizada no dia do respectivo processo. O estudo não proporcionou prejuízos ao andamento do tratamento dos pacientes bem como não necessitou de procedimentos invasivos além daqueles preconizados no Protocolo.

O estudo não trouxe riscos à saúde dos pacientes, devido à pesquisa ser realizada no material biológico excedente. Este foi colhido em tubo contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para análise imunofenotípica e confecção de esfregaços medulares em lâminas. O transporte da amostra para o laboratório e a sua conservação foram realizados em temperatura ambiente até o processamento, o qual foi imediato ou iniciado em até 24 horas.

### 3.6 Estudo morfológico

Os esfregaços de medula óssea foram corados pela técnica de May-Grunwald-Giemsa (Anexo C) e analisados morfológicamente por um médico hematologista, o qual avaliou as subpopulações celulares. Adotou-se o critério de 20% ou mais de linfoblastos sobre o total dos elementos nucleados na medula para o diagnóstico de LLA-B (NORONHA et al., 2011).

### 3.7 Preparação da amostra biológica para imunofenotipagem

O processamento da amostra para imunofenotipagem no citômetro de fluxo foi realizado no dia da coleta do material biológico ou em até 24 horas após, pelo profissional responsável no Serviço de Hematologia e Oncologia do HUSM. A aquisição das células de interesse na população CD19 positiva foi realizada por técnica qualitativa. Os anticorpos monoclonais utilizados foram representados na tabela 1.

Tabela 1 – Marca e características dos anticorpos monoclonais humanos com seus respectivos fluorocromos conjugados

<b>Especificidade</b>	<b>Clone</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Marca</b>
Anti-IgM	Policlonal	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	Dako (Glostrup, Denmark)
Anti-CD34	581	Ficoeritrina (PE)	Coulter (Immunotech, Marseille, France)
Anti-CD19	SJ25C1	Proteína da clorofila peridina (PerCP)	BD (Becton Dickinson, Biosciences, San Jose, CA, USA)
Anti-CD45	J33	FITC	Coulter
Anti-CD10	SS2/36	PE	Dako

A caracterização dos precursores linfoides B foi efetuada por meio da tripla marcação da amostra com os fluorocromos: FITC, PE e PerCP. Foi utilizado o seguinte painel de anticorpos monoclonais: mIgM FITC / CD34 PE / CD19 PerCP e CD45 FITC / CD10 PE / CD19 PerCP e um conjunto de controle isotópico, de modo que possibilitou a distinção do grau de maturação das células.

As amostras foram processadas conforme a técnica para marcadores de superfície celular e para a lise de eritrócitos (Anexo D).

Como controle de qualidade, foi realizada a calibração do citômetro de fluxo de três cores da BD FACSCalibur™, com as *bides* e na otimização foi utilizado o CD45 marcado com as três cores: FITC, PE e PerCP. Após a preparação do material biológico, a aquisição foi realizada imediatamente utilizando o software da Cell Quest Pro™ da Becton Dickinson® (San Jose, California, USA), sendo a análise estatística realizada pelo próprio programa.

O anticorpo anti-CD19 em todos os tubos serviu como guia para a marcação das células B, sendo adquiridos 10000 eventos da subpopulação CD19 positiva. A expressão dos anticorpos CD45 x CD10 e mIgM x CD34 foi avaliada nessa população B, com interesse nas células precursoras linfoides.

### **3.8 Diagnóstico laboratorial dos pacientes de LLA-B**

A amostra de MO, no momento do diagnóstico, foi analisada através da citologia, imunofenotipagem, biologia molecular e citogenética.

Após serem diagnosticados como portadores de LLA-B, os pacientes pediátricos deste estudo, juntamente com os pais ou responsáveis legais, aceitaram e posteriormente, iniciaram o tratamento de acordo com o Protocolo GBTLI LLA-2009. Este tem como objetivo melhorar as chances de cura das crianças e adolescentes.

### **3.9 Dados clínicos e laboratoriais**

A coleta dos dados foi realizada a partir do prontuário dos pacientes. Informações sobre a clínica, contato dos pais com substâncias tóxicas e resultados dos exames laboratoriais

foram anotados e armazenados em planilhas, tais como: idade, sexo, ocorrência de óbito em pacientes pediátricos de LLA-B, presença de blastos no sangue periférico, sinais e sintomas ao diagnóstico (febre, dor óssea, púrpuras ou equimoses, sangramento das mucosas, linfonomegalia, hepatomegalia e esplenomegalia) dados do hemograma e exposição dos pais a agrotóxicos, inseticidas, drogas alucinógenas e radiação ionizante.

O conjunto de informações sobre a população deste estudo foi analisado, armazenado e publicado de forma anônima. A completa destruição desses dados ocorrerá após dois anos de término desta pesquisa.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 17 pacientes participaram deste estudo, os quais foram divididos em dois grupos: 11 crianças e adolescentes ao diagnóstico de LLA-B, e grupo controle com 6 indivíduos saudáveis e isentos de neoplasia.

A maioria dos pacientes portadores de LLA-B apresentou na análise morfológica do esfregaço medular, corado pela técnica de May-Grunwald-Giemsa, mais de 90% das células representadas por blastos de linhagem linfoide. Na análise citológica do esfregaço de MO dos indivíduos sadios, foram encontradas de 4% a 14% de células mononucleares, sugestivas de HGs.

A detecção de células precursoras leucêmicas na MO de portadores de LLA-B possui um elevado valor prognóstico durante a terapia, porém, a distinção entre células imaturas normais e malignas somente pela morfologia pode apresentar dificuldades (DELBUONO et al., 2008). Este equívoco pode ocorrer devido às semelhanças morfológicas entre o precursores linfoides em casos de suspeita de leucemia residual ou recaída de LLA-B durante a fase de regeneração ou após a quimioterapia (HASSANEIN et al., 2009; SEVILLA et al., 2010).

A diferenciação, de forma confiável, dos progenitores linfoides é realizada pela CF, pois as HGs possuem características na morfologia e na imunofenotipagem que coincidem com os linfoblastos (HASSANEIN et al., 2009). Semelhanças imunofenóticas entre precursores linfoides B normais e malignos formaram a base para a classificação dos linfoblastos B (LUCIO et al., 2001).

As HGs e os blastos expressam alguns marcadores em comum, como o CD10 e o CD34, mas, o que os diferencia é a continuidade da expressão desses antígenos. As células progenitoras linfoides normais exibem um processo de maturação heterogêneo, sendo possível detectar a expressão gradual de certos antígenos. Entretanto, os linfoblastos B mostram um perfil único representado por uma população imatura.

Nas amostras de MO dos 17 pacientes deste estudo, foi realizada a análise imunofenotípica qualitativa. Os resultados laboratoriais dos 6 indivíduos sadios e dos 11 portadores de LLA-B ao diagnóstico foram reproduzidos diante da associação de marcadores para detecção de CD45 x CD10 e representados nas figuras 1 e 2.



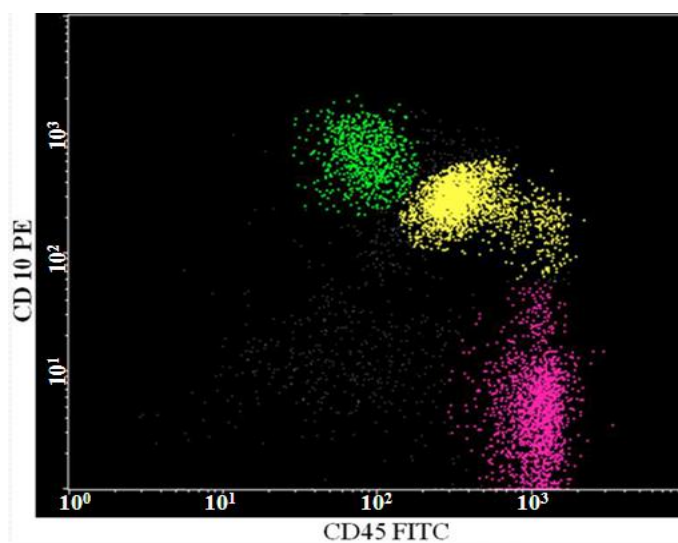


Figura 1 – Perfil de maturação das células da MO apresentado por todas as amostras do grupo controle

Legenda: FITC (isotiacianato de fluoresceína). PE (ficoeritrina). Cor verde (HGs imaturas), amarelo (HGs intermediárias) e rosa (HGs maduras)

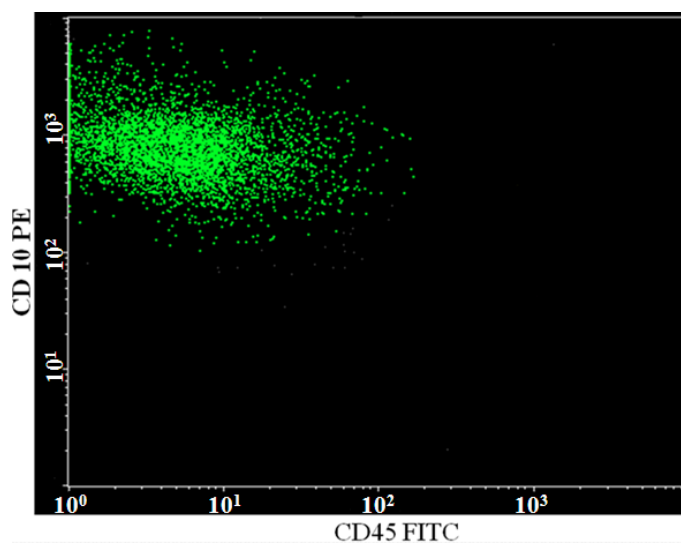


Figura 2 – Perfil de maturação das células da MO apresentado pelos pacientes com LLA-B

Legenda: FITC (isotiacianato de fluoresceína). PE (ficoeritrina). Cor verde (linfoblastos B)

Através da associação de CD45 FITC / CD10 PE / CD19 PerCP, as populações de HGs e de linfoblastos B apresentaram perfis imunológicos diferentes. Os padrões fenotípicos das HGs nas amostras de MO dos indivíduos sem neoplasia (Figura 1) mostraram um perfil de antígenos em três estágios de maturação: células imaturas, intermediárias e maduras.

Todas as amostras analisadas (100% do grupo controle) apresentaram o mesmo perfil, com amplo espectro maturacional. As células imaturas expressaram elevada intensidade de CD10 e CD45 de baixa intensidade, a expressão do CD10 em declínio em células intermediárias resultou em intensidade intermediária de CD10 e CD45, e as HGs maduras mostraram expressão negativa e / ou positiva de baixa intensidade de CD10 e CD45 de alta intensidade.

As HGs apresentaram pequeno tamanho (FSC) e baixa complexidade (SSC) através da imunofenotipagem, mostrando um padrão de maturação heterogêneo dentro de uma mesma população celular, com os antígenos CD45 e CD10 definindo a evolução normal dessas células B precursoras. Pesquisadores relataram em seus estudos esse mesmo padrão maturacional (HURFORD et al., 2008; JORGE et al., 2006; LOKEN et al., 1987; SEVILLA et al., 2010).

Os pacientes portadores de LLA-B exibiram um padrão maturacional incompleto representado por uma população única de linfoblastos B imaturos. Conforme a associação de marcadores para a detecção de CD45 x CD10, esse perfil foi confirmado pela presença de regiões de CD10 de alta intensidade com baixa (45,5%) ou ausente (54,5%) expressão do antígeno CD45. A expressão forte de CD10 com ausência de CD45 é uma característica restrita das células blásticas. Os pacientes pediátricos de LLA-B não apresentaram células precursoras linfoides normais no momento do diagnóstico.

Uma pesquisa realizada por Jorge et al (2006), em amostras de MO de 10 pacientes pediátricos de LLA-B, revelou na CF o mesmo perfil de imaturidade dos linfoblastos B, com CD10 de alta intensidade e CD45 negativo (em mais de 90% dos casos) ou de baixa intensidade. Utilizando a mesma técnica, Noronha et al (2011) analisaram amostras de MO de crianças e adultos portadores de LLA-B. Estes observaram que em 86,6% dos pacientes com CD19 positivo, 83,3% apresentaram positividade para o antígeno CD10, sendo que 87% dos indivíduos foi positivo para o CD45.

Os estudos de Jorge et al (2006) e Noronha et al (2011) mostraram a imaturidade dos linfoblastos B ao diagnóstico através da expressão do antígeno CD10 de alta intensidade na maioria dos casos. Estes resultados realçaram o perfil incompleto e imaturo observado nas células blásticas medulares dos pacientes pediátricos de LLA-B do HUSM.

A fim de confirmar o grau de maturação das células precursoras linfoides B normais e malignas analisadas, foi realizada a associação de marcadores para a detecção de IgM x CD34, conforme as figuras 3, 4 e 5.

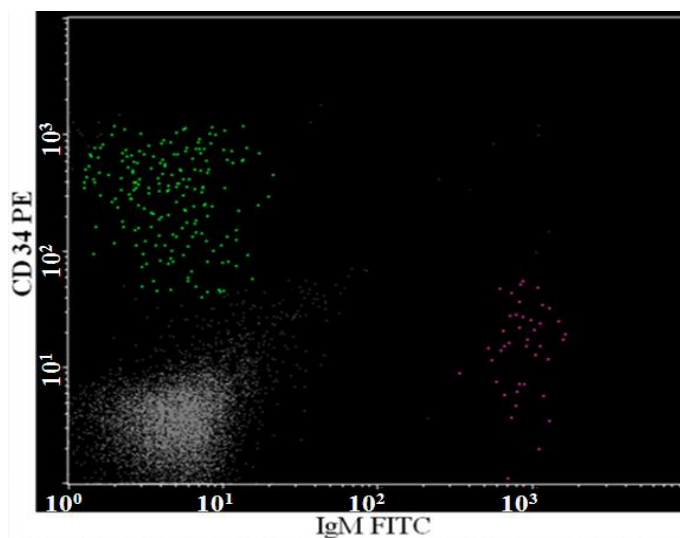
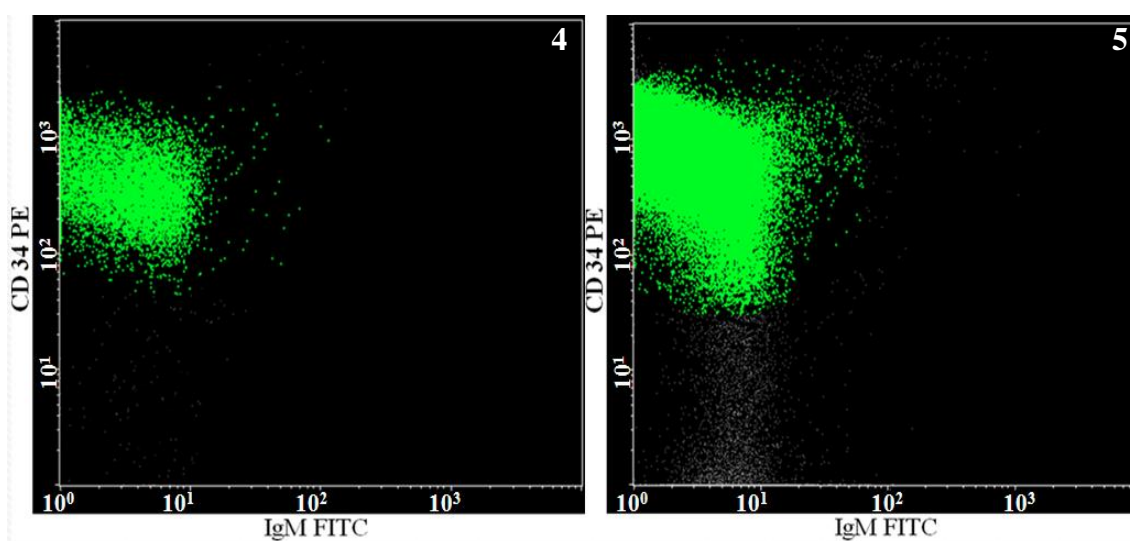


Figura 3 – Perfil de maturação das células da MO apresentado por todas as amostras dos indivíduos saudáveis

Legenda: FITC (isotiocianato de fluoresceína). PE (ficoeritrina). Cor verde (HGs imaturas), cinza (HGs intermediárias) e rosa (HGs maduras)



Figuras 4 e 5 – Perfil de maturação de células da MO de portadores de LLA-B

Legenda: FITC (isotiocianato de fluoresceína). PE (ficoeritrina). Cor verde (CD34+/IgM-), cinza (CD34-/IgM-)

Todas as amostras de MO dos 6 indivíduos saudáveis (100%) apresentaram um padrão de expressão das HGs com regiões positivas para o antígeno CD34 (alta intensidade) ausentes de expressão de IgM, resultado característico de HGs imaturas, seguido, por uma população com negatividade para os antígenos CD34 e IgM, que condiz com o padrão de células intermediárias. Entre esses 6 indivíduos sadios, 4 apresentaram além das HGs imaturas e intermediárias, células precursoras linfoides mais maduras caracterizadas pela ausente expressão de CD34 com IgM positiva (Figura 3).

Um estudo imunofenotípico por CF realizado por Seegmiller et al (2009), em amostras de MO e SP de crianças e adultos antes do tratamento, exibiu um espectro maturacional bem definido de expressão dos antígenos CD34 e IgM à medida que as células amadureceram. As hematogônias imaturas, expressaram somente o antígeno CD34, as intermediárias perderam a positividade do CD34 com ausência de expressão do IgM, e nas HGs maduras, foram detectados níveis de expressão do IgM aumentando gradualmente na superfície celular.

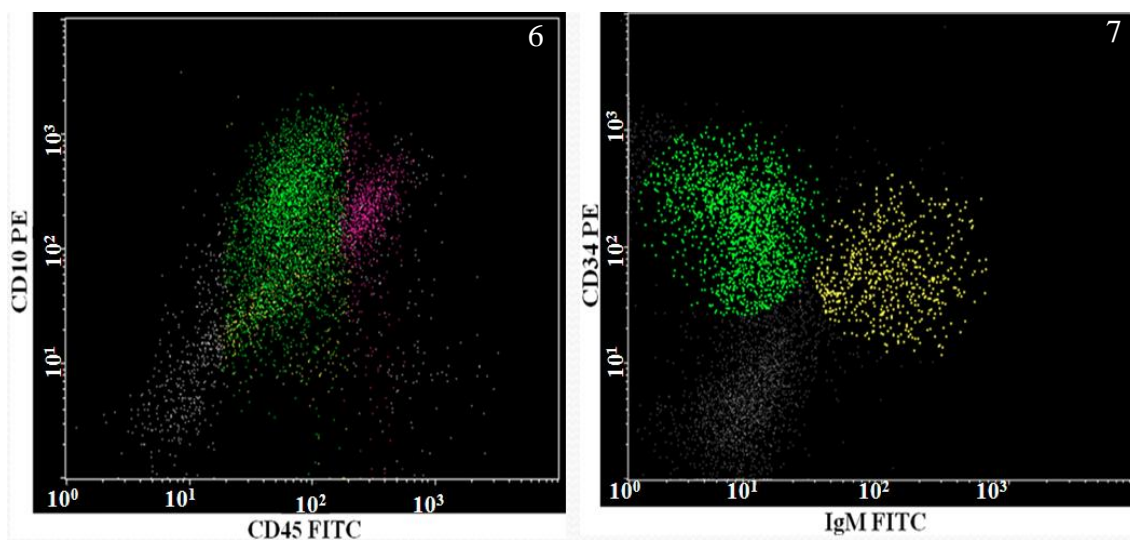
Sevilla et al (2009) caracterizaram as fases de maturação das HGs através da análise por CF de 25 aspirados de MO de pacientes não portadores de LLA-B. Estes, classificaram essas células jovens em estágios: o primeiro foi representado por uma pequena população de HGs mais imaturas com positividade para CD34, baixa expressão de CD19 e alta intensidade de CD10. O estágio intermediário foi formado por uma grande proporção de células progenitoras, caracterizadas pela queda de CD34, CD19 de alta intensidade com expressão de CD10 diminuindo gradualmente e IgM de superfície negativo ou positivo. A última fase, caracterizada pela presença de células B maduras, apresentaram CD19 de alta intensidade, com ausência de expressão do antígeno CD10 e positividade para IgM de superfície.

Seegmiller et al (2009) e Sevilla et al (2009) evidenciam em seus estudos o perfil heterogêneo e altamente reprodutível das HGs. Na pesquisa realizada no HUSM, esse padrão foi observado diante da associação de marcadores para detecção de mIgM FITC / CD34 PE / CD19 PerCP.

Entre as 11 crianças e adolescentes portadores de LLA-B, 7 pacientes foram analisados através do uso de marcadores para detecção de IgM e CD34, sendo que nos outros 4 casos não foi possível realizar essa pesquisa. Todas as amostras analisadas, expressaram o antígeno CD34 de alta intensidade com IgM negativo (Figura 4). Estes resultados reforçaram o perfil imaturo dos linfoblastos B e condizem com resultados da literatura (JORGE et al., 2006; MATOS; JORGE; QUEIROZ, 2007; NORONHA et al., 2011).

Neste estudo, dos 7 portadores de LLA-B analisados pela associação IgM x CD34, apenas 2 pacientes apresentaram além do perfil imaturo (CD34+/IgM-) observado na figura 4, uma segunda fase de maturação com negatividade para os antígenos CD34 e IgM, conforme a figura 5. Apesar do caráter imaturo dessa neoplasia, nesses 2 pacientes esta se manifestou sem a expressão positiva do antígeno mais frequente em células blásticas, o CD34. Jorge et al (2006) evidenciaram este padrão em alguns pacientes de LLA-B, os quais não mostraram expressão do antígeno de imaturidade CD34 ou este apresentou positividade em raras células.

Durante a pesquisa, foi analisado o perfil de um indivíduo que não participou do estudo inicialmente. Este era um paciente pediátrico de LLA-B em tratamento quimioterápico, o qual foi acometido por uma recidiva testicular sem envolvimento medular inicial. A reatividade diante da associação de marcadores para os antígenos CD45 FITC / CD 10 PE / CD19 PerCP e mIgM FITC / CD34 PE / CD19 PerCP foi representada através das figuras 6 e 7.



Figuras 6 e 7 – Perfil de maturação das células da MO de um indivíduo portador de LLA-B em tratamento quimioterápico com recidiva testicular sem envolvimento medular

Legenda: FITC (isotiocianato de fluoresceína). PE (ficoeritrina). Figura 6 – cor verde (HGs imaturas) e rosa (HGs intermediárias). Figura 7 – cor verde (células imaturas), cinza (células intermediárias) e amarelo (população anômala)

Através da expressão dos antígenos CD45 e CD10 nas células B, essa criança portadora de LLA-B com recidiva testicular apresentou duas populações representadas por

HGs imaturas (CD45 baixo / CD10 alto) e intermediárias (CD45 e CD10 de intensidade intermediária), conforme a figura 6. No gráfico IgM x CD34 (Figura 7), foi observada a presença de células imaturas (CD34+ / IgM-), intermediárias (CD34- / IgM-) e uma população anômala (CD34+ / IgM+).

A imunofenotipagem da amostra de MO realizada com cinco anticorpos monoclonais nesse paciente com recidiva mostrou ser eficiente na discriminação entre as células precursoras linfoides, contribuindo no prognóstico laboratorial. Posteriormente, essa criança apresentou infiltração de células blásticas na MO.

#### 4.1 Perfil dos pacientes de LLA-B estudados

O HUSM é considerado um centro de referência para tratamento oncológico na região. A maioria dos pacientes portadores de LLA-B era proveniente de Santa Maria e cidades próximas, como Santa Cruz do Sul e São Gabriel, conforme a figura 8.



Figura 8 – Cidades de procedência dos pacientes pediátricos portadores de LLA-B

Neste estudo, todos os pacientes de LLA-B avaliados eram de raça branca, com predomínio do sexo feminino em 64% dos casos. A faixa etária dos pacientes leucêmicos variou de 2 a 16 anos, com uma média de idade ao diagnóstico de 7,4 anos, sendo que 8 crianças (73%) eram menores de 10 anos.

O predomínio do sexo feminino foi observado em um estudo realizado por Ibagy et al (2013) com lactentes portadores de LLA, na proporção de 1,7 meninas para cada menino, sendo que todos os pacientes eram de etnia branca. Esses resultados em evidência na literatura foram observados entre os pacientes pediátricos de LLA de células B atendidos no Serviço de Hematologia e Oncologia do HUSM.

Cabral et al (2012) observaram um predomínio do sexo masculino (78%) entre portadores de LLA menores de 15 anos na região de uma refinaria de petróleo, mostrando uma razão de 3,5 meninos para cada menina. Apesar disso, esses pesquisadores confirmaram a elevada incidência dessa neoplasia em pacientes com idade menor de 10 anos (83,3%).

Uma pesquisa realizada por Stow et al (2010) mostrou um maior número (79,4%) de crianças portadoras de LLA-B da raça branca e 81,5% do total desses indivíduos com neoplasia eram menores de 10 anos. Esses pesquisadores realçaram o predomínio da raça branca e de crianças na maioria dos pacientes de LLA-B sem apresentar variação significativa entre os sexos.

Segundo Gurney et al (1995) e Pui, Robison e Look (2008), o pico de prevalência da LLA em crianças é entre 2 a 5 anos de idade. Entre as crianças com LLA-B atendidas no HUSM, 45,45% (5/11) eram menores de 5 anos. Várias pesquisas comprovam que a LLA é uma neoplasia que acomete, principalmente, crianças e adolescentes (CABRAL et al., 2012; GURNEY et al., 1995; PUI; ROBISON; LOOK, 2008; STOW et al., 2010).

Os dados laboratoriais das 11 crianças e adolescentes portadores de LLA-B avaliados estão representados na tabela 2. Nestes, foram observadas alterações hematológicas significativas na contagem de leucócitos e plaquetas e na dosagem de hemoglobina e ácido úrico.

Tabela 2 – Dados laboratoriais de pacientes pediátricos ao diagnóstico de LLA-B em amostras de SP

Paciente	Idade	Sexo	Hb	Leucócitos	Linfócitos	Blastos	Plaq	Ác.úrico
1	4	F	6,5	32400	43	55	94	0,9
2	16	F	6,2	1600	68	12	37	4,5
3	13	F	8,9	2700	58	18	57	NR
4	9	F	6,5	1300	86	00	24	2,1
5	6	F	3,8	2800	90	00	400	2,9
6	8	F	12,2	26200	28	50	68	3,3
7	13	F	9,7	38300	13	79	167	7,5
8	3	M	2,9	5500	94	00	58	9,6
9	2	M	4,7	8000	32	62	50	2,8
10	3	M	7,6	3300	76	4	18	4,9
11	4	M	4,4	9500	39	57	31	3,9

Legenda: Idade (anos), Hb (hemoglobina: g / dL), contagem leucocitária /  $\text{mm}^3$ , percentual de linfócitos e blastos, Plaq (plaquetas  $\times 10^3/\text{mm}^3$ ), Ác. úrico (ácido úrico: mg / dL), NR (não realizado).

Em relação aos exames laboratoriais, foi evidenciado que a dosagem de ácido úrico dos pacientes 7 e 8 apresentou valores elevados, considerando os valores normais para mulheres entre 2,4 a 5,7mg / dL e para homens entre 3,4 a 7,0mg / dL. O ácido úrico surge como resultado da quebra contínua de uma proteína presente em vários alimentos, a purina, através da enzima xantina oxidase. Após serem utilizadas, as purinas são degradadas e transformadas em ácido úrico. A constante renovação no metabolismo do urato permite que quantidades constantes de ácido úrico sejam formadas e excretadas (MOTTA, 2009).

O acúmulo de urato pode ocorrer devido ao aumento da sua síntese, a defeitos em sua eliminação ou à combinação desses dois mecanismos, como no caso da intensa destruição dos ácidos nucleicos devido à elevada renovação dos leucócitos (leucocitose) ou destruição dessas células. A intensa leucocitose promove a elevação das dosagens de ácido úrico, provavelmente, devido a maior degradação dos leucócitos (FAILACE, 2009; MOTTA, 2009).



A paciente 7 apresentou nos resultados hematológicos uma hiperuricemia de 7,5 mg / dL juntamente com leucocitose, pois essa adolescente apresentou 38300 leucócitos / mm<sup>3</sup> no SP ao diagnóstico. Provavelmente, o aumento do ácido úrico nessa paciente ocorreu devido à intensa destruição dos ácidos nucleicos promovida pelo número elevado de leucócitos. Porém, apesar do paciente 8 apresentar hiperuricemia de 9,6 mg / dL, a contagem leucocitária ao diagnóstico apresentou valores normais.

Devido às alterações hematológicas significativas na dosagem de hemoglobina e no número de leucócitos e plaquetas das crianças e adolescentes portadores de leucemia no momento do diagnóstico, estes dados laboratoriais foram representados na tabela 3 para melhor avaliação.

Tabela 3 – Variação no número de leucócitos e plaquetas, e na dosagem de hemoglobina em amostras de SP de pacientes com LLA-B ao diagnóstico

Alterações hematológicas	Nº	%
Leucócitos <3600	5	45,45
Leucócitos >3600 e < 11000	3	27,3
Leucócitos >11000	3	27,3
Plaquetas ≤50	5	45,45
Plaquetas >50 e <100	4	36,4
Plaquetas >100	2	18,2
Hemoglobina <7	7	64
Hemoglobina >7 e <11	3	27,3
Hemoglobina >11	1	9,1

Legenda: Nº (número de casos), % (percentual), contagem leucocitária (leucócitos / mm<sup>3</sup>), plaquetas (10<sup>3</sup> / mm<sup>3</sup>) e hemoglobina (g / dL).

A contagem leucocitária até 14000 / mm<sup>3</sup> pode ser considerada como valor de referência normal para crianças com menos de 10 anos. Acima desta faixa etária, os limites de referência situam-se até 12000 / mm<sup>3</sup>. Chen et al (2010) e Failace (2009) relataram que quanto mais elevado o valor da leucometria inicial, maiores serão os riscos de um efeito adverso durante o tratamento do paciente, promovendo um pior prognóstico. Tendo em vista

esses riscos evidenciados na literatura, foram observados em 3 pacientes pediátricos de LLA-B (27,3%) deste estudo, uma intensa leucocitose.

A leucopenia pode ser observada quando ocorre uma contagem reduzida de leucócitos, com valores abaixo de  $4000 / \text{mm}^3$  em crianças menores de 10 anos. Acima desta faixa etária, considera-se leucopênico, os indivíduos com valores abaixo de  $3600 / \text{mm}^3$ .

Em pacientes de LLA, a contagem leucocitária pode estar elevada, normal ou reduzida. Esta pesquisa apresentou 5 casos (45,45%) de pacientes leucêmicos com leucopenia, sendo que este percentual não é considerado comum; pois, geralmente, esta baixa contagem leucocitária se manifesta em até 30% dos pacientes de LLA (CHEN et al., 2010; FAILACE, 2009).

Contagem plaquetária reduzida foi observada em 9 (82%) dos casos. Os valores de referência normais de plaquetas em pacientes pediátricos são iguais aos dos adultos, sendo que uma contagem menor que  $150 \times 10^3$  plaquetas /  $\text{mm}^3$  pode favorecer o surgimento de petéquias, equimoses e manchas hemorrágicas pelo corpo (FAILACE, 2009; NORONHA et al., 2011).

Entre os 11 pacientes portadores de LLA-B deste estudo, 10 (91%) apresentaram dosagem de hemoglobina reduzida. Valores deste parâmetro abaixo de  $12 \text{g} / \text{dL}$  é indicativo de anemia em crianças de 6 a 12 anos e adolescentes; porém, em crianças de 6 meses a 6 anos, a dosagem de Hb menor de  $11 \text{g} / \text{dL}$  é um sinal dessa patologia.

Entre os sintomas de uma anemia comum estão a fadiga, palidez, tonturas, anorexia e alterações tróficas da pele e anexos cutâneos (FAILACE, 2009; LORENZI et al., 2003). Neste estudo, foi realizada uma correlação entre os dados clínicos e laboratoriais das crianças e adolescentes no momento do diagnóstico da LLA-B e os sinais e sintomas que predominam nessa patologia.

Entre os 11 pacientes diagnosticados com leucemia, foi possível observar a presença de sinais e sintomas em 10 portadores de LLA-B, sendo que um paciente não apresentou dados suficientes no prontuário, impossibilitando essa análise. Entre os 11 pacientes de LLA-B deste estudo, a presença de palidez predominou em 82% dos casos, com presença de astenia em 36,4% destes indivíduos, conforme apresentado na tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização dos pacientes pediátricos de LLA-B quanto à presença de sinais e sintomas ao diagnóstico

Sinais e sintomas	Nº	%
Assintomático	1	9,1
Palidez	9	82
Astenia	4	36,4
Febre	6	54,5
Dor nas articulações	1	9,1
Petéquias e / ou equimoses	7	64
Sangramento das mucosas	1	9,1
Linfonomegalia	4	36,4
Hepatomegalia	4	36,4
Esplenomegalia	3	27,3
Sem dados	1	9,1

Legenda: Nº (número de casos) e % (percentual).

Os resultados laboratoriais confirmaram a presença de plaquetopenia em 82% dos portadores de LLA-B, comprovando os sinais encontrados no momento do diagnóstico em 64% dos casos, representados pelo surgimento de petéquias e equimoses na pele. Em uma pesquisa realizada por Noronha et al (2011) foi observado que todos os subtipos de LLA apresentaram trombocitopenia, com uma média menor que  $50 \times 10^3$  plaquetas /  $\text{mm}^3$ .

Quanto às evidências clínicas deste estudo ao diagnóstico, a maioria dos pacientes de LLA-B apresentaram sinais e sintomas característicos dessa neoplasia, como: palidez, petéquias ou equimoses, febre e astenia. Em alguns casos, foi observado o aumento dos linfonodos, fígado e baço. Esses resultados foram evidenciados na literatura pelos pesquisadores Conter et al (2004), Hamerschlak (2008) e Oliver et al (2013) que relataram sinais de febre, sangramento, cansaço e palidez em pacientes de LLA.

O mais comum é a febre ter origem da própria leucemia, não necessitando de nenhum outro fator, como a presença de infecções, para desencadear esse quadro. O paciente portador de LLA pode apresentar um estado febril elevado com a presença de calafrios. Progressivos danos à MO promovem o surgimento de anemia, hemorragias e suscetibilidade a invasões por

agentes infecciosos que podem se prolongar por dias a meses (CONTER et al., 2004; HAMERSCHLAK, 2008).

Durante o período deste estudo, ocorreu um único óbito entre os portadores de leucemia, os outros pacientes (91%) continuavam em tratamento. Esse adolescente, portador de Síndrome de Down, faleceu devido ao choque séptico provocado por uma pneumonia.

Definida como uma alteração genética, a SD é conhecida na literatura por apresentar neste portador uma maior predisposição ao desenvolvimento de leucemia com mais complicações e menor sobrevida quando comparado com um indivíduo saudável (MONTENEGRO; CAMPBELL; RODRIGUEZ, 2012; NAUMBURG, 2002; ZEN et al., 2009). O portador de SD apresenta cópias adicionais do cromossomo 21, o qual pode ser associado com a leucemogênese; porém, esse mecanismo ainda não foi esclarecido (IZRAELI et al., 2007; ZEN et al., 2009).

Montenegro, Campbell e Rodrigues (2012) realizaram um estudo com crianças portadoras de SD com diagnóstico de LLA. De um total de 42 pacientes, foram à óbito por infecção 26,2% (11 / 42), sendo 73% (8 / 11) devido à septicemia e 18,2% (2 / 11) à pneumonia. A menor sobrevida entre esse grupo ocorreu devido a infecções.

Ibagy et al (2013) observaram que a infecção séptica foi a principal causa de morte em pacientes de LLA (41% dos óbitos), provavelmente, devido ao longo período de neutropenia gerado pelo tratamento quimioterápico. Chen et al (2010) relataram que, aproximadamente, 80% das mortes de pacientes lactentes de LA ocorreram durante a terapia devido a infecções.

Neste estudo, uma criança portadora dessa neoplasia apresentou um quadro assintomático, sendo que este estado oculta uma suposta leucemia, prejudicando e atrasando o início do tratamento. Esta característica esteve presente em um estudo realizado por Conter et al (2004). Estes relataram um quadro clínico assintomático nos pacientes ao diagnóstico de LLA ou a presença de sintomas característicos de fase aguda como hemorragia fatal, infecções, anemia severa, problemas respiratórios e febre.

Pacientes pediátricos de LLA também podem apresentar dor nos ossos e nas articulações, dor de cabeça, vômitos, oligúria e anúria, aumento do fígado ou do baço e linfadenopatia, geralmente, indolor podendo ser local ou generalizada (CONTER et al., 2004; HAMERSCHLAK, 2008). Oliver et al (2013) relataram a presença de dores articulares ou ósseas em até 30% das crianças, adolescentes e adultos jovens portadores dessa neoplasia. Estes achados, juntamente com a citopenia, mascaram a suspeita de leucemia.

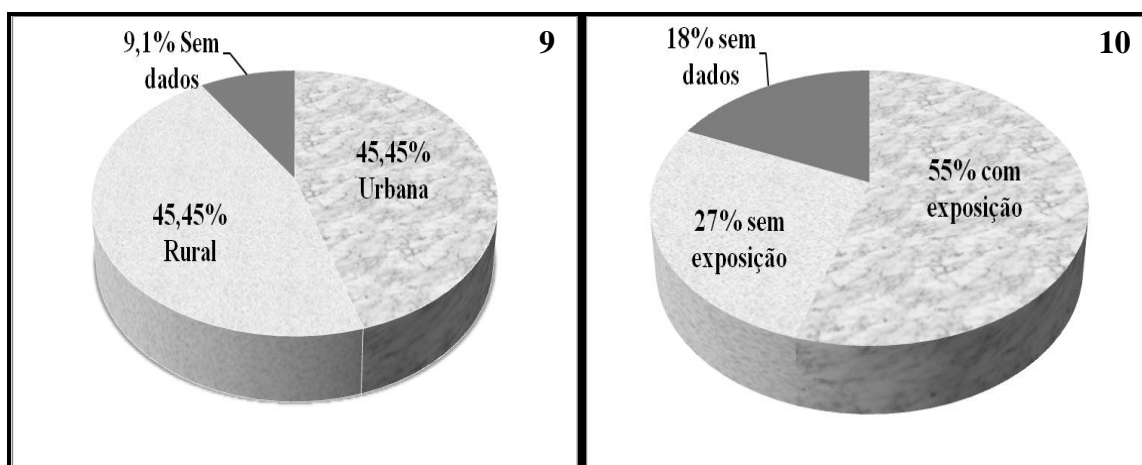
As causas da dor articular em pacientes leucêmicos são numerosas, entre elas: infiltração de blastos no líquido sinovial, inflamação, formação de complexos imunes e

deposição de cristais de ácido úrico (OLIVER et al., 2013; ROBAZZI et al., 2007). Apenas um adolescente portador de LLA-B (9,1%) relatou sentir intensa dor nas articulações inferiores.

Hamerschlak (2008) sugeriu que o aumento de gânglios, a presença de inflamação dos testículos, vômitos e dor de cabeça podem ser indicativos de sinais de envolvimento do sistema nervoso central (SNC). Entre os pacientes portadores de LLA-B deste estudo, um adolescente apresentou esses sintomas característicos ao diagnóstico, relatando a presença de cefaléia lateral, tontura, náusea e dor nos linfonodos. Porém, posteriormente, este paciente não apresentou infiltração de células blásticas no SNC.

#### 4.2 Fatores ambientais como potenciais desencadeantes de LLA-B

Neste estudo foi realizada a distribuição quantitativa quanto à exposição dos pais e dos pacientes de LLA-B aos fatores ambientais potencialmente oncogênicos. A distribuição das crianças e adolescentes portadores de LLA-B aos possíveis fatores de risco estão representadas nas figuras 9 e 10.



Figuras 9 e 10 – Percentual de pacientes de LLA-B que residiram na zona urbana ou rural (Figura 9). Percentual de exposição a substâncias tóxicas ou radiação entre os pais dos portadores de LLA-B (Figura 10)

Metade dos pacientes pediátricos de LLA-B do HUSM residiram na zona rural e a outra metade, na área urbana (Figura 9). Um dos pacientes não apresentou dados suficientes no prontuário.

Segundo Miranda Filho (2012), os grupos populacionais mais expostos a substâncias tóxicas, como agrotóxicos e inseticidas, são os trabalhadores agrícolas e as comunidades rurais. A pesquisa de Kokouva et al (2011) sugeriu uma associação entre leucemia e a atividade agrícola, principalmente pela exposição a pesticidas.

De acordo com a figura 10, os pais ou responsáveis pelos pacientes portadores de LLA-B relataram exposição a fatores ambientais prejudiciais, como produtos tóxicos ou radiação ionizante em 55% dos casos. Porém, as informações obtidas dos prontuários foram insuficientes em 18% dos pacientes.

Os pais dos pacientes de LLA-B deste estudo, relataram constante exposição a alguns tipos de produtos tóxicos ou potencialmente oncogênicos, informados na tabela 5. Em 27,3% (3 / 11) dos casos, os pais relataram ausência de contato ou exposição às substâncias tóxicas ou afins.

Tabela 5 – Exposição dos pais aos tipos de substâncias tóxicas ou radiação

Contato com a substância	Número de pais	%
Drogas ilícitas	1	9,1
Inseticidas	3	27,3
Agrotóxicos	2	18,2
Produtos tóxicos	1	9,1
Radiação ionizante	1	9,1

Um percentual de 36,4% dos pais (4 / 11) tiveram a sua profissão ligada à zona rural, destes, 27,3% descreveram contato contínuo com agrotóxicos, inseticidas e afins, inclusive, uma mãe descreveu antecedentes de exposição a pesticidas durante o período gestacional. Em 18% dos casos, os prontuários não apresentaram informações sobre a exposição a produtos tóxicos.

Um dos objetivos deste estudo foi gerar hipóteses referentes aos tipos de produtos tóxicos aos quais as crianças e adolescentes portadores de LLA-B foram expostos e que podem ser potencialmente oncogênicos. Outras investigações são necessárias para confirmar essas suspeitas de leucemogênese na infância.

As pesquisadoras Zahm e Ward (1998) sugeriram que as crianças podem ser particularmente mais sensíveis que os adultos aos efeitos carcinogênicos dos agrotóxicos. A exposição dos indivíduos menores de 18 anos aos pesticidas pode ocorrer pela proximidade de moradia a áreas agrícolas. As crianças pequenas podem entrar em contato com tóxicos ao levar objetos contaminados à boca e também, ao se expor a roupas e objetos infectados dos pais, devido à ligação da profissão destes ao uso de produtos tóxicos no meio rural (CURVO; PIGNATI; PIGNATTI, 2013; KOKOUVA et al., 2011).

Curvo, Pignati e Pignatti (2013) relataram que um maior risco no desenvolvimento de leucemia ocorre quando as mães são expostas a substâncias tóxicas durante a gravidez. Pesquisadores observaram que vários fatores podem induzir ao desenvolvimento dessa neoplasia durante esse período fetal, como os hábitos de vida maternos e a atenção obstétrica durante a gestação, parto e puerpério (FERREIRA et al., 2012).

Ibagoien et al (2013) descreveram o contato dos pais com agrotóxicos em 19,51% dos casos em um estudo realizado com lactentes portadores de LLA, sendo que 41,5% dos pacientes não apresentaram dados disponíveis nos prontuários.

Um estudo realizado no interior do estado do Mato Grosso avaliou a morbidade e a mortalidade por câncer em pacientes na faixa etária de 0 a 19 anos, relacionando estes com o uso agrícola de agrotóxicos. Os pesquisadores relataram a incidência de 30,48% (214 casos) de leucemias nos pacientes menores de 20 anos, sendo essa neoplasia a responsável pelo maior número de casos de óbito (31,94%) nesta população (CURVO; PIGNATI; PIGNATTI, 2013).

## 5 CONCLUSÕES

A imunofenotipagem permitiu uma melhor caracterização das HGs entre os pacientes do grupo controle sadio, apresentando um padrão maturacional progressivo dentro da mesma população celular, com células imaturas, intermediárias e maduras. Os linfoblastos B exibiram um espectro maturacional incompleto representado por única população com características de imaturidade. Os pacientes de LLA-B não apresentaram células precursoras linfoides normais.

Este estudo visou a inclusão deste painel de anticorpos monoclonais com cinco reativos na rotina laboratorial. Este, somado à revisão morfológica e à imunofenotipagem inicial da amostra biológica do paciente de LLA-B ao diagnóstico, garantiu uma eficiente discriminação entre as subpopulações de progenitores linfoides B, contribuindo para uma avaliação laboratorial mais precisa. Desta forma, o prognóstico não conterà dúvidas quanto à origem normal ou maligna das células precursoras.

Os sintomas frequentemente apresentados por estes pacientes condizem com os dados laboratoriais ao diagnóstico. A palidez e astenia observadas foram relacionadas com a dosagem de hemoglobina reduzida e a presença de equimoses ou petéquias com a plaquetopenia.

Nesta pesquisa, a mesma proporção de pacientes de LLA-B residia nas zonas rural e urbana (45,45%). Se por um lado os pacientes que moram no campo apresentaram características que possam justificar a etiologia da LLA, como a ligação profissional dos pais ao contato com agrotóxicos e inseticidas, por outro, a população residente na área urbana exibiu uma maior dificuldade de associação a algum fator ambiental prejudicial.

A interpretação dos dados clínicos e laboratoriais de cada paciente leucêmico ao diagnóstico deve compreender o histórico dos antecedentes da doença neste indivíduo, incluindo informações ligadas aos pais sobre os fatores ambientais aos quais sofreram exposições. Essas medidas são necessárias e possuem a finalidade de descobrir agentes potencialmente oncogênicos, com o objetivo de reduzir ou proibir o uso ou contato intencional com essas substâncias tóxicas para a prevenção dessa neoplasia.

Devido ao número de pacientes portadores de LLA-B neste estudo, pesquisas adicionais são sugeridas para correlacionar as características clínicas e laboratoriais que predominam nas crianças e adolescentes desta região.



## REFERÊNCIAS

AGARWAL, K. et al. Increased hematogones in an infant with bicytopenia and leucocytosis: a case report. **Cases Journal**, v. 3, n. 75, p. 1-4, Mar. 2010.

BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 1, p. 138-145, Jan. 2007.

BENDER, J. G. et al. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. **Journal of the American Society of Hematology**, v. 77, n. 12, p. 2591-2596, June 1991.

BÉNÉ, M. C. et al. Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias. **The Hematology Journal**, v. 84, n. 11, p. 1024-1034, Nov. 1999.

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukemias: French-American-British Cooperative Group. **British Journal of Haematology**, v. 33, p. 451-458, 1976.

BRADY, K. A.; ATWATER, S. K.; LOWELL, C. A. Flow cytometric detection of CD10 (cALLA) on peripheral blood B lymphocytes of neonates. **British Journal of Haematology**, v. 107, p. 712-715, 1999.

BRASIL. Decreto n. 4.074 de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei n. 7.802 de 11 de julho de 1989. **Presidência da República, Casa Civil, Subchefia para assuntos jurídicos**. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/2002/d4074.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm)>. Acesso em: 19 nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2012. Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2011.

CABRAL, S. N. S. et al. Linha de base da leucemia linfocítica aguda para a vigilância da saúde ambiental no território de abrangência da refinaria de petróleo do Estado de Pernambuco, Brasil, 2004 a 2008. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 4, p. 601-608, out./dez. 2012.

CAMPANA, D.; PUI, C. H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodological advances and clinical significance. **Journal of the American Society of Hematology**, v. 85, n. 6, p. 1416-1434, Mar. 1995.

CAZARIN, G.; AUGUSTO, L. G. S.; MELO, R. A. M. Doenças hematológicas e situações de risco ambiental: a importância do registro para a vigilância epidemiológica. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 10, n. 3, p. 380-390, 2007.

CHANTEPIE, S. P. et al. Hematogones: a new prognostic factor for acute myeloblastic leukemia. **Journal of the American Society of Hematology**, v. 117, n. 4, p. 1315-1318, 2011.

CHEN, S. H. et al. Clinical features, molecular diagnosis and treatment outcome of infants with leukemia in Taiwan. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 55, p. 1264-1271, 2010.

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

CONTER, V. et al. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Orphanet Encyclopedia**, Monza, Dec. 2004. Disponível em: <<http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-ALL.pdf>>. Acesso em: 16 Oct. 2013.

CRAIG, F. E.; FOON, K. A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Journal of the American Society of Hematology**, v. 111, n. 8, p. 3941-3967, Apr. 2008.

CURVO, H. R. M.; PIGNATI, W. A.; PIGNATTI, M. G. Morbimortalidade por câncer infantojuvenil associada ao uso agrícola de agrotóxicos no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Cadernos Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 10-17, 2013.

DELBUONO, E. et al. Detecção de doença residual mínima em crianças com leucemia linfoblástica aguda por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 4, p. 281-286, 2008.

DEL VECCHIO, L. et al. Recommended reporting format for flow cytometry diagnosis of acute leukemia. **The Hematology Journal**, v. 89, n. 5, p. 594-598, May 2004.

ECKER, C. S. et al. Leucemia linfóide aguda: a importância do laboratório de líquido para o sucesso do tratamento. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 41, n. 3, p. 201-203, 2009.

ELMAN, I.; SILVA, M. E. M. P. Crianças portadoras de leucemia linfóide aguda: análise dos limiares de detecção dos gostos básicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 297-303, 2007.

FAILACE, R. R. **Hemograma**: manual de interpretação. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 424 p.

FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfoides agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 2, p. 91-98, abr. 2004.

FERREIRA, J. D. et al. Exposições ambientais e leucemias na infância no Brasil: uma análise exploratória de sua associação. **Revista Brasileira de Estudos de População**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 2, p. 477-492, jul./dez. 2012.

FRANCÉS, M. A. P. El linfoblasto en la leucemia linfoblástica aguda: morfología y citoquímica. **The Hematology Journal**, v. 87, n. 1, Oct. 2002.

FOON, K. A.; TODD, R. F. 3°. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. **Journal of the American Society of Hematology**, v. 68, n. 1, p. 1-31, July 1986.

FUDA, F. S.; KARANDIKAR, N. J.; CHEN, W. Significant CD5 expression on normal stage 3 hematogones and mature B lymphocytes in bone marrow. **American Journal Clinical Pathology**, v. 132, p. 733-737, 2009.

GINER, F. J. O.; ORFAO, A. Aplicación de la citometría de flujo al diagnóstico y seguimiento inmunofenotípico de las leucemias agudas. **Medicina Clínica**, Barcelona, v. 118, n. 11, p. 423-436, 2002.

GURNEY, J. G. et al. Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. **Cancer**, v. 75, n. 8, p. 2186-2195, Apr. 1995.

HAMERSCHLAK, N. Leucemia: fatores prognósticos e genética. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 4, supl. 52-57, 2008.

HASSANEIN, N. M. et al. Distinct expression patterns of CD123 and CD34 on normal bone marrow B-cell precursors (“hematogones”) and B lymphoblastic leukemia blasts. **American Journal Clinical Pathology**, v. 132, p. 573-580, 2009.

HAYCOCKS, N. G. et al. Optimizing antibody panels for efficient and cost-effective flow cytometric diagnosis of acute leukemia. **Cytometry – Part B – Clinical Cytometry**, 80 B, p. 221-229, 2011.

HURFORD, M. et al. Unique pattern of nuclear TdT immunofluorescence distinguishes normal precursor B cells (Hematogones) from lymphoblasts of precursor B-lymphoblastic leukemia. **American Journal Clinical Pathology**, v. 129, p. 700-705, 2008.

IBAGY, A. et al. Leucemia linfoblástica aguda em lactentes: 20 anos de experiência. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 1, p. 64-69, 2013.

INTERMESOLI, T. et al. Abnormally expanded pro-B hematogones associated with congenital cytomegalovirus infection. **American Journal of Hematology**, v. 82, p. 934–936, July 2007.

IZRAELI, S. et al. Trisomy of chromosome 21 in leukemogenesis. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 39, n. 2, p. 156-159, 2007.

JOBIM, M.; JOBIM, L. F. J. Células *natural killer* e vigilância imunológica. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 4, p. 58-67, 2008.

JORGE, F. M. G. et al. Hematogônias: Distinção com blastos da leucemia linfóide aguda de células B por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 4, p. 258-263, 2006.

KEE, B. L. A comprehensive transcriptional landscape of human hematopoiesis. **Cell Stem Cell**, v. 8, p. 122-124, Feb. 2011.

KERSEY, J. H. Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. **Journal of the American Society of Hematology**, v. 90, p. 4243-4251, 1997.

KOEHN, T. A. et al. Increasing the clinical efficacy of NK and antibody-mediated cancer immunotherapy: potential predictors of successful clinical outcome based on observations in high-risk neuroblastoma. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, n. 91, p. 1-10, May 2012.

KOKOUVA, M. et al. Pesticide exposure and lymphohaematopoietic cancers: a case-control study in an agricultural region (Larissa, Thessaly, Greece). **BioMed Central Public Health**, v. 11, n. 5, p. 4-9, 2011.

KROFT, S. H. et al. Haematogones in the peripheral blood of adults: a four-colour flow cytometry study of 102 patients. **British Journal of Haematology**, v. 126, p. 209–212, 2004.

LAKS, D. et al. Avaliação da sobrevida de crianças com leucemia linfocítica aguda tratadas com o protocolo Berlim-Frankfurt-Munique. **Jornal de Pediatria**, v. 79, n. 2, 2003.

LEBIEN, T. W. Fates of human B-cell precursors. **Journal of the American Society of Hematology**, v. 96, n. 1, p. 9-23, July 2000.

LOKEN, M. R. et al. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II Normal B lymphoid development. **Journal of the American Society of Hematology**, v. 70, p. 1316-1324, 1987.

LONGACRE, T. A. et al. Hematogones: A multiparameter analysis of bone marrow precursor cells. **Journal of the American Society of Hematology**, v. 73, n. 20, p. 543-552, 1989.

LORENZI, T. F. et al. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 655 p.

LUCIO, P. et al. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. **Leukemia**, v. 13, p. 419-427, 1999.

LUCIO, P. et al. Flow cytometric analysis of normal and leukemic bone marrow B-cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor B-ALL patients. **Leukemia**, v. 15, p. 1185-1192, 2001.

MAFTOUN-BANANKHAH, S. et al. Multiparameter flow cytometric analysis reveals low percentage of bone marrow hematogones in myelodysplastic syndromes. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 129, p. 300-308, 2008.

MATOS, J. C.; JORGE, F. M. G.; QUEIROZ, J. A. N. Análise comparativa da intensidade de fluorescência de CD10 e de CD19 em blastos leucêmicos e hematogônias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 114-118, 2007.

MCGINNIS, K.; LETARTE, M.; PAIGE, C. J. B-lineage colonies from normal, human bone marrow are initiated by B cells and their progenitors. **Journal of the American Society of Hematology**, v. 77, n. 5, p. 961-970, Mar. 1991.

MCKENNA, D. H. et al. Increased lymphoblast-like cells following umbilical cord blood stem cell transplantation do not predict recurrent acute leukemia. **Leukemia**, v. 16, p. 2171-2172, 2002.

MCKENNA, R. W. et al. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. **Journal of the American Society of Hematology**, v. 98, n. 8, p. 2498-2507, 2001.

METCALF, D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? **Journal of the American Society of Hematology**, v. 82, n. 12, p. 3515-3523, Dec. 1993.

MIRANDA FILHO, A. L. **Mortalidade por neoplasias potencialmente associadas à atividade agrícola no estado do Rio de Janeiro**. 2012. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Saúde Pública e Meio Ambiente)–Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2012.

MONTENEGRO, B. R.; CAMPBELL, M. B.; RODRIGUEZ, N. Z. Leucemia linfoblástica aguda em pacientes portadores de síndrome de Down. **Revista Chilena de Pediatría**, v. 83, n. 1, p. 58-67, enero/feb. 2012.

MORENO-MADRID, F. et al. The presence of precursors of benign pre-B lymphoblasts (hematogones) in the bone marrow of a paediatric patient with cytomegalovirus infection. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 2, p. 437-439, 2008.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2009. 400 p.

MUZZAFAR, T. et al. Aberrant underexpression of CD81 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. Utility in detection of minimal residual disease by flow cytometry. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 132, p. 692-698, 2009.

NADLER, K. S. J. et al. B cell origin of non T cell acute lymphoblastic leukaemia. A model for discrete stages of neoplastic and normal pre-B cell differentiation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 74, p. 332-340, 1984.

NAOUM, P. C. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 23, n. 2, p. 15-23, 2001.

NAUMBURG, E. **Perinatal risk factors for childhood leukemia**. 2002. 44 f. Tese (Doutorado em Medicina Pediátrica) – Universidade de Uppsala, Uppsala, 2002.

NORONHA, E. P. et al. Immunophenotypic characterization of acute leukemia at a public oncology reference center in Maranhão, northeastern Brazil. **São Paulo Medical Journal**, v. 129, n. 6, p. 392-401, 2011.

NOVOA, V. et al. Inmunofenotipos aberrantes en leucemias agudas en una población hospitalaria de Buenos Aires. **Medicina**, Buenos Aires, v. 73, p. 9-16, 2013.

OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. **Journal of the American Society of Hematology**, v. 81, n. 11, p. 2844-2853, June 1993.

OLIVEIRA, B. M. et al. Avaliação da adesão ao tratamento através de questionários: estudo prospectivo de 73 crianças portadoras de leucemia linfoblástica aguda. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 3, p. 245-250, 2005.

OLIVER, C. et al. Manifestaciones articulares como debut de leucemia aguda linfoblástica. Presentación de tres casos. **Revista Médica del Uruguay**, v. 29, n. 2, p. 118-122, 2013.

ONCIU M. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 23, p. 655-674, 2009.

ORFAO, A. et al. Flow cytometry: its applications in hematology. **The Hematology Journal**, v. 80, p. 69-81, 1995.

ORFAO, A. et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 1708-1717, 1999.

PORWIT-MACDONALD, A. et al. BIOMÉD-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). **Leukemia**, v. 14, p. 816-825, 2000.

PUI, C. H.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 371, n. 9617, p. 1030-1043, Mar. 2008.

REGO, E. M. et al. Age-related changes of lymphocyte subsets in normal bone marrow biopsies. **Cytometry. Communications in Clinical Cytometry**, v. 34, p. 22-29, 1998.

RIMSZA, L. M. et al. Benign hematogone-rich lymphoid proliferations can be distinguished from B-lineage acute lymphoblastic leukemia by integration of morphology, immunophenotype, adhesion molecule expression and architectural features. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 114, n. 1, p. 66-75, 2000.

ROBAZZI, T. C. et al. Osteoarticular manifestations as initial presentation of acute leukemias in children and adolescents in Bahia, Brazil. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 29, n. 9, p. 622-626, Sept. 2007.

SEEGMILLER, A. C. et al. Characterization of immunophenotypic aberrancies in 200 cases of B acute lymphoblastic leukemia. **American Journal Clinical Pathology**, v. 132, p. 940-949, 2009.

SEVILLA, D. W. et al. The pattern of cytoplasmic IgM expression in the context of the three currently recognised maturational stages of hematogones. **Leukemia and Lymphoma**, v. 50, n. 4, p. 642-644, Apr. 2009.

SEVILLA, D. W. et al. Hematogones: a review and update. **Leukemia and Lymphoma**, v. 51, n. 1, p. 10-19, Jan. 2010.

SILVA, T. L. et al. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Boletim de biotecnologia**, v. 77, p. 32-40, abr. 2004.

SILVEIRA, N. A.; ARRAES, S. M. A. A. A imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: uma revisão. **Arquivos do Mudi**, v. 12, n. 1, p. 5-14, 2008.

SLATER, M. E. et al. Maternal prenatal cigarette, alcohol, and illicit drug use and risk of infant leukemia: A report from the Children's Oncology Group. **Cancer Causes and Control**, v. 22, n. 8, p. 1197-1204, Aug. 2011.

STEKHOVEN, J. H. S. et al. Morphology and incidence of the "posttherapeutic lymphoid cell" in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. **The American Journal of Pathology**, v. 124, n. 1, p. 46-52, July 1986.

STOCK, W. Adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of the American Society of Hematology**, Education Book, n. 1, p. 21-29, Dec. 2010.

STOW, P. et al. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of the American Society of Hematology**, v. 115, n. 23, p. 4657-4663, June 2010.

SUTTON, L.; VUSIRIKALA, M.; CHEN, W. Hematogone hyperplasia in copper deficiency. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 132, p. 191-199, 2009.



TABERNERO, M. D. et al. Adult precursor B-ALL with BCR/ABL gene rearrangements displays a unique immunophenotype based on the pattern of CD10, CD34, CD13 and CD38 expression. **Leukemia**, v. 15, p. 406-414, 2001.

TSAO, L. et al. Characterizing CD43 expression in haematogones using multicolour flow cytometric analysis. **British Journal of Haematology**, v. 128, p. 820-823, 2005.

VAN LOCHEM, E. G. et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. **Cytometry – Part B – Clinical Cytometry**, 60 B, p. 1-13, 2004.

VAN WERING, E. R. et al. Regenerating normal B-cell precursors during and after treatment of acute lymphoblastic leukaemia: implications for monitoring of minimal residual disease. **British Journal of Haematology**, v. 110, p. 139-146, Mar. 2000.

VASCONCELOS, D. M. Análise de marcadores intracelulares por citometria de fluxo nas leucemias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 105-106, 2007.

VIDRIALES, M. B. et al. Inmunofenotipo del linfoblasto normal y patológico y sus implicaciones en la detección de enfermedad residual mínima en la leucemia aguda linfoblástica (LAL) del adulto. **The Hematology Journal**, v. 87, n. 1, oct. 2002.

VIVIER, E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of Natural Killer cells. **Science**, v. 331, n. 6.013, p. 44-49, Jan. 2011.

WIEMELS, J. L. et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. **The Lancet**, v. 354, p. 1499-1503, Oct. 1999.

WOOD, B. L. et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. **Cytometry – Part B – Clinical Cytometry**, 72 B, p. 14-22, 2007.

ZAHM, S. H.; WARD, M. H. Pesticides and childhood cancer. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 3, p. 893-908, June 1998.

ZEN, P. R. G. et al. Evolução clínica e fusão *TEL/AML1* em pacientes pediátricos com síndrome de Down e leucemia linfoblástica aguda. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 5, p. 321-325, 2009.

ZERBINI, M. C. N. et al. Classificação dos tumores hematopoéticos e linfóides de acordo com a OMS: padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4<sup>a</sup> edição. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 6, p. 643-648, 2011.

## ANEXOS

### Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado(a) para participar como voluntário de uma pesquisa. Este termo lhe trará informações sobre o estudo a ser realizado e caso você queira participar preencha os dados do formulário. O projeto não lhe trará custos financeiros, não haverá recompensa pela sua participação e não ocorrerá penalidade caso você não aceite participar da pesquisa. Uma via deste termo é sua e a outra do pesquisador responsável.

Título do projeto: **DISTINÇÃO ENTRE HEMATOGÔNIAS E BLASTOS EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA DE CÉLULAS B**

Pesquisador responsável: Aline Bicca Wohlfahrt.

Universidade Federal de Santa Maria - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Telefone para contato (inclusive a cobrar): 55 99341591

Pesquisadores participantes: Liliane Zimmermann de Oliveira, Thereza Christina Sampaio Lafayette. Telefone para contato: 55 32208542

A pesquisa busca informações sobre os aspectos laboratoriais dos pacientes portadores de leucemia linfocítica aguda de células B. Os seus dados serão avaliados a partir dos prontuários médicos do arquivo do HUSM e de exames laboratoriais em amostra biológica excedente (medula óssea ou sangue periférico) para confirmar a distinção entre células normais (hematogônias) e malignas (blastos). A amostra biológica será analisada por profissionais capacitados através das técnicas de citometria de fluxo e citomorfologia. As amostras a serem avaliadas pertencem à rotina de coletas para diagnóstico e acompanhamento do tratamento das Leucemias Linfocíticas Agudas no serviço de Hematologia e Oncologia do HUSM. O tempo previsto para a sua participação na pesquisa restringe-se ao período de preparo e análise da amostra.

Caso seja constatada alguma alteração em seu exame, você será informado e terá o acompanhamento necessário junto aos profissionais responsáveis pela pesquisa para o esclarecimento de eventuais dúvidas. Você tem o direito de não participar ou de se retirar do estudo a qualquer momento, sem qualquer punição. Sua identidade e dados pessoais serão mantidos em sigilo, e não serão divulgados sem a sua autorização. Apenas os pesquisadores terão acesso às suas informações pessoais e aos resultados dos exames, os quais serão utilizados em conjunto com os dados de outros pacientes para a avaliação do estudo e publicações científicas.

Declaração de consentimento

Eu,.....(paciente ou responsável), após ler as informações sobre a pesquisa e esclarecer minhas dúvidas, concordo voluntariamente em participar desse estudo por meio da doação de amostra biológica excedente (medula óssea). Discuti com o (a) Dr(a).....sobre a minha decisão em participar nessa pesquisa, ficando claro para mim os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu tratamento neste serviço.

Santa Maria, ..... de ..... de 2013.

Paciente ou responsável: \_\_\_\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato: Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM - Cidade Universitária - Bairro Camobi, Av. Roraima, nº1000 - CEP: 97.105.900 Santa Maria – RS. Telefone: (55)3220-9362 – Fax: (55)3220-8009 Email:comiteeticapesquisa@smail.ufsm.br. Web: www.ufsm.br/cep

**Anexo B - Termo de confidencialidade**

**Título do projeto: DISTINÇÃO ENTRE HEMATOGÔNIAS E BLASTOS EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA DE CÉLULAS B**

Pesquisador responsável: Aline Bicca Wohlfahrt

Universidade Federal de Santa Maria / Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Telefone para contato (inclusive a cobrar): 55 99341591

Pesquisadores participantes:

- Liliane Zimmermann de Oliveira
- Thereza Christina Sampaio Lafayette
- José Edson Paz da Silva

Telefones para contato: 55 32208542

Local da coleta de dados: prontuário dos pacientes arquivados no HUSM.

Os pesquisadores do presente projeto assumem o compromisso de preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados em prontuários e laudos dos exames realizados no Hospital Universitário de Santa Maria; e concordam; igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima e serão mantidas na sala número 1401 do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFSM, prédio 26, por um período de dois anos após o término da pesquisa, sob a responsabilidade do Prof. José Edson Paz da Silva e da pesquisadora responsável: Aline Bicca Wohlfahrt. Após este período, os dados serão destruídos.

Este projeto de pesquisa foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM em 13/03/2012, com o número do CAAE: 01112412.4.0000.5346.

Pesquisador responsável: .....

Santa Maria, .....de .....de 20.....

## **Anexo C – Preparação do corante May-Grunwald-Giemsa**

### Corante de May-Grunwald

Pesar 6g de pó do corante de May-Grunwald e misturar com o álcool metílico puro, quantidade suficiente para 1000mL, até completa dissolução. Deixar em repouso por no mínimo 15 dias, após, filtrar.

### Corante de Giemsa

Pesar 3g de pó do corante Giemsa e misturar com o álcool metílico, quantidade suficiente para 1000mL, até completa dissolução. Deixar em repouso por no mínimo 15 dias, após, filtrar.

Dosar 7,5mL dessa solução inicial e completar o volume com água tamponada destilada, quantidade suficiente para 100mL.

### Água Tamponada

Pesar 1g de fosfato monopotássico e 3g de fosfato dissódico. Adicionar as duas substâncias em um balão volumétrico de 1000mL e completar o volume com água destilada. O pH final da solução deve ser igual a 7.

### Procedimento para corar a lâmina pela técnica de May-Grunwald-Giemsa

- Após fazer o esfregaço, deixar secar.

- Colocar a lâmina com o esfregaço voltado para cima no suporte e cobrir esta com o corante de May-Grunwald. Aguardar 2 minutos. Ocorre a fixação do esfregaço pelo metanol.
- Acrescentar a água destilada tamponada sobre o corante. Assoprar para misturar o corante com a água. Deixar 2 minutos. Inicia-se a coloração.
- Desprezar o corante que está sobre a lâmina.
- Cobrir a lâmina com o Giemsa e esperar 5 minutos.
- Desprezar o corante.
- Lavar em água corrente e retirar o excesso de corante aderido ao verso da lâmina com uma gaze ou algodão.
- Deixar secar em posição vertical.

## Anexo D – Preparação das amostras para imunofenotipagem

### A) Preparo das soluções de tampão fosfato-salino (PBS)

- PBS puro: pH=7,4, conforme a tabela 6.

Tabela 6 – Substâncias e quantidades utilizadas para o preparo do PBS puro

Substância	Quantidade
NaCl	4,0g
KCl	0,1g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,72g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,12g
H <sub>2</sub> O	qsp 500mL

Legenda: qsp (quantidade suficiente para), NaCl (Cloreto de sódio), KCl (Cloreto de potássio), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Hidrogenofosfato dissódico), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (dihidrogenofosfato de potássio), H<sub>2</sub>O (água destilada)

Dissolver os sais em H<sub>2</sub>O destilada, acertar o pH para 7,4 e completar o volume de 500mL. Distribuir a solução em frascos contendo 100mL cada. Podem ser congelados no freezer à -20°C. A validade da solução é de 3 meses. Para uso, armazenar um frasco de 100mL na geladeira à temperatura de 2-8°C.

- Preparo das soluções de PBS azida: pH=7,4, conforme a tabela 7.

Tabela 7 – Substâncias e quantidades utilizadas para o preparo do PBS azida

Substância	Quantidade
NaN <sub>3</sub> 0,02%	0,02 g
Soro albumina bovina 0,02% (pó)	0,02g
EDTA 0,01%	0,01g
Solução Tampão PBS	qsp 100mL

Legenda: qsp (quantidade suficiente para), NaN<sub>3</sub> (azida de sódio), EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)

Para preparar o PBS azida, dissolver os sais no PBS até completar o volume de 100mL. A solução em uso deve ser armazenada na geladeira, temperatura entre 2-8°C, a qual possui uma validade de 3 meses.

#### B) Técnica para marcadores de superfície

- Retirar os tampões fosfato da geladeira, o PBS puro e o PBS azida, deixando em temperatura ambiente antes do uso.
- Identificar os tubos com os anticorpos a serem utilizados.
- Dispensar 50µL de PBS azida em cada tubo (responsável pela eliminação de ligações inespecíficas).
- Calcular a quantidade de amostra a ser pipetada, entre 20 a 200µL, a fim de obter 750000 células por tubo. O número de leucócitos de MO ou SP foram quantificados, previamente, no contador hematológico.
- Pipetar a amostra em cada tubo.
- Adicionar os anticorpos monoclonais na quantidade recomendada pelo fabricante, em torno de 10µL, para a marcação da superfície celular em três tubos: mIgM FITC / CD34 PE / CD19 PerCP, CD45 FITC / CD10 PE / CD19 PerCP e um controle isotópico.
- Homogeneizar no vórtex.
- Incubar durante 15 minutos em temperatura ambiente no escuro.



- Para a lise dos eritrócitos, foi utilizada a técnica de *Lyse / wash* (lise seguida de lavagem) com a solução comercial FACS Lysing Solution™ (BD), diluída 1 : 10 em água destilada ou deionizada (5mL de solução para 45mL de água) em tubo estéril envolvido com papel alumínio. A solução é estável por um mês à temperatura ambiente.
- Após os 15 minutos de incubação no escuro, adicionar 1,5mL de solução FACS Lysing e homogeneizar em vórtex.
- Incubar 10 minutos à temperatura ambiente no escuro.
- Centrifugar 5 minutos à 1800 rotações por minuto (RPM).
- Desprezar o sobrenadante retirando o excesso com gaze dobrada.
- Lavar com 1mL de PBS azida homogeneizando no vórtex, centrifugar por 5 minutos à 1800 RPM. Após, desprezar o sobrenadante retirando o excesso com gaze dobrada.
- Se o sobrenadante parecer róseo, repetir o procedimento de lavagem com o PBS azida.
- Ressuspender com 1mL de PBS puro, homogeneizar no vórtex. A preparação está pronta para a aquisição e análise no citômetro.