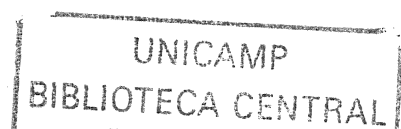


FERNANDA GONÇALVES PEREIRA CUNHA ✓

**PAINEL RACIONALIZADO DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS PARA LEUCEMIAS AGUDAS:
SEU VALOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO**

CAMPINAS

2005



PAINEL RACIONALIZADO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA LEUCEMIAS AGUDAS: SEU VALOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO

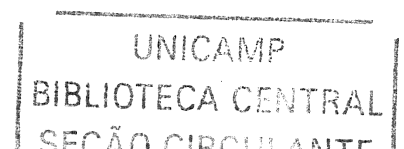
Aluna: Fernanda Pereira Gonçalves Cunha

Orientadora: Prof Dra. Irene G.H. Lorand-Metze

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós- Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área
de Ciências Básicas.*

CAMPINAS

2005



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	2914 p
EX	
OMBO BCI	66316
ROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
REÇO	11.00
DATA	9/11/05
CPD	

BIB ID: 373309

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C914p Cunha, Fernanda Gonçalves Pereira
Painel racionalizado de anticorpos monoclonais para leucemias agudas: seu valor diagnóstico e prognóstico . / Fernanda Gonçalves Pereira Cunha. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Irene Lorand-Metze
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucemia aguda. 2. Citometria de fluxo. 3. Diagnóstico. 4. Prognóstico. I. Lorand-Metze, Irene. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

20052541

*“O saber contra a ignorância, a saúde contra a doença, a vida, a morte...
Mil reflexos da Batalha Permanente em que estamos todos envolvidos...”*

Osvaldo Cruz

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Ednaldo e à minha mãe Zeilah como retribuição de todo o esforço que fizeram para que um dia eu pudesse chegar até aqui...

Ao meu marido Carlos por todo amor, incentivo e paciência dispensados durante o desenvolvimento desse trabalho e sempre...

AGRADECIMENTOS

À Dra. Irene, pelo voto de confiança, incentivo, compreensão e paciência que teve comigo principalmente no final desse trabalho e por tudo o que ensinou e que me permitiu aprender com ele.

Ao Alan, por sua participação direta na parte prática deste trabalho, por seu desempenho no laboratório, sempre prestativo e competente, o que permitiu que eu pudesse me dedicar a este estudo principalmente na fase final, pelo incentivo, respeito e amizade a mim dispensados.

À Dra. Flávia, pelo levantamento dos dados clínicos, dúvidas sanadas e pela amizade e carinho com que sempre me tratou.

Ao Dr. Konradin, pelo desenvolvimento estatístico que enriqueceu os resultados deste trabalho, pelo tempo e conhecimento dispensados.

À Eliana, por tudo que me ensinou sobre estatística com toda a paciência e disposição e por todos os cálculos que fizemos juntas.

À Arlete, minha grande amiga que tanto me ajudou na confecção de posters para apresentações deste trabalho em congressos, pela formatação da tese e slides usados na qualificação e na defesa e principalmente pelo incentivo que sempre me deu.

Ao Leonardo, que também ajudou no apoio didático, sempre com muita boa vontade e paciência e pela amizade que construímos nesse tempo.

À Secretária Nicete, sempre ajudando na parte burocrática com muita disposição e competência.

Aos secretários da Pós-graduação, primeiro à Renata, que me ajudou enquanto aluna especial até o meu ingresso como aluna regular, depois ao Eduardo e à Emília com suas orientações até o término da tese.

Aos médicos e residentes, que consultaram, fizeram as punções das medulas, diagnosticaram e trataram os pacientes.

Aos funcionários da Coleta, que participaram desde a coleta do material até a entrega do mesmo no laboratório.

À **Mônica e sua equipe do Laboratório de Hematologia**, sempre dispostas a colaborar, cedendo o Cell Dyn para as contagens de células e diluições necessárias, pelas inúmeras colorações de lâminas, pela realização dos mielogramas e citoquímicas, que fizeram parte do diagnóstico desses pacientes.

À **Dra. Carmen, Maristela, Rose e toda a equipe do Laboratório de Citogenética**, pela realização dos estudos citogenéticos, dos quais os dados foram utilizados e de suma importância para este estudo e principalmente pela amizade de longa data.

À **Dra. Gislaine**, por ter me encorajado a fazer mestrado, por ser minha médica e amiga e principalmente por saber que posso contar com você em qualquer situação...

À **Vera**, minha professora de Inglês, que com muita dedicação e paciência me ensina essa tão universal língua, que se fez absolutamente necessária neste estudo.

À **Dra. Márcia e ao Dr. Fábio**, meus companheiros de Pós, pelas dicas e ajudas, pelas angústias e ansiedades que dividimos uns com os outros e principalmente pela nossa amizade que cresceu neste período.

À **Soraia, Larissa e Márcia**, minhas grandes amigas, pelas ajudas, dicas, incentivos e pelo carinho com que me tratam.

Aos meus amigos do **Hemocentro**, Manoela, Karina, Gustavo, Adriana, Maria Helena, pelo incentivo.

À **Martinha**, minha amiga e “irmã mais nova” que tanto me incentivou e me ajudou no começo...

À **Cida e à Aglaê**, pela amizade e por tudo que me ensinaram sobre citometria de fluxo.

À **FAPESP e CNPQ** que viabilizaram o desenvolvimento desse projeto, disponibilizando verba para a compra dos reagentes.

Ao meu pai, Ednaldo, por todo o seu amor e dedicação, educando, auxiliando, ensinando, transmitindo valores como dignidade, respeito, honestidade, importância do estudo e dedicação ao trabalho.

À minha mãe, Zeilah, por todo o seu amor, dedicação, preocupação com minha formação pessoal e profissional, estando sempre presente incentivando e mostrando uma direção a seguir, com tranquilidade e segurança, para que eu nunca desistisse...

Aos meus irmãos Claudia e Flávio André, pelo companheirismo, amizade e por tudo que vivemos juntos, crescendo, aprendendo e ensinando alguma coisa um para o outro, cada um ao seu modo...

Ao meu marido Carlos, pelo seu amor, dedicação, carinho, compreensão e paciência que tem comigo sempre... por tudo de bom que vivemos e pelo que ainda temos para viver!

À todos os meus familiares, pelo amor e carinho a mim dispensados.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUÇÃO	17
Leucemia Aguda.....	18
Classificação	19
Imunofenotipagem.....	20
Maturação da célula T.....	22
Expressão de antígenos como fator prognóstico em LLA T.....	23
Maturação da célula B	24
Expressão de antígenos como fator prognóstico em LLA B.....	25
Maturação mielóide	27
Expressão de antígenos como fator prognóstico em LMA	28
OBJETIVOS	32
PACIENTES E MÉTODOS	34
Pacientes	35
Avaliação laboratorial.....	35
Citogenética	35
Classificação imunológica das leucemias agudas.....	35
Tratamento	37
Imunofenotipagem.....	37
Preparação das amostras para imunofenotipagem.....	39
Aquisição e análise das amostras por citometria de fluxo	40
Análise Estatística	42
LLA	42
LMA	42

RESULTADOS	43
LLA	44
LLA T.....	44
LLA B:	46
Análise de sobrevida.....	49
LMA	49
Análise de sobrevida.....	57
DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	79

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
BD	Becton Dickinson
CD	Cluster Defferentiation
CMF	Canal Médio de Fluorescência
Del	Deleção
DRM	Doença Residual Mínima
FAB	French-American-British
FITC	Isitiocianato de Fluoresceína
FSC	Forward Scatter
Ig	Imunoglobulina
inv	Inversão
ISCN	International System for Human Cytogenetics Nomenclature
κ	Kappa
λ	Lambda
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
MO	Medula Óssea
MPO	Mieloperoxidase
NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato

PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Piridina de Clorofila
RC	Remissão Completa
SG	Sobrevida Global
SP	Sangue Periférico
SSC	Side Scatter
t	Translocação
TA	Temperatura Ambiente

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Presença dos antígenos durante a maturação da célula T.....	23
Figura 2:	Presença dos antígenos durante a maturação da célula B..	25
Figura 3:	Presença dos antígenos durante a maturação mielomonocítica..	28
Figura 4:	Dot plot CD45 x SSC com “gate” (R1) nos blastos, CD45.	41
Figura 5:	Dot plot CD19 x SSC com “gate” (R1) nos blastos de LLA B.	41
Figura 6:	LLA - T.	44
Figura 7:	LLA – B.	46
Figura 8:	LMA com 1 população de blastos.....	51
Figura 9:	LMA com 2 populações de blastos..	51
Figura 10:	LMA FAB-M6 com 3 populações de blastos.....	52
Figura 11:	Curva de SG dos pacientes de acordo com o risco prognóstico do cariótipo.	57
Figura 12:	Curva de SG dos pacientes de acordo com a positividade de CD14 nas populações de blastos.	57
Figura 13:	Curva de SG dos pacientes de acordo com a presença de populações de blastos fenotipicamente diferentes.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Classificação imunológica das LLA de linhagem T.	36
Tabela 2:	Classificação imunológica das LLA de linhagem B.	36
Tabela 3:	Classificação imunológica das LMA.	36
Tabela 4:	Painel de Anticorpos monoclonais usados para diagnosticar as Leucemias Agudas:...	38
Tabela 5:	Anticorpos monoclonais usados para imunofenotipagem das leucemias agudas:	39
Tabela 6:	Dados clínicos e hematológicos dos pacientes com LLA T.....	44
Tabela 7:	Intensidade de fluorescência e variação de expressão dos antígenos nos pacientes com LLA T.....	45
Tabela 8:	Dados clínicos e hematológicos dos pacientes com LLA B.	46
Tabela 9:	Intensidade de fluorescência e variação de expressão dos antígenos nos pacientes com LLA B.	47
Tabela 10:	Correlações significativas entre o CMF do CD45 e os CMF dos CD10, CD20 e λ de superfície e citoplasma dos pacientes com LLA B.	48
Tabela 11:	Correlações entre a % e CMF dos marcadores das LLA, através do teste de Spearman:	48
Tabela 12:	Valores da análise multivariada de Cox:.....	49
Tabela 13:	Dados clínicos e hematológicos dos pacientes com LMA.	49
Tabela 14:	Presença de populações de blastos com relação ao subtipo FAB.	50
Tabela 15:	Intensidade de fluorescência e variação dos anticorpos expressos nos pacientes com LMA, que tiveram apenas 1 população de blastos, N = 29.....	53
Tabela 16:	Intensidade de fluorescência e variação dos anticorpos expressos nos pacientes com LMA, que tiveram 2 populações de blastos, N = 5.	53
Tabela 17:	Intensidade de fluorescência e variação da expressão de CD45 nas LMA imaturas M0 e M1, nas M3 e nas maduras M2, M4 e M5.....	54
Tabela 18:	Correlação entre o CMF de CD45 e os CMF dos CD14, CD15, CD33 dos pacientes com LMA.	55
Tabela 19:	Correlações entre a % e CMF dos marcadores das LMA, através do teste de Spearman:	55
Tabela 20:	Resultado de cariótipo e alterações encontradas com relação ao subtipo FAB.	56
Tabela 21:	Distribuição do valor prognóstico do cariótipo com relação ao subtipo FAB.	56
Tabela 22:	Valores da análise multivariada de Cox:.....	58

expressando CD20 e outras não. O CD10 desaparece durante o próximo estágio, de célula pré-B e cadeias μ intracitoplasmáticas aparecem, havendo rearranjo do gene de imunoglobulina de cadeia pesada. As cadeias μ alcançam a superfície das células junto com pseudocadeias leves, provavelmente no primeiro passo de seleção e para inicializar o rearranjo de uma cadeia leve de imunoglobulina (Ig) (LEMMERS et al., 2000), que na forma de H2L2 é carregada para a superfície por heterodímeros de CD79. Essas células B “naive” expressam CD79, CD19, CD22, CD21, CD20 e Ig de superfície, elas são submetidas a processos de seleção medular, objetivando remover células que produzem anticorpos auto-reagentes e então alcançam órgãos linfóides periféricos secundários, na zona do manto de centros germinativos (BÉNÉ, 2005).

A Figura 2 representa a presença dos antígenos na diferenciação da célula B (Van Lochem et al., 2004).

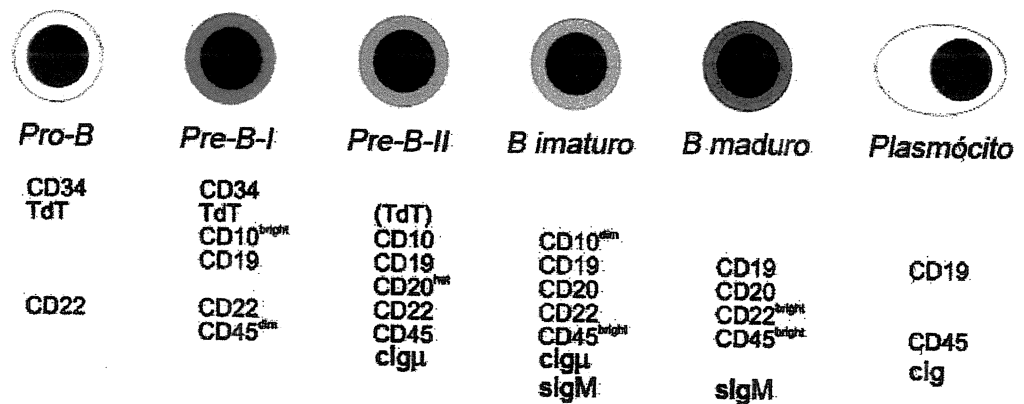


Figura 2: Presença dos antígenos durante a maturação da célula B. C = citoplasma; S = superfície.

Expressão de antígenos como fator prognóstico em LLA B

Inicialmente o CD10 era considerado um antígeno comum de LLA e chamado de cALLA. Sua atuação na maturação da célula B ainda é obscura, mas deve estar envolvida na regulação do crescimento e diferenciação dos progenitores das células B (BÉNÉ, 2005).

O CD19 é considerado um antígeno pan-B e é a molécula chave na diferenciação e ativação das células B (CARTER et al., 2002; BÉNÉ, 2005).

O CD20 é uma pequena molécula que regula a ativação da célula B (BÉNÉ, 2005). Estudos realizados pelo Grupo de Oncologia Pediátrica mostraram que a positividade de CD20 >25% indica pior prognóstico para crianças maiores que um ano de idade (RILEY et al., 2002).

A fosfoglicoproteína CD22 é uma molécula de adesão de célula B que está presente na superfície de todas as células das LLA de linhagem B. Está associada à proliferação celular (BOUE e LEBIEN, 1988; PEZZUTTO et al., 1988). Anormalidades na expressão de CD22, bem como de CD10, podem estar associadas à diferenciação anormal e/ou proliferação de células B neoplásicas (LUCIO et al., 2001).

O antígeno de superfície celular CD45 ou antígeno leucocitário comum constitui uma família de glicoproteínas de alto peso molecular expressas na maioria das células hematopoiéticas nucleadas, mas não na mesma isoforma molecular (KAWANO et al., 1993; MIYACHI et al., 1999; NAKAMURA et al., 2001). Sabe-se que na LLA T, a expressão de CD45 é mais constante do que na LLA B. NAKAMURA e colaboradores (2001) mostraram que altos níveis de expressão de CD45 correlacionam com pior prognóstico. O Grupo de Oncologia Pediátrica também estudou a expressão do CD45 em crianças com LLA-B e mostraram que a positividade >75% correlacionou com pior prognóstico para crianças maiores que um ano de idade (RILEY et al., 2002). A perda da expressão de CD45 é um fator prognóstico favorável em crianças, por apresentarem melhor resposta a quimioterapia, contagem mais baixa de leucócitos, hiperdiploidia >50 e índice de DNA >1.15 (BEHM et al., 1992; BOROWITZ et al., 1997). RATEI et al. (1998) não observaram impacto prognóstico significativo do CD45 em LLA infantil, mas demonstraram que há diferenças funcionais entre as subpopulações com CD45+ e CD45-.

CD34 é uma glicoproteína com peso molecular de 110 kDa codificada por um gene localizado no braço longo do cromossomo 1 (1q) e preferencialmente expressa nas células progenitoras hematopoiéticas, não só nas células normais, mas também nas células leucêmicas, tanto linfóide quanto mielóide. Sua expressão tem sido considerada um fator prognóstico favorável, tanto para sobrevida livre de doença como para sobrevida global (SG) em LLA de criança e está associada à ausência de envolvimento extramedular, baixos níveis de DHL, baixa contagem de leucócitos e baixa atividade proliferativa (CASCAVILLA et al., 1997; RILEY et al., 2002). Mas segundo um

estudo realizado por (THOMAS et al., 1995) a expressão de CD34 foi identificada como um fator prognóstico adverso em LLA de adulto.

O CD33 foi identificado como o antígeno aberrante mais freqüentemente expresso na LLA B, seguido pelos CD13 e CD7 (BRADSTOCK et al., 1989). As crianças com LLA B e CD33+ tinham idade mais avançada e pior prognóstico, sua expressão também foi associada à co-expressão de antígenos de células T como os CD2, CD4 e CD7. Supõe-se que LLA de linhagem B com CD33+ é derivada de células hematopoiéticas minimamente diferenciadas comprometidas com a linhagem B e que a maior freqüência de sua expressão na recaída pode refletir uma evolução clonal ou expansão do menor clone CD33+ (RILEY et al., 2002).

Maturação mielóide

A primeira molécula comprometida com a linhagem mielóide a aparecer na célula progenitora CD34+DR+ é a enzima intracitoplasmática MPO. Os CD13, CD33 e CD117 são os 3 antígenos de diferenciação mielóide que podem ser considerados os marcadores mais precoces, freqüentemente observados juntos na superfície dos blastos mielóides, embora o CD117 ainda desapareça nos estágios imaturos da diferenciação. As células ligadas à diferenciação mielóide dependem de sinais enviados pelos fatores de crescimento hematopoiéticos no seu microambiente para tornarem-se monócitos ou granulócitos e mais tarde neutrófilos, basófilos ou eosinófilos. Essas células também expressam os antígenos citados acima, ainda que os CD15 e CD65 sejam considerados mais característicos de neutrófilos, enquanto que o CD14 é mais específico de monócitos. Já os eritroblastos e megacarioblastos não expressam MPO e adquirem antígenos de diferenciação específicos muito cedo. O CD36 e a glicoforina são característicos dos eritroblastos e os megacarioblastos expressam, primeiro no citoplasma, e depois na superfície, as integrinas CD41 e CD61 bem como membros da família CD42 (BÉNÉ, 2005).

As Figuras 3A e 3B representam a presença dos antígenos na diferenciação mielo e monocítica B (Van Lochem et al., 2004).

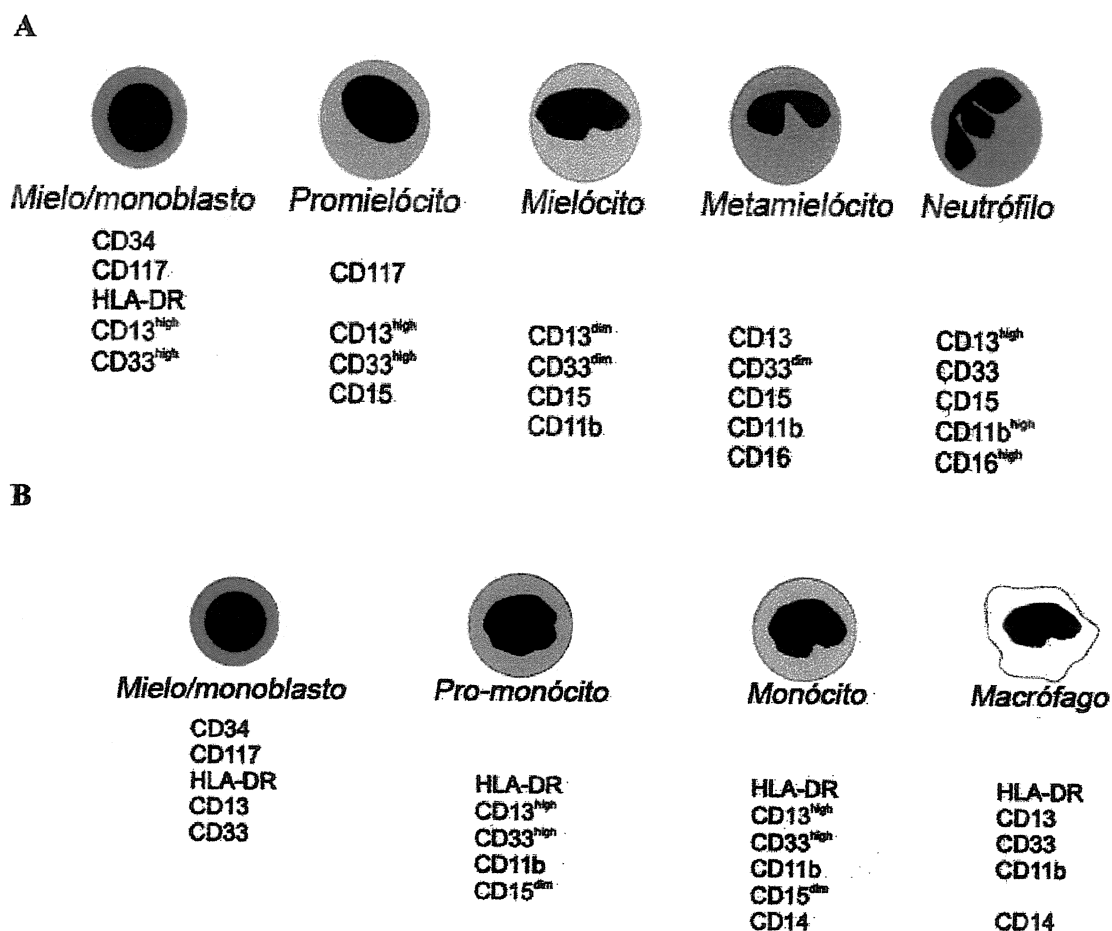


Figura 3: Presença dos antígenos durante a maturação mielomonocítica. A: Diferenciação mielóide, as células não expressam CD14. B: Diferenciação Monocítica.

Expressão de antígenos como fator prognóstico em LMA

Em geral, os marcadores pan-mielóides, como CD13, CD33 e MPO estão associados a um bom prognóstico (LEGRAND et al., 2000; PEFFAULT DE LATOUR et al., 2003).

A porcentagem de positividade da MPO tem impacto na evolução clínica da LMA. Um estudo do ECOG mostrou que pacientes com menos de 50% de blastos positivos para MPO, apresentavam baixa taxa de remissão completa (RC); enquanto pacientes com mais de 50% de blastos positivos para MPO, tiveram uma taxa significativamente melhor de RC nas LMA M1 e M2 (MATSUO et al.,

2003). Para MATSUO e colaboradores (2003) a porcentagem de MPO positiva nas LMA é fator prognóstico, principalmente quando analisada em pacientes com cariótipo de risco intermediário.

O CD14 é o principal marcador imunológico para a diferenciação monocitóide (LMA M4 e M5), mas também pode ser encontrado em alguns casos de M0, M1 e M2. Alguns estudos associaram sua positividade com pior prognóstico, mas existem divergências de resultados. (FERGEDAL et al., 1998) mostraram que casos que expressavam mais de 10% de CD14 apresentavam pior prognóstico. A expressão de CD14 está ligada à resistência celular a drogas como arabinosideo de citosina e inibidores da topoisomerase II (NORGAARD et al., 2001), o que explicaria sua associação com um prognóstico ruim.

BAHIA e colaboradores (2001) observaram que pacientes que expressavam CD15 e CD117 e que entraram em RC, eram mais jovens e apresentavam cariótipos favoráveis. Para SCHABATH et al. (2003) o CD15 está associado a uma melhor resposta ao tratamento.

O antígeno CD56 é uma isoforma da molécula de adesão da célula neural (NCAM) que media a interação de célula a célula e possivelmente está envolvida na citotoxicidade mediada por célula. É considerado um marcador de células NK, mas também é expresso nos linfócitos T citotóxicos (CD8) e numa pequena população de células T CD4+ e monócitos (DELGADO et al., 2002). A expressão do CD56 tem sido associada com características monocíticas das células leucêmicas e a algumas anormalidades cromossômicas tais como a trissomia do 8, t(8:21) e 11q23 e está associada com prognóstico desfavorável em LMA M2 com t(8:21) ou t(15;17) e na leucemia promielocítica aguda (LPA) (BAHIA et al., 2001; DELGADO et al., 2002; REPP et al., 2003; SEYMOUR et al., 1994). Sua expressão prevalece no subtipo FAB M5, mas também aparece na LMA-M4, seguido de LMA-M7 e M2. Há correlação da positividade do CD56 com marcadores monocíticos, CD14 e CD11b e também com marcador de célula B, CD19 (SEYMOUR et al., 1994). Seu valor prognóstico ainda continua incerto (DI BONA et al., 2002). REPP e colaboradores (2003) também observaram um aumento significativo na taxa de RC em pacientes com CD56 positivo. CHANG e colaboradores (2004) correlacionaram a expressão de CD56 com menor SG, mas nem a taxa de RC, nem sobrevida livre de doença foram influenciadas por ela.

Estudos prévios sugeriram que a expressão de CD7 nos blastos leucêmicos mielóides pode resultar da transformação e maturação dos precursores hematopoéticos no estágio inicial da

maturação mielóide quando o CD7 era expresso transitoriamente (TIEN et al., 1996), mas nenhuma característica clínica ou biológica está associada com a expressão desse marcador (KRAGULJAC et al., 2000). Alguns autores associaram a positividade do CD7 com um prognóstico desfavorável. Outros associaram sua presença com o cariótipo, onde, para OGATA et al. (2001) a positividade de CD7 não teve impacto prognóstico no grupo de cariótipo intermediário, mas para o cariótipo desfavorável, foi associada à SG e sobrevida livre de doença curtas. BAHIA e colaboradores (2001) observaram que casos positivos para CD7 e CD34 apresentaram resistência a múltiplas drogas e pior prognóstico. Já REPP e colaboradores (2003) encontraram melhor prognóstico para os pacientes que expressaram CD7. CHANG e colaboradores (2004) não encontraram valor prognóstico para esse marcador.

As moléculas classe II são expressas em muitos casos de LMA, com exceção da LPA, que é caracterizada pela perda da expressão desse ag (HANSON et al., 1987). A ausência de expressão de HLA nas leucemias não-LPA é rara (BAER et al., 2001) e existe pouca informação sobre seu significado clínico (WETZLER et al., 2003). A expressão de DR está associada com CD34. Pacientes que não expressam DR e CD34 tem melhor RC do que aqueles que expressam um dos dois marcadores ou ambos (CHANG et al., 2004).

A expressão de CD34 na LMA de adulto está associada com pior prognóstico (DUNPHY et al., 2001; RASPADORI et al., 1997).

A expressão de CD2 está associada com Bcr3 (CLAXTON et al., 1992) ou LPA microgranular variante (WETZLER et al., 2003) e a uma melhor resposta ao tratamento (BALL et al., 1991; SCHABATH et al., 2003).

Pouco se sabe sobre o modelo de expressão dos antígenos CD45 (RA/RO) nas LMA (KAWANO et al., 1993). Na mielopoiese normal, progenitores comprometidos com a linhagem mielóide são compostos de células CD45RA+ e o CD45RO primeiro aparece nos estágios de blastos e promielócitos e aumenta consistentemente durante a diferenciação, por isso muitos macrófagos e granulócitos humanos expressam o antígeno CD45RO. Na LMA a prevalência de expressão de CD45RA tem sido sugerida relatar a habilidade de manutenção da proliferação anormal pelas células progenitoras mielóides malignas (CALDWELL et al., 1991). A importância das isoformas do CD45 na diferenciação celular da LMA não está bem estabelecida. MIYACHI e

colaboradores (1999) sugeriram que a expressão de CD45 RA/RO nas LMA está associada com a diferenciação das linhagens mielomonocíticas e distribuídas especificamente em cada subtipo FAB. Sugere-se que o CD45 está envolvido na regulação do crescimento celular hematopoético, diferenciação e ativação celular (RATEI et al., 1998). Pouco se sabe sobre o impacto prognóstico da presença de CD45 na LMA.

Os antígenos de superfície celular freqüentemente encontrados com expressão aberrante em LMA são os CD2, CD5, CD7, CD19 e CD56 (TERSTAPPEN, 1994). Com relação à co-expressão de antígenos linfóides, os antígenos T são mais comuns que os B, sendo o CD7 mais freqüente, assim como o CD2, e são menos comuns os CD5, CD19, CD10 e CD20 (BAHIA et al., 2001; LAUNDER et al., 1996).

Segundo LEGRAND e colaboradores (2000), a percentagem dos antígenos encontrados em LMA são: - mielóides: CD13 (95%), CD33 (91%), MPO (73%); - de células progenitoras: HLA-DR (87%), CD117 (73%), CD34 (68%); - de linhagem T: CD2 (18%), CD5 (4%), cCD3 (2%); - de linhagem B: CD19 (16%), CD10 (10%), cCD22 (2%); - de linhagem monocítica: CD4 (63%) e CD14 (25%).

Os mieloblastos leucêmicos expressam uma variedade de antígenos de diferenciação leucocitária concomitante à linhagem mielóide e com os níveis de maturação. A avaliação desses antígenos tem sido muito útil no diagnóstico dessas leucemias, mas seu valor prognóstico ainda é controverso. Além do que, as células leucêmicas das LMA também podem expressar antígenos de linhagem linfóide, caracterizando infidelidade ou promiscuidade de linhagem, leucemia de linhagem mista ou híbrida ou bifenotípica, também com significado prognóstico ainda não bem definido (BRADSTOCK et al., 1994; CHANG et al., 2004).

O diagnóstico das leucemias agudas, por citometria de fluxo, tem sido baseado em marcadores de linhagem, maturação e aberrantes, considerando positividade dos marcadores acima de 20%. No presente trabalho exploramos a importância da intensidade de expressão dos antígenos, usando o programa Paint-a-gate para análise.

Objetivos

1. Propor um painel racionalizado de anticorpos monoclonais usados na imunofenotipagem para diagnóstico de leucemias agudas, direcionando-os para cada linhagem celular.
2. Verificar a efetividade do painel de triagem proposto.
3. Estudar os fenótipos aberrantes e as sub populações.
4. Comparar os resultados com critérios FAB.
5. Verificar a utilidade da análise da intensidade de expressão dos antígenos (CMF).
6. Confirmar parâmetros prognósticos.

Pacientes e Métodos

Pacientes

Entraram no estudo casos novos de leucemia aguda, diagnosticados no serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Unicamp, no período de agosto de 2002 a setembro de 2004. O diagnóstico de leucemia aguda foi feito baseado nos achados clínicos de hemograma e mielograma. Os dados relativos à identificação, história e os dados laboratoriais foram obtidos a partir do prontuário dos pacientes. Todos foram submetidos a exames de hemograma, mielograma, citoquímica, imunofenotipagem e cariótipo.

Avaliação laboratorial

A análise do SP ou aspirado de MO foi feita através de esfregaços corados pelo método de Leishman e a análise morfológica por exame de microscopia óptica. Simultaneamente foram realizadas técnicas de citoquímica como Peroxidase, Sudan Black, Alfa-naftil-acetato esterase, pH=6,3 e inibição pelo NAF.

Citogenética

Foram colhidas amostras de MO dos pacientes ao diagnóstico, para análise cariotípica. A análise dos cromossomos foi realizada após 24 horas de cultura não estimulada à 37°C. Em cada caso, pelo menos 20 metáfases em Banda G foram analisadas e o cariótipo foi designado de acordo com ISCN (MITELMAN, 1995).

Classificação imunológica das leucemias agudas

Baseado no protocolo de LLA do grupo alemão GMALL, construímos as tabelas de classificação imunológica para LLA T e LLA B de acordo com os anticorpos que utilizamos, como mostram as Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Classificação imunológica das LLA de linhagem T.

	HLA-DR	CD3	CD3c	CD7
PRÉ-T	- /+	-	+	+
LLA-T	-	+	-	+

Tabela 2: Classificação imunológica das LLA de linhagem B.

	CD34	HLA-DR	CD10	CD19	CD20	Igc	Igs
Pré-Pré-B	+	+	-/+	+	-/+	-	-
COMUM	-	+	+	+	-	-	-
Pré-B	-	+	+	+	-/+	+	-
B madura	-	+	-/+	+	+	- / +	+

Baseado numa tabela de classificação imunológica das LMA segundo a classificação FAB, citada por SZCZEPANSKI et al. (2003) elaboramos outra somente com os anticorpos monoclonais que utilizamos, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3: Classificação imunológica das LMA.

	HLA-DR	CD13	CD14	CD15	CD33	CD34	MPO	Glicof A	CD41	CD61
M0	++	++	-	-/+	++	++	-	-	-	-
M1	++	++	-	-/+	++	++	+	-	-	-
M2	+	++	-	-/+	++	+	++	-	-	-
M3	-	++	-	-/+	++	-/+	++	-	-	-
M4	++	++	+	-	++	-/+	++	-	-	-
M5	++	++	+	-	++	+	++	-	-	-
M6	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
M7	++	++	-	-	++	++	-	-	+	+

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

Como algumas categorias FAB foram pouco freqüentes, agrupamos os tipos, MO e M1, M4 e M5, para os cálculos estatísticos.

O cariótipo foi subdividido em baixo risco: t(15;17), t(8;21) e inv(16), risco intermediário: normal, +8 e -Y e alto risco: t(9;22), +11, del(11), t(1;11), +21.

Tratamento

Os pacientes de LLA são tratados de acordo com o protocolo do grupo alemão GMALL 05/93 (HOELZER et al., 1988). Seguindo o protocolo os pacientes foram subdivididos em 4 braços de tratamento: LLA T; LLA B madura com Ig de superfície positiva; LLA B imatura de baixo risco e LLA B imatura de alto risco. Os fatores de risco considerados foram o CD10 positivo, leucocitose $> 30.000/\text{mm}^3$, cromossomo Ph+ ou t(4,11). Os pacientes com > 50 anos foram tratados conforme protocolo baixo risco.

De acordo com o protocolo de tratamento do nosso serviço os pacientes com LMA receberam quimioterapia de indução de 1 ou 2 ciclos de TAD-9. Os pacientes que não entraram em RC foram tratados com o regime MEC. Pacientes que entraram em RC foram submetidos a 2 ciclos consecutivos de consolidação, seguido por um ciclo de TAD-7. Após esses 2 ciclos os pacientes foram submetidos ao tratamento de manutenção por 24 meses (PAGNANO et al., 2000).

Imunofenotipagem

Foram colhidas amostras de MO dos pacientes através da punção do esterno ou crista ilíaca em tubos Vacutainer de 4ml (Vacuette) contendo EDTA. Algumas amostras de sangue total foram colhidas, quando a leucocitose excedeu $25 \times 10^9/\text{L}$, através de venopunção em tubos Vacutainer de 4ml (Vacuette) contendo EDTA para imunofenotipagem. As amostras foram manipuladas em até 24h após a coleta e mantidas a temperatura ambiente (T.A.).

Para o diagnóstico das leucemias foi proposto um painel de triagem, com anticorpos monoclonais usando três cores: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e proteína piridina de clorofila (PerCP) e com a seguinte combinação de marcadores: CD19/CD3/CD45, CD7/CD33/CD45, HLA-DR/CD13/CD45. A escolha desses anticorpos foi feita com o objetivo de

fazer uma triagem das linhagens e estudar os fenótipos aberrantes mais comuns. Conforme a linhagem apontada pelo painel de triagem, dois painéis secundários foram propostos para LLA B e LMA, demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4: Painel de Anticorpos monoclonais usados para diagnosticar as Leucemias Agudas:

Painel de Triagem
IgG1 FITC/ IgG1 PE/ CD45 PerCP
CD19 FITC/ CD3 PE/ CD45 PerCP
CD7 FITC/ CD33 PE/ CD45 PerCP
HLA-DR FITC/ CD13 PE/ CD45 PerCP
Painel Secundário para LLA-B
CD10 FITC/ CD20 PE/ CD19 PerCP
Fab' FITC/ CD19 PerCP
Kappa FITC/ CD19 PerCP
Lambda FITC/ CD19 PerCP
c Fab' FITC/ CD19 PerCP
c Kappa FITC/ CD19 PerCP
c Lambda FITC/ CD19 PerCP
Painel Secundário para LMA
CD56 FITC/ CD14 PE/ CD45 PerCP
CD15 FITC/ CD34 PE/ CD45 PerCP
CD2 FITC/ CD45 PerCP
IgG1 FITC/ CD45 PerCP
MPO FITC/ CD45 PerCP

Quando marcadores de células T se apresentavam positivos o diagnóstico já era fechado como LLA de linhagem T, ou o painel era complementado com MPO, para descartar LMA ou Leucemia bifenotípica, quando algum marcador mielóide era expresso no painel de triagem. Quando o marcador de linhagem B era positivo, aplicava-se o painel secundário para LLA de linhagem B: CD10/CD20/CD19 e cadeias leves de Ig de superfície e citoplasmática KAPPA (κ)/CD19 e LAMBDA (λ)/CD19. O painel também era complementado com MPO, quando algum marcador mielóide era expresso no primeiro momento. Quando os marcadores de linhagem mielóide eram positivos aplicava-se o painel secundário para LMA: CD56/CD14/CD45, CD15/CD34/CD45,

CD2/CD45 e MPO/CD45. O painel era complementado com CD10/CD20, se o CD19 fosse positivo no painel de triagem. Em caso de suspeita de M6 usamos a Glicoforina A e de M7, os CD41 e CD61. Foram usados controles isotípicos para os anticorpos do painel primário, para κ e λ de superfície e de citoplasma e para MPO que é citoplasmático. A Tabela 5 mostra os anticorpos monoclonais utilizados.

Tabela 5: Anticorpos monoclonais usados para imunofenotipagem das leucemias agudas:

Marcadores	Fluorocromos	Clones	Fabricantes
CD2	FITC	RPA-2.10	Pharmlingem
CD3	PE	UCHT1	Pharmlingem
CD7	FITC	M-T701	Pharmlingem
CD10	FITC	W8E7	Becton Dickinson
CD13	PE	WM15	Pharmlingem
CD14	PE	M5E2	Pharmlingem
CD15	FITC	H198	Pharmlingem
CD19	FITC	HIB19	Pharmlingem
CD19	PERCP	SJ25C1	Becton Dickinson
CD20	PE	2H7	Pharmlingem
CD33	PE	WM53	Pharmlingem
CD34	PE	8G12	Becton Dickinson
CD45	PERCP	2D1	Becton Dickinson
CD56	FITC	NCAM16.2	Becton Dickinson
Anti-HLA-DR	FITC	G46-6 (L243)	Pharmlingem
Anti-MPO	FITC	5B8	Becton Dickinson
Anti-Kappa	FITC	Policlonal	Becton Dickinson
Anti-Lambda	FITC	Policlonal	Becton Dickinson

Preparação das amostras para imunofenotipagem

Foram usadas amostras de MO ou SP totais, sem separação das células mononucleares em coluna de Ficoll-Hipaque. As amostras de MO dos pacientes foram diluídas (1:1) com meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab ou Gibco), centrifugadas a 1500 RPM na centrífuga Excelsa baby II da Fanem por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 1 ml de RPMI ao pellet. As células foram quantificadas no contador hematológico CellDyn 1700 da Abott e diluídas a uma concentração aproximada de 5×10^6 células/ml para as marcações de membrana e de 1×10^6

células/ml para as marcações intracitoplasmáticas. As amostras de SP foram diluídas diretamente nas mesmas concentrações que a medula.

Para a marcação de membrana foram usados 100ul das amostras diluídas em cada tubo e incubados com 5 ul de cada anticorpo por 20 minutos, no escuro e a T.A. As hemácias foram lisadas com 2 ml da solução de lise FACS Lysing da BD diluída 1:10 por 10 minutos, também no escuro e a T.A.. As células foram centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 2 ml de tampão fosfato (PBS) 1x (pH=7,4), então foram centrifugadas novamente e o pellet ressuspensionado em 1 ml de PBS.

Para a marcação intracitoplasmática foram usados 100ul das amostras diluídas em cada tubo. As hemácias foram lisadas com 2 ml de solução de lise por 10 minutos a T.A., centrifugadas por 5 minutos a 1500 RPM e o sobrenadante foi descartado. As células foram fixadas com 2 ml de paraformaldeído 4% por 10 minutos, então foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Foram permeabilizadas com 2 ml de PBS contendo 0,5% de Tween 20 por 2 minutos e centrifugadas também durante 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram acrescentados mais 2 ml de PBS/Tween 20, centrifugando novamente por 2 minutos e descartando o sobrenadante. Então as células foram incubadas com 5 ul de cada anticorpo por 20 minutos, no escuro, a T.A. e depois foram lavadas 1 vez com PBS/Tween 20 e ressuspensionadas em 1 ml do mesmo PBS. Estando prontas para leitura no citômetro de fluxo.

Aquisição e análise das amostras por citometria de fluxo

A aquisição das amostras foi feita no citômetro de fluxo FACSCalibur™ da Becton Dickinson – San Jose – Califórnia – USA, usando o programa CellQuest™ (BD) e a análise no programa Paint-a-gate™ (BD), após calibração do citômetro com o kit Calibrite beads (BD), através do programa FACSComp™ (BD).

Para uma melhor análise das leucemias agudas sugere-se o uso do “plot” CD45/SSC para delimitar a janela dos blastos, pois discrimina as células blásticas leucêmicas das células normais residuais, exclui células normais da análise fenotípica das células leucêmicas e identifica a

heterogeneidade das células blásticas em muitos casos de leucemias baseados nas intensidades das diferentes distribuições do CD45 (LACOMBE et al., 1997).

Usando o dot plot CD45 x SSC (Figura 4) no painel primário e no secundário para LMA, os blastos foram identificados e então selecionados através de uma janela eletrônica (“gate”). No painel secundário para LLA de Linhagem B, as células selecionadas foram as CD19 positivas (CD19 x SSC) (Figura 5).

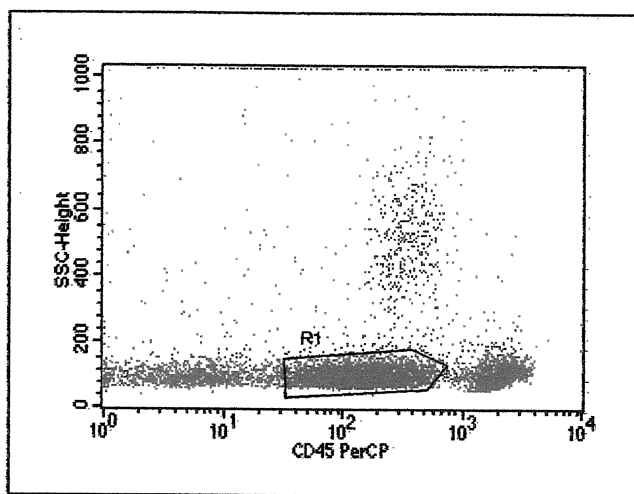


Figura 4: Dot plot CD45 x SSC com “gate” (R1) nos blastos, CD45.

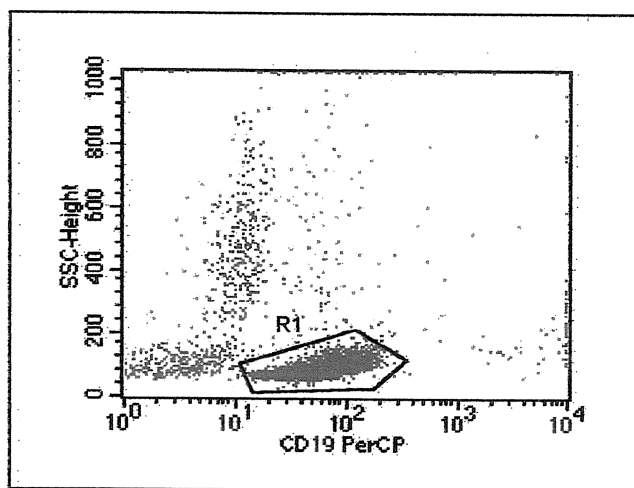


Figura 5: Dot plot CD19 x SSC com “gate” (R1) nos blastos de LLA B.

As populações foram compensadas através dos detectores, amplificadores e da compensação das fluorescências, eliminando sobreposições. Foram adquiridas 10.000 células em todos os casos. A expressão dos antígenos foi considerada através da intensidade de fluorescência medida pelo canal médio de fluorescência (CMF).

Os imunofenótipos aberrantes foram considerados de acordo com as expressões de antígenos tais como, linhagem cruzada e assincronismo de maturação, como descrito anteriormente.

Análise Estatística

A análise descritiva foi realizada para todos os parâmetros estudados.

As correlações entre o CD45 e outros antígenos foram feitas pelo teste de Spearman. Os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

LLA

O teste de Mann-Whitney foi realizado para ver se havia diferença na expressão de CD45 entre as LLA T e B.

Para os casos de LLA B fizemos a regressão de Cox, usando o método Backward, para avaliar a influência dos parâmetros analisados na SG. Os programas SPSS 10.1.4 e WinStat foram usados para os cálculos.

LMA

O teste Kruskal Wallis foi realizado para ver se havia diferença na expressão de CD45 entre os subtipos FAB.

Na análise de sobrevida as variáveis categóricas foram testadas pelo método Kaplan-Meier para os grupos de risco de cariótipo (baixo, intermediário e alto), número de sub populações (1,2 ou 3), presença de expressão de CD14, CD56, CD19 e MPO (0=negativo; > 0=positivo). A influência das variáveis contínuas como idade, o número de leucócitos ao diagnóstico e o CMF de vários antígenos foram analisados no modelo Cox (Backward) além das variáveis categóricas. Os programas SPSS 10.1.4 e WinStat foram usados para os cálculos.

Resultados

Este estudo foi realizado em 71 pacientes portadores de leucemia aguda ao diagnóstico. Cinquenta e quatro casos foram estudados através do aspirado de MO e 13 de SP. Os dados individuais dos pacientes estão nas tabelas do anexo.

• LLA

Trinta e seis casos foram classificados como LLA, dos quais 5 foram LLA de linhagem T e 31 LLA de linhagem B. Com o painel de triagem proposto, foi possível identificar 4 das LLA T (80%) e 19 das LLA B (61%). Nos casos que expressaram algum marcador anômalo, estudamos outros antígenos para confirmar a linhagem. Nos casos de LLA B fizemos o painel secundário sugerido para ela.

- LLA T

As características clínicas dos 5 pacientes com LLA T estão representadas na Tabela 6.

Tabela 6: Dados clínicos e hematológicos dos pacientes com LLA T.

	Mediana	Varição
Idade	29	14-51
Masculino/Feminino	3/2	
Hemoglobina g/dl	13,0	11,0-14,0
Leucócitos x10 ⁹ /l	39	0,76-90,7
Plaquetas x10 ⁹ /l	174	94-189

A Figura 6 mostra um exemplo de LLA – T.

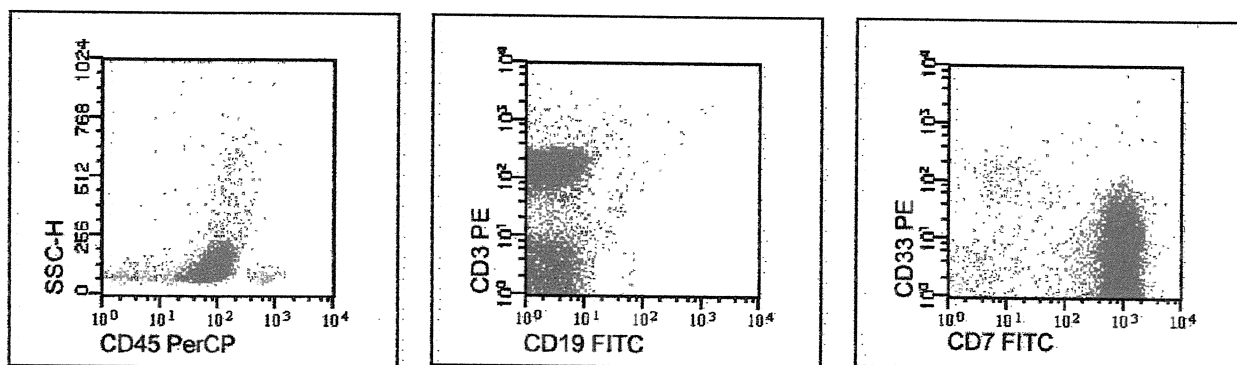


Figura 6: LLA - T, com CD3 e CD7 positivos.

Nós tivemos 1 caso de Pré-T com CD3 de superfície negativo, por isso fizemos o CD3 citoplasmático e o CD2, que foram positivos junto com o CD7 e HLA-DR. Este caso também apresentou expressão anômala de CD13 e CD19, então fizemos CD33, MPO, CD10, CD20, κ e λ , para descartar Leucemia Bifenotípica e todos deram negativos.

Tivemos 4 casos de LLA-T, com CD7 e CD3 de superfície positivos.

O resultado do estudo da intensidade média de fluorescência, medida pelo CMF, dos marcadores expressos nos casos de LLA T está representado na Tabela 7.

Tabela 7: Intensidade de fluorescência e variação de expressão dos antígenos nos pacientes com LLA T.

Marcadores	Total de casos analisados	Total de casos positivos	Mediana CMF (Variação)
CD45	5/5	5	272 (42-446)
CD7	5/5	5	1124 (30-1688)
CD3	5/5	4	81 (69-173)
cCD3	1/5	1	21
HLA-DR	5/5	1	898
CD13	5/5	4	18 (13-50)
CD19	5/5	1	21

Todos os casos apresentaram somente 1 população de blastos, 3/5 (60%) dos casos tiveram 1 expressão anômala e 1/5 (20%) tiveram 2 expressões anômalas. O fenótipo aberrante mais encontrado foi o marcador de linhagem cruzada, CD13 presente em 4/5 (80%) dos casos.

Tivemos resultado de cariótipo em 4/5 (80%) dos casos, dos quais 3 foram normais e 1 tetraplóide (92,XXXX).

Dos casos que tivemos acompanhamento 3 entraram em RC. Ao final do estudo, 2 pacientes estavam vivos e 2 haviam falecido.

Não investigamos fatores que pudessem influenciar a SG desses pacientes por termos um número muito pequeno de casos.

- LLA B:

As características clínicas dos 31 pacientes com LLA B estão representadas na Tabela 8.

Tabela 8: Dados clínicos e hematológicos dos pacientes com LLA B.

	Mediana	Variação
Idade	27	7-67
Masculino/Feminino	18/13	
Hemoglobina g/dl	80	6,0-16,0
Leucócitos $\times 10^9/l$	12,4	0,6-176
Plaquetas $\times 10^9/l$	50	5-502

A Figura 7 mostra um exemplo de LLA – B.

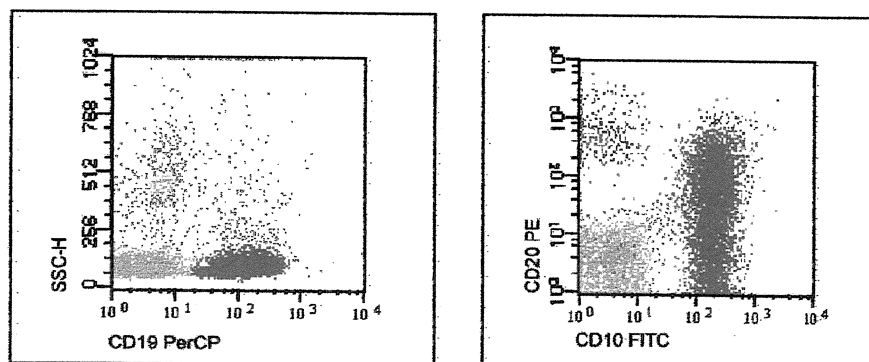


Figura 7: LLA – B, com CD19, CD10 positivo e expressão variável de CD20.

Imunologicamente classificamos 19/31 (61%) dos casos, dos quais 1 foi pré-pré-B, 1 comum, 11 pré-B e 4 B madura. Os 14/31 (38%) dos casos restantes se dividiram entre: comum ou pré-B (11 casos), pré-B ou B madura (2 casos) e pré-pré-B, pré-B ou B madura (1 caso).

O resultado do estudo da intensidade média de fluorescência dos marcadores expressos nos casos de LLA B está representado na Tabela 9.

Tabela 9: Intensidade de fluorescência e variação de expressão dos antígenos nos pacientes com LLA B.

Marcadores	Total de casos analisados	Total de casos positivos	Mediana CMF (Variação)
CD45	25/31	24	91 (0-678)
CD19	31/31	31	80 (19-426)
CD10	31/31	27	172 (11-810)
CD20	31/31	8	163 (9-757)
sKappa	22/31	1	16
cKappa	13/31	7	19 (14-65)
sLambda	22/31	3	26 (13-58)
cLambda	13/31	4	31 (10-50)
HLA-DR	31/31	31	490 (72-2814)
CD7	31/31	2	38 (37-39)
CD13	31/31	11	37 (14-116)
CD33	31/31	12	57 (24-342)

s = superfície; c = citoplasma

A expressão de CD45 foi avaliada em 25/31 (80%) dos casos. Três variaram de negativo a fraco positivo (valor baixo do CMF). O CD10 foi negativo em 4 casos e sua expressão foi fraca em outros quatro.

Observamos a presença de 2 populações de blastos fenotipicamente diferentes em 1 caso (3%), com CD45, CD19, HLA-DR positivos, mas apenas uma delas expressou o CD10 e ambas expressaram os CD13 e CD33. Além deste caso, mais 13/31 (42%) apresentaram 1 expressão anômala do CD7, CD13 ou CD33, 3/31 (9%) apresentaram duas, os CD13 e CD33 e 1/31 (3%) apresentou três marcadores anômalos, os CD7, CD13 e CD33. Em todos os casos que expressaram os CD13 e 33 foi realizado a MPO, a qual foi negativa. Em geral o CMF dos marcadores anômalos foi baixo. Tivemos 13/31 (42%) dos casos que não apresentaram nenhuma expressão anômala.

Através do teste de Spearman correlacionamos a expressão de CD45 com a de outros antígenos (CD19, CD10, CD20, HLA-DR, κ e λ) e os valores significativos estão representados na Tabela 10.

Tabela 10: Correlações significativas entre o CMF do CD45 e os CMF dos CD10, CD20 e λ de superfície e citoplasma dos pacientes com LLA B.

Marcadores	CD45	
	R	P
CD10	-0,61	0,0004
CD20	0,48	0,006
s Lambda	0,46	0,02
c Lambda	0,51	0,04

Analizando a expressão de CD45 entre os casos de LLA T e B através do teste Mann-Whitney, pudemos observar que não há diferença de expressão desse antígeno entre eles.

Analizamos as correlações entre a % e o CMF dos marcadores das LLA e vimos que a maior parte deles tiveram correlação, exceto o CD45 e o HLA-DR, como mostra a Tabela 11.

Tabela 11: Correlações entre a % e CMF dos marcadores das LLA, através do teste de Spearman:

Marcadores	R	P
CD45	0,33	0,08
CD19	0,50	0,002
CD10	0,76	0,00001
CD20	0,96	0,00001
s Kappa	1,0	
c Kappa	0,85	0,00001
s Lambda	0,99	0,00001
c Lambda	0,96	0,00001
CD3	0,99	0,00001
CD7	0,99	0,00001
HLA-DR	0,29	0,18

Obtivemos resultado de cariótipo de 13/31 (42%) dos casos, 10 foram normais, 2 com t(9;22) e 1 com del(11)(q23).

Conseguimos levantar dados de evolução de 26 pacientes. Destes 22 (84,6%) entraram em RC, 1 não entrou e os outros 3 (11,5%) morreram durante a indução.

- Análise de sobrevida

Na análise multivariada de Cox os parâmetros idade e CMF do CD45 foram fatores de pior prognóstico Tabela 12.

Tabela 12: Valores da análise multivariada de Cox:

	<i>P</i>	B	IC (95%)
Idade	0,02	0,0075	0,001-0,014
CMF CD45	0,02	0,0574	0,0073-0,0107

• LMA

Trinta e cinco casos foram classificados como LMA. O painel de triagem proposto foi capaz de identificar todas as LMA, mesmo assim o secundário foi realizado. Pela morfologia e citoquímica tivemos 8 LMA sem maturação, 10 LMA com maturação, 4 Leucemia Promielocítica, 12 Leucemia Mielomonocítica e 1 Leucemia Eritróide.

As características clínicas dos pacientes estão representadas na Tabela 13.

Tabela 13: Dados clínicos e hematológicos dos pacientes com LMA.

	Mediana	Variação
Idade	51	11-79
Masculino/Feminino	22/13	
Hemoglobina g/dl	8,0	4,0-13,0
Leucócitos x 10 ⁹ /l	16,7	0.8-150
Plaquetas x 10 ⁹ /l	61	11-271

Com relação à presença de populações de blastos, 29/35 (60%) tiveram apenas 1 população, 5/35 (%) tiveram 2 populações (1 M1, 3 M4 e 1 M5) e 1 (M6) teve 3 populações de blastos fenotipicamente diferentes, que estão representados na Tabela 14.

Tabela 14: Presença de populações de blastos com relação ao subtipo FAB.

		Populações			
		1	2	3	Total
FAB	M0	3			3
	M1	4	1		5
	M2	7			7
	M3	4			4
	M4	6	3		9
	M5	2	1		3
	M6			1	1
Total		26	5	1	32 *

*Em 3 casos, as lâminas estavam inadequadas para fazer a classificação FAB. Todos eles apresentaram somente 1 população de blastos.

Os casos que não tiveram classificação FAB, apresentaram os seguintes fenótipos:

- Caso 11 – CD45+, CD13+, CD15+, CD33+, HLA-DR+, CD56+ e MPO-
- Caso 27 - CD45+, CD13+, CD33+, CD34+ e MPO+
- Caso 30 - CD13+, CD33+, HLA-DR+ e CD14-

A Figura 8 mostra um exemplo de LMA com 1 população de blastos.

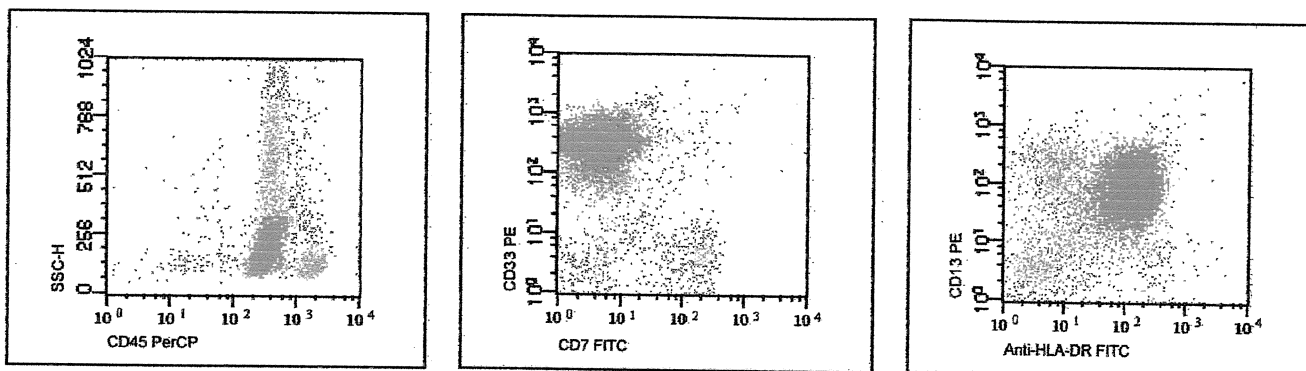


Figura 8: LMA com 1 população de blastos positivos para CD33, CD13 e HLA-DR.

A Figura 9 mostra uma caso de LMA com 2 populações de blastos.

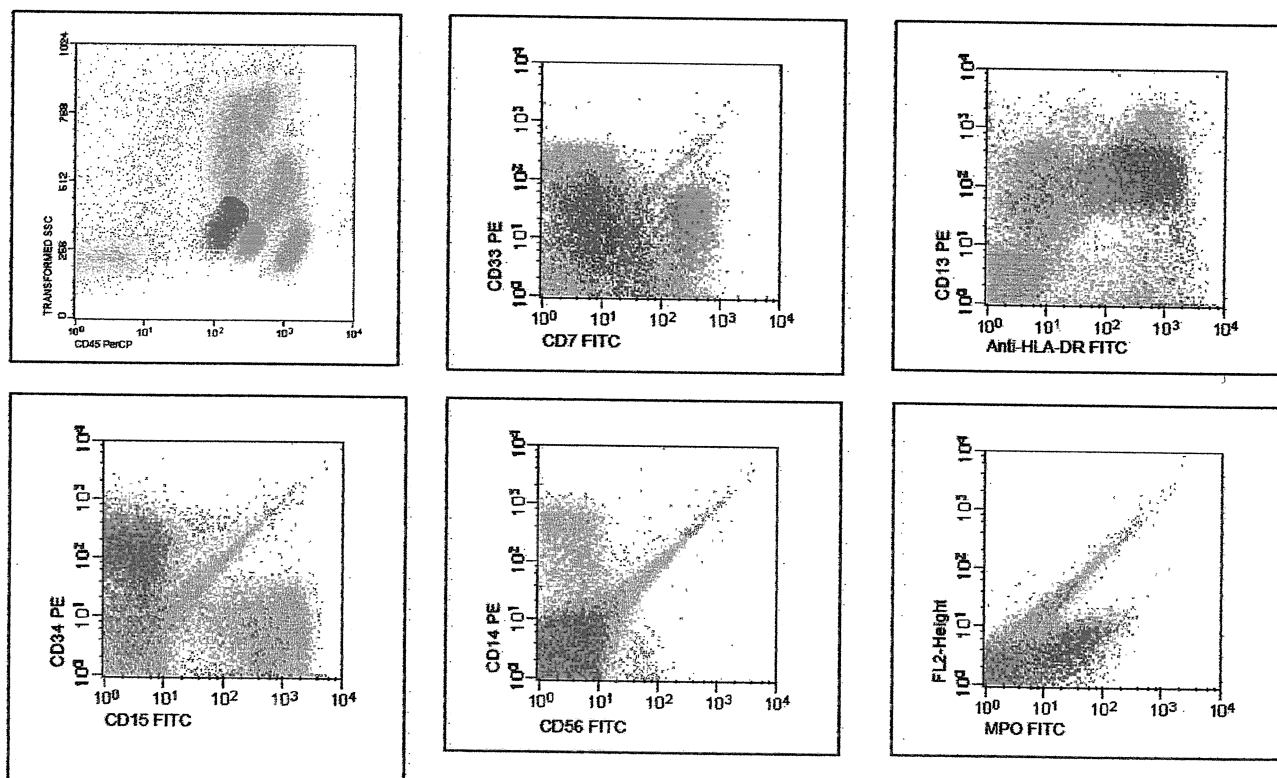


Figura 9: LMA com 2 populações de blastos. Onde a população vermelha tem expressão fraca de CD7 e CD33, forte de HLA-DR, CD13 e CD34 e positiva para MPO e população verde expressa mais CD7, HLA-DR, CD13 e CD34, o CD33 é fraco e negativa para MPO.

A Figura 10 mostra o caso de LMA com 3 populações de blastos.

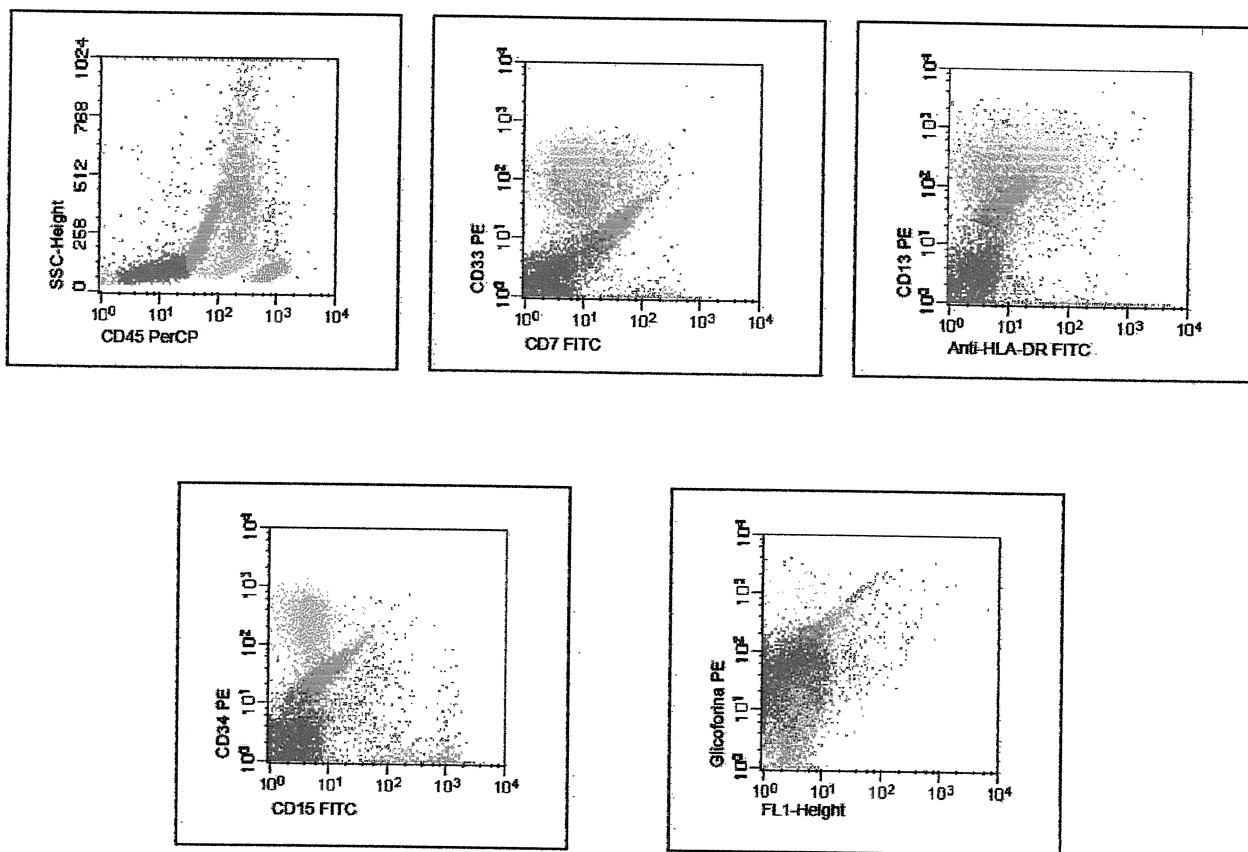


Figura 10: LMA FAB-M6 com 3 populações de blastos, onde a vermelha são os eritroblastos positivos para glicoforina, a verde tem SSC e CD45 característicos de pró-eritroblastos que além de expressarem glicoforina, são positivos para CD13, CD33 e CD34 e a amarela que está na janela de blastos (mieloblastos) e expressam CD13, HLA-DR, CD33, CD34 e pouca glicoforina.

O estudo da intensidade média de fluorescência dos marcadores mais expressos nessa leucemia está representado nas Tabelas 15 e 16, de acordo com a presença de populações de blastos.

Tabela 15: Intensidade de fluorescência e variação dos anticorpos expressos nos pacientes com LMA, que tiveram apenas 1 população de blastos, N = 29.

Marcadores	N	Mediana CMF (variação)
CD45*	27	188 (5-995)
CD13	28	122 (19-1116)
CD15	8	135 (32-264)
CD33	27	196 (27-4381)
MPO	18	62 (6-232)
CD14	8	228 (36-347)
CD56	10	29 (8-156)
CD7	4	83 (51-771)
CD34	19	262 (27-737)
HLA-DR	24	252 (65-2280)
CD19	1	91
CD2	1	131

N = número de casos em que foi encontrada expressão dos antígenos. * o CD45 não foi realizado em 2 casos.

Tabela 16: Intensidade de fluorescência e variação dos anticorpos expressos nos pacientes com LMA, que tiveram 2 populações de blastos, N = 5.

Marcadores	População 1		População 2	
	N	Mediana CMF (variação)	N	Mediana CMF (variação)
CD45	5	172 (72-776)	5	353 (157-637)
CD13	3	61 (41-205)	5	154 (60-241)
CD15	3	46 (33-171)	3	150 (98-186)
CD33	5	66 (32-427)	4	116 (35-161)
MPO	4	44 (32-115)	1	25
CD14	0	0	3	201 (195-239)
CD56	2	110 (77-143)	2	50 (32-69)
CD7	1	35	1	385
CD34	2	287 (171-403)	2	105 (11-199)
HLA-DR	5	637 (216-1235)	2	357 (209-506)
CD19	2	17 (14-20)	0	0
CD2	0	0	1	19

N = número de casos em que foi encontrada expressão dos antígenos.

O caso de LMA-M6 apresentou 3 populações de blastos com as seguintes características: População 1: CMF Glicof. A = 18; População 2: CMF Glicof. A = 45; População 3: %CD45 = 17, CMF CD45 = 49, CMF Glicof. A = 172, CMF CD2 = 16, CMF CD19 = 49.

Com relação aos fenótipos aberrantes, encontramos os seguintes resultados:

O CD7, considerado um marcador de imaturidade, foi expresso em 7/35 (20%) casos, sendo 2 M0, 1 M1 (populações 1 e 2), 1 M2, 2 M4 e na M6.

Os marcadores aberrantes de outras linhagens como o CD19 e o CD2 foram expressos em 4/35 (11%) casos. O CD19 em 1 M0 e 2 M4 (população 1) e na M6 (população 3) e o CD2 em 1 M0 (população 1), 1 M4 (população 2) e na M6 (população 3).

O marcador anômalo CD56, foi expresso em 13/35 (37%) casos (1 M0, 1 M1, 4 M2, 1 M3, 1 M4, 2 M5, na M6 e em 1 sem classificação FAB).

Com relação ao assincrinismo de maturação, 7/35 (20%) casos co-expressaram CD15/CD34 (1 M2, 4 M4 e 2 M5) e 8/35 (22%) casos co-expressaram CD34/CD56 (2 M0, 2 M2, 1 M5 e a M6).

A expressão de CD45 foi muito variada nos diversos tipos FAB, como mostra a Tabela 17.

Tabela 17: Intensidade de fluorescência e variação da expressão de CD45 nas LMA imaturas M0 e M1, nas M3 e nas maduras M2, M4 e M5.

LMA	Mediana CMF CD45 (Variação)
LMA imaturas	88 (5-306)
LMA M3	124 (72-183)
LMA maduras	209 (37-796)

Analisando a expressão de CD45 entre os tipos FAB, através do teste Kruskal-Wallis, pudemos observar que não há diferença de expressão entre os tipos.

As correlações significantes da expressão de CD45 com a expressão dos outros antígenos estão representadas na Tabela 18.

Tabela 18: Correlação entre o CMF de CD45 e os CMF dos CD14, CD15, CD33 dos pacientes com LMA.

Marcadores	CD45	
	R	P
CD14	0,46	0,003
CD15	0,33	0,03
CD33	0,62	0,0001

Correlacionando a porcentagem de positividade e o CMF de cada marcador, somente o CD45 não teve correlação entre sua % e o CMF, como mostra a Tabela 19:

Tabela 19: Correlações entre a % e CMF dos marcadores das LMA, através do teste de Spearman:

Marcadores	R	P
CD45	-0,12	0,51
CD13	0,45	0,006
CD14	0,99	0,00001
CD15	0,99	0,00001
CD33	0,62	0,00001
MPO	0,82	0,00001
CD34	0,91	0,00001
HLA-DR	0,42	0,01
CD56	0,91	0,00001

Obtivemos resultado de cariótipo em 23/35 (65%) casos. As alterações encontradas com relação ao subtipo FAB estão na Tabela 20.

Tabela 20: Resultado de cariótipo e alterações encontradas com relação ao subtipo FAB.

Cariótipo		
	N	FAB
Sem cariótipo	12	
Normal	14	
+11	1	M2
+21	1	M1
inv(16)	1	M4
t(8;21)	1	M2
t(9;22)	1	M0
t(8;21), -Y	1	M2
Normal, t(15;17)	1	M3
t(8;21), +8	1	M2
Del(11), t(1;11)	1	M4
Total	35	

O cariótipo foi estratificado conforme seu valor prognóstico pelos critérios da OMS e pode-se observar que o maior número de casos teve risco intermediário. Somente 1 M2, 1 M3 e 1 M4 apresentaram cariótipo de baixo risco, e 1 M0, 1 M1, 1 M2 e 1 M4 tiveram cariótipo de alto risco, como mostra a Tabela 21.

Tabela 21: Distribuição do valor prognóstico do cariótipo com relação ao subtipo FAB.

Cariótipo					
		Baixo Risco	Risco Intermediário	Alto Risco	Total
FAB	M0		1	1	2
	M1		4	1	5
	M2	1	5	1	7
	M3	1	1		2
	M4	1	2	1	4
	M5		2		2
	M6		1		1
Total		3	16	4	23

Análise de sobrevida

Análise de sobrevida pelo método Kaplan-Meier, para variáveis categóricas, mostrou uma diferença significativa para cariótipo estratificado de acordo com os grupos de risco definidos pelos critérios da OMS ($P=0,05$) (Figura 11).

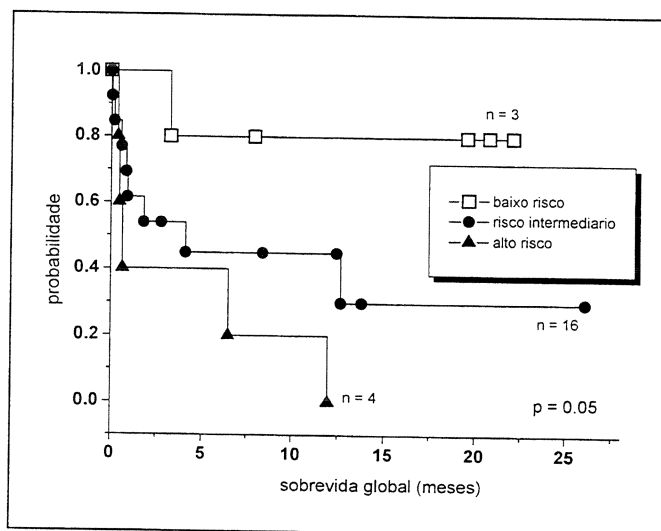


Figura 11: Curva de SG dos pacientes de acordo com o risco prognóstico do cariótipo.

A análise da expressão de CD14 teve valor prognóstico fraco ($P=0,07$) (Figura 12). Foi interessante notar que a sua expressão em uma das populações de blastos teve influência na SG. Todos os pacientes com CD14+ e CD34+ tiveram óbito.

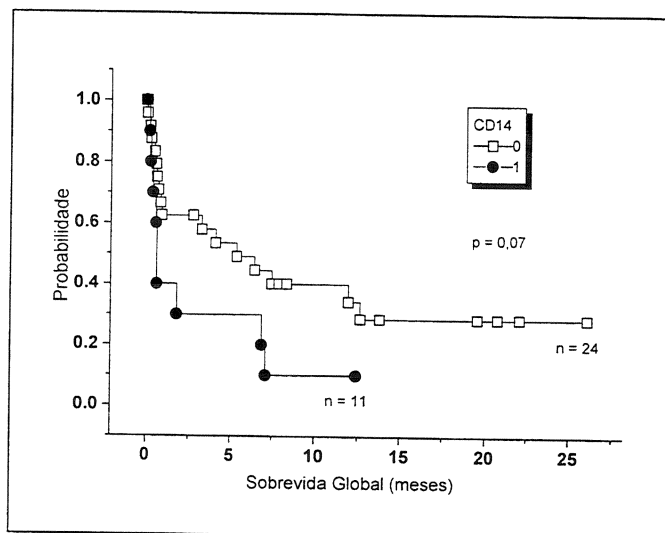


Figura 12: Curva de SG dos pacientes de acordo com a positividade de CD14 nas populações de blastos. 0 = CD14 negativo, 1 = CD14 positivo em uma das populações.

Comparando-se a SG dos casos que apresentaram apenas 1 população de blastos com aqueles onde se pode evidenciar 2 ou mais sub populações pelo método de Kaplan-Meier o valor de P não foi significativo ($P=0,29$). Porém observando-se a curva há uma tendência de que os casos com várias sub populações tenham melhor sobrevida a partir de 2 meses (Figura 13).

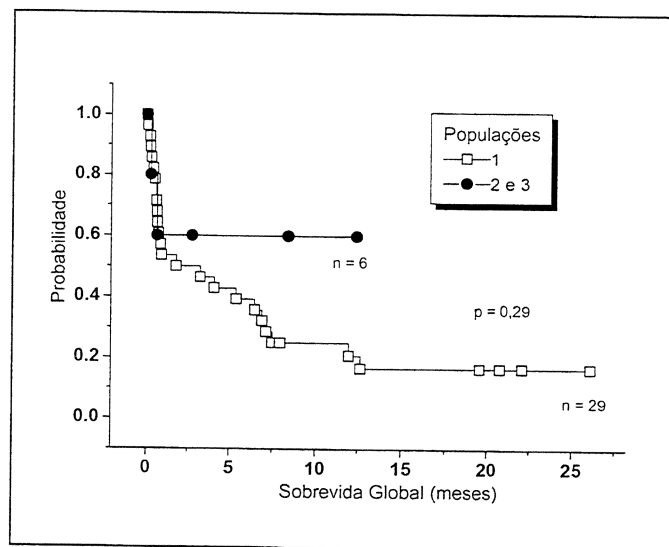


Figura 13: Curva de SG dos pacientes de acordo com a presença de populações de blastos fenotipicamente diferentes.

Os tipos FAB bem como a expressão de CD19, CD56 e MPO não tiveram influência na SG.

No modelo de Cox, a idade ($P=0,11$), número de leucócitos ao diagnóstico ($P=0,02$), cariótipo ($P=0,09$), o CMF de CD45 ($P=0,06$) e MPO ($P=0,08$) foram significantes na análise univariada. Na multivariada, somente o número de leucócitos e CMF do CD45 permaneceram como fatores prognósticos negativos, como mostra a Tabela 22.

Tabela 22: Valores da análise multivariada de Cox:

	P	B	IC (95%)
Leucócitos	0,03	0,0106	0,002-0,020
CMF CD45	0,05	0,0025	0,003-0,0048

Discussão

A imunofenotipagem por citometria de fluxo tem sido considerada uma técnica fundamental para o estudo das leucemias agudas.

Neste estudo fizemos o diagnóstico dessas doenças em duas etapas usando um painel de triagem e depois outros complementares para LLA B e LMA, com poucos anticorpos monoclonais. Estes foram escolhidos de acordo com a maior incidência em cada tipo de leucemia, no que diz respeito à linhagem, maturação e expressão aberrante.

Dois marcadores recomendados pela Primeira Conferência Latino-Americana de Consenso para Classificação Imunológica das Leucemias não foram usados, o TdT de imaturidade da linhagem linfóide e o CD79a específico da linhagem linfóide B.

Segundo PIEDRAS e colaboradores (2000) que fizeram um estudo desse painel, o TdT foi expresso em todos os casos de LLA T, assim como o CD3 citoplasmático e o CD7. O CD3, embora de superfície, e o CD7 também estavam no nosso painel. Por outro lado, o TdT foi positivo em 79% dos casos de LLA B, visto que os CD79a citoplasmático e o CD19 foram expressos em 100% e no nosso painel constava o CD19 que também foi expresso em todos os casos de LLA B. Portanto conseguimos fazer o diagnóstico dos dois tipos de leucemias sem o TdT e o CD79a, embora talvez a maior importância do CD79a seja na classificação da leucemia bifenotípica, porque sua pontuação é maior do que a do CD19 no “score” de classificação.

Em 80% dos casos de LLA T foi possível definir a linhagem celular com o painel de triagem, concluindo o diagnóstico para inclusão dos pacientes nos protocolos de tratamento.

O CD3 de superfície e o CD7 foram suficientes para diagnosticá-las, visto que em apenas um caso foi necessário fazer o CD3 intracitoplasmático.

O fenótipo aberrante mais encontrado nessa leucemia foi o marcador de linhagem cruzada, CD13 (80%), embora fracamente expresso. Outros autores encontraram expressão desse marcador em cerca de 50% dos casos (BABUSIKOVA e TOMOVA, 2002; GARCIA VELA et al., 2000).

Seria necessário um número maior de casos para estudarmos parâmetros prognósticos, o que não foi possível devido à baixa incidência dessa leucemia em adultos.

Com o painel de triagem foi possível definir a linhagem celular de 61% das LLA B e em todos os casos concluímos o diagnóstico com o painel secundário, que foi muito útil para a confirmação da linhagem e classificação imunológica das mesmas, apesar de ainda termos dificuldade de classificar alguns casos em que não foram realizadas as imunoglobulinas, principalmente de citoplasma que acabaram sendo fundamentais e agora foram incluídas na rotina do laboratório. De um modo geral, o painel utilizado mostrou efetividade no diagnóstico e capacidade de encaminhar tratamento.

Os marcadores de linhagem cruzada encontrados em 54% dessas leucemias apresentaram expressão fraca. Entre eles estão o CD7 (6%) além de CD13 (35%) e CD33 (38%). DEN BOER e colaboradores (1999) descreveram expressão de marcadores mielóides em 36% das LLA B e T. Já GARCÍA VELA e colaboradores (2000) observaram em 47% dos casos de LLA B expressão desses marcadores, sendo 85% de CD13 e 75% de CD33.

Os blastos leucêmicos linfóides expressaram mais CD45 e CD19 do que os linfócitos T e B normais (HENDRICKX e BOSSUYT, 2001; RIBEIRO et al., 2005). No trabalho de HENDRICKX e BOSSUYT (2001) a intensidade do CD45 foi obtida por outro método, usando beads. Isto pode explicar tal resultado. Mas no de RIBEIRO e colaboradores (2005) eles usaram o mesmo equipamento e programa que no nosso trabalho para medirem a intensidade do CD19.

A expressão de CD19 nas células blásticas das LLA B, teve uma mediana de intensidade de fluorescência (80) maior que os linfócitos normais e seu valor mínimo (19) foi inferior e o máximo (426) foi bem maior, quando comparados com os linfócitos imaturos normais que apresentaram mediana de 52 variando de 30 a 104. Os linfócitos maduros normais tiveram mediana de 49, variando de 44 a 187, (RIBEIRO et al., 2005). Com isso pudemos observar que os blastos tanto podem ter deficiência como super expressão desse marcador.

O CD45 teve correlação inversa com o CD10. Isso se explica com a maturação celular. A medida que as células amadurecem, ganham CD45 e perdem CD10.

O modelo de Cox, usando a análise multivariada, definiu que a idade e o CMF do CD45 são fatores de pior prognóstico para a sobrevida desses pacientes.

A idade é um dos fatores prognósticos mais importantes nas leucemias agudas (RILEY et al., 2002). Levando em consideração que uma porcentagem maior de crianças com LLA B (95%) entram em RC do que a de adultos (60-85%) (BRUNNING et al., 2001).

Alguns autores como (BEHM et al., 1992; BOROWITZ et al., 1997; NAKAMURA et al., 2001; RILEY et al., 2002) consideram a expressão de CD45 como um fator de pior prognóstico nas LLA B e nós pudemos comprovar isso no nosso estudo através da análise de Cox. O papel biológico do CD45 ainda não está bem elucidado. Acredita-se que ele induza apoptose nos linfócitos B normais (KLAUS et al., 1996) e que a perda do CD45 contribua para um subgrupo funcional e imunologicamente diferente de LLA B com regulação alterada do crescimento celular, apoptose, diferenciação e ativação celular (RATEI et al., 1998). E essa perda tem sido associada com uma excelente resposta à quimioterapia com múltiplas drogas (RILEY et al., 2002).

O painel de triagem foi suficiente para definir a linhagem de todos os casos de LMA. Os CD13 e CD33 foram suficientes para diagnosticá-las e o painel secundário foi útil para a classificação FAB e imunológica e para o estudo dos fenótipos aberrantes, inclusive CD56 e CD2.

Os fenótipos aberrantes encontrados foram os marcadores de linhagem cruzada, o CD56 (37%), CD19 e CD2 (11%), o marcador de imaturidade CD7 (20%) e assincronismo de maturação CD34/CD15 (20%) e CD34/CD56 (22%), mas nenhum deles mostrou importância prognóstica.

DI BONA et al. (2002) encontraram o CD56 positivo em 22% dos casos de LMA por eles estudados, semelhante também a vários outros estudos onde o CD56 poderia ser expresso em 16 a 24% das LMA. Segundo a literatura, o CD7 é o antígeno de linhagem linfóide mais observado na LMA e o CD2 apresenta igual incidência, seguidos do CD19 e outros. BRADSTOCK e colaboradores (1994) encontraram o CD7 em 28%, o CD2 em 16% e o CD19 em 7% dos casos de LMA estudados. Nos casos com CD2 e CD7 positivos, a resposta dos pacientes ao tratamento, foi pior. LAUNDER e colaboradores (1996) observaram a presença do CD7 em 44%, do CD2 em 38% e do CD19 em 13% das LMA.

Deve-se lembrar que essas discrepâncias nas porcentagens de casos positivos para os marcadores em geral, seu valor prognóstico e fenótipos aberrantes encontrados, se devem ao fato de que os estudos não são realizados da mesma maneira em todos os serviços, variando o tipo de análise e anticorpos usados, o número de casos e as características dos pacientes estudados.

A presença de sub populações foi praticamente restrita às LMA. Nos 6 casos que apresentaram 2 ou mais sub populações, o CD45 geralmente teve expressão mais forte na população 2, assim como CD13 e CD33. Já o CD34 e HLA-DR tiveram menor expressão nessa população. Esses achados sugerem que a população 2 representa um estágio mais maduro que a população 1, mas a expressão de CD15 e MPO, não corroboram com essa hipótese, pois foram menos expressos na população 2. Portanto, a população 2 poderia ainda ser um estágio mais maduro que a 1, mas apresentar uma deficiência de expressão de um antígeno. Os CD14 e CD56 tiveram praticamente a mesma expressão nas duas populações. A detecção de 2 populações fenotipicamente diferentes é importante quando se pensa na quimioterapia, que pode selecionar apenas uma delas e a DRM ou recaída podem ser diferentes do diagnóstico se analisadas da maneira tradicional, onde não se separa as sub populações através da expressão do CD45 e considera a positividade do marcador somente baseada na porcentagem. A presença de sub populações foi mais encontrada nos subtipos FAB M4 e M5, no entanto, não teve associação com prognóstico como mostrou a curva de Kaplan-Meier, devido ao fato de serem poucos casos e também não sabemos se outros parâmetros estão influenciando ou não, por não ter entrado na análise de Cox.

A citogenética é um fator prognóstico bem definido no diagnóstico da LMA (GRIMWADE et al., 1998; PELLOSO et al., 2003) e pudemos confirmar isso, nas nossas amostras, quando analisamos o impacto risco do cariótipo na sobrevida dos pacientes.

O número de leucócitos ao diagnóstico é considerado um fator de prognóstico desfavorável. O mesmo se repetiu nas nossas amostras.

Comparando os diagnósticos pelo critério FAB, baseado na morfologia e citoquímica, a discrepância mais importante foi vista nos casos com componente monocítico. Outros autores também encontraram diferenças entre as expressões de alfa-naftil-acetato esterase (ANAE) e CD14 em até 26% dos casos. FERGEDAL e colaboradores (1998) observaram ausência da expressão de CD14 em 15% dos casos. Entre os nossos pacientes, dos 12 casos diagnosticados como FAB M4 e M5, somente 8 expressaram CD14. Portanto tivemos deficiência de CD14 em 33% dos casos. O CD14 também pode ser expresso nos tipos FAB M0, M1 e M2. Porém, nos nossos casos, assim como em outros trabalhos (FERGEDAL et al., 1998), o CD14 teve mais influência prognóstica que a ANAE. A expressão de CD14 está associada à resistência a múltiplas drogas, segundo um estudo

realizado por NORGAARD e colaboradores (2001), onde eles observaram que, *in vitro*, as células leucêmicas de pacientes com LMA M4 e M5, com alta porcentagem de positividade para o CD14 eram mais resistentes a várias drogas, como Ara-C, daunorrubicina e outras, o que pode justificar sua associação com um pior prognóstico. Enfim, todos esses fatos podem ser responsáveis pelos resultados conflitantes sobre a sobrevida na LMA com componente monocítico. Essas controvérsias dificultam a escolha de qual é o melhor método de se identificar as leucemias com diferenciação monocítica.

DUNPHY et al. (2004) analisaram a expressão de vários antígenos associados com a linhagem monocítica, tais como, CD11b, CD14, CD15 e CD64 nas células positivas para ANAE. Eles demonstraram que, além da variação de expressão dos antígenos monocíticos de acordo com a maturação celular, há uma deficiência parcial ou completa de um ou mais deles. Isso também ocorre com a MPO na linhagem granulocítica. Em nossos pacientes, cerca de 30% dos casos não expressaram MPO, bem como em outros trabalhos (MATSUO et al., 2003, PEFFAULT DE LATOUR et al., 2003) que também observaram a perda de expressão dessa enzima.

Podemos discutir então qual é a melhor técnica para identificação da linhagem mielóide incluindo a monocítica, se é através da citoquímica, mieloperoxidase, que é considerada o padrão ouro para detecção da LMA em muitos laboratórios, mas que, no entanto, não é expressa nas M0 e M7, podendo dar um resultado falso negativo ou se é através da citometria de fluxo onde vários outros marcadores podem ser estudados ao mesmo tempo, confirmando a linhagem. Segundo PEFFAULT DE LATOUR e colaboradores (2003) a citometria é mais sensível do que a citoquímica para detecção de MPO. Basta ajustar a porcentagem em que as células são consideradas positivas, pois a citometria preconiza 10% e a citoquímica 3%. Já DUNPHY e colaboradores (2004), ainda preferem o estudo da série monocítica através da citoquímica, visto que há variação na expressão dos marcadores durante a maturação celular. Se considerarmos que a citometria seja mais sensível e que podemos usar vários marcadores ao mesmo tempo, conseguiremos estudar a linhagem monocítica com mais segurança por esse método.

O CD45 teve correlação positiva com os CD14, CD15, CD33 e negativa com CD34. Isso indica que o CD45 está relacionado com a maturidade dos blastos (METZE et al., 2005).

Pouco se sabe sobre o valor prognóstico do CD45 na LMA. Mas no modelo de Cox, analisando o CMF do CD45 dos nossos pacientes, evidenciamos um fator prognóstico independente de menor sobrevida, associado com o número de leucócitos ao diagnóstico. Talvez uma explicação seja sua relação com resistência a drogas como citaram RILEY e colaboradores (2002).

A análise no Paint-a-gate nos proporcionou uma melhor visualização das populações blásticas, podendo identificar a presença de sub populações, observar a forma de expressão de cada marcador e sua positividade quanto à porcentagem e intensidade de fluorescência, pela qual pudemos detectar parâmetros prognósticos. A presença de sub populações não influenciou na sobrevida, mas eles podem dificultar estudos de DRM, por citometria de fluxo, pois a quimioterapia pode selecionar uma das sub populações.

Os antígenos tem distribuições diferentes nas leucemias, o que pode tornar inadequada a análise apenas por porcentagem de células positivas, mesmo quando tiver distribuição unimodal, pois a intensidade de fluorescência pode ser baixa, sobrepondo a população de células do controle negativo, o que torna o resultado de valor numérico não apropriado. A intensidade de fluorescência descreve melhor a distribuição dos antígenos nas células leucêmicas (BOROWITZ et al., 1997). Através da análise da intensidade de fluorescência, que é uma nova abordagem, onde se pode ter uma melhor noção de como e quanto os antígenos são expressos pelas células e ainda conseguimos encontrar fatores prognósticos que não encontramos pela porcentagem, principalmente o CD45 que não teve correlação entre porcentagem e CMF tanto nas leucemias linfóides quanto nas mielóides.

Encontramos algumas limitações nas análises estatísticas devido ao número de pacientes ser pequeno, outros estudos com maior número de casos devem ser realizados a fim de confirmar tais achados.

Sugerimos que as análises realizadas através da citometria de fluxo sejam encaradas de maneira mais ampla e moderna, quebrando o paradigma da análise apenas pela porcentagem, que também é importante, mas não em todas as situações.

Conclusões

1. O uso de um painel racionalizado foi suficiente para diagnosticar as linhagens das leucemias agudas na maioria dos casos.
2. Através da análise no Paint-a-gate pudemos observar quais foram as expressões anômalas mais presentes em cada tipo de leucemia aguda e a presença de sub populações de blastos.
3. O nosso estudo serviu para esclarecer divergências na literatura sobre o prognóstico de LMA com componente monocítico. CD14 e não ANAE discrimina prognóstico. Pudemos comparar os resultados obtidos através da imunofenotipagem com os critérios FAB, principalmente no que se diz respeito à linhagem monocítica.
4. Observamos que a análise da intensidade de fluorescência dos marcadores pode ajudar a determinar fatores prognósticos, principalmente o CD45.
5. Confirmamos alguns fatores prognósticos já conhecidos, como idade e CD45 nas LLA B e citogenética e número de leucócitos nas LMA e encontramos outros, como o CD14, discutido na literatura e o CD45, ainda pouco esclarecido na LMA.

Referências Bibliográficas

1. BABUSIKOVA, O.;TOMOVA, A. The analogy in cell immunophenotype and parameters of cell cycle of ectopic thymus, normal thymus, and some acute lymphoblastic leukemia of T-phenotype. **Neoplasma**, 49: 312-8, 2002.
2. BAER M.R.; STEWART C.C.; DODGE R.K.; LEGET G.; SULE N.; MROZEK K.; SCHIFFER C.A.; POWELL B.L.; KOLITZ J.E.; MOORE J.O.; STONE R.M.; DAVEY F.R.; CARROLL A.J.; LARSON R.A.; BLOOMFIELD C.D. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). **Blood**, 97: 3574-3580, 2001.
3. BAHIA, D.M.;YAMAMOTO, M.;CHAUFFAILLE MDE, L.;KIMURA, E.Y.;BORDIN, J.O.;FILGUEIRAS, M.A.;KERBAUY, J. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and its clinical significance. **Haematologica**, 86: 801-6, 2001.
4. BALL, E.D.;DAVIS, R.B.;GRIFFIN, J.D.;MAYER, R.J.;DAVEY, F.R.;ARTHUR, D.C.;WURSTER-HILL, D.;NOLL, W.;ELGHETANY, M.T.;ALLEN, S.L.;ET AL. Prognostic value of lymphocyte surface markers in acute myeloid leukemia. **Blood**, 77: 2242-50, 1991.
5. BASSO, G.;BULDINI, B.;DE ZEN, L.;ORFAO, A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. **Haematologica**, 86: 675-92, 2001.
6. BEHM, F.G.;RAIMONDI, S.C.;SCHELL, M.J.;LOOK, A.T.;RIVERA, G.K.;PUI, C.H. Lack of CD45 antigen on blast cells in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with chromosomal hyperdiploidy and other favorable prognostic features. **Blood**, 79: 1011-6, 1992.
7. BENE M.C. Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunol Lett*, 98: 9-21, 2005.
8. BOROWITZ, M.J.;SHUSTER, J.;CARROLL, A.J.;NASH, M.;LOOK, A.T.;CAMITTA, B.;MAHONEY, D.;LAUER, S.J.;PULLEN, D.J. Prognostic significance of fluorescence intensity of surface marker expression in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. A Pediatric Oncology Group Study. **Blood**, 89: 3960-6, 1997.
9. BOUCHEIX, C.;DAVID, B.;SEBBAN, C.;RACADOT, E.;BENE, M.C.;BERNARD, A.;CAMPOS, L.;JOUAULT, H.;SIGAUX, F.;LEPAGE, E.;ET AL. Immunophenotype of adult acute lymphoblastic leukemia, clinical parameters, and outcome: an analysis of a prospective

- trial including 562 tested patients (LALA87). French Group on Therapy for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**, 84: 1603-12, 1994.
10. BOUE, D.R.;LEBIEN, T.W. Expression and structure of CD22 in acute leukemia. **Blood**, 71: 1480-6, 1988.
 11. BRADSTOCK, K.;MATTHEWS, J.;BENSON, E.;PAGE, F.;BISHOP, J. Prognostic value of immunophenotyping in acute myeloid leukemia. Australian Leukaemia Study Group. **Blood**, 84: 1220-5, 1994.
 12. BRADSTOCK, K.F.;KIRK, J.;GRIMSLEY, P.G.;KABRAL, A.;HUGHES, W.G. Unusual immunophenotypes in acute leukaemias: incidence and clinical correlations. **Br J Haematol**, 72: 512-8, 1989.
 13. BRUNNING R.D.;MATUTES E.;HARRIS N.L.;FLANDRIN G.;VARDIMAN J.;BENNETT J.;HEAD D. Acute Myeloid Leukaemias. In: JAFFE E.S.;HARRIS N.L.;STEIN H.;VARDIMAN J.W. **Pathology and Genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. World Health Organization Classification of Tumours, 3. Lyon, IARC Press: 2001. 79-107.
 14. BRUNNING R.D.;MATUTES E.;HARRIS N.L.;FLANDRIN G.;VARDIMAN J.;BENNETT J.;HEAD D. Precursor B-cell and T-cell neoplasms. In: JAFFE E.S.;HARRIS N.L.;STEIN H.;VARDIMAN J.W. **Pathology and Genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. World Health Organization Classification of Tumours, 3. Lyon: IARC Press, 2001. 111-17.
 15. CALDWELL, C.W.;PATTERSON, W.P.;TOALSON, B.D.;YESUS, Y.W. Surface and cytoplasmic expression of CD45 antigen isoforms in normal and malignant myeloid cell differentiation. **Am J Clin Pathol**, 95: 180-7, 1991.
 16. CAMPANA, D.;BEHM, F.G. Immunophenotyping of leukemia. **J Immunol Methods**, 243: 59-75, 2000.
 17. CARTER, R.H.;WANG, Y.;BROOKS, S. Role of CD19 signal transduction in B cell biology. **Immunol Res**, 26: 45-54, 2002.

18. CASCAVILLA, N.;MUSTO, P.;D'ARENA, G.;LADOGANA, S.;MATERA, R.;CAROTENUTO, M. Adult and childhood acute lymphoblastic leukemia: clinico-biological differences based on CD34 antigen expression. **Haematologica**, 82: 31-7, 1997.
19. CHANG, H.;SALMA, F.;YI, Q.;PATTERSON, B.;BRIEN, B.;MINDEN, M.D. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. **Leuk Res**, 28: 43-8, 2004.
20. CLAXTON, D.F.;READING, C.L.;NAGARAJAN, L.;TSUJIMOTO, Y.;ANDERSSON, B.S.;ESTEY, E.;CORK, A.;HUH, Y.O.;TRUJILLO, J.;DEISSEROTH, A.B. Correlation of CD2 expression with PML gene breakpoints in patients with acute promyelocytic leukemia. **Blood**, 80: 582-6, 1992.
21. DELGADO, J.;MORADO, M.;JIMENEZ, M.C.;GARCIA-GRANDE, A.;HERNANDEZ-NAVARRO, F. CD56 expression in myeloperoxidase-negative FAB M5 acute myeloid leukemia. **Am J Hematol**, 69: 28-30, 2002.
22. DEN BOER M.L.; KAPAUN P.; PIETERS R.; KAZEMIER K.M.; JANKA-SCHAUB G.E.;VEERMAN A.J. Myeloid antigen co-expression in childhood acute lymphoblastic leukaemia: relationship with in vitro drug resistance. **Br J Haematol**, 105: 876-882, 1999.
23. DI BONA, E.;SARTORI, R.;ZAMBELLO, R.;GUERCINI, N.;MADEO, D.;RODEGHIERO, F. Prognostic significance of CD56 antigen expression in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, 87: 250-6, 2002.
24. DUNPHY, C.H.;ORTON, S.O.;MANTELL, J. Relative contributions of enzyme cytochemistry and flow cytometric immunophenotyping to the evaluation of acute myeloid leukemias with a monocytic component and of flow cytometric immunophenotyping to the evaluation of absolute monocytoses. **Am J Clin Pathol**, 122: 865-74, 2004.
25. DUNPHY, C.H.;POLSKI, J.M.;EVANS, H.L.;GARDNER, L.J. Evaluation of bone marrow specimens with acute myelogenous leukemia for CD34, CD15, CD117, and myeloperoxidase. **Arch Pathol Lab Med**, 125: 1063-9, 2001.

26. FERGEDAL, M.;ASTROM, M.;TIDEFELT, U.;KARLSSON, M.G. Differences in CD14 and alpha-naphthyl acetate esterase positivity and relation to prognosis in AML. **Leuk Res**, 22: 25-30, 1998.
27. GARCIA VELA, J.A.;MONTESERIN, M.C.;DELGADO, I.;BENITO, L.;ONA, F. Aberrant immunophenotypes detected by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma**, 36: 275-84, 2000.
28. GRIMWADE, D.;WALKER, H.;OLIVER, F.;WHEATLEY, K.;HARRISON, C.;HARRISON, G.;REES, J.;HANN, I.;STEVENS, R.;BURNETT, A.;GOLDSTONE, A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. **Blood**, 92: 2322-33, 1998.
29. HANSON, C.A.;GAJL-PECZALSKA, K.J.;PARKIN, J.L.;BRUNNING, R.D. Immunophenotyping of acute myeloid leukemia using monoclonal antibodies and the alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase technique. **Blood**, 70: 83-9, 1987.
30. HENDRICKX, A.;BOSSUYT, X. Quantification of the leukocyte common antigen (CD45) in mature B-cell malignancies. **Cytometry**, 46: 336-9, 2001.
31. HOELZER, D.;THIEL, E.;LOFFLER, H.;BUCHNER, T.;GANSER, A.;HEIL, G.;KOCH, P.;FREUND, M.;DIEDRICH, H.;RUHL, H.;ET AL. Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. **Blood**, 71: 123-31, 1988.
32. KAWANO, S.;TATSUMI, E.;YONEDA, N.;YAMAGUCHI, N. Pattern of expression of CD45 RA/RO isoformic antigens in acute myeloblastic leukemia cells. **Am J Clin Pathol**, 100: 386-93, 1993.
33. KLAUS S.J.;SIDORENKO S.P.;CLARK E.A. CD45 ligation induces cell death in T and B lymphocytes. **J Immunol**, 156: 2743-2753, 1996.
34. KRAGULJAC, N.;MARISAVLJEVIC, D.;JANKOVIC, G.;RADOSEVIC, N.;PANTIC, M.;DONFRID, M.;MILETIC, N.;BOSKOVIC, D.;COLOVIC, M. Characterization of CD13 and CD33 surface antigen-negative acute myeloid leukemia. **Am J Clin Pathol**, 114: 29-34, 2000.

35. LACOMBE, F.;DURRIEU, F.;BRIAIS, A.;DUMAIN, P.;BELLOC, F.;BASCANS, E.;REIFFERS, J.;BOISSEAU, M.R.;BERNARD, P.H. Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. **Leukemia**, 11: 1878-1886, 1997.
36. LAUNDER, T.M.;BRAY, R.A.;STEMPORA, L.;CHENGGIS, M.L.;FARHI, D.C. Lymphoid-associated antigen expression by acute myeloid leukemia. **Am J Clin Pathol**, 106: 185-91, 1996.
37. LEGRAND, O.;PERROT, J.Y.;BAUDARD, M.;CORDIER, A.;LAUTIER, R.;SIMONIN, G.;ZITTOUN, R.;CASADEVALL, N.;MARIE, J.P. The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. **Blood**, 96: 870-7, 2000.
38. LEMMERS, B.;ARNOULET, C.;FOSSAT, C.;CHAMBOST, H.;SAINTY, D.;GABERT, J.;SCHIFF, C. Fine characterization of childhood and adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) by a proB and preB surrogate light chain-specific mAb and a proposal for a new B cell ALL classification. **Leukemia**, 14: 2103-11, 2000.
39. LOOK, A.T. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. **Science**, 278: 1059-64, 1997.
40. LUCIO, P.;GAIPA, G.;VAN LOCHEM, E.G.;VAN WERING, E.R.;PORWIT-MACDONALD, A.;FARIA, T.;BJORKLUND, E.;BIONDI, A.;VAN DEN BEEMD, M.W.;BAARS, E.;VIDRIALES, B.;PARREIRA, A.;VAN DONGEN, J.J.;SAN MIGUEL, J.F.;ORFAO, A. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-1 Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation. **Leukemia**, 15: 1185-92, 2001.
41. MARTINS, S.L.;FALCAO, R.P. [Importance of immunophenotyping of leukemia myelocytic acute]. **Rev Assoc Med Bras**, 46: 57-62, 2000.
42. MATSUO, T.;KURIYAMA, K.;MIYAZAKI, Y.;YOSHIDA, S.;TOMONAGA, M.;EMI, N.;KOBAYASHI, T.;MIYAWAKI, S.;MATSUSHIMA, T.;SHINAGAWA, K.;HONDA, S.;OHNO, R. The percentage of myeloperoxidase-positive blast cells is a strong independent

- prognostic factor in acute myeloid leukemia, even in the patients with normal karyotype. **Leukemia**, 17: 1538-43, 2003.
43. METZE K.;SILVA R.C.;ADAM R.A.;LEITE N.J.;PEREIRA F.G.;LORAND-METZE I. Relation between chromatin texture and phenotype in acute leukemias. **Cellular Oncology**, 27: 112, 2005.
 44. MITELMAN F. ISCN: Ann International System for Human Cytogenetics Nomenclature. Basel: Karger, 1995.
 45. MIYACHI, H.;TANAKA, Y.;GONDO, K.;KAWADA, T.;KATO, S.;SASAO, T.;HOTTA, T.;OSHIMA, S.;ANDO, Y. Altered expression of CD45 isoforms in differentiation of acute myeloid leukemia. **Am J Hematol**, 62: 159-64, 1999.
 46. NAKAMURA, A.;TSURUSAWA, M.;KATO, A.;TAGA, T.;HATAE, Y.;MIYAKE, M.;MIMAYA, J.;ONODERA, N.;WATANABE, A.;WATANABE, T.;KANEGANE, H.;MATSUSHITA, T.;IWAI, A.;HYAKUNA, N.;GUSHI, K.;KAWAKAMI, T.;SEKINE, I.;IZICHI, O.;ASAMI, K.;KIKUTA, A.;TANAKA, A.;FUJIMOTO, T. Prognostic impact of CD45 antigen expression in high-risk, childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Lymphoma**, 42: 393-8, 2001.
 47. NORGAARD, J.M.;OLESEN, L.H.;OLESEN, G.;MEYER, K.;KRISTENSEN, J.S.;BENDIX, K.;PEDERSEN, B.;KJELDSSEN, E.;HOKLAND, P. FAB M4 and high CD14 surface expression is associated with high cellular resistance to Ara-C and daunorubicin: implications for clinical outcome in acute myeloid leukaemia. **Eur J Haematol**, 67: 221-9, 2001.
 48. OGATA, K.;YOKOSE, N.;SHIOI, Y.;ISHIDA, Y.;TOMIYAMA, J.;HAMAGUCHI, H.;YAGASAKI, F.;BESSYO, M.;SAKAMAKI, H.;DAN, K.;KURIYA, S. Reappraisal of the clinical significance of CD7 expression in association with cytogenetics in de novo acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol**, 115: 612-5, 2001.
 49. PAGNANO, K.B.;TRAINA, F.;TAKAHASHI, T.;OLIVEIRA, G.B.;ROSSINI, M.S.;LORAND-METZE, I.;VIGORITO, A.C.;MIRANDA, E.C.;DE SOUZA, C.A. Conventional chemotherapy for acute myeloid leukemia: a Brazilian experience. **Sao Paulo Med J**, 118: 173-8, 2000.

50. PEFFAULT DE LATOUR, R.;LEGRAND, O.;MOREAU, D.;PERROT, J.Y.;BLANC, C.M.;CHAOUI, D.;CASADEVALL, N.;MARIE, J.P. Comparison of flow cytometry and enzyme cytochemistry for the detection of myeloperoxydase in acute myeloid leukaemia: interests of a new positivity threshold. **Br J Haematol**, 122: 211-6, 2003.
51. PELLOSO, L.A.;CHAUFFAILLE MDE, L.;GHANAME, F.S.;YAMAMOTO, M.;BAHIA, D.M.;KERBAUY, J. [Karyotype in acute myeloid leukemia: importance and type of aberrations in 30 patients at diagnosis]. **Rev Assoc Med Bras**, 49: 150-5, 2003.
52. PEZZUTTO, A.;RABINOVITCH, P.S.;DORKEN, B.;MOLDENHAUER, G.;CLARK, E.A. Role of the CD22 human B cell antigen in B cell triggering by anti-immunoglobulin. **J Immunol**, 140: 1791-5, 1988.
53. PIEDRAS, J.;BARRALES-BENITEZ, O.;LOPEZ-KARPOVITCH, X. [Classification of acute leukemias according to the first latin-american consensus conference for the immunophenotyping of leukemias]. **Rev Invest Clin**, 52: 524-8, 2000.
54. PUI, C.H.;RAIMONDI, S.C.;HEAD, D.R.;SCHELL, M.J.;RIVERA, G.K.;MIRRO, J., JR.;CRIST, W.M.;BEHM, F.G. Characterization of childhood acute leukemia with multiple myeloid and lymphoid markers at diagnosis and at relapse. **Blood**, 78: 1327-37, 1991.
55. RASPADORI, D.;LAURIA, F.;VENTURA, M.A.;RONDELLI, D.;VISANI, G.;DE VIVO, A.;TURA, S. Incidence and prognostic relevance of CD34 expression in acute myeloblastic leukemia: analysis of 141 cases. **Leuk Res**, 21: 603-7, 1997.
56. RATEI, R.;SPERLING, C.;KARAWAJEW, L.;SCHOTT, G.;SCHRAPPE, M.;HARBOTT, J.;RIEHM, H.;LUDWIG, W.D. Immunophenotype and clinical characteristics of CD45-negative and CD45-positive childhood acute lymphoblastic leukemia. **Ann Hematol**, 77: 107-14, 1998.
57. RIBEIRO E.;SUDÓN S.M.;SANTIAGO M.;LIMA C.S.P.;METZE K.;GIRALT M.;SAAD S.T.O.;ORFAO A.; LORAND-METZE I. Maturation-associated immnophenotypic abnormalities in bone marrow b-lymphocytes in myelodysplastic syndromes **Leukemia Research**, 2005 in press.

58. REGO, E.M.;GARCIA, A.B.;CARNEIRO, J.J.;FALCAO, R.P. Immunophenotype of normal and leukemic bone marrow B-precursors in a Brazilian population. A comparative analysis by quantitative fluorescence cytometry. **Braz J Med Biol Res**, 34: 183-94, 2001.
59. REGO, E.M.;TONE, L.G.;GARCIA, A.B.;FALCAO, R.P. CD10 and CD19 fluorescence intensity of B-cell precursors in normal and leukemic bone marrow. Clinical characterization of CD10(+strong) and CD10(+weak) common acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res**, 23: 441-50, 1999.
60. REPP, R.;SCHAEKEL, U.;HELM, G.;THIEDE, C.;SOUCEK, S.;PASCHEBERG, U.;WANDT, H.;AULITZKY, W.;BODENSTEIN, H.;SONNEN, R.;LINK, H.;EHNINGER, G.;GRAMATZKI, M. Immunophenotyping is an independent factor for risk stratification in AML. **Cytometry**, 53B: 11-9, 2003.
61. REZAEI, A.;ADIB, M.;MOKARIAN, F.;TEBIANIAN, M.;NASSIRI, R. Leukemia markers expression of peripheral blood vs bone marrow blasts using flow cytometry. **Med Sci Monit**, 9: CR359-62, 2003.
62. RILEY, R.S.;MASSEY, D.;JACKSON-COOK, C.;IDOWU, M.;ROMAGNOLI, G. Immunophenotypic analysis of acute lymphocytic leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, 16: 245-99, v, 2002.
63. RUIZ-ARGUELLES, A.;DUQUE, R.E.;ORFAO, A. Report on the First Latin American Consensus Conference for flow cytometric immunophenotyping of leukemia. **Cytometry**, 34: 39-42, 1998.
64. SCHABATH, R.;RATEI, R.;LUDWIG, W.D. The prognostic significance of antigen expression in leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol**, 16: 613-28, 2003.
65. SEYMOUR, J.F.;PIERCE, S.A.;KANTARJIAN, H.M.;KEATING, M.J.;ESTEY, E.H. Investigation of karyotypic, morphologic and clinical features in patients with acute myeloid leukemia blast cells expressing the neural cell adhesion molecule (CD56). **Leukemia**, 8: 823-6, 1994.
66. SZCZEPANSKI, T.;ORFAO, A.;VAN DER VELDEN, V.H.;SAN MIGUEL, J.F.;VAN DONGEN, J.J. Minimal residual disease in leukaemia patients. **Lancet Oncol**, 2: 409-17, 2001.

67. SZCZEPANSKI, T.;VAN DER VELDEN, V.H.;VAN DONGEN, J.J. Classification systems for acute and chronic leukaemias. **Best Pract Res Clin Haematol**, 16: 561-82, 2003.
68. TERSTAPPEN, L.W.;KONEMANN, S.;SAFFORD, M.;LOKEN, M.R.;ZURLUTTER, K.;BUCHNER, T.;HIDDEMANN, W.;WORMANN, B. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part 1. Significance of light scattering properties. **Leukemia**, 5: 315-21, 1991.
69. THALHAMMER-SCHERRER, R.;MITTERBAUER, G.;SIMONITSCH, I.;JAEGER, U.;LECHNER, K.;SCHNEIDER, B.;FONATSCH, C.;SCHWARZINGER, I. The immunophenotype of 325 adult acute leukemias: relationship to morphologic and molecular classification and proposal for a minimal screening program highly predictive for lineage discrimination. **Am J Clin Pathol**, 117: 380-9, 2002.
70. THOMAS, X.;ARCHIMBAUD, E.;CHARRIN, C.;MAGAUD, J.P.;FIERE, D. CD34 expression is associated with major adverse prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, 9: 249-53, 1995.
71. TIEN, H.F.;CHOU, C.C.;WANG, C.H.;CHANG, C.H.;HSING, C.C. Putative normal counterparts of leukaemic cells from CD7-positive acute myeloid leukaemia can be demonstrated in human haemopoietic tissues. **Br J Haematol**, 94: 501-6, 1996.
72. UCKUN, F.M.;SATHER, H.N.;GAYNON, P.S.;ARTHUR, D.C.;TRIGG, M.E.;TUBERGEN, D.G.;NACHMAN, J.;STEINHERZ, P.G.;SENSEL, M.G.;REAMAN, G.H. Clinical features and treatment outcome of children with myeloid antigen positive acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. **Blood**, 90: 28-35, 1997.
73. VAN LOCHEM, E.G.; VAN DER VELDEN, V.H.J.; WIND, H.K.; TE MARVELDE, J.G.; WESTERDAAL, N.A.C.; VAN DONGEN, J.J.M. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. **Cytometry**, 60B: 1-13,2004.
74. VARDIMAN J.W.;HARRIS N.L.;BRUNNING R.D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood**, 100: 2292-2302, 2002.

75. WEINKAUFF, R.;ESTEY, E.H.;STAROSTIK, P.;HAYES, K.;HUH, Y.O.;HIRSCHGINSBERG, C.;ANDREEFF, M.;KEATING, M.;KANTARJIAN, H.M.;FREIREICH, E.J.;ALBITAR, M. Use of peripheral blood blasts vs bone marrow blasts for diagnosis of acute leukemia. **Am J Clin Pathol**, 111: 733-40, 1999.
76. WETZLER, M.;MCELWAIN, B.K.;STEWART, C.C.;BLUMENSON, L.;MORTAZAVI, A.;FORD, L.A.;SLACK, J.L.;BARCOS, M.;FERRONE, S.;BAER, M.R. HLA-DR antigen-negative acute myeloid leukemia. **Leukemia**, 17: 707-15, 2003.
77. ZEMLIN, M.;SCHELONKA, R.L.;BAUER, K.;SCHROEDER, H.W., JR. Regulation and chance in the ontogeny of B and T cell antigen receptor repertoires. **Immunol Res**, 26: 265-78, 2002.

Anexos

Tabela 1: Características clínicas e hematológicas dos pacientes com LLA.

Casos	Tipo	Sexo	Idade(anos)	Hb(g/dl)	Leuc(x10 ⁹ /l)	Pla(x10 ⁹ /l)	Blastos MO(%)	Expressões Anômalas	Cariótipo	RC	Situação	SG (meses)
1	B	M	27	7,2	1,3	399	97	1		S	vivo	21.16
2	B	M	20	12,4	38,7	65	96	1	nl	S	morto	9.60
3	T	M	29				88	1				
4	B	M	20				88	0				
5	B	F	27	12,1	14	139	67	3	nl; t(9,22)	S	morto	2.50
6	B	F	49	6,0	149	136	86	0			morto	0.20
7	B	M		9,3	34,7	26	88	0				
8	T	M	14	14,0	33	94	84	0	nl	S	vivo	15.90
9	B	F		8,4	3,5		85	2		S	morto	7.80
10	B	F	17	6,2	10,7	45	86	0	nl	S	morto	16.20
11	B	F	18	13,0	4,1	502	23	2			morto	12.83
12	B	M	16	10,4	10,8	34	24	0		S	vivo	16.26
13	T	F	16	13,5	90,7	165	90	1	nl	S	vivo	17.26
14	B	M	59	9,1	118	41	60	2	nl	N	morto	3.06
15	B	M	43	6,3	0,6	22	80	3	t(9,22)	S	morto	8.03
16	B	F	19	8,0	12,8	5	94	0	nl			
17	B	F	33				46	1	nl	S	vivo	17.46
18	B	M	65				98	0			morto	1.00
19	B	F	34	10,5	25	55	98	0	nl	S	morto	2.63
20	B	M	54				97	0		S	morto	15.06
21	B	M	14		100		73	0		S	vivo	15.00
22	B	M	7	7,3	14,9	57	65	1				
23	B	F	8				72	1				
24	B	F	67	10,6	12	22	95	1		S	morto	7.16
25	B	M	36	7,1	6,9	34	90	1		S	vivo	10.26
26	T	M	46	12,6	45	189	90	1	nl		morto	0.76
27	B	F	18	7,9	39	69	95,5	1	nl	S	morto	8.80
28	B	M	16	7,2	5,3	27	24	1		S	vivo	9.83
29	B	F	31	11,0	3,4	186	76	1	nl	S	vivo	10.10
30	B	F	12	11,6	90	30	90	1		S	vivo	9.10
31	B	M	23	8,7	5	93	48	0		S	vivo	10.13
32	B	M	42	16,0	93	37	92	0	nl	S	vivo	8.80
33	B	M	35	11,9	176	217	91	0	del11(q34)	S	morto	6.56
34	B	M	28	8,8	3,4	17	94	1	nl	S	vivo	7.00
35	T	F	51	11,0	0,7	184	83	2	92,XXXX	S	morto	1.33
36	B	M	41	6,9	2	100	96	1		S	vivo	7.10

Tabela 2: Características imunofenotípicas dos pacientes com LLA.

Casos	Tipo	% CD45	CMF CD45	CMF CD45	CMF CD19	CMF CD10	CMF CD20	CMF DR	sKappa	sLambda	cKappa	cLambda	CMF CD7	CMF CD3	CMF CD13	CMF CD33
1	B	100	160	152	27	0	750	0	0	0	0	0	0	0	40	0
2	B	100	62	42	729	0	296	0	0	0	17	0	0	0	0	50
3	T	100	95	0			0						1125	173	15	0
4	B	100	91	89	86	0	449	0	0	0	20	0	0	0	0	0
5	B	100	120	31	403	0	494	0	0	0	18	0	39	0	101	152
6	B	100	678	50	11	328	669	26	26				0	0	0	0
7	B	100	290	40	11	160	1003	13	13				0	0	0	0
8	T	100	368	0			0						125	85	0	0
9*	B	33	54	25	39	0	72	0	0	0	0	0	0	0	34	33
10	B	100	176	98	214	757	565	0	0	0	0	50	0	0	0	0
11	B	100	158	426	487	0	853	0	0	0	65	0	0	0	80	342
12	B	100	14	75	59	0	453	0	0	0	14	0	0	0	0	0
13	T	100	446	0			0						1124	77	13	0
14	B	100	31	61	307	0	534	0	0	0	32	0	0	0	18	24
15	B	100	56	55	172	0	490	0	0	0	0	0	37	0	107	172
16	B	100	216	123	19	0	816	0	0	0			0	0	0	0
17	B	100	179	399	400	166	1224	0	0	0			0	0	14	0
18	B	100	295	102	0	494	512	0	0	0			0	0	0	0
19	B	100	328	67	0	0	436	0	0				0	0	0	0
20	B	100	63	126	220	0	268						0	0	0	0
21	B	100	45	80	127	0	356	0					0	0	0	0
22	B	100	83	41	199	128	456						0	0	27	0
23	B	100	23	220	810	0	2814	0					0	0	0	49
24	B			116	0	0	106						0	0	15	0
25	B			80	413	9	317	0	0	0	0	40	0	0	37	0
26	T	100	42	0			0						1688	69	22	0
27	B			214	538	0	112	0	0	0	0	23	0	0	0	84
28	B	0	0	205	429	0	166						0	0	116	0
29	B	100	21	57	669	0	351	0	0	0			0	0	0	57
30	B			148	45	0	651						0	0	0	39
31	B	100	15	89	32	0	799	0	0	0			0	0	0	0
32	B			64	27	114	1109						0	0	0	0
33	B			64	0	0	240	58	58				0	0	0	0
34	B	100	188	19	16	0	1528	0	0	0	0	10	0	0	0	57
35*	T	100	272	21	0	0	898	0	0	0	0	0	30	0	50	0
36	B	100	263	132	129	0	353	0					0	0	0	76

Caso 9: possui 2 populações. Os marcadores expressos na população 2 são: %CD45=51; CMF CD45=80; CD19=80; CMF DR=725; CMF CD13=26; CMF CD33=46.

Tabela 3: Dados clínicos e hematológicos dos pacientes com LMA.

Casos	FAB	Sexo	Idade(anos)	Hb(g/dl)	Leucócitos (x10 ⁹ /l)	Plaquetas (x10 ⁹ /l)	Blastos MO(%)	Populações	Expressões Anômalas	Cariótipo	Risco Cariótipo	RC	Situação	SG (meses)
1	M4	M	48	10,9	148	100	79	1	0			N	morto	6.90
2	M1	F	76	6,5	135	31	88	1	0	21	2		morto	0.47
3	M2	M	39	6,7	4,7	27	42	1	0	nl	1	S	vivo	26.10
4	M1	F	53	5,8	3,8	43	30	2	2	nl	1		vivo	2.77
5	M5	M	51	8,3	21,8	73	89	1	0					
6	M0	F	79	11,1	38,9	95	91	1	1			N	morto	7.50
7	M1	M	56	7,4	1,5	93	64	1	0	nl	1		morto	12.67
8	M4	F	11	8,7	18,6	32	97	2	2				morto	0.23
9	M0	M	34	9,3	2,1	25	94	1	3	t(9,22)	2	N	morto	11.97
10	M2	F	49	6,7	46	11	70	1	1	t(8,21); -Y	0	S	morto	3.27
11		F	76	13,0	9,4	121	73	1	1				morto	5.40
12	M1	F	41	10,2	2,9	93	88	1	1	nl	1	N	morto	4.10
13	M3	F	51	9,1	1	22	61	1	0	nl; t(15,17)	0	S	vivo	19.57
14	M3	M	24	9,5	24,8	57	87	1	0	nl	1	S	vivo	22.10
15	M2	M	65	8,5	2,4	14	40	1	0	t(8,21); +8	2		morto	0.37
16	M4	F		8,7	79,1	61	66	1	1			N	morto	7.13
17	M2	F	56	6,2	14,9	31	85	1	1	t(8,21)	0	S	vivo	20.77
18	M0	M	72	8,4	8	255	37	1	2	nl	1		morto	0.03
19	M4	M	65	8,8	115	91	74	2	1	del(11); t(1,11)	2		morto	0.63
20	M4	M	19	11,2	119	18	97	1	0	nl	1		morto	0.17
21	M2	M	70	8,1	112	169	59	1	1		2	N	morto	6.47
22	M3	M	45	8,5	10,4	24	94	1	1				morto	0.20
23	M4	F	63	5,7	0,8	11	62	1	0				morto	0.70
24	M5	M	30	12,0	44	66	94	2	1	nl	1	S	vivo	12.43
25	M4	M	69	10,7	85,7	160	71	1	0				morto	0.63
26	M6	M	42	8,3	1,7	271	35	3	3	nl	1	S	vivo	13.80
27		M	65				70	1	0				morto	0.57
28	M4	M	50	5,2	7,2	17	33	2	1	nl	1	S	vivo	8.40
29	M4	F	50	4,0	5,7	120	48	1	0	inv(16)	0	S	vivo	7.93
30		M			100		80	1	0				morto	0.60
31	M1	M	42	12,3	150	60	79	1	0	nl	1		morto	0.90
32	M5	F	67	10,2	60,4	209	80	1	1	nl	1		morto	0.57
33	M2	M	78	10,7	77,6	68	77	1	1	nl	1		morto	0.83
34	M3	M	39	6,4	8,4	36	91	1	0				morto	0.27
35	M2	M	50	9,2	3,2	10	20	1	1	nl	1		morto	1.80

Tabela 4: Características imunofenotípicas dos pacientes com LMA.

Casos	% CD45a		CMF CD45b	CMF CD13a	CMF CD13b	CMF CD14a	CMF CD14b	CMF CD15a	CMF CD15b	CMF CD33a	CMF CD33b	CMF CD34a	CMF CD34b	CMF DRa	CMF DRb	CMF MPOa	CMF MPOb	CMF CD56a	CMF CD56b	CMF CD7a
	CD45a	CD45b																		
1	81	188		56	146		54		280		54		129	73				0		0
2	100	306		113	0		0		364		0		147	33				0		0
3	100	84		223	0		0		30		182		175	52				0		0
4*	10	172	9	353	154	0	0	0	43	35	171	199	816	209	34	0	0	0	0	35
5	69	394		424	347		32		183		27		65		0			0	0	0
6	100	128		124	0		0		0		737		0		0			0		771
7	33	98		192	0		0		0		191		494	0				0		0
8	27	116	45	289	241	0	195	98	117	161	0	0	216	0	55	25		0	0	0
9	100	5		123	0		0		70		550		602	0				28		0
10	99	229		61	0		0		35		422		436	79				14		0
11	100	360		106	0		264		141		0		2280	0				69		0
12	100	609		0	0		179		155		0		1362	19				156		0
13	100	72		33	0		0		321		0		0	108				0		0
14	100	162		34	0		0		188		0		135	131				0		0
15	100	146		54	36		166		81		335		250	83				0		0
16	65	242		121	256		49		484		133		221	39				0		51
17	100	86		117	0		0		75		614		1439	116				77		0
18	100	229		79	0		0		214		694		473	0				31		112
19	24	196	40	500	65	0	201	150	32	159	0	0	314	0	32	0		143	69	0
20	100	272		198	92		0		537		167		255	24				0		0
21	100	42		142	0		0		30		262		67	20				13		0
22	100	87		19	0		0		292		0		0					8		0
23	100	796		436	0		0		310		678		680					0		0
24	33	776	24	637	0	219	33	0	427	0	0	11	1235	506	0	0		77	32	0
25	73	323		837	200		105		564		0		228	104				0		0
26*	23	210	20	9	0	0	0	0	202	0	279	0	44	0	40	0		11	0	55
27	67	226		175	0		0		435		89		0		6			0		0
28	34	72	36	157	60	0	0	186	66	74	403	0	637	0	115	0		0	0	0
29	100	110		72	0		169		27		222		275		232			0		0
30				56	0		0		56				390							
31				191	0		0		307		64		85					0		0
32	30	995		248	343				1200				114					25		0
33	100	37		142	0		0		108		403		289	0				0		54
34	100	183		57	0		0		196		0		0		105			0		0
35	100	624		1116	311		0		4381		450		221		36			55		0

Caso 4: População 2: CMF CD7=385

Caso 8: População 1: CMF CD19=20; População 2: CMF CD2=19.

Caso 9: CMF CD2=131, CMF CD19=91.

Caso 26: População 1: CMF CD19=10; População 2: CMF CD2=19.