

RAUL CORRÊA RIBEIRO

CLASSIFICAÇÃO IMUNOLÓGICA DAS LEUCEMIAS
LINFOCÍTICAS AGUDAS

Dissertação ao Nível de Mestrado em
Pediatria, apresentada à Universidade
Federal do Paraná. Departamento de
Pediatria.

CURITIBA
ESTADO DO PARANÁ
1980

Dedico este trabalho

À Regina, companheira de todos os momentos

Ao Rafael e Mariana que deram uma nova
dimensão à minha vida.

Aos meus pais, pelo apoio recebido na minha
formação.

Aos pacientes com Leucemia Aguda.

AGRADECIMENTOS

O autor recebeu contribuições de muitas pessoas e instituições para a realização deste trabalho e expressa seu agradecimento a todos e principalmente:

Ao Prof. Dr. Euripides Ferreira

- ORIENTADOR -

Ao Prof. Dr. Paulo Barbosa da Costa pela inestimável colaboração ao revisar os estudos morfológicos e citoquímicos.

Ao Prof. Dr. Izrail Cat Coordenador do curso de Pós-Graduação - Mestrado em Pediatria, pela orientação e estímulo que nos tem sempre proporcionado bem como pelas sugestões formuladas em diversas fases da elaboração deste trabalho.

Aos Drs. Leide Parolin Marinoni, Dinarte José Giraldi, Orival Costa e Noboro Miasaki, membros do colegiado do curso de Pós-Graduação - Mestrado em Pediatria, pelo apoio e incentivo.

Ao Dr. Rhomes J.A. Aur pela análise crítica e sugestões apresentadas para a realização do presente trabalho.

Aos Drs. Amadeu Cassilha, Carlos Roberto Medeiros, Dionísio Abrão, Flora Watanabe, Guilherme Almada, Maria Ester Malvesi,

Miriam Conceição, Pedro Dorlhiac, Ricardo Pasquini e Waldir de Paula Furtado, pelo incentivo prestado e por terem encaminhado os pacientes para estudo.

Ao Dr. Nei Ferreira de Camargo Neto, pelo auxílio na preparação do anti-soro.

Ao Dr. Fernando Lopes Martins, pela orientação e às Dras. Samira Fadel, Cecília M. Tomizawa, Lisnara Bonfim dos Santos pelo valioso auxílio, nas preparações de citoquímicas.

Às Dras. Luiza Guilherme, Linda Nakamura e Maria Berna dete L. Barbosa, Maria Alice Kichel e Shirley R. Rosa, pela boa vontade e eficiência sempre demonstrada na caracterização imunológica das leucemias.

Às Dras. Elvira N. Doi, Mitoko Kuriki e Kioko Nair Seki pelo auxílio técnico no laboratório de imunofluorescência.

Às Sras. Alice Guimarães e Ilza Coutinho pela realização dos exames laboratoriais de rotina.

À Sra. Alice Bonfim, pelas facilidades que proporcionou ao nosso trabalho no laboratório.

À Sra. Honorina de A. Schmidt, pelo fornecimento de hemácias de carneiro.

Ao Dr. Henrique Koehler pelos auxílios na análise estatística.

Ao Dr. Ênio Rogacheski pelas sugestões e correções dos textos.

À Suzana G. Castilho e suas auxiliares pela colaboração na revisão bibliográfica.

Ao Dr. Itaci Amoejo Canto pela confecção das figuras.

Aos Residentes de Pediatria e Clínica Médica pela colaboração prestada no atendimento dos doentes.

À Srta. Marlene Elza Mendonça. pela sua assistência secretarial durante todo o tempo de realização do trabalho.

Ao Paulo Cortellini pelo auxílio prestado na realização das fotografias.

À Srta. Suely Terezinha Kaminski pelo excelente trabalho datilográfico.

À CAPES pelo auxílio.

Ao Dr. Dirceu Rodrigues pela revisão dos estudos radiológicos.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.	1
SISTEMA IMUNE	7
A - LINFÓCITOS B	9
B - LINFÓCITOS T	11
C - LINFÓCITOS NÃO-T/NÃO-B	15
OBJETIVOS	19
CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	21
A - CASUÍSTICA	22
1. POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA	22
2. POPULAÇÃO DE ESTUDO	22
B - MATERIAIS.	25
1. REAGENTES E SOLUÇÕES.	25
2. EQUIPAMENTOS.	27
C - MÉTODOS.	29
1. COLHEITA DO MATERIAL.	29
2. MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS T.	29
3. MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS B.	36
4. CITOQUÍMICA	39
5. MORFOLOGIA CELULAR.	41
6. OUTROS EXAMES COMPLEMENTARES.	41
7. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.	42
8. TRATAMENTO ESTATÍSTICO.	42a
EFEITO CITOTÓXICO E ESPECIFICIDADE DO AALT	47
A - EFEITO CITOTÓXICO.	48
B - ESPECIFICIDADE DO AALT	54

RESULTADOS.	60
A - LLA DO TIPO T.	62
B - LLA DO TIPO B.	63
B - LLA DO TIPO NÃO-T/NÃO-B.	63
DISCUSSÃO	75
A - LLA DO TIPO T.	80
B - LLA DO TIPO B.	82
C - LLA DO TIPO NÃO-T/NÃO-B.	83
D - CORRELAÇÃO DOS ACHADOS MORFOLÓGICOS E CITOQUÍMICOS COM OS MARCADORES DE MEMBRANA.	84
E - CORRELAÇÃO DOS VALORES HEMATOLÓGICOS E DAS MANIFES TAÇÕES CLÍNICAS COM OS TIPOS DE AAL.	87
CONCLUSÕES.	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
ANEXOS.	119

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O tratamento moderno da leucemia linfocítica aguda (LLA) modificou a história natural desta doença ⁸¹. Até 1940, o Raio X e as transfusões sanguíneas eram as únicas medidas terapêuticas utilizadas e a sobrevida dos pacientes era, em média, de 2 a 4 meses ³⁵.

O estudo farmacológico de um gás venenoso chamado mostarda nitrogenada utilizado durante a primeira guerra mundial e a verificação de que produzia aplasia de medula e severo comprometimento do sistema linfóide, possibilitaram a introdução de produtos químicos no combate à neoplasia animal e humana ^{74, 107}.

No final da década de 40, Sidney Farber descreveu um antagonista do ácido fólico, a aminopterina, que induzia remissões temporárias da doença em aproximadamente 50% dos pacientes ⁴².

Na década seguinte já estavam em uso três agentes quimioterápicos no tratamento da LLA; o methotrexate, a 6-mercaptopurina e a prednisona e a sobrevida foi prolongada para 6 a 12 meses. Em 1960, dispunha-se da vincristina e da ciclofosfamida e iniciou-se a utilização de agentes quimioterápicos de maneira combinada, obtendo-se remissão da doença em aproximadamente 80 a 90% dos pacientes ⁴⁵.

Mesmo com a utilização desses agentes na indução da remissão, verificou-se que ainda persistiam no organismo aproximadamente 10^9 células leucêmicas, sendo deste modo necessária a aplicação de medicação quimioterápica adicional, o que foi realizada através de protocolos analisados sistematicamente ⁸⁷.

Outra importante contribuição à curabilidade de LLA foi a observação de que os pacientes mantidos em quimioterapia sistêmica em remissões hematológicas prolongadas apresentavam, em mais de 50% dos casos, recidiva da doença em órgãos não-hematopoiéticos e destes, o mais importante, o sistema nervoso central (SNC) ^{50, 64, 102}. Com a utilização da profilaxia com methotrexate intratecal e radioterapia craniana, a recidiva da doenças nesse órgão diminuiu para aproximadamente 10% ¹.

Atualmente, 50% dos pacientes vivem dois anos sem manifestações clínicas da LLA; dois terços destes irão sobreviver mais de cinco anos, quando serão considerados curados ⁵¹.

Entretanto, mesmo com a indução da remissão satisfatória, profilaxia precoce da doença no SNC e manutenção da remissão, muitos pacientes apresentam recidiva da doença precoce ou tardiamente ². Estes pacientes constituem os desafios ainda não solucionados pela estratégia do tratamento moderno. Se a medicação é mantida constante, outras variáveis estão influenciando a resposta do paciente e o resultado final do tratamento.

Está cada vez mais se tornando evidente que a LLA não é uma entidade clínica homogênea e este raciocínio está baseado na diversificação da apresentação clínica, achados morfológicos, citoquimi

cos, imunológicos, bioquímicos e citogenéticos 4, 8, 17, 25, 44, 49, 98, 100, 114, 116, 126.

Muitas tentativas estão sendo feitas para estratificação de grupos de pacientes com apresentações clínicas diferentes e correlação destas manifestações com o prognóstico 49, 120. Os resultados tendem a apoiar o conceito que o prognóstico do paciente com LLA depende diretamente da massa de tecido neoplásico existente inicialmente. Pacientes com leucócitos acima de 100.000 por microlitro (μ l), visceromegalia importante e aumento acentuado e generalizado dos linfonodos parecem apresentar pior prognóstico 120.

No entanto, outras manifestações clínicas que também estão correlacionadas com mau prognóstico, parece não depender da massa de tecido neoplásico existente inicialmente e sim de alguma característica biológica particular. As formas clínicas com comprometimento inicial do SNC, massas tumorais em mediastino e idade inferior a dois anos parecem ter pior prognóstico 2, 106. Porém, é importante salientar-se que quando se observam séries de pacientes já considerados curados, encontram-se muitos que apresentaram inicialmente manifestações clínicas relacionadas com mau prognóstico 2, 91, 120.

A morfologia celular é apontada por alguns autores como possuindo implicações prognósticas 11, 12, 60. Pantazoupoulos & Sinks 100 estudaram 39 crianças com LLA e constataram que os pacientes com menos de 10% de células leucêmicas medindo menos que 10 mm possuíam melhor prognóstico. Mathé et al. 86 classificaram as células leucêmicas dos pacientes com LLA em cinco grupos:

microlinfoblastos, pr \bar{o} -linf \bar{o} citos, macrolinfoblastos, pr \bar{o} -linfoblastos e imunoblastos. Estes autores conclu \bar{i} ram que, quando o tipo de c \bar{e} lula predominante era o microlinfoblasto, o progn \bar{o} stico era melhor, enquanto que, quando havia predomin \bar{i} o dos imunoblastos, o progn \bar{o} stico era pior. Lee et al.⁷⁹ estudaram uma s \bar{e} rie de 92 pacientes com LLA e analisaram os seguintes par \bar{a} metros: gr \bar{a} nlulos citoplasm \bar{a} ticos, quantidade de citoplasma proporcionalmente ao n \bar{u} cleo, nucl \bar{e} olos, cromatina nuclear e vac \bar{u} olos citoplasm \bar{a} ticos. Conclu \bar{i} ram que, dos par \bar{a} metros analisados, a presen \bar{c} a de nucl \bar{e} olos e a maior quantidade de citoplasma em rela \bar{c} o \bar{a} o ao n \bar{u} cleo estavam relacionados com pior progn \bar{o} stico.

M \bar{e} todos citoqu \bar{i} micos s \bar{a} o tamb \bar{e} m empregados para a distin \bar{c} o \bar{a} o dos subgrupos de LLA e sua correla \bar{c} o \bar{a} o com o progn \bar{o} stico. As colora \bar{c} o \bar{e} s mais utilizadas s \bar{a} o o Sudan Negro a Peroxidase, \bar{A} ci do Per \bar{o} dico de Schieff (PAS), Fosfatase \bar{A} cida (FA) e as Esterases. O S \bar{u} dan Negro, a Peroxidase e a Esterase-cloroacetado (EACA), quando positivos, caracterizam um grupo de leucemias n \bar{a} o-linfobl \bar{a} sticas, com pior progn \bar{o} stico que as LLA²⁹. O PAS, a FA e a Esterase n \bar{a} o-espec \bar{i} fica (ENE) possuem utilidade no estudo das LLA.

A correla \bar{c} o \bar{a} o da positividade do PAS com o progn \bar{o} stico do paciente com LLA \bar{e} contradit \bar{o} ria. Swan¹¹⁴ e Laurie⁷⁸ conclu \bar{i} ram que altos escores do PAS implicavam em maior sobrevida dos pacientes, por \bar{e} m Swan¹¹⁵, em outro estudo, analisando 80 casos de LLA, n \bar{a} o observou nenhuma correla \bar{c} o \bar{a} o com a dura \bar{c} o \bar{a} o da primeira remiss \bar{a} o ou sobrevida em fun \bar{c} o \bar{a} o da positividade do PAS. Embora os resultados destes trabalhos sejam conflitantes, admite-se atualmente que altos escores do PAS correlacionam-se com a maior

duração da sobrevida, porém que a positividade do PAS isoladamente não pode ser considerada para o prognóstico.

A reação citoquímica que detecta a atividade da FA foi recentemente introduzida no estudo da LLA²¹. Existem evidências de que a atividade da FA correlaciona-se com uma subpopulação de LLA de origem tímica^{21, 22}, com reconhecido pior prognóstico^{24, 38}.

O emprego da reação citoquímica que detecta a atividade da ENE possui interesse para o estudo da LLA. Em alguns destes casos, é a única reação citoquímica que pode distinguir a LLA com heterogeneidade celular da leucemia monoblástica²⁴, além disso a atividade desta enzima foi detectada em subpopulação de linfócitos⁷⁵.

Atualmente, além do estudo da morfologia celular e das reações citoquímicas, os investigadores estão classificando as LLA com base em diferenças estruturais existentes na superfície da membrana das células leucêmicas^{15, 17, 19, 30, 38, 44, 47, 63, 96, 97, 108, 118, 139}.

SISTEMA IMUNE

SISTEMA IMUNE

A função principal do sistema imune é a proteção do organismo contra proteínas estranhas, microorganismos e outras substâncias. O sistema imune é capaz de reconhecer e discriminar substâncias que são próprias do organismo (self) das não-próprias (not self) e, na maioria das vezes, é capaz de eliminar as substâncias indesejáveis.

No organismo humano as células linfóides estão organizadas em vários tecidos de complexidade estrutural variada. Na maioria dos tecidos linfóides, os linfócitos estão suportados por células e fibras reticulares com um arranjo tridimensional ³⁷. Este arranjo complexo entre os linfócitos e as células reticulares facilita a interação destas células com outras células e particularmente com o antígeno.

Com o termo linfócito, são designados tipos celulares semelhantes do ponto de vista morfológico, porém com grande heterogeneidade funcional. Funcionalmente, os linfócitos humanos são classificados em três grandes subgrupos: linfócitos B, linfócitos T e linfócitos não-T/não-B ^{27, 32, 55, 58,65, 67, 68,104, 119, 129, 132}.

A - LINFÓCITOS B

Os linfócitos B originam-se na medula óssea e diferenciam-se sob influência de um órgão equivalente à Bursa de Fabricius das aves. Eles são os precursores das células plasmáticas, produtores de imunoglobulinas além de serem os responsáveis pela imunidade humoral 31, 99, 134.

O linfócito B mais primitivo que pode ser detectado é chamado de linfócito pré-B. Ele é encontrado primeiramente no fígado fetal entre a 5ª e 7ª semana de gestação 48 e posteriormente na medula óssea 101. Este tipo de linfócito sintetiza pequena quantidade de imunoglobulina M (IgM), que é detectada apenas em seu citoplasma e apresenta na sua membrana antígenos de diferenciação codificados ou não pelos genes do sistema maior de histocompatibilidade dos loci D e DR 3; 130.

O próximo linfócito B a aparecer durante o desenvolvimento fetal é caracterizado pela presença de IgM na superfície da membrana. Na sequência da maturação celular, o linfócito B adquire, na superfície da membrana, receptores para o complemento e para o segmento Fc da imunoglobulina G 36. Do ponto de vista funcional, os linfócitos B maduros diferenciam-se entre si constituindo classes de clones, as quais se especializam na produção das diferentes imunoglobulinas 48, 133.

Em subpopulações de linfócitos B maduros e também em linfócitos B em estágios precoces de desenvolvimento foram

demonstrados receptores para eritrócitos de camundongo ¹²². Experimentos conjugados com a demonstração da imunoglobulina de superfície por imunofluorescência (IgS) e formação de rosetas com eritrócitos de camundongo (MR) mostraram que estes receptores se encontram principalmente nos linfócitos B produtores de IgM ou IgM mais IgD ⁵⁶. A natureza deste receptor para os eritrócitos de camundongo ainda não foi determinada.

Além disso, foram demonstrados receptores para o vírus de Epstein-Barr nos linfócitos B e em subpopulações dos linfócitos não-T/não-B ⁶⁶. Estes receptores não são encontrados nos timócitos nem em outros linfócitos periféricos.

Antígenos associados aos linfócitos B (AALB) podem ser detectados mediante o uso de anti-soros ¹³⁵. Estes anti-soros são produzidos inoculando-se animais primatas ou não-primatas com células de pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) ^{19, 105}, medula óssea ¹¹¹, células de tonsila palatina ¹⁴² e células linfoblastóides mantidas em cultura ⁷⁰. Estes antígenos são detectados em aproximadamente 18% dos linfócitos do sangue periférico, em 30% dos linfócitos não-T/não-B e em 90% das células leucêmicas com imunoglobulina de superfície (IgS) ^{70, 142}. Recentemente, foi caracterizado um grupo de antígenos polimórficos nos linfócitos B, monócitos e células endoteliais ^{13, 135}. Este antígeno foi detectado também em outras células do organismo e, entre elas, subpopulações de linfócitos T ^{26, 109}. A expressividade deste antígeno é controlada por genes relacionados aos loci D e DR do complexo maior de histocompatibilidade. Este grupo

de antígenos é distinto dos antígenos HLA A, B e C, que estão presentes em todas as células humanas, exceto nos eritrócitos. Estes antígenos são considerados como equivalentes aos antígenos da resposta imune do camundongo (Ia) e, devido a isto, são conhecidos como antígenos humanos Ia-like.

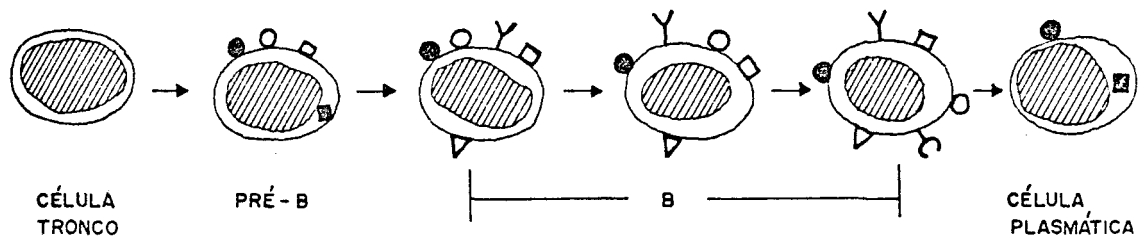
Já foram descritos também antígenos de diferenciação específicos para os linfócitos B detectados mediante anticorpos obtidos pela inoculação em coelhos de linfócitos B de macacos ³. Estes antígenos são distintos dos descritos anteriormente e estão presentes nos linfócitos pré-B, linfócitos B periféricos e células plasmáticas e não foram detectados em outras populações de linfócitos do organismo.

A seqüência do desenvolvimento dos linfócitos B com os respectivos marcadores está ilustrado na Figura 1.

B - LINFÓCITOS T

Os linfócitos T originam-se na medula óssea, diferenciam-se sob influência do timo e são responsáveis pela imunidade celular ⁶⁷.

Os progenitores dos linfócitos T, provenientes da medula óssea, começam a popular o timo em torno da 8^a semana de gestação ⁶¹. As características destes linfócitos pré-tímicos ainda não estão bem determinadas, porém existem evidências que eles já possuem antígenos próprios na sua membrana ¹¹⁰. Entre a 10^a e a 14^a semana de gestação os linfócitos T adquirem receptores para eritrócitos de carneiro e pa



- ANTÍGENO DE DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS B
- IMUNOGLOBULINA INTRA-CITOPLASMÁTICA
- RECEPTOR PARA ERITRÓCITOS DE CAMUNDONGO
- ANTÍGENOS "IA-LIKE"
- Y IMUNOGLOBULINA DE SUPERFÍCIE
- △ RECEPTOR PARA O SEGMENTO F_c DA IMUNOGLOBULINA
- Y RECEPTOR PARA O COMPLEMENTO

FIGURA 1 : SEQUÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO DOS LINFÓCITOS B E SEUS RESPECTIVOS MARCADORES (MODIFICADO DE GUPTA E GOOD) 55

ra a fração ativada do complemento ^{7, 61, 65}. Os receptores para os eritrócitos de carneiro ainda não tiveram a sua natureza determinada, porém esta propriedade é atualmente aceita como o mais importante marcador para linfócitos T. Os receptores para a fração ativada do complemento (C3b e C3d) surgem pouco antes dos receptores para eritrócitos de carneiro e persistem em subpopulações de linfócitos T maduros ⁷. Nesta ocasião, os linfócitos T adquirem também a capacidade para responder a mitógenos específicos e a células alógenas ¹²³. Receptores para o segmento Fc das imunoglobulinas G e M aparecem na seqüência do desenvolvimento dos linfócitos T. Foi demonstrado que os linfócitos T que possuem receptores para a IgG secretam substâncias que impedem a diferenciação das células B e os que possuem receptores para a imunoglobulina M secretam substâncias que irão auxiliar a diferenciação daquelas células ^{93, 94}.

A evidência da atividade de determinadas enzimas citoplasmáticas também está relacionada com as fases evolutivas dos linfócitos T. A enzima transferase-deoxinucleotidil terminal (TdT) foi inicialmente considerada marcador dos linfócitos T que evoluem para os timócitos ⁴. Posteriormente, foi notada a sua presença em células leucêmicas B e pré-B e atualmente se sabe que o TdT não é um marcador exclusivo das células T pré-tímicas, porém está presente também em várias linhagens hematopoéticas em estágios precoces do desenvolvimento ^{53, 116}. A demonstração da atividade da ENE é aceita como marcador das células da série monócitos-macrófagos ¹⁴¹. Recentemente, a atividade desta enzima foi demonstrada tanto em linfócitos T periféricos como naqueles estimulados por

determinados mitógenos ^{75, 126}. O padrão de coloração dos linfócitos T difere daquele exteriorizado pelos monócitos ⁷⁵. Finalmente, a atividade da FA demonstrada por citoquímica com disposição granular nas regiões paranucleares parece ter especificidade para as neoplasias linfoproliferativas de Linfócitos T ^{22, 23, 43}. Os linfócitos T maduros, entretanto, apresentam diminuição da atividade dessa enzima ⁵.

Antígenos relacionados com os linfócitos T podem ser detectados utilizando-se anti-soros. Os anti-soros antilinfócitos T (AALT) são preparados usando-se vários esquemas de imunização e procedimentos de adsorção. Os antígenos utilizados para a produção de ALLT incluem timócitos fetais ^{92, 111}, linfoblastos ER positivos ¹⁵, linfócitos periféricos de pacientes portadores de agamaglobulinemia ligada ao sexo ¹⁹, linfócitos T mantidos em cultura ⁷⁰, linfócitos T periféricos purificados ⁴⁰ e homogeneizado de cérebro ¹⁸. Os anti-soros assim produzidos detectam 3 tipos principais de antígenos de diferenciação chamados de: antígeno associado à leucemia tímica humana (AALTH), antígeno TH1 e antígeno TH2.

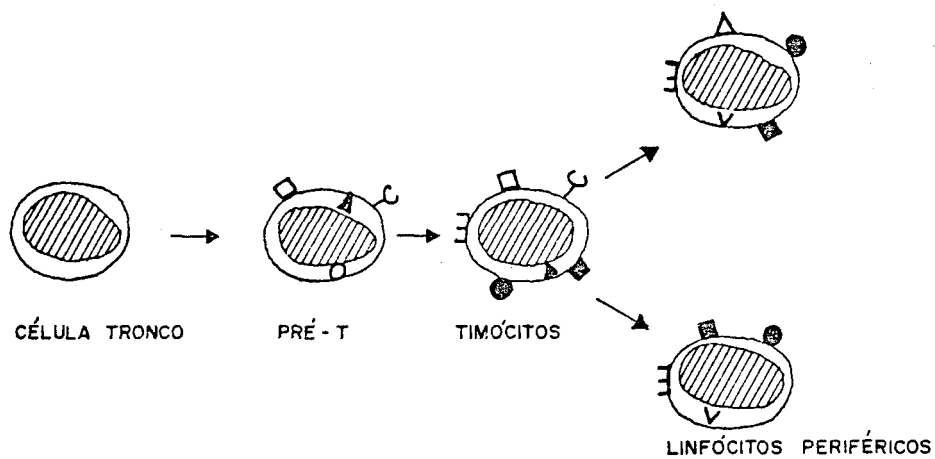
O AALTH é produzido pela inoculação de coelhos com linfoblastos ER positivos. Após adsorções apropriadas, este anti-soro reage com células de pacientes com leucemia linfoblástica do tipo T, timócitos, porém não reage com linfócitos T periféricos ⁶⁹. A adsorção deste anti-soro com timócitos elimina a reação do anti-soro para com estas células mas não interfere na reação sobre as células leucêmicas dos pacientes com LLA do tipo T ¹⁵.

Os anti-soros que detectam os antígenos TH1 e TH2 são produzidos pela inoculação de coelhos com linfócitos T periféricos altamente purificados ³⁹. O antígeno TH1 está presente em aproximadamente 90% dos timócitos e 40 a 60% dos linfócitos T periféricos. As células que possuem o TH1 diferenciam-se das que não possuem este antígeno pela sua capacidade de proliferar em resposta a células alógenas em cultura mista de linfócitos. Além disso, estes linfócitos secretam substâncias que inibem a migração de leucócitos e a resposta mutagênica a antígenos solúveis, bem como secretam fatores auxiliares para a diferenciação dos linfócitos B ⁴⁰. O antígeno TH2 é detectado em aproximadamente 20 a 30% dos linfócitos T periféricos por um anti-soro preparado de maneira semelhante ao anti-TH1, adsorvido com células de pacientes com LLC ⁴⁰. Os linfócitos T que reagem com o anti-soro TH2 respondem mal à estimulação com antígenos ou células alógenas. Além disso, possuem atividade citotóxica em linfólise mediada por células e parecem ter atividade supressora para as respostas celulares dos linfócitos T e B. Os linfócitos que não reagem com o anti-TH2 respondem bem à estimulação com antígenos solúveis e parecem ter atividade estimuladora para as respostas dos linfócitos T e B ⁴⁰.

A seqüência do desenvolvimento dos linfócitos T, com os respectivos marcadores, está ilustrado na Figura 2.

C - LINFÓCITOS NÃO-T/NÃO-B

A terceira população de linfócitos conhecidos como não-T/não-B não possuem características bem definidas ¹⁰³.



- ANTÍGENO DA LEUCEMIA TÍMICA HUMANA (ALH)
- ▲ FOSFATASE ÁCIDA
- Υ RECEPTOR PARA COMPLEMENTO
- TRANSFERASE DEOXINUCLEOTIDIL TERMINAL (TdT)
- ≡ RECEPTOR PARA ERITRÓCITOS DE CARNEIRO
- ANTÍGENO DE DIFERENCIAÇÃO (TH1)
- △ ANTÍGENO DE DIFERENCIAÇÃO (TH2)
- RECEPTOR PARA O SEGMENTO Fc DA IMUNOGLOBULINA
- ∇ ESTERASE α -NAFTIL ACETATO

FIGURA 2 : SEQUÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO DOS LINFÓCITOS T COM OS RESPECTIVOS MARCADORES (ADAPTADO DE GUPTA E GOOD) 55

Sabe-se que estas células apresentam receptores para o segmento Fc da imunoglobulina G, porém, ao contrário do que ocorre com os linfócitos B, estes receptores apresentam grande afinidade por este segmento da IgG⁸². Foi também observado que aproximadamente 30% das células não-T/não-B possuem os antígenos codificados pelos genes dos loci D e DR ou Ia-like 26.

Na Tabela 1, estão resumidos os marcadores de superfície dos linfócitos T, B e não-T/não-B e timócitos.

TABELA 1 - MARCADORES DE MEMBRANA DOS LINFÓCITOS PERIFÉRICOS
T, B e NÃO-T/NÃO-B e TIMÓCITOS.

CÉLULAS	ER	RC	RFc	IgS	ALTH	AALB	TH1	<u>Ia-like</u>
Linfócitos								
T	+	-	+	-	-	-	- ou +	-
B	-	+	+	+	-	+	-	+
não-T/não-B	-	+ ou -	+	-	-	-	-	+ ou -
Timócitos	+	+ ou -	-	-	+	-	+	-

ER = Roseta com eritrócitos de carneiro

RC = Receptor para o complemento

RFc = Receptor para o segmento Fc da imunoglobulina

IgS = Imunoglobulina de superfície

ALTH = Antígeno da leucemia tímica humana

AALB = Antígeno de diferenciação dos linfócitos B

TH1 = Antígeno de diferenciação de linfócitos T

Ia-like = Antígeno codificado por genes dos Loci D e DR

+ = presente

- = ausente

+ ou - =

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Os objetivos do nosso trabalho são:

1. Estudar a incidência, em nosso meio, dos tipos de LLA mediante a utilização dos marcadores imunológicos de membrana.
2. Correlacionar os marcadores imunológicos de membrana com os achados citoquímicos e morfológicos da célula leucêmica e com as manifestações clínicas dos pacientes com LLA.

CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

A - CASUÍSTICA

1. População de Referência
Pacientes com diagnóstico de LLA, com idade igual ou inferior a 20 anos.
2. População de Estudo
Quarenta pacientes de ambos os sexos, com diagnóstico clínico e laboratorial de LLA. O diagnóstico laboratorial de LLA foi baseado no achado de mais de 25% de células leucêmicas no aspirado de medula óssea.
 - 2.1 Critérios para Exclusão dos Pacientes
 - 2.1.1 Morfologia das células leucêmicas compatíveis com leucemia não-linfoblástica.
 - 2.1.2 Positividade das células leucêmicas às reações citológicas do Sudan B, Peroxidase e EACA.
 - 2.1.3 Medicação citostática prévia.
 - 2.2 Critérios para a definição dos grupos
Definiu-se como portador de LLA do tipo T o indivíduo que apresentasse 20% ou mais de células leucêmicas formando ER ou 50% ou mais reagindo com o AALT. Como portador de LLA do tipo B, todo paciente que apresentasse 20%

ou mais de células leucêmicas com IgS e 50% ou mais reagindo com o AALB. Como portador de LLA não-T/não-B, o indivíduo que apresentasse menos de 20% das células leucêmicas ER e IgS positivas e não reagindo com AALT.

A Tabela 2 descreve a distribuição dos pacientes segundo a idade, sexo e cor.

Todos os pacientes estudados, exceto três, (casos nºs 12, 21 e 38) foram examinados pelo Autor.

TABELA 2 - IDADE, SEXO E COR DOS PACIENTES COM LLA

Nº	IDADE		SEXO	COR
	ANOS	MESES		
1	16	3	M	B
2	6	4	M	B
3	19	1	M	B
4	17	6	M	B
5	4	4	M	B
6	19	7	M	B
7	7	1	F	B
8	3	2	M	B
9	11	8	M	P
10	3	3	M	B
11	3	4	M	B
12	20	10	M	B
13	1	10	M	B
14	-	2	F	B
15	2	-	F	B
16	3	2	F	B
17	9	8	M	B
18	2	2	M	B
19	3	6	F	P
20	4	6	M	P
21	-	3	F	B
22	13	3	F	B
23	3	8	M	B
24	2	5	M	B
25	2	2	M	B
26	12	11	M	B
27	16	-	M	B
28	0	11	M	B
29	4	9	F	B
30	14	10	M	B
31	13	3	F	B
32	10	2	M	B
33	17	3	F	B
34	1	3	F	B
35	4	1	M	B
36	4	3	F	B
37	13	8	F	B
38	10	1	F	B
39	7	-	F	B
40	2	-	F	B

B - MATERIAIS

1. Reagentes e Soluções

- 1.1 Solução de Alsever modificada - 20,5 g de dextrose anidra juntamente com 8,0 g de citrato de sódio $3H_2O$ e 4,2 g de cloreto de sódio foram dissolvidos em água destilada e o volume foi completado a 1.000 mililitro (ml). O pH foi acertado para 6,1 com ácido cítrico a 10%. A solução foi posteriormente autoclavada por 15 minutos a 110°C. Para cada ml da solução foi adicionado 0,002 g de estreptomicina Squibb.
- 1.2 Gradiente de Ficoll-Hypaque - Lymphocyte Separation Medium - Bionectic Laboratory Products - Kensington, MD, USA.
- 1.3 Azul tripan 1% Trypan blue - K&K Laboratories, Inc., Plasmaview, New York, USA.
- 1.4 Meio de cultura - RPMI Medium 1.640 - Grand Island Biological Company, Grand Island, New York, USA.
- 1.5 Zymosan - Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.
- 1.6 Tampão barbital pH 7,4 - Barbitone Buffer Oxide, Barbitone CFT 100 tablets - Consolidated Laboratories,

Inc., Chicago, Illinois, USA. Dez comprimidos foram dissolvidos em 1.000 ml de água destilada.

- 1.7 Anti-soros anti-imunoglobulinas humanas, monoespecífica e total, conjugadas com fluoresceína - Meloy Laboratories, Inc., Springfield, Virginia, USA.
- 1.8 Salina - Solução de cloreto de sódio a 0,85g%.
- 1.9 Heparina - Liquefine Roche - 5.000 UI de heparina por ml.
- 1.10 Solução de azul de metileno a 1% - 1 g de azul de metileno juntamente com 1 g de bicarbonato de sódio foram dissolvidos em água destilada e o volume completado para 100 ml.
- 1.11 Soro bovino fetal - GIBCO, Grand Island Biological Company.
- 1.12 Soro AB adsorvido com eritrócitos de carneiro - Soro AB de indivíduos adultos normais foi adsorvido com eritrócitos de carneiro na proporção de 2 volumes de eritrócitos para 1 volume de soro previamente inativado. A mistura foi mantida 2 horas em banho-maria e 2 horas a 4°C. Centrifugou-se e separou-se o soro adsorvido. O soro foi estocado a -20°C em aliquotas de 0,1ml.
- 1.13 Albumina bovina - Sigma Chemical Company, Albumin Stock Solution - 4,5 g%.

- 1.14 Solução de azida sódica a 0,015%.
- 1.15 Citrato de sódio a 3,8%. Foi diluído na proporção de 1 ml do citrato de sódio a 3,8% para 9 ml de salina.
- 1.16 Solução adjuvante de Freund - GIBCO, Grand Island Biological Company.
- 1.17 TRIS-NH₄Cl - Um volume de Tampão Tris pH 7,2 - 7,4 em 9 volumes de NH₄Cl.
2. Equipamentos
 - 2.1 Centrífuga Alpha II - Instrumentos Científicos Alpha Ltda., Goiânia, Brasil.
 - 2.2 Microcentrifuga Eppendorf - Brinkmann Instruments Westbury, New York, USA.
 - 2.3 Ultracentrifuga MOM 3.170 - Budapest, Hungria.
 - 2.4 Placas de Terasaki-Microtest 3.034 - Falcon, Div. Becton & Deckson, Co., Oxnard, Ca., USA.
 - 2.5 Câmara de Suta.
 - 2.6 Pipetas Pasteur - Fisher Scientific Company Pitisburg, USA.
 - 2.7 Algodão de nylon - EI Dupont de Memours, Co., Wilmington, Del, USA.

- 2.8 Banho-maria - Soc. Fabbe Ltda., São Paulo, Brasil.
- 2.9 Seringas de precisão de 5 μ l e 1 μ l Hamilton - Hamilton Company, Reno Nevada, USA.
- 2.10 Microscópio de-Imunofluorescência - Carl Zeiss.
- 2.11 Microscópio óptico - American Optical Corporation - Buffalo, New York, USA.
- 2.12 Contador automático de células sanguíneas - Marca Coulter Counter. Modelo D-2 μ l; e Hemenoglobímetro - Coulter Electronics.
- 2.13 Coluna de nylon - 0,5 g de algodão de nylon lavado, escovado e colocado em seringa plástica.

C - MÉTODOS

1. Colheita do Material

O material para os estudos morfológico, citoquímico e de marcadores de membrana foi obtido por punção medular em crista ilíaca pósterio-superior. Em dois pacientes (casos nºs 12 e 21), o material para os estudos foi obtido de sangue periférico; nestes dois pacientes existia mais de 60% de células leucêmicas circulantes.

Linfócitos de indivíduos adultos saudáveis serviram como controle.

2. Marcadores de Superfície de Linfócitos T

2.1 Obtenção de Células Leucêmicas

Três ml do aspirado de medula óssea ou sangue periférico heparinizado 50 Unidades/ml (UI/ml) foram diluídos em 10 ml de RPMI 1.640 e passados através de agulhas de calibre progressivamente menores até a dissolução de possíveis coágulos. Quando a contagem de plaquetas do sangue periférico foi maior que 20.000 μ l, a suspensão foi passada em coluna de nylon. A seguir, a suspensão foi colocada em tubos cônicos contendo 3 ml de Ficoll-Hypaque e centrifugada a 800 g por 20 minutos. As células mononucleares da interface dos líquidos foram separadas com

pipetas Pasteur e lavadas 3 vezes com RPMI 1.640. Quando as células da interface estavam misturadas com eritrócitos, estes foram lisados com TRIS-NH₄Cl. A suspensão final foi ajustada à concentração de 2×10^6 células leucêmicas por ml.

2.2 Determinação das Células Leucêmicas ER pela técnica de Mendes et al.⁸⁹ modificada.

Meio mililitro de eritrócitos de carneiro foi lavado 2 vezes com salina e 1 vez com tampão barbital e a concentração foi ajustada para 0,5% com tampão barbital antes do uso. Um décimo de mililitro desta suspensão de eritrócitos a 0,5% foi centrifugado a 200 g por 5 minutos e foi descartado o sobrenadante. Aos eritrócitos foi adicionado 0,1 ml da suspensão de células leucêmicas e 0,1 ml de soro AB previamente adsorvido com eritrócitos de carneiro. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos e, a seguir, centrifugada a 200 g por 5 minutos e um dos tubos incubado a 4°C por 1 hora e o outro foi incubado por 18 horas. Do caso nº 30 em diante, um tubo foi também incubado somente a 37°C¹⁶. A seguir foi adicionada, a cada tubo, 1 gota de azul de metileno a 1% e o conteúdo dos tubos foi cuidadosamente misturado por lentos movimentos de rotação até a homogeneização da mistura. A percentagem de células leucêmicas ER foi determinada em câmara hemocitométrica. Foram contadas 200 células em cada amostra, por dois observadores independentemente, e a média das contagens foi anotada. Quando ha

via discrepância de mais de 5 células entre a de terminação dos dois observadores, as contagens fo ram repetidas. Foram consideradas células leucêmi- cas ER as que possuíssem 3 ou mais eritrócitos de carneiro aderidos. Foram consideradas LLA ER-posi- tivas quando mais de 20% das células leucêmicas a presentassem ER em qualquer dos experimentos (Figu ra 3).

2.3 Determinação das Células Leucêmicas ER pela sedimen- tação Gravitacional em Câmara de Suta

Em 0,1 ml da suspensão de ER foi acrescentado 0,1 ml de albumina bovina e a mistura foi sedimentada em câma ra de Suta montada com papel-filtro Watman 41. A se guir, a lâmina foi corada pelo May-Grünwald-Gimsa e a morfologia das células ER foi verificada em mi croscopia comum (Figura 3). Estas determinações fo ram realizadas quando a contagem de células leucê- micas ER foi igual ou superior a 20%.

2.4 Produção do Anti-soro Antilinfócitos T (AALT) pe- la Técnica de Schlesinger & Galili ¹¹¹ modificada.

2.4.1 Obtenção dos Timócitos

Timo de recém-nascidos não-mortos foram obtidos em condições de esterilidade e retalhados com tesoura e pinça em meio RPMI 1.640. A seguir a suspensão foi filtrada em gaze e os timócitos foram separa dos por gradiente Ficoll-Hypaque estéril a 800 g por 20 minutos. A seguir, foram lavados 3 vezes

com RPMI 1.640 e a concentração foi ajustada para 10^9 timócitos por ml em salina estéril. A viabilidade celular foi determinada pelo Azul tripan.

2.4.2 Imunização

Dois coelhos foram inoculados ^{via endovenosa} subcutaneamente nas 4 patas com 10^9 timócitos viáveis emulsionados em adjuvante de Freund, na proporção de 10^9 timócitos para 1 ml do adjuvante. A seguir, foram realizadas 3 inoculações de 10^9 timócitos ^{via endovenosa} endovenosamente com intervalos de 7 dias entre uma inoculação e outra. No 28º dia após a primeira inoculação foi colhido o sangue e separado o soro.

2.4.3 Adsorções

2.4.3.1 Eritrócitos A e B

Cinco mililitros de sangue citratado de indivíduos do grupo A ou B foram lavados com 5 ml de salina, três vezes, e utilizados na hora do preparo.

2.4.3.2 Homogeneizado de Medula Óssea

Cinco mililitros de aspirado de medula óssea de indivíduos adultos sem doença hematológica, obtidos imediatamente antes do uso, em seringa heparinizada (50 U/ml), foram lavados com 5 ml de salina, 3 vezes.

2.4.3.3 Homogeneizado de Cérebro

Cem gramas de cérebro obtidos de material de necrôp

sia foram homogeneizados em liquidificador. Após a homogeneização, 5 ml do material foram lavados em 5 ml de salina, várias vezes, até que o sobrenadante ficasse incolor.

2.4.3.4 Procedimentos

Em seguida, procedeu-se à adsorção na seqüência descrita abaixo:

- Inicialmente, o soro de coelho foi incubado a 56°C por 30 minutos para se inativar o complemento.
- Adsorvido 3 vezes com eritrócitos A e B, na proporção de 5 partes do soro para 1 parte de eritrócitos, durante 30 minutos à temperatura ambiente, com agitação freqüente.
- Adsorvido 1 vez com homogeneizado de medula óssea a 4°C por 1 hora, na proporção de 1 ml do homogeneizado de medula óssea para 10 ml de soro.
- Adsorvido 1 vez com homogeneizado de cérebro na proporção de 1 ml do homogeneizado para 1 ml do soro, durante 1 hora a 4°C.
- Adsorvido 3 vezes com células de pacientes com LLC, na proporção de 1 ml do soro para 10^9 células leucêmicas, durante 12 horas, a 4°C.

O soro foi separado após cada adsorção por centrifugação a 12.000 g. Aliquotas de 0,1 ml de anti-soro foram distribuídas em placas de Terasaki e mantidas a -20°C.

2.4.4 Determinação da especificidade do AALT

A especificidade do AALT foi caracterizada pela sua

capacidade de inibir a formação de ER por linfócitos do sangue periférico e pela microlinfocitotoxicidade.

2.4.4.1 Inibição da formação de ER, por linfócitos de sangue periférico de indivíduos adultos sadios.

Uma alíquota de 0,3 ml do AALT em diferentes diluições foi misturada com 0,3 ml de uma suspensão de 2×10^6 linfócitos por ml, à qual foram adicionados soro de coelho à diluição de 1:2, como fonte de complemento. A mistura foi incubada a 37°C por 60 minutos. Ao mesmo tempo, o experimento foi repetido porém não se adicionando o complemento. Os linfócitos assim tratados foram lavados 2 vezes em tampão barbital e a concentração ajustada para 2×10^6 células por ml. Estes linfócitos foram utilizados para a formação de ER e evidênciação da presença de IgS, bem como para a presença do receptor ZC, por técnicas descritas neste trabalho (Tabelas 7,9 e 10)

2.4.4.2 Efeito Citotóxico do AALT

O AALT, adsorvido ou não, em diferentes concentrações (Tabelas 3, 4, 5, 6 e 8) foi distribuído em placas de Terasaki na quantidade de 0,1 ml por escavação. Como fonte de antígeno foram utilizadas células mononucleares do timo, sangue periférico, linfócitos T e B periféricos, células leucêmicas de pacientes com LLC e de pacientes com leucemia mielocítica aguda.

A detecção do efeito citotóxico foi realizada pela técnica

de microlinfocitotoxicidade, como descrita.

As células mononucleares do timo, sangue periférico e células leucêmicas foram obtidas como já descrito. Os linfócitos T e B do sangue periférico foram obtidos da seguinte maneira: 0,5 ml da suspensão de eritrócitos de carneiro a 0,1% foi misturado com 0,5 ml da suspensão de 2×10^6 linfócitos periféricos de indivíduos adultos saudáveis e com 0,5 ml de soro AB previamente adsorvido com hemácias de carneiro.

A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos, centrifugada a 200 g por 5 minutos e, a seguir (centrifugada a 200 g por 5 minutos e) incubada a 4°C por uma hora. A mistura foi ressuspensa e colocada em tubos de hemólise sobre 1 ml de Ficoll-Hypaque e centrifugada a 800 g por 20 minutos. As células da interface foram consideradas linfócitos B (embora elas sejam heterogêneas, vide Anexo VII). A seguir, o sobrenadante foi desprezado e o botão celular foi tratado com TRIS-NH₄Cl por 10 minutos a 37°C. A seguir, as células foram lavadas com tampão barbital duas vezes e consideradas linfócitos T.

2.5 Determinação das Células Leucêmicas com Antígenos Associados ao Linfócitos T pela Técnica de Terasaki & McClelland ¹²⁴ modificada.

Utilizando-se seringas Hamilton, 1 µl da suspensão de linfócitos ou células leucêmicas foi adicionado às escavações da placa de Terasaki, previamente descongelada. A placa foi agitada para homogeneiza

ção da mistura AALT-células. A seguir, a mistura foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e após isso foi adicionada uma gota de tampão barbital a cada escavação e a placa foi novamente incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. O tampão barbital foi desprezado e foi adicionado complemento, previamente adsorvido com células leucêmicas do paciente,¹²¹ sendo a mistura incubada por mais 30 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e 1 gota de Azul tripan foi adicionada e a mistura, incubada por 10 minutos. A placa foi lida em microscópio e a reação foi considerada positiva quando era evidenciado coloração azulada das células leucêmicas, indicando incorporação do Azul tripan.

Todas as reações foram feitas em sextuplicatas e foi estabelecida a média aritmética dos escores baseado nas percentagens de lise celular. Desse modo, foi atribuído escore 6 quando mais de 81% das células estavam lisadas, escore 5 quando a lise atingiu entre 51 e 80%, escore 4 quando era entre 31 e 50%, 3 quando era entre 21 e 30%, 2 quando era entre 15 e 20% e 1 quando a lise celular atingia menos do que 15% das células.

A toxicidade do complemento foi testada pela incubação das células leucêmicas em tampão barbital.

3. Marcadores de Superfície de Linfócitos B

3.1 Determinação dos Linfoblastos com Receptores para

o Complemento pela Formação de Rosáceas com Zymosan Tratadas com Complemento (ZC) pela Técnica de Mendes et al⁸⁹ modificada.

Em 1 ml de tampão barbitál, colocou-se uma pequena quantidade de Zymosan, que foi dissolvida mediante bombeamento com seringa de 1 ml e agulha 10x5. A seguir, a suspensão foi ajustada para 10^8 partículas por ml. A 0,1 ml desta suspensão foi adicionado 0,1 ml de uma mistura de soros humanos como fonte de complemento e incubada a 37°C por 30 minutos. Após isso, foi transferido 0,1 ml desta mistura para outros tubos e acrescentado 0,1 ml da suspensão de células leucêmicas e, a seguir, o tubo foi centrifugado a 200 g por 5 minutos. Após a adição de 1 gota de azul de metileno a 1%, o botão celular foi ressuspensão e a percentagem de células leucêmicas formando rosetas com partículas de Zymosan foi calculada do mesmo modo como o descrito para a ER.

3.2 Determinação das Células Leucêmicas com IgS pela Reação de Anti-soros Anti-imunoglobulinas Humanas Conjugadas com Fluoresceína pela técnica de Winchester e Ross¹³⁷ modificada.

Tubos contendo 0,2 ml da suspensão de células leucêmicas e 3 ml de RPMI 1.640 com 5% de soro fetal bovino foram incubados a 37°C por 30 minutos. A seguir, foram adicionados 3 ml de RPMI 1.640, aquecidos a 37°C, e a mistura foi centrifugada a 500 g por 5 minutos, sendo o sobrenadante desprezado. O botão celular foi ressuspensão em 0,2 ml de anti-so

ro anti-imunoglobulina total, e os tubos foram incubados em banho de gelo por 60 minutos com agitação freqüente. A seguir, as células foram lavadas cinco vezes com RPMI 1.640 com 5% de soro fetal bovino e azida sódica a 0,015%. As células leucêmicas foram colocadas sobre lâminas, cobertas com lâminulas, e examinadas na hora da preparação.

A percentagem de células fluorescentes foi determinada com microscópio de imunofluorescência. Foram contadas 200 células por dois observadores, independentemente. Quando houve discrepância de mais de 5 células entre a determinação dos dois observadores, as contagens foram repetidas. Quando a percentagem de células fluorescentes foi acima de 20%, as determinações foram também realizadas utilizando-se anti-soros monoespecíficos (IgM, IgG, IgD, kappa e lambda).

Os conjugados foram previamente ultracentrifugados para se removerem agregados de imunoglobulinas.

3.3 Determinações das Células Leucêmicas com Receptores para Eritrócitos de Camundongo (MR) pela técnica de Stathopoulos & Elliott¹²².

Sangue de camundongo, obtido no momento da determinação, foi colhido em citrato de sódio a 3,8%. Os eritrócitos foram lavados duas vezes em salina e uma vez em tampão barbital e a concentração foi ajustada para 0,5% com o mesmo tampão, imediatamente antes do uso; 0,2 ml da suspensão de eritrócitos de camundongo foi centrifugado a 200 g por 5 minu

tos e o sobrenadante, desprezado. Ao botão celular foi adicionado 0,2 ml da suspensão de células leucêmicas e 0,05 ml de soro fetal bovino e a mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. A seguir, foi centrifugada a 200 g por 5 minutos e incubada durante 2 horas a 4°C. Após a adição de 1 gota de azul de metileno a 1%, o botão celular foi ressuspensado e a percentagem de células leucêmicas MR foi determinada em câmara hemocitométrica. Foram considerados células MR positivas, aquelas células com 3 ou mais eritrócitos aderidos. A percentagem de células leucêmicas MR foi calculada do mesmo modo como o descrito para a ER.

3.4 Determinação das Células Leucêmicas com Antígenos Associados aos Loci D e DR (Ia-like) pela Técnica de Microlinfocitotoxicidade

Utilizando-se anti-soro cedido gentilmente pelo Dr. Peter Cressewel, da Duke University, foram determinados os antígenos referidos, pela técnica de microlinfocitotoxicidade. A especificidade do anti-soro aos diversos tipos celulares já foram publicados.
34

4. Citoquímica

4.1 Demonstração da Presença de Glicogênio na Célula Leucêmica, Realizada pela Coloração Citoquímica do PAS pela Técnica Descrita por Hayhoe et al ⁵⁹. Considerou-se leucemia PAS fracamente positiva, quando menos de 20% das células leucêmicas apresen

tavam grânulos ou blocos avermelhados no citoplasma; moderadamente positiva, quando esta percentagem estava entre 20 e 50% e fortemente positiva, quando a percentagem era superior a 50% (Figura 4).

4.2 Demonstração da Atividade das Enzimas Peroxidases da Célula Leucêmica, Realizada pela Coloração Citoquímica da Peroxidase pela Técnica de Kaplow⁷¹. Considerou-se leucemia Peroxidase-positiva quando mais do que 5% das células leucêmicas apresentavam granulações marrom-esverdeadas.

4.3 Demonstração da Presença de Substâncias Lipídicas nas Células Leucêmicas, Realizada pela Coloração Citoquímica do Sudan B pela Técnica de Sheehan & Storey¹¹⁷. Considerou-se leucemia Sudan B-positiva quando mais do que 5% das células leucêmicas apresentavam grânulos marrons ou pretos.

4.4 Demonstração da Atividade das Enzimas FA, Realizada pela Coloração Citoquímica de Golberg & Barca⁵⁴. Considerou-se leucemia FA-positiva quando menos de 20% das células leucêmicas apresentavam grânulos avermelhados no citoplasma. Foi considerada moderadamente positiva quando esta percentagem estava entre 20 e 50% e fortemente positiva quando era superior a 50% (Figura 5).

4.5 Demonstração da Atividade das Enzimas EACA na Célula Leucêmica pela Técnica de Yam et al.¹⁴¹.

fraca mente

Considerou-se leucemia EACA-positiva quando mais de 5% das células blásticas apresentavam grânulos de coloração azul.

4.6 Demonstração da Atividade das Enzimas ENE, Realizada pela Técnica de Yam et al.¹⁴¹.

Considerou-se leucemia ENE-positiva quando as células leucêmicas apresentavam grânulos variando do marrom ao vermelho (Figura 6). A graduação da positividade foi realizada como para o PAS.

5. Morfologia Celular

A caracterização morfológica das células leucêmicas foi realizada de acordo com as sugestões do grupo colaborativo Frances-Americano-Britânico (FAB)¹² (Figuras 8, 9 e 10).

Quando houve dificuldades para a classificação, foram consideradas as células que predominavam no esfregaço e a avaliação final foi dada pelo conjunto da lâmina.

Em um paciente (caso nº 16), não foi possível a distinção entre célula leucêmica do tipo L1 ou L2.

6. Outros Exames Complementares

6.1 Contagem de Células Sangüíneas

Sangue foi coletado em vidros de 5 ml contendo EDTA potássico para a rotina de valores hematológicos. A contagem das células sangüíneas e a determinação da hemoglobina foram realizadas com o Coulter Counter

Model D2. A contagem das plaquetas foi obtida pelo método direto. O volume globular foi obtido pelo micrométodo. A contagem diferencial das células do aspirado de medula óssea e do sangue periférico foi realizada em lâminas coradas pelo May-Grünwald-Giemsa.

6.2 Exame do líquido Cefalorraquidiano

A contagem do número total de células foi obtida em câmara de Fuchs-Rosenthal e a diferencial, obtida em lâminas sedimentadas em câmara de Suta e coradas pelo May-Grünwald-Giemsa.

7. Manifestações Clínicas

7.1 Considerou-se linfonomegalia generalizada, quando os linfonodos mediam mais do que 2,0 cm em qualquer diâmetro e pertenciam a mais de uma cadeia regional não-contígua.

7.2 Considerou-se visceromegalia acentuada, quando o fígado e/ou o baço possuíam mais de 5,0 cm abaixo do rebordo costal direito e do rebordo costal esquerdo, respectivamente.

7.3 Considerou-se massa em mediastino presente, quando esta alteração foi detectada mediante radiografia simples de tórax nas incidências ântero-posterior e perfil.

8. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram analisados utilizando-se o pacote estatístico para ciências sociais (statistical package for the social sciences) disponível no sistema DEC-10 do centro de computação da Universidade Federal do Paraná.

Foram realizados testes de Qui-Quadrado para se verificar o grau de associação das diversas variáveis em estudo.

Quando houve limitações para o uso do teste de Qui-Quadrado, foi usado o teste exato de Fisher.

FIGURA 3 - Célula leucêmica formando roseta com eritrócitos de carneiro.
x 1.000 - May-Greünwald - Giemsa

Figura 4 - Citoquímica da célula leucêmica. Reação do PAS.
x 1.000

FIGURA 5 - Citoquímica da célula leucêmica. Reação da FA.

x 1.000

FIGURA 6 - Citoquímica da célula leucêmica. Reação da ENE.

x 1.000

FIGURA 8 - Morfologia da célula leucêmica. Tipo
L1.

x 1.000 - May-Greünwald - Giemsa

FIGURA 9 - Morfologia da célula leucêmica. Tipo
L2.

x 1.000 - May-Greünwald - Giemsa

FIGURA 10 - Morfologia da célula leucêmica. Tipo L3.

x 1.000 - May-Greünwald - Giemsa

EFEITO CITOTÓXICO E ESPECIFICIDADE DO AALT

A - EFEITO CITOTÓXICO

O efeito citotóxico do AAL^TA', adsorvido ou não, foi investigado com células de timo, linfócitos de sangue periférico, células de pacientes com LLC, LMA e neuroblastoma metastático.

A Tabela 3, mostra os escores do efeito citotóxico do AALT não-adsorvido sobre as células do timo e linfócitos do sangue periférico. Houve lise completa dos dois tipos celulares até a diluição do anti-soro de 1:8 (escore 6). A pós esta diluição, a percentagem de células lisadas diminuiu, sendo mais acentuada em relação aos linfócitos periféricos. O AALT sem o complemento não possui nenhum efeito lítico sobre as células investigadas. Quando foi usado apenas complemento, observou-se efeito citotóxico parcial em 2 experimentos.

A Tabela 4 mostra os escores do efeito citotóxico do AALT adsorvido com eritrócitos A e B, cérebro e medula óssea sobre as células do timo e linfócitos periféricos. Este procedimento diminuiu o efeito citotóxico do AALT, tanto para células do timo como para os linfócitos do sangue periférico. Quando foram usados o AALT e o complemento, isoladamente, não se evidenciou efeito citotóxico sobre as células estudadas.

A Tabela 5 mostra os escores do efeito citotóxico do AALT adsorvido com eritrócitos A e B, cérebro, medula óssea, bem como com células de pacientes com LCC, sobre as células do timo e linfócitos periféricos. O efeito citotóxico do AALT também adsorvido com células de pacientes com LLC foi semelhante àquele sem esta adsorção sobre os timócitos, porém, evidenciou-se diminuição deste efeito sobre os linfócitos periféricos.

A Tabela 6 mostra os escores do efeito citotóxico do AALT adsorvido com eritrócitos A e B, medula óssea, cérebro e células de pacientes com LLC sobre células de pacientes com LLA^(M), LLC e neuroblastoma metastático (NM)^(NAG). Foi evidenciado (que não houve) lise destas células com o emprego de AALT.

TABELA 3 - ESCORES BASEADO NO EFEITO CITOTÓXICO DE VÁRIAS DILUIÇÕES DO AALT NÃO-ADSORVIDO SOBRE AS CÉLULAS DO TIMO E LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO.

CÉLULAS	EXPERIMENTOS	AALT NÃO-ADSORVIDO + C'								AALT NÃO-ADSORVIDO	C'	CONTROLE
		DILUIÇÕES										
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128			
TIMO	1	6	6	6	6	6	6	6	4	1	1	1
	2	6	6	6	6	6	6	6	5	1	1	1
	3	6	6	6	6	6	6	5	5	1	3	1
	4	6	6	6	6	6	5	4	4	1	2	1
	5	6	6	6	6	5	4	4	4	1	1	1
LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO	1	6	6	6	5	4	4	3	3	1	1	1
	2	6	6	6	6	5	5	5	4	1	1	1
	3	6	6	6	6	5	4	4	4	1	1	1
	4	6	6	5	5	4	4	3	3	1	1	1
	5	6	6	6	6	5	5	4	4	1	1	1
	6	6	6	6	5	5	5	4	4	1	1	1
	7	6	6	6	6	6	5	5	5	1	1	1
	8	6	6	6	6	6	6	4	4	1	1	1

C' = Complemento

TABELA 4 - ESCORES BASEADO NO EFEITO CITOTÓXICO DE VÁRIAS DILUIÇÕES DO AALT(ADSORVIDO COM ERITRÓCITOS A e B, CÉREBRO E MEDULA ÓSSEA) SOBRE AS CÉLULAS DO TIMO E LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO.

CÉLULAS	EXPERIMENTOS	AALT ADSORVIDO + C'							AALT ADSORVIDO	C'	CONTROLE
		DILUIÇÕES									
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64			
TIMO	1	6	6	6	5	5	4	3	1	1	1
	2	6	6	6	5	4	4	3	1	1	1
	3	6	6	6	5	4	4	4	1	1	1
LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO	1	6	5	5	4	3	3	3	1	1	1
	2	6	6	5	5	4	3	2	1	1	1
	3	6	6	6	5	4	4	3	1	1	1
	4	6	6	6	5	4	4	3	1	1	1
	5	6	6	6	5	4	4	3	1	1	1

C' = Complemento

TABELA 5 - ESCORES BASEADO NO EFEITO CITOTÓXICO DE VÁRIAS DILUIÇÕES DO AALT (ADSORVIDO COM ERITRÓCITOS A e B, CÉREBRO E MEDULA ÓSSEA E CÉLULAS DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA) SOBRE AS CÉLULAS DO TIMO E LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO.

CÉLULAS	EXPERIMENTOS	AALT ADSORVIDO + C'							AALT ADSORVIDO	C'	CONTROLE
		DILUIÇÕES									
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128			
TIMO	1	6	6	6	5	4	3	2	1	1	1
	2	6	6	6	5	4	3	2	1	1	1
	3	6	6	6	5	4	3	2	1	1	1
LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO	1	5	4	4	3	2	1	1	1	1	1
	2	5	5	4	3	1	1	1	1	1	1
	3	4	4	3	2	1	1	1	1	1	1
	4	5	4	4	3	1	1	1	1	1	1
	5	4	4	4	3	3	2	1	1	1	1

C' = Complemento

TABELA 6 - ESCORES BASEADO NO EFEITO CITOTÓXICO DE VÁRIAS DILUIÇÕES DO AALT (ADSORVIDO COM ERITRÓCITOS A e B, CÉREBRO, MEDULA ÓSSEA E CÉLULAS DE PACIENTES COM LLC) SOBRE AS CÉLULAS DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA, LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA E NEUROBLASTOMA METASTÓTICO (NM).

CÉLULAS	EXPERIMENTOS	AALT ADSORVIDO + C'				AALT ADSORVIDO	C'	CONTROLE
		DILUIÇÕES						
		1:1	1:2	1:4	1:8			
LMA	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1	2	1	1	1	1	1
	3	1	1	1	1	1	1	1
LLC	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1	1	1	1
	3	1	1	1	1	1	1	1
	4	1	1	1	1	1	1	1
	5	1	1	1	1	1	1	1
NM	1	1	1	1	1	1	1	1

C' = Complemento

B - ESPECIFICIDADE DO AALT

Evidências de que o AALT adsorvido é específico para antígenos associados aos linfócitos T foram baseadas na inibição da formação de ER pelos linfócitos do sangue periférico, pela não-interferência na expressão de imunoglobulina pelos linfócitos B, pelo efeito citotóxico do AALT sobre os timócitos e linfócitos T do sangue periférico e pela diminuição do efeito citotóxico na população de linfócitos B.

A Tabela 7 mostra os valores de ER expressos por linfócitos de sangue periférico, tratados com a AALT adsorvido com eritrócitos A e B, cérebro e medula óssea, em diversas diluições, em presença ou não do complemento. O AALT, em presença do complemento, eliminou a formação de ER por linfócitos de sangue periférico até a diluição de 1:4. Na diluição de 1:16 os valores são praticamente iguais aos do controle. O AALT, mesmo sem o complemento, inibe parcialmente a formação de ER até a diluição de 1:2. O complemento, isoladamente, não possui nenhum efeito inibitório sobre a expressão da ER.

A Tabela 8 mostra os escores do efeito citotóxico do AALT sobre os linfócitos T e linfócitos B de sangue periférico. O AALT lisa completamente as células T até a diluição de 1:8 e, apenas parcialmente, a população B até a diluição de 1:16

O AALT não apresentou nenhuma interferência na expressão da IgS e dos receptores de ZC (Tabelas 9 e 10).

TABELA 7 - INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE ER DE LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO TRATADOS COM VÁRIAS DILUIÇÕES DO AALT (ADSORVIDO COM ERITRÓCITOS A e B, MEDULA ÓSSEA E CÉREBRO).

CELULAS	EXPERIMENTOS	ANTI-SORO ADSORVIDO + C'					ANTI-SORO ADSORVIDO			C'	CONTROLE
		DILUIÇÕES					DILUIÇÕES				
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:1	1:2	1:4		
	1	0	0	4	16	43	20	28	40	55	58
	2	0	2	3	20	38	30	27	50	59	60
LINFÓCITOS PERIFÉRICOS	3	0	8	6	19	48	22	22	58	61	66
	4	0	1	2	19	40	18	24	45	63	60
	5	0	2	3	23	41	28	20	50	58	62

C' = Complemento

TABELA 8 - ESCORES BASEADO NO EFEITO CITOTÓXICO DE VÁRIAS DILUIÇÕES DO AALT (ADSORVIDO COM ERITRÓCITOS A e B, CÉREBRO, MEDULA ÓSSEA E CÉLULAS DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA) SOBRE OS LINFÓCITOS T e B.

CÉLULAS	EXPERIMENTOS	AALT ADSORVIDO + C'						AALT ADSORVIDO	C'	CONTROLE
		DILUIÇÕES								
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32			
Linfócitos T	1	6	6	6	6	5	3	1	1	1
	2	6	6	6	5	5	4	1	1	1
Linfócitos B	1	4	3	2	1	1	1	1	1	1
	2	4	2	2	2	1	1	1	1	1

C' = Complemento

TABELA 9 - EFEITO DO AALT (ADSORVIDO COM ERITRÓCITOS A e B, CÉREBRO E MEDULA ÓSSEA) SOBRE A PERCENTAGEM DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS EXPRESSANDO IgS.

CELULAS	EXPERI MENTOS	AALT ADSORVIDO + C'			AALT ADSORVIDO	C'	CONTROLE
		DILUIÇÃO					
		1:1	1:2	1:4			
		IgS%			IgS%		
LINFÓCITOS PERIFÉRICOS	1	17	18	16	15	13	15
	2	13	15	14	16	14	16
	3	16	16	13	15	17	16

C' = Complemento

TABELA 10 - EFEITO DO AALT (ADSORVIDO COM ERITRÓCITOS A e B, CÉREBRO E MEDULA ÓSSEA) SOBRE A PERCENTAGEM DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS ZC.

CÉLULAS	EXPERI MENTOS	AALT ADSORVIDO + C'			AALT ADSORVIDO	C'	CONTROLE
		DILUIÇÃO					
		1:1	1:2	1:4			
		ZC%			ZC%	ZC%	ZC%
	1	18	19	14	13	14	13
	2	20	18	16	12	14	15
LINFÓCITOS PERIFÉRICOS	3	21	17	17	13	12	10
	4	19	18	16	10	11	11

C' = Complemento

RESULTADOS

RESULTADOS

Os achados referentes ao tamanho dos linfonodos, do fígado e baço e à presença de massa em mediastino constam dos Anexos I e II. As características morfológicas, resultados dos estudos citoquímicos e dos marcadores de membrana constam dos Anexos III, IV e V. Os valores hematimétricos constam do Anexo VI.

A Tabela 11 mostra o número de pacientes classificados nos 3 grupos de LLA, correlacionados com os marcadores imunológicos de membrana utilizados na sua classificação.

TABELA 11 - NÚMERO DE PACIENTES NOS TRÊS TIPOS DE LLA DEFINIDOS PELOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS DE MEMBRANA.

TIPOS DE LLA	n	ER > 20%	ER < 20%	IgS > 20%	IgS < 20%	AALT	AALB
T	18	13	5	1	17	17	1
B	1	-	1	1	-	-	1
NÃO-T/ NÃO-B	21	-	21	-	21	-	18
TOTAL	40	13	27	2	38	17	20

n = número de pacientes

A - LLA DO TIPO T

Dezoito pacientes foram classificados como LLA do tipo T, os quais preencheram pelo menos um dos dois critérios anteriormente estabelecidos. Dezesete pacientes reagiram com o AALT, dos quais 12 apresentaram células leucêmicas ER acima de 20%. Cinco pacientes reagiram exclusivamente com o AALT. As células leucêmicas de um paciente não foram reativas com o AALT, mas formaram ER em número superior a 20% (Tabela 12).

TABELA 12 - NÚMERO DE PACIENTES COM LLA DO TIPO T APRESENTANDO CÉLULAS LEUCÊMICAS REATIVAS AO AALT E/OU EXPRESSANDO ER.

n	MARCADORES DE MEMBRANA
12	AALT +/-ER +
5	AALT +
1	ER +

n = número de pacientes

As células leucêmicas do caso nº 33, além de reagirem com o AALT e formarem rosetas acima de 20%, apresentaram imunoglobulina de superfície (ER 72% e IgS 34%).

De modo semelhante, as células leucêmicas do caso nº 12, além de reagirem com AALT, também reagiram com o AALB.

B - LLA DO TIPO B

Apenas 1 paciente (caso nº 8) foi classificado como LLA do tipo B, pois apresentava mais de 80% das células leucêmicas com IgS do tipo IgM kappa e reativas ao AALB.

C - LLA DO TIPO NÃO-T/NÃO-B

Vinte e um pacientes foram classificados como portadores de LLA do tipo não-T/não-B. As células leucêmicas destes pacientes não formaram ER acima de 20%, não expressaram IgS acima de 20% e não reagiram com o AALT. As células de dezoito destes pacientes foram reativas com o AALB (Tabela 8).

A Tabela 13 mostra o número de pacientes nos 3 tipos de LLA que possuíam receptores ZC e MR. Dos 7 pacientes que possuíam ZC acima de 10%, 5 pertenciam ao tipo T, porém a diferença do número de pacientes com estes receptores entre os tipos T e o não-T/não-B não foi estatisticamente significativa ($X^2 = 1,591$ $p > 0,05$).

TABELA 13 - NÚMERO DE PACIENTES NOS 3 TIPOS DE LLA COM RECEPTORES PARA ZC e MR.

TIPOS DE LLA	n	ZC (%)			MR (%)	
		0-5	6-10	> 10	0-5	> 5
T	18	7	6	5	18	0
B	1	1	0	0	0	1
NÃO-T/ Não-B	21	13	6	2	17	4
TOTAL	40	21	13	7	35	5

ZC = Receptor para o complemento; MR = Receptor para eritrocito de camundongo; n = número de pacientes.

Os receptores MR foram encontrados em percentagens acima de 5%, tanto em pacientes dos tipos não-T/não-B como nos do tipo B. Embora os receptores MR não estivessem associados ao tipo não-T/não-B (χ^2 3,680 $p = 0,06$), 4 dos 21 pacientes deste tipo de LLA apresentaram valores acima de 5% e nenhum do tipo T.

A Tabela 14 mostra os resultados das reações citoquímicas dos tipos T, B e não-T/não-B. Nove pacientes apresentaram reação intensa ao PAS. Destes, 4 pacientes eram do tipo T e 5 pacientes do tipo não-T/não-B, não se evidenciando, portanto, diferença estatisticamente significativa entre estes dois tipos de LLA ($\chi^2=0,069$ $p > 0,05$).

TABELA 14 - NÚMERO DE CASOS POSITIVOS ÀS REAÇÕES CITOQUÍMICAS DOS 3 TIPOS DE LLA.

CITOQUÍMICA	n	TIPOS DE LLA		
		T	NÃO-T/NÃO-B	B
PAS				
+++	9	4	5	-
++	-	-	-	-
FA				
+++	8	8	-	-
++	4	4	-	-
ENE				
+++	3	2	1	-
++	1	1	-	-

+++ = reação intensa;
 ++ = reação moderada;
 n = número de pacientes

Doze pacientes apresentaram reação da FA-positiva, sendo todos do tipo T. Desse modo, evidenciou-se uma associação entre a positividade da FA e os pacientes do tipo T ($X^2=18,521$ $p < 0,001$). A positividade da reação citoquímica da FA não esteve associada com massa em mediastino ($X^2=2,529$ $p > 0,05$) e número de leucócitos ($X^2= 1.027$ $p > 0,05$).

Quatro pacientes apresentaram reação da ENE-positiva. Três deles pertenciam ao tipo T e 1, ao tipo não-T/não-B. Com relação à positividade da ENE, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois tipos LLA ($X^2= 0,678$ $p > 0,05$).

A Tabela 15 mostra os achados morfológicos das células leucêmicas dos tipos T, B e não-T/não-B. No tipo T, observaram-se 11 pacientes com células leucêmicas do tipo morfológico L1, 5 pacientes com o tipo L2 e 1 paciente com o tipo L3. Em um paciente deste grupo, não foi possível a caracterização morfológica.

TABELA 15 - NÚMERO DE CASOS COM OS VÁRIOS PADRÕES MORFOLÓGICOS DE CÉLULAS LEUCÊMICAS DOS 3 TIPOS DE LLA.

MORFOLOGIA	n	TIPOS DE LLA		
		T	NÃO-T/NÃO-B	B
L1	25	11	14	-
L2	12	5	7	-
L3	2	1	-	1
NC	1	1	-	-

n = número de pacientes
NC = Não-classificado

No tipo de LLA não-T/não-B foram evidenciados 14 pacientes com o tipo morfológico L1 e 7 pacientes com o tipo L2.

A frequência dos diferentes tipos morfológicos, entre os dois tipos de LLA, não apresentou diferença estatisticamente significativa ($X^2 = 1,453$ $p > 0,05$).

A Tabela 16 mostra os valores hematológicos dos pacientes por ocasião da internação. Do total de 40 pacientes, 14 apresentaram concentração de Hb acima de 10 g/dl e 26 apresentaram valores inferiores a este.

TABELA 16 - VALORES HEMATOLÓGICOS POR OCASIÃO DA INTERNAÇÃO DOS PACIENTES NOS 3 TIPOS DE LLA.

VALORES HEMATOLÓGICOS	n	TIPOS DE LLA		
		T	NÃO-T/NÃO-B	B
Hb				
5	2	0	2	0
5-10	24	8	16	0
>10	14	10	3	1
Leucócitos				
> 50.000	9	5	4	0
10.000-50.000	15	7	8	0
< 10.000	16	6	9	1
Plaquetas				
> 100.000	8	3	4	1
50.000-100.000	2	1	1	0
< 50.000	28	14	14	0

n = número de casos;
Hb = hemoglobina.

Na LLA do tipo T, 10 pacientes apresentaram valores de Hb acima de 10 g/dl e os demais, entre 5 a 10 g/dl. Chamou a atenção o fato de que nenhum paciente deste tipo apresentou níveis de Hb inferiores a 5 g/dl.

No grupo não-T/não-B, 3 pacientes apresentaram níveis de Hb acima de 10 g/dl, 16 pacientes, entre 5 e 10 g/dl e 2 pacientes com valores de Hb abaixo de 5 g/dl.

Os pacientes com LLA do tipo T apresentaram valores de Hb maiores do que os do tipo não-T/não-B. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($X^2 = 8,254$ $p < 0,05$).

Em relação à contagem de leucócitos, foi observado que, entre os 40 pacientes, 9 apresentaram leucócitos acima de 50.000/ μ l, 15 pacientes, entre 10.000 e 50.000/ μ l e 16 pacientes, abaixo de 10.000/ μ l.

Chamou a atenção o fato de que apenas 5 pacientes do grupo T apresentaram valores de leucócitos acima de 50.000/ μ l.

No grupo não-T/não-B, 4 pacientes apresentaram valores de leucócitos acima de 50.000/ μ l, 8 pacientes apresentaram valores entre 10.000 e 50.000/ μ l e 9 pacientes, valores abaixo de 10.000/ μ l.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de leucócitos nos grupos T e não-T/não-B ($X^2 = 0,550$ $p > 0,05$).

A contagem do número de plaquetas não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos T e não-T/não-B ($X^2 = 0,116$ $p > 0,05$).

A Tabela 17 mostra o número de pacientes do grupo T com diferentes contagens de leucócitos nas diversas faixas etárias. Observou-se que todos os pacientes deste grupo, que apresentavam leucócitos acima de $50.000/\mu\text{l}$, tinham mais de 5 anos de idade. Por outro lado, observou-se que apenas 2 pacientes com mais de cinco anos de idade apresentavam leucócitos abaixo de $10.000/\mu\text{l}$. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as contagens de leucócitos nas diferentes faixas etárias ($X^2 = 10,782$ $p=0,09$)

TABELA 17 - NÚMERO DE PACIENTES POR FAIXA ETÁRIA COM DIFERENTES CONTAGENS LEUCOCITÁRIA NO GRUPO DE LLA DO TIPO T.

IDADE (anos)	n	CONTAGEM LEUCOCITÁRIA (por μl)		
		< 10.000	10.000 - 50.000	> 50.000
0 - 2	2	-	2	-
2 - 5	5	4	1	-
5 - 10	3	1	1	1
10	8	1	3	4

n = número de pacientes

A Tabela 18 mostra a distribuição dos pacientes do tipo não-T/não-B nas diferentes faixas etárias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as contagens de leucócitos nas diferentes faixas etárias deste tipo ($X^2 = 7,913$ $p > 0,05$).

TABELA 18 - NÚMERO DE PACIENTES POR FAIXA ETÁRIA COM DIFERENTES CONTAGENS LEUCOCITÁRIAS NO GRUPO DE LLA DO TIPO NÃO-T/NÃO-B.

IDADE (anos)	n	CONTAGEM LEUCOCITÁRIA (por μ l)		
		< 10.000	10.000 - 50.000	> 50.000
0 - 2	3	0	1	2
2 - 5	10	6	3	1
5 - 10	1	0	1	0
10	7	3	3	1

n = número de pacientes

A Tabela 19 mostra a distribuição por sexo e idade dos pacientes com os 3 tipos de LLA. No grupo LLA do tipo T, 14 pacientes eram do sexo masculino (M) e 4 pacientes, do sexo feminino (F). No tipo de LLA não-T/não-B, 9 pacientes eram do sexo masculino e 12 pacientes eram do sexo feminino. Observou-se uma maior proporção de pacientes do sexo masculino no tipo T (M:F = 3:1) e uma maior proporção de pacientes do sexo feminino no tipo não-T/não-B (M:F = 0,7:1).

No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os sexos nos dois tipos de LLA ($X^2 = 3,548$ $p=0,06$). Chamou a atenção o fato de que, nos pacientes com mais de 10 anos de idade, a proporção M:F nos pacientes do tipo T foi de 8:1 (Figura 7).

TABELA 19 - DISTRIBUIÇÃO POR SEXO E IDADE DOS PACIENTES COM OS TRÊS TIPOS DE LLA.

	n	TIPOS DE LLA		
		T	NÃO-T/NÃO-B	B
Sexo Masc.	24	14	9	1
Fem.	16	4	12	-
Idade (anos)				
< 2	5	2	3	-
2 - 5	16	5	10	1
5 - 10	4	3	1	-
> 10	15	8	7	-

n = número de pacientes

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de pacientes nas 4 faixas etárias consideradas, nos dois tipos de LLA ($X^2 = 2,719$ $p > 0,05$). Notou-se, entretanto, uma maior proporção de pacientes com idades compreendidas entre 2 e 5 anos no tipo não-T/não-B e uma maior proporção de pacientes com idade superior a 14 anos no tipo T (Figura 7).

A Tabela 20 mostra as manifestações clínicas dos pacientes nos 3 tipos de LLA. Dezesesseis pacientes apresentavam linfonodomegalia generalizada, 9 destes pacientes pertenciam ao tipo T e 7 pacientes, ao tipo não-T/não-B, não existindo associação entre linfonodomegalia generalizada e os tipos de LLA ($X^2 = 0,530$ $p > 0,05$).

TABELA 20 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DOS PACIENTES NOS TRÊS TIPOS DE LLA.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	n	TIPOS DE LLA		
		T	NÃO-T/NÃO-B	B
Linfonodos > 2 cm	16	9	7	-
Fígado				
0 - 5	17	7	4	-
> 5	29	11	17	1
Baço				
0 - 5	22	9	12	-
> 5	18	9	9	-
Massa no Mediastino	6	6	-	-
SNC	2	1	1	-

n = número de pacientes

SNC = sistema nervoso central

Vinte e nove pacientes possuíam fígado medindo além de 5 cm do RCD; destes, 11 pertenciam ao tipo T e 17, ao ti

po não-T/não-B. Dos dezoito pacientes que apresentavam o baço medindo além de 5 cm do RCE, 9 pertenciam ao tipo T e 9 ao tipo não-T/não-B. Portanto, visceromegalia acentuada não este associada a qualquer dos dois tipos de LLA ($X^2 = 1,031$ $p > 0,05$ e $X^2 = 0,015$ $p > 0,05$, respectivamente).

O aumento dos linfonodos, baço e fígado não esteve associado com nenhuma idade em particular (idade x linfonodo $X^2 = 4,653$ $p > 0,05$), (idade x baço $X^2 = 1,667$ $p > 0,05$) e (idade x fígado $X^2 = 0,460$ $p > 0,05$).

Seis pacientes de nossa série apresentaram massa em mediastino. Esta manifestação clínica esteve associada com o grupo T ($X^2 = 5,910$ $p < 0,05$). Os 6 pacientes tiveram células leucêmicas, que reagiram com AALT, porém, apenas dois destes apresentaram ER acima de 20%. Três pacientes foram classificados morfológicamente como L1, dois como L2 e um paciente como L3. A reação citoquímica da FA foi intensamente positiva em 5 destes pacientes, enquanto que foi fracamente positiva em um.

Chamou a atenção o fato de que a massa em mediastino foi observada em apenas 1 paciente com idade inferior a 7 anos (caso nº 35, 4 anos). Todos os demais pacientes com esta manifestação clínica apresentaram idade igual ou superior a 7 anos.

Dois pacientes apresentaram envolvimento do SNC na entrada; um era do sexo masculino e do tipo T e o outro, do se

xo feminino e do tipo não-T/não-B. Este último paciente foi a óbito no segundo dia de internação e a necrôpsia evidenciou infiltração meníngea com células leucêmicas.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A aplicação dos métodos imunológicos ao estudo da LLA permitiu uma nova dimensão para o entendimento desta doença. A questão central é conhecer quanto que as informações imunológicas podem acrescentar à experiência clínica, morfológica e citológica, e se estes achados podem ser correlacionados entre si, possibilitando maiores informações sobre o prognóstico dos pacientes, bem como a separação de grupos de pacientes que devam ser tratados de modo distinto.

A confiança nos resultados dos estudos de marcadores de membrana das células leucêmicas depende do conhecimento e controle de uma série de problemas metodológicos e técnicos. Embora já existam técnicas padronizadas para a diferenciação das células T e B⁹, ainda se conhece pouco sobre a sequência da expressão dos marcadores detectados e as subpopulações de células que apresentam estes marcadores. Estas dificuldades são mais evidentes quando se trabalha com populações de células anormais, como são as células leucêmicas.

A formação de ER é aceita como marcador para linfócitos T do sangue periférico⁹. A aplicação desta metodologia às células leucêmicas, entretanto, apresenta algumas dificuldades. A primeira delas é em relação ao local de colheita das células para a realização do teste. A utilização do sangue periférico co

mo fonte de células para a realização dos estudos imunológicos pode levar a conclusões discrepantes se o mesmo paciente for estudado com células de medula óssea. Lauer et al.⁷⁷ estudaram 13 pacientes com diagnóstico de LLA. Com a utilização do sangue periférico como fonte de células leucêmicas, 8 de 13 pacientes apresentaram ER acima de 20% e, quando utilizaram aspirado de medula óssea, apenas 1 paciente apresentou ER acima de 20%. Desse modo, a utilização do sangue periférico como fonte de células para estudo, pode aumentar o número de pacientes com LLA do tipo T.

A temperatura de incubação da suspensão de células leucêmicas com eritrócitos de carneiro também tem importância na contagem final das células que formam ER. Borella et al.¹⁶ verificaram que as células leucêmicas formam ER, tanto a 40°C quanto a 37°C, enquanto que os linfócitos T maduros perdem a capacidade de formar ER a 37°C.

O tempo de incubação da suspensão das células leucêmicas com eritrócitos de carneiro é outra variável que influencia na contagem final das células formando ER. Lukes et al.⁸⁴ verificaram que os escores de ER alcançam um platô após duas horas de incubação. Períodos menores do que este poderiam estar detectando subpopulações celulares com receptores de alta afinidade 140.

O tratamento dos eritrócitos de carneiro com determinadas substâncias também aumenta as contagens finais das células ER. Melvin⁹⁰ estudou o efeito do S-(2-aminoethyl) isothiuronium bromide hydrobromide (AET) em amostras de células leucê

micas de pacientes com LLA. Verificou que, 14 pacientes, possuem células leucêmicas formando ER. Seis destes pacientes formaram ER somente quando foi adicionado AET aos eritrócitos.

Finalmente, a identificação morfológica da célula formando ER é importante para a diferenciação entre célula madura e imatura. O procedimento mais utilizado é a citocentrifugação em lâminas da suspensão de células formadoras de ER, coradas pelo Wright ou May-Grünwald-Giemsa ⁸⁴.

A presença da imunoglobulina de superfície detectada por imunofluorescência é considerada o mais aceitável marcador de linfócitos B ⁹. No entanto, esta identificação apresenta também alguns problemas. Um deles é dependente da sensibilidade e especificidade do anti-soro empregado, havendo por isso a necessidade de utilização de controles conhecidos, positivos e negativos. Outro problema está relacionado ao fato de que a simples presença da imunoglobulina da superfície da célula não significa que ela seja produzida por esta célula. Somente a demonstração de imunoglobulina sintetizada pela célula é válida como um marcador de membrana. Determinações da imunoglobulina produzida pela célula podem ser conseguidas após o tratamento destas com tripsina ⁸⁰, ou por incubação a 37°C ⁷⁶.

Finalmente, podem ocorrer falsos positivos, com imunofluorescência da célula, pela ligação de agregados de imunoglobulinas do anti-soro com a célula via receptor Fc. Isto pode ser evitado utilizando-se reagentes F (ab')₂ ¹³⁸.

A utilização dos hétéro-anti-soros obtidos a partir de células B ou T maduras, fetais ou imaturas, com o objetivo de se

determinar o fenótipo celular, estão sendo cada vez mais empregados. Os resultados da utilização deste procedimento sugerem que os mesmos devam ser cuidadosamente analisados, uma vez que existem diferenças qualitativas e quantitativas dependentes do tipo de célula usada como antígeno e o animal utilizado como fonte de anticorpo. A metodologia é também importante na avaliação dos antígenos de membrana. Rotineiramente são utilizadas as técnicas de imunofluorescência e da microlinfocitotoxicidade. Na metodologia que emprega a microlinfocitotoxicidade, é importante a avaliação crítica dos resultados porque alguns anti-soros são pouco específicos. Além disso, este método não permite a identificação das células reativas. Como alternativa utilizam-se técnicas de imunofluorescência, que são muito mais informativas, porém necessitam de anti-soros altamente específicos, difíceis de serem obtidos.

Três hetero-anti-soros estão sendo usados amplamente no estudo das LLA. O primeiro é o anti-soro antitimócitos, que reage com aproximadamente 70 a 80% dos linfócitos do sangue periférico e com mais de 90% dos timócitos. O segundo é o anti-soro antilinfócitos B. Este anti-soro detecta o que se supõe serem antígenos codificados pelos genes dos loci D e DR do complexo maior de histocompatibilidade, conhecidos como antígenos Ia-like. Este anti-soro reage com aproximadamente 20% dos linfócitos do sangue periférico. Finalmente, o anti-soro antileucemia comum (AALC)⁵² que é produzido, pela inoculação em coelhos, de células de pacientes com LLA que não expressam receptores ER, não reagem com o AALT, não possuem IgS, reagem com o anti-soro anti-Ia-like e apresentam a reação citoquímica do PAS positiva. Após adsorções apropriadas, este anti-soro reage com células leucêmicas e, aproximadamente 60% dos pacientes do grupo pediátrico com LLA.

Com a utilização dos 5 testes acima referidos, pode-se classificar as LLA em três grupos principais bem como em subtipos, conforme a presença dos diversos marcadores (Anexo VIII). Considera-se LLA do grupo T, quando as células leucêmicas expressam ER e/ou reagem com o AALT. Este grupo pode ser subdividido em três tipos. Considera-se LLA do tipo de células do timo, quando estas expressam ER e reagem simultaneamente com o AALT. LLA de células pré-tímicas, quando as células reagem apenas com o AALT. Um terceiro tipo, chamado de intermediário, é definido quando as células leucêmicas reagem com o AALT e o AALC.

Considera-se leucemia de células B, quando as células leucêmicas apresentam IgS e reagem com o AALB.

Finalmente, o grupo não-T/não-B é caracterizado por apresentar células leucêmicas que não expressam ER, IgS e não reagem com o AALT. Este grupo de LLA é heterogêneo, uma vez que alguns destes pacientes reagem com o AALB e AALC (LLA comum). Outros apresentam imunoglobulina intracitoplasmática e são denominados de LLA pré-B¹³¹. Neste grupo, ainda se encontram pacientes que não expressam nenhum marcador de membrana ou reagem somente com o AALB (LLA indiferenciada).

Em nosso estudo, empregamos 4 testes indicados, o que nos permitiu identificar 3 grupos principais: LLA do tipo T, do tipo B e do tipo não-T/não-B.

A - LLA DO TIPO T

Dezoito pacientes na nossa série preencheram um dos dois critérios para a inclusão do grupo de LLA do tipo T. De

zessete pacientes apresentaram células leucêmicas que reagiram com o AALT e, destes pacientes, 12 formaram ER acima ou igual a 20%. Um paciente apresentou apenas ER acima de 20%, porém não reagiu ao AALT. Estes achados já foram encontrados por alguns autores. Kaplan et al.⁷⁰ estudaram 9 pacientes com LLA do tipo T, sendo que todos reagiram com o AALT, porém apenas 6 apresentaram concomitantemente ER igual ou acima de 20%. Bowman et al.¹⁷, em 25 pacientes que apresentaram células leucêmicas reativas com o AALT encontraram 14 pacientes (54%) que formaram ER. Netzel et al.⁹⁶ estudaram 15 pacientes com LLA, dos quais apenas 9 (60%) possuíam receptores para ER.

Ainda não está perfeitamente definido o motivo pelo qual as células leucêmicas de pacientes com LLA do tipo T expressam antígenos detectados pelo AALT e não os receptores ER. A primeira possibilidade é de que os anti-soros em uso estivessem detectando antígenos HLA, que são comuns a outros tipos celulares. Outra possibilidade é de que estas células leucêmicas representariam uma população de células que ainda não tivessem desenvolvido¹²⁵ ou já tivessem perdido o receptor ER⁷².

Um paciente em nossa série apresentou células leucêmicas com marcadores de células T e IgS. Um caso semelhante ao nosso foi descrito por Haegert et al.⁵⁷. O significado desta associação não é conhecida, entretanto, sugere-se que estas células poderiam representar uma proliferação de células extremamente imaturas com capacidade de diferenciação para células T ou B ou, ainda, representar duas populações de células leucêmicas com características diferentes.

Um paciente apresentou apenas ER acima de 20%, porém não reagiu com o AALT. Embora a maioria dos autores considere que a presença de ER deva ser sempre acompanhada da reação positiva ao AALT ^{17, 70, 72, 96}. Brouet et al. ¹⁹ também descreveram um caso em que havia apenas a formação de ER.

Outro paciente, além de apresentar os marcadores de células T, apresentou reatividade com o AALB. Este fato está de acordo com os achados de Samaratu et al. ¹⁰⁹, que mostra a existência de antígenos Ia-like em subpopulações T ativadas.

B - LLA DO TIPO B

Apenas 1 paciente da nossa série (2,5%) apresentou células leucêmicas com IgS acima de 20% e, concomitantemente, reatividade com o AALB. A imunoglobulina detectada era do tipo IgM kappa. Estes achados concordam com os de Flannery et al. ⁴⁴, que descreveram 6 pacientes com diagnóstico de LLA de células B, representando 2% do total de seus casos de LLA. As células leucêmicas apresentavam imunoglobulina de superfície e, na maioria dos casos, ela era do tipo IgM. Chessels et al. ²⁸ também encontraram 2% de pacientes com LLA do tipo B na série por elas estudada. Esses pacientes também apresentavam imunoglobulina de superfície. Do mesmo modo, Brouet et al. ¹⁹ encontraram uma incidência de 3% de pacientes com LLA do tipo B. Estes pacientes apresentavam IgS e reagiram com o AALB. Bowman et al. ¹⁷ encontraram uma incidência de menos de 2% em 200 casos, que também apresentavam IgS e reagiam com AALB.

Yamanaka et al.¹⁴² encontraram uma alta incidência (38%) de LLA do tipo B, porém apenas 1 paciente apresentou IgS acima de 30%, e eles consideraram LLA do tipo B quando mais de 60% das células leucêmicas reagiram com o AALB. Esta alta percentagem pode não estar refletindo a incidência real de LLA do tipo B, uma vez que o anti-soro utilizado pode estar detectando antígenos de histocompatibilidade, frequentemente encontrados nas LLA do tipo não-T/não-B^{28,46}.

C - LLA DO TIPO NÃO-T/NÃO-B

Vinte e um pacientes, em nossa série, foram classificados como não-T/não-B. As células leucêmicas assim caracterizadas não possuíam ER, IgS nem reatividade ao AALB. Dezoito pacientes apresentaram células leucêmicas reativas ao AALB. Estes achados concordam com os de Bowman et al.¹⁷, que encontraram reatividade com o AALB na maioria dos pacientes com LLA do tipo não-T/não-B. Yamanaka et al.¹⁴² encontraram, num grupo de 16 casos de LLA do tipo não-T/não-B, 9 que possuíam células leucêmicas que expressavam reatividade com o AALB.

Ainda não existe uma explicação definitiva para a presença dos antígenos Ia-like na membrana das células leucêmicas do tipo não-T/não-B. Como estes antígenos são expressos sobre as células B e sobre células leucêmicas de alguns pacientes com LLA, é possível que a LLA do tipo não-T/não-B se origine de células muito imaturas, com possibilidade de serem precursoras tanto de células linfóides como de células mielóides.

Nossos pacientes não foram estudados com o anti-soro que detecta o conhecido antígeno comum das LLA descrito por Greaves ⁵². Este anti-soro define o grupo de pacientes com LLA que apresenta bom prognóstico ^{17, 28}.

D - CORRELAÇÃO DOS ACHADOS MORFOLÓGICOS E CITOQUÍMICOS COM OS MARCADORES DE MEMBRANA

As células leucêmicas dos pacientes com LLA foram classificadas em L1, L2 e L3, de acordo com as sugestões do grupo Francês-Americano-Britânico ¹². Vinte e cinco pacientes (62,5%) foram classificados como tipo L1, 12 pacientes (30%) como L2 e 2 pacientes (5%) como L3 (Tabela ⁵12).

Dos 25 pacientes com células leucêmicas do tipo L1, 11 (44%) pertenciam ao grupo T e 14 (56%), ao grupo não-T/não-B. Dos 12 pacientes com morfologia celular do tipo L2, 5 (41,6%) pertenciam ao grupo T e 7 (58,4%), ao grupo não-T/não-B. Dos 2 pacientes classificados como L3, 1 pertencia ao grupo B e o outro ao grupo T. Não houve, portanto, associação entre os tipos morfológicos e os grupos de LLA definidos pelos marcadores imunológicos.

Estes dados são concordantes com os de Brouet et al. ¹⁹, que classificaram as LLA em dois tipos morfológicos e não evidenciaram associação entre os tipos celulares e as LLA dos tipos T e não-T/não-B. Chessels et al. ²⁸ também não evidenciaram associação entre os tipos morfológicos e a presença de marcadores de membrana.

Belpomme et al. ¹⁰, entretanto, encontraram uma associação entre os tipos morfológicos descritos por Mathé & Rappaport ⁸⁵ e os marcadores imunológicos.

Recentemente, Mckenna et al. ⁸⁸ observaram que, mesmo não existindo associação entre os grupos de LLA definidos por marcadores de membrana com os parâmetros sugeridos pelo FAB, algumas características morfológicas particulares podem ser evidenciadas na LLA do tipo T.

Um paciente da nossa série apresentou morfologia celular compatível com o tipo L3 e marcadores de membrana de células T. Embora exista associação entre o tipo morfológico L3 e LLA do tipo B ¹², fato semelhante ao encontrado por nós foi descrito por Falletta et al. ⁴¹, que evidenciaram pacientes com morfologia do tipo L3 e marcadores imunológicos de células T.

Os estudos citoquímicos realizados em nossos pacientes mostraram que a positividade moderada ou forte da FA esteve associada com os pacientes do tipo T (Tabela 11). Dos 18 pacientes deste grupo, 12 (66,6%) apresentaram reação moderada ou forte da FA e ela foi negativa ou fracamente positiva nos tipos B e não-T/não-B. Ocorreu, portanto, uma associação entre LLA do tipo T e a positividade da FA.

Dados semelhantes foram encontrados por Catovski et al. ²³, que, ao estudarem 148 pacientes com LLA, observaram, em 90% dos pacientes com LLA do tipo T, positividade da reação citoquímica da fosfatase ácida e em apenas 3,4% dos pa

cientes do tipo não-T/não-B. Mackenna et al.⁸⁸ estudaram 12 pacientes do grupo T, 11 possuíam reação positiva da fosfatase ácida, enquanto que apenas 3 pacientes de 47 do tipo não-T/não-B. Willians et al.¹³⁶ verificaram que, em 7 pacientes com LLA do tipo T, 4 apresentaram reação positiva da FA.

Dos 9 pacientes que apresentaram reação positiva do PAS, 4 pacientes (44,5%) eram do grupo T e cinco (55,5%) do grupo não-T/não-B. Em relação à reação citoquímica do PAS, não foi observada associação entre a positividade desta reação e a dos grupos de LLA. Resultados semelhantes foram observados por Brouet et al.¹⁹, que também não observaram associação entre os grupos de LLA definidos por marcadores imunológicos de membrana e a reação citoquímica do PAS. Willians et al.¹³⁶ evidenciaram também reação positiva do PAS em 2 pacientes com LLA do grupo T (28,5%).

Nossos resultados não concordam com os de Tsukimoto et al.¹²⁷, que evidenciaram que os pacientes com LLA do tipo T possuem a reação citoquímica do PAS fraca ou negativa, concluindo que estes achados reforçaria a hipótese de que a reação do PAS possui valor prognóstico. Nossos resultados, entretanto, parece não comprovar que possa existir uma relação entre o achado de células com reação positiva ao PAS e as manifestações clínicas que indicariam bom prognóstico. Por exemplo, o caso nº 26 apresentou marcadores imunológicos de células T, massa em mediastino, infiltração de sistema nervoso central e positividade intensa à reação citoquímica do PAS.

A reação citoquímica da ENE foi encontrada positiva em quatro pacientes. Destes, 3 pertenciam ao grupo T e 1, ao grupo não-T/não-B. Em nossa série, esta reação citoquímica não esteve associada aos tipos de LLA.

Estes achados são discordantes dos encontrados por Kulenkampff et al.⁷⁵. Neste trabalho, dos 5 pacientes com LLA do tipo T, 4 apresentaram positividade à reação citoquímica da ENE enquanto que apenas 1 de 16 pacientes do tipo não-T/não-B a apresentou. A menor incidência de casos positivos para ENE no grupo T, em nossa série, pode ser explicada em função do tempo de incubação das lâminas como substrato, que foi de 45 minutos, ao contrário do de Kulenkampff et al.⁷⁵, que foi de 3 horas.

E - CORRELAÇÃO DOS VALORES HEMATOLÓGICOS E DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS COM OS TIPOS DE AAL

Em nossa série, houve 9 pacientes com contagens leucocitárias acima de 50.000/ μ l. Destes, 5 pacientes pertenciam ao grupo T (27,7% do grupo T) e 4, ao grupo não-T/não-B (19,0% do grupo não-T/não-B), conforme a Tabela 13. A diferença entre os dois grupos, em relação às contagens de leucócitos, não foi estatisticamente significativa. Dados semelhantes foram encontrados por Heidemann et al.⁶², que também não evidenciaram associação entre as contagens de leucócitos e os grupos T e não-T/não-B. Entretanto, a maioria dos autores estão em desacordo com estes achados. Bowman et al.¹⁷ estudaram 179 pacientes com LLA e, dos 33 com LLA do

tipo T, 19 (57,3%) possuíam leucócitos acima de $50.000/\mu\text{l}$, enquanto que, em 146 do grupo não-T/não-B, apenas 16 (6,5%) apresentaram estas contagens de leucócitos. Dados semelhantes foram observados por Brouet et al.²⁰, que observaram que 45% dos pacientes com LLA do tipo T possuíam leucócitos acima de $50.000/\mu\text{l}$, enquanto que isto ocorreu em apenas 9% do grupo não-T/não-B. Chessel et al.²⁸ verificaram que, em 11 pacientes do grupo T, 8 (72,7%) possuíam leucócitos acima de $100.000/\mu\text{l}$ e em 8 de 71 pacientes (11,3%) no grupo não-T/não-B. Os estudos de Tsukimoto et al.¹²⁷ e Kersey et al.⁷² também concordam com estes achados.

Em nossos pacientes com LLA do tipo T, notou-se uma pequena incidência de casos que possuíam contagens leucocitárias acima de $50.000/\mu\text{l}$. Isto, provavelmente, é devido ao fato de que todos os pacientes com estas contagens leucocitárias possuíam mais de 5 anos. Se fossem retirados do grupo de pacientes com LLA do tipo T aqueles com menos de 5 anos, a percentagem de pacientes deste tipo de LLA com contagens leucocitárias acima de $50.000/\mu\text{l}$, passaria a 45,6%, concordando portanto com os dados da literatura^{17, 20, 72}.

Em nossa série, houve uma associação entre níveis mais elevados de Hb e o grupo de LLA do tipo T. Estes achados concordam com os de Brouet et al.²⁰, que também observaram níveis mais elevados de Hb nos pacientes do grupo de LLA do tipo T.

A possível explicação para o fato de os pacientes do grupo de LLA do tipo T possuírem níveis mais elevados de Hb

pode estar ligada ao comportamento biológico do tumor. Existem muitas evidências de que as células leucêmicas deste tipo de LLA nasceriam no timo e posteriormente invadiriam a medula óssea¹⁰⁶, provavelmente não interferindo com a eritropoese nos estágios iniciais da doença.

Todos os pacientes que apresentaram massa em mediastino pertenciam ao grupo T. Este achado concorda com os de Yamanaka et al.¹⁴² e de Kaplan et al.⁷⁰, os quais evidenciaram massa em mediastino apenas em pacientes com LLA do tipo T. Entretanto, alguns autores, entre eles Bowman et al.¹⁷, Barret et al.⁶, Sen et al.¹¹³ e Chessel et al.²⁸, observaram a presença de massa em mediastino, tanto em pacientes do grupo de LLA do tipo T como nos do tipo não-T/não-B. A análise destes trabalhos, porém, evidencia que muitos destes pacientes com massa em mediastino, classificados no grupo de LLA do tipo não-T/não-B, não tiveram as células leucêmicas estudadas com o AALT e isto provavelmente influenciou os resultados. A importância deste fato pode ser observado em nossa série, onde apenas 2 pacientes dos 6 que apresentaram massa em mediastino possuíam ER acima de 20%.

Na série estudada por Kaplan et al.⁷⁰, dos 4 pacientes que possuíam massa no mediastino, 2 não apresentaram ER acima de 20% e na de Bowman et al.¹⁷, com 12 pacientes, apenas 6 apresentaram células leucêmicas com receptores para ER. Saliente-se que todos estes pacientes possuíam células leucêmicas reativas com o AALT.

Deve ser salientado ainda que nenhum paciente da nossa série que apresentava massa em mediastino possuía idade

inferior a 4 anos. Da revisão dos trabalhos publicados ⁶, 70, 113, onde existiam estes dados, não se evidenciou nenhum paciente com esta manifestação clínica com idade inferior a 3 anos.

Chamou a atenção o fato de que, dos 6 pacientes com massa em mediastino, 1 não apresentou positividade à reação citoquímica da FA. Este achado está de acordo com os estudos de Catovski et al. ²³, os quais evidenciaram que 3 pacientes com massa em mediastino e marcadores celulares de linfócitos T apresentaram reação citoquímica da FA negativa.

Dois aspectos principais foram evidenciados na análise dos nossos pacientes. O primeiro refere-se à maior incidência de LLA do tipo T na casuística. Este fato poderia ser devido à reatividade do AALT com outros tipos celulares, que não os linfócitos T. Isto é pouco provável porque o AALT foi exaustivamente adsorvido com vários tecidos e testados com vários tipos celulares. Além disso, todos os pacientes, com exceção de um, não apresentaram marcadores de linfócitos B. Outra evidência que torna pouco provável a possibilidade de outros tipos de LLA no tipo T foi o acompanhamento clínico destes pacientes. Embora eles não tenham sido tratados de maneira semelhante, o esquema de tratamento clínico utilizado em todos os pacientes obedeceu critérios gerais do tratamento moderno de LLA ⁸⁷. Apesar disso, apenas 3 pacientes deste tipo (casos n^os 25, 34 e 39) permanecem em remissão por 8, 9 e 11 meses, respectivamente.

Muitas evidências sugerem que um mesmo tipo de neoplasia pode apresentar diferentes manifestações clínicas e pa

drões de malignidade, dependendo da região onde ela é encontrada. Uchiyama et al.¹²⁸ descreveram 16 pacientes com LLA do tipo T, com evolução subaguda ou crônica, com manifestações clínicas particulares em uma mesma localidade. Entre nós, Costa³³ encontrou maior incidência de Doença de Hodgkin em pacientes de baixa idade e com tipos histológicos de pior prognóstico, quando comparados com os da literatura. As possíveis causas para estes fatos permanecem inexplicadas, porém têm sido implicados fatores genéticos⁸³, ambientais^{14,73, 112} e infecciosos⁹⁵.

Outro aspecto é a forma de manifestação clínica dos pacientes do grupo de LLA do tipo T com idade inferior a 3 anos, que diferiu daquela dos pacientes com idade superior a esta.

Do total de 6 pacientes do tipo T com idade inferior a 3 anos, 5 apresentaram manifestações clínicas semelhante aos pacientes do tipo não-T/não-B. Nenhum paciente apresentou leucócitos acima de 50.000/ μ l ou massa em mediastino. Um paciente caso (nº 34) apresentou tumorações cutâneas além de um comprometimento importante da medula óssea.

Chamou a atenção também que apenas 1 paciente desse grupo apresentou reação da FA fortemente positiva. Além disso, a reatividade das células leucêmicas ao AALT e a contagem de células ER foi menor do que nos pacientes do tipo T com idade superior a 3 anos.

Estes dados suportam a hipótese que possa existir um tipo intermediário de AAL do tipo T (Anexo VIII). Netzel et

al. ⁹⁶ estudaram 66 pacientes com LLA dos quais 21 reagiram simultaneamente com o AALT e com o AALC. Em nenhum desses pacientes foi demonstrado massa em mediastino e a contagem leucocitária foi menor do que no tipo T que não possui reatividade com o AALC.

Devido a pouca experiência com este tipo de LLA ainda não se conhece o modo desses pacientes responderem à terapêutica. Dos nossos 6 casos, apenas 2 permanecem em remissão sugerindo que este tipo de LLA provavelmente apresente pior prognóstico.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Observou-se maior incidência de LLA do tipo não-T/não-B entre 2 e 5 anos e de LLA do tipo T acima dos 14 anos.
2. Nos casos de LLA do tipo T predominou o sexo masculino e nos do tipo não-T/não-B predominou o sexo feminino.
3. Níveis elevados de hemoglobina estiveram associados a LLA do tipo T.
4. A contagem leucocitária bem como o tamanho dos linfonodos, fígado e baço não são úteis para distinguir os tipos de LLA.
5. Todos os pacientes que apresentaram massa em mediastino foram classificados como LLA do tipo T.
6. Não existiu correlação entre a contagem de leucócitos e a idade dos pacientes com os diferentes tipos de LLA.
7. A morfologia celular não distingue os diferentes tipos de LLA.
8. As reações citoquímicas com PAS e ENE não foram úteis para caracterizar os diferentes tipos de LLA.

9. A reação citoquímica com FA somente foi positiva em pacientes com LLA do tipo T.
10. Os pacientes com LLA do tipo T com idade inferior a 3 anos apresentam exteriorização clínica diferente daqueles com idade superior a 3 anos.
11. Para a classificação das LLA é fundamental a realização de estudos imunológicos que detectem antígenos associados aos linfócitos T e B por anti-soros específicos, imunoglobulinas de superfície e formação de E-rosetas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AUR, R.J.A.; SIMONE, J.V.; HUSTU, H.O.; VERZOSA, M.S. A comparative study of central nervous system irradiation and intensive chemotherapy early in remission of childhood acute lymphocyte leukemia. Cancer, 29:381-91, 1972.
2. AUR, R.J.A.; SIMONE, J.V.; VERZOSA, M.S.; HUSTU, H.O.; BARKER, L.F.; PINKEL, D.P.; RIVERA, G.; DAHL, G.V.; WOOD, A.; STAGNER, S.; MASON, C. Childhood acute lymphocytic leukemia - Study VIII. Cancer, 42:2123-34, 1978.
3. BALCH, C.M.; DOUGHERTY, P.A.; VOGLER, L.B.; ADES, E.W.; FERRONE, S. A new B cell differentiation antigen (BDA) on normal and leukemic human B lymphocytes that is distinct from known DR (Ia-like) antigens. J.immunol., 121:2322-8, 1978.
4. BALTIMORE, D. Is terminal deoxynucleotidyl transferase a somatic mutagen in lymphocytes? Nature London, 248:409-10, 1973.
5. BAN, R.D. & PERRY, S. Lysosomal acid hydrolases in human lymphocyte subpopulations. Br.j.haematol., 32:565-72, 1976.
6. BARRET, S.G.; SCHWADE, J.G.; RAUKEN, R. KADIN, M.E. Lymphoblasts with both T and B markers in childhood leukemic and lymphoma. Blood, 50:71-9, 1977.

7. BARRET, S.G. Tissue distribution of human T cells with complement receptors (D cells). Clin.immunol.immunopathol., 11:190-5, 1978.
8. BAUMER, J.H.; MOTT, M.G.; GENTLE, T.A. Sex and prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. Lancet,2:128-29, 1978.
9. BELPOMME, D.; BORELLA, L.; BRAYLAN, R.; GREAVES, M.; HERBERMAN, R.; HITZIG, W.; KERSEY, J.; PETROV, R.; SELIGMANN, M.; SOBIN, L.; THIERFELDER, S.; TONIGIANI, G. Immunological diagnosis of leukaemic and lymphoma: A World Health Organization/International Union of Immunological Societies Technical Report. Brit.j.haem., 38:85-98, 1976.
10. BELPOMME, D. & MATHE, G. Clinical significance and prognostic value of the T-B immunological classification of human primary acute lymphoid leukaemias. Lancet, 1:555-8, 1977.
11. BENNETT, J.M.; KLEMPERER, M.R.; SEGEL, G.B. Survival prediction based on morphology of lymphoblasts. Rec.res.cancer.res., 43:23-7, 1973.
12. BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D.A.G.; CRABUION, H.R.; SULTAN, G. Proposals of the classification of the acute leukemias. Br.j.haematol., 33:451-8, 1976.
13. BILLING, R. RAFIZADEH, R.; DREW, I.; HARTMAN, G.; GALE, R.; TERASAKI, P. Human b-lymphocyte antigens expressed by

- lymphocytic and myelocytic leukemia cells. J.exp med.,
144:167-78, 1976.
14. BIRCH, J.M.; MARSDEN, H.B.; SWINDELL, R. Acute lymphoid leu
kaemia of childhood in North-West England. Lancet, 2:
854-5, 1979.
15. BORELLA, L.; SEN, L.; CASPER, J.T. Acute lymphoblastic leu
kemia (ALL) antigens detected with antisera to E rosette-
forming and Non-E rosette forming ALL Blasts. J.immunol.,
118:309-15, 1977.
16. BORELLA, L. & SEN, L. E-receptor on Blasts from untreated
acute lymphocytic leukemia (ALL): Comparison of tempera
ture dependence of E-rosettes formed by normal and leu
kemic lymphoid cells. J.immunol., 114:187-90, 1975.
17. BOWMAN, P.W.; MELVIN, S.L.; AUR, R.J.A.; MAUER, A.M. Cell
markers in acute lymphocytic leukemia. A Clinical Per
spective. Cancer chemother.rep./no prelo/.
18. BROUET, J.C. & TOBEN, H. Characterization of a subpopula
tion of human T lymphocytes reactive with an heteroanti
serum to human brain. J.immunol., 116:1041-44, 1976.
19. BROUET, J.C.; VALENSI, F.; DANIEL, M.T. FLANDRIN, G.; PREUD'
HOMME, J.L. SELIGMANN, M. Immunological classification
of acute lymphoblastic leukemias. Evaluation of its cli
nical significance in a hundred patients. Br.j.haematol.,
33:319-28, 1976.

20. BROUET, J.C. & SELIGMANN, M. The immunological classification of acute lymphoblastic leukemias. Cancer, 42(suppl.2): 817-27, 1978.
21. CATOVSKY, D. GALETTO, J. OKOS, A.; MILIANI, E.; GALTON, D.A.G. Cytochemical profile of B and T leukaemic lymphocytes with special reference to acute lymphoblastic leukemia. J.clin.pathol., 27:767-71, 1974.
22. CATOVSKY, D. T-cell origin of acid-phosphatase positive lymphoblasts. Lancet, 2:327-8, 1975.
23. CATOVSKY, D.; GREAVES, M.F.; PAIN, C.; CHERCHI, M.; JANOSSY, G.; KAY, H.E.M. Acid-phosphatase reaction in acute lymphoblastic leukemia. Lancet, 1:749-51, 1978.
24. CATOVSKY, D.; O'BRIEN, M.; CHERCHI, M. Cytochemistry: An aid to the diagnosis and classification of the acute leukemias. Rec.res.cancer.res., 64:108-12, 1978.
25. CIMINO, M.C.; ROWLEY, J.D.; KINWALEY, A.; VANAKOJIS, D.; GLOMB, H. Banding studies of chromosomal abnormalities in patient with acute lymphocytic leukemia. Cancer Research, 39:227-38, 1979.
26. CHESS, L.; EVANS, R.; HUMPHREYS, R.E. Inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity and immunoglobulin synthesis by an antiserum prepared against a human B-cell Ia-like molecule. J.exp.med., 144:113-22, 1976 / citado por/ Gupta & Good op.cit.55.

27. CHESS, L. & SCHLOSSMAN, S.F. Human lymphocyte subpopulations. Adv. immunol., 25:213-8, 1977.
28. CHESSELS, J.M.; HARDISTY, R.M.; RAPSON, N.T. Acute lymphoblastic leukaemia in children: Classification and Prognosis. Lancet, 2:1307-9, 1977.
29. CHOI, S.I. & SIMONE, J.V. Acute nonlymphocytic leukemia in 171 children. Med. ped. oncol., 2:119-146, 1976.
30. COCCIA, P.F.; KERSEY, J.H.; CAJL-PECZALSKA, K.J.; KRIVIT, W.; NESBIT, M.E. Prognostic significance of surface marker analysis in childhood non-Hodgkin's lymphoproliferative malignancies. Am. j. hematol., 1:405-17, 1976.
31. COOPER, M.D.; PETERSON, R.D.A.; SOUTH, M.A.; GOOD, R.A. The functions of thymus system and the Bursa system in the chicken. J. exp. med., 123:75-102, 1966.
32. COOPER, M.D.; LAWTON, A.R. The development of the immune system. Sci. am., 231:58, 1974/citado por/ BALCH, C.M.: Recent advances in human cellular immunobiology. Surg. clin. n. amer., 59:235-49, 1979.
33. COSTA, P.B. Doença de Hodgkins; classificação histológica de 127 pacientes, segundo os critérios de Jackson, Parker e Rye. Curitiba, 1976./Tese de Livre Docência. Universidade Federal do Paraná./

34. CRESSWELL, P. & GELER, S.S. Antisera to human B-lymphocyte membrane glycoproteins block stimulation in mixed lymphocyte culture. Nature London, 257:147-9, 1975.
35. DAMESHEK, W. & GUNZ, F. The treatment of leukemia. In: _____. leukemia. New York, Grune & Stratton, 1958. p.314-97.
36. DICKLER, H.B. Studies of human lymphocyte receptor for heat aggregated or antigen-complexed immunoglobulins. J.exp.med., 140:508-22, 1974.
37. DOUGLAS, S.D. & ACKERMAN, S.K. Anatomy of the immune system. Clin.hematol., 6:299-330, 1977.
38. DOW, L.W.; BORELLA, L.; SEN, L.; AUR, R.J.A.; GEORGE, S. L.; MAUER, A.M.; SIMONE, J.V. Initial prognostic factors and lymphoblast-erythrocyte rosette formation in 109 children with acute lymphoblastic leukemia. Blood, 50:671-82, 1977.
39. EVANS, R.L.; BREARD, J.M.; LAZARUS, H.; SCHLOSSMAN, S.F.; CHES, L. Detection isolation and functional characterization of two human T-cell subclasses bearing unique differentiation antigens. J.exp.med., 145:221-33, 1977.
40. EVANS, R.L.; BREAD, J.M.; LAZARUS, H.; PENTA, A.C.; SCHLOSSMAN, S.F. Two functionally distinct subpopulations of human T cells that collaborate in the generation of cytotoxic cells responsible for cell-mediated lympholysis. J.immunol., 120:1423-8, 1978.

41. FALLETA, J.M.; METZGAR, R.S.; PULLEN, J.; CRIST, W.; HUMPHREY, G.B.; van EYS, J. Clinical and laboratory characteristics of T-antigen positive acute lymphocytic leukemia in children. Pediat.res., 4:553, 1980 (resumo).
42. FARBER, S.; DIAMOND, L.K.; MERCER, R.D. et al. Temporary remission in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterin) N. engl.j.med., 238:787, 1948./citado por/ Dameshek & Gunz op.cit.nº 35.
43. FLANDRIN, G. & BROUET, J.C. The Sezary cell: Cytologic, Cytochemical, and Immunologic Studies. Mayo clin.proc., 49:575-83, 1974.
44. FLANDRIN, G.; BROUET, J.C.; DANIEL, M.T.; PREUD'HOMME, J. L. Acute leukemia with Burkitt's tumor cells: Study of six cases with special reference to lymphocyte surface markers Blood, 45:183-8, 1975.
45. FREIREICH, E.J.; KARON, M.; FREI, E.III. Quadruple combination therapy (VAMP) for acute lymphoblastic leukemia of childhood. Proc.am. assoc.cancer.res., 5:20, 1964 (resumo).
46. FU, S.M.; WENCHESTER, R.J.; KUNKEL, H.G. The occurrence of HL-B allo-antigens on the cells of unclassified acute lymphoblastic leukemias. J.exp.med., 142:1334-8, 1975.

47. GAJL-PECZALSKA, K.J.; BLOOMFIELD, R.D.; NESBITT, M.E.; KERSEY, J.H. B-cell markers on lymphoblasts in acute lymphoblastic leukemia. Clin.exp.immunol., 17:561-9, 1974.
48. GATHINGS, W.E.; LAWTON, A.R.; COOPER, M.D. Immunofluorescent studies of the development of prē-B cells, B lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans. Eur.j.immunol., 7:804-10, 1977.
49. GEHAN, E.A.; SMITH, T.L.; FREIREICH, E.J.; BODEY, G.; RODRIGUEZ, V.; SPEER, J.; McCREDIE, K. Prognostic factors in acute Leukemia. Semin.oncol., 3:271-82, 1976.
50. GEORGE, P. PINKEL, D. Radiation in children with acute lymphocytic leukemia in remission. Proc.am.assoc.cancer.res., 6:22, 1965.
51. GEORGE, S.L.; AUR, R.J.A.; MAUER, A.M.; SIMONE, J.V. A reaprasial of the results of stopping therapy in childhood leukemia. N.engl.j.med., 300:269-73, 1979.
52. GREAVES, M.F.; BROWN, G.; RAPRON, N.T.; LISTER, T.A. Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. Clin. immunol. immunopath., 4:67-84, 1975.
53. GREENWOOD, M.F.; COLEMAN, M.S.; HUTTON, J.J.; LAMPKIN, B.; KRILL, C.; BOLLUN, F.J.; HOLLAND, P. Terminal deoxinucleotidyltransferase distribution in neoplastic and hematopoietic cells. J.clin.invest., 59:889-99, 1977.

54. GOLBERG, A.F. & BARKA, T. Acid phosphatase activity in human blood cells. Nature (London), 195:297, 1962.
55. GUPTA, S. & GOOD, R.A. Markers of human lymphocyte subpopulations in primary immunodeficiency and lymphoproliferative disorders. Semin.hematol., 17:1-29, 1980.
56. GUPTA, S.; GOOD, R.A.; SIEGAL, F.P. Rosette formation with mouse erythrocytes. II. A marker of human B and non-T lymphocytes. Clin.exp.immunol., 25:319-27, 1976.
57. HAEGERT, D.G.; CAWLEY, J.C.; KARPAS, A.; GOLDSTONE, A. H. Combined T and B cell acute lymphoblastic leukaemia. Br.med.j., 4: 79-82, 1974.
58. HAMMARSTRÖM, S.; HELLSTRÖM, U.; PERLMANN, P.; DILLNER, M.L. A new surface marker on T lymphocytes of human peripheral blood. J.exp.med., 138:1270-75, 1973.
59. HAYHOE, F.G.J.; QUAGLINO, D.; DOLL, R. Material and methods of study. In: The cytology and cytochemistry of acute leukemias; a study of 140 cases. London, Her Majesty's Stationery Office, 1964. p.11-23.
60. HAYHOE, F.G.J. & CAWLEY, J.C. Acute leukaemia: Cellular morphology and fine structure. Clin.haematol., 1:49-94, 1972.
61. HAYWARD, A.R. & EZER, G. Development of lymphocyte populations in the human foetal thymus and spleen. Clin.exp.immunol., 17:169-78, 1974.

62. HEIDEMAN, R.L.; FALLETTA, J.M.; MUKHOPADHYAY, N.; FERNBACH, D., J. Lymphocytic leukemia in children: Prognostic significance of clinical and laboratory findings at time of diagnosis. J. Pediat., 92:540-5, 1978.
63. HUMPHREY, G.B. & LAUKFORD, J. Acute leukemia: The use of surface markers in classification. Semin. oncol., 3:243-51, 1976.
64. HUSTU, H.O. & AUR, R.J.A. Extramedullary leukaemia. Clin. haematol., 7:313-37, 1978.
65. JONDAL, M.; HOLM, G.; WIGZELL, H. Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells. J. exp. med., 136:207-15, 1972.
66. JONDAL, M. & KLEIN, G. Surface markers on human B and T lymphocytes. II. Presence of Epstein - Barr virus receptors on B lymphocytes. J. exp. med., 138:1365-78, 1973.
67. JONDAL, M.; WIGZELL, H.; AIUTI, F. Human lymphocyte subpopulations: Classification according to surface markers and/or functional characteristic. Transplant. rev., 16:163-95, 1973.
68. JONDAL, M. & PROSS, H. Surface markers on human B and T lymphocytes. VI. Cytotoxicity against cell lines as a functional marker for lymphocyte subpopulations. Int. j. cancer, 15:596-605, 1975.

69. KAPLAN, J.; TILTON, J.; PETERSON, W.D. Identification of T cell lymphoma tumor antigens on human T cell lines. Am. j. hematol., 1:219-24, 1976.
70. KAPLAN, J.; RAVINDRANATH, Y.; PETERSON, W.D. T and B lymphocyte antigen - positive null cell leukemias. Blood, 49:371-8, 1977.
71. KAPLOW, L.S. Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. Blood, 26:215-9, 1965.
72. KERSEY, J.H.; NESBIT, M.E.; LUCKASEN, J.R. HALLGREN, H.M.; SABAD, A.; YUNIS, E.J.; GAJL-PECZLSKA, K.J. Acute lymphoblastic leukemic and lymphoma cells with thymus-derived (T) markers. Mayo clin. proc., 49:584-7, 1974.
73. KINLEN, L.J. The epidemiology of leukemias and lymphomas: a Review. Royal. soc. med., 70:553-6, 1977.
74. KRUMBHAAR, E.B. & KRUMBHAAR, H.D. The blood and bone marrow in yellow cross gas (mustard gas) poisoning. Changes produced in bone marrow of fatal cases. J. med. res., 40:497, 1919. /citado por/Burchenal, H.J. The historical Development of Cancer Chemotherapy. Semin. oncol., 4:135-46, 1977.
75. KULENKAMPFF, J.; JANOSSY, G.; GREAVES, M.F. Acid esterase in human lymphoid cells and leukaemic blasts: a Marker for T lymphocytes. Br. j. haematol., 36:231-40, 1977.

76. KUNKEL, H.G. Surface markers of human lymphocytes. Johns Hopkins med.j., 137:216-22, 1975.
77. LAUER, J.S.; CASPER, J.T.; BORELLA, L.D. Immunodiagnosis of childhood ALL: Problems associated with the use of peripheral blood alone. Med.pediat.oncol., 6:157-62, 1976.
78. LAURIE, H.C. Duration of remissions in lymphoblastic leukemia of childhood. Br.med.j., 2:95-7, 1968.
79. LEE, S.L.; KOPEL, S.; GLIDEWELL, O. Cytomorphological determinants of prognosis in acute lymphoblastic leukemia of children. Semin.oncol., 3:209-17, 1976.
80. LEECH, J.H.; GLICK, A.D.; WALDRON, J.A.; FLEXNER, J.M.; HORN, R.G.; COLLINS, R.D. Malignant lymphomas of follicular center cell origin in man. I. Immunologic studies. J.natl.cancer.inst., 54:11-21, 1975./citado por/ Lukes et al. op.cit. nº 84.
81. LI, F.P.; MYERS, M.H.; HEISE, H.W.; JAFFE, N. The course of five-year survivors of cancer in childhood. J.pediatr., 93:185-7, 1978.
82. LOBO, P.I. & HORWITZ, D.A. An appraisal of Fc receptors on human peripheral blood B and L lymphocyte. J.immunol., 117:939-43, 1976.
83. LOWIE, S. & SCHWARTZ, R.S. Immunodeficiency and the pathogenesis of lymphoma and leukemia. Semin.hematol., 15:117-38, 1978.

84. LUKES, R.J.; TAYLOR,C.R.; CHIR,B.; PHIL,D.; PARKER,J.W.; LINCOLN,T.L.; PATTENGAL,P.K.; TINDLE,B.H.A morphologic and immunologic surface marker study of 299 cases of non-Hodgkin lymphomas and related leukemias. Am.j.pathol., 90:461-86, 1978.
85. MATHE,G. & RAPPAPORT,H. Histological and Cytological typing of neoplastic diseases of hematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization, Geneva, 1976. /citado por/ Belpomme & Mathé op.cit. nº 11.
86. MATHE,G.; DeVASSAL,F.; SCHWARZENBERG,L.; DELGADO,M.; WEINER,R.; GIL,M.A.; PENA-ANGULO,J.;BELPOMNE,D.;POUILLART, P.; MACHOVER,D.; MISSET,J.L.; PICO,J.L.; JASMIN,C.;HAYAT, M.; SCHNEIDER,M.; CATTAN,A.; AMIEL,J.L.; MUSSET,M.; ROSENFELD,C.; RIBAUD,P. Preliminary results of three protocols for the treatment of acute lymphoid leukaemia of children:Distinction of two groups of patients according to predictable prognosis. Med.pediat.oncol., 4:17-27, 1978.
87. MAUER,A.M. & SIMONE,J.V. The current status of the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer treat.rev., 3:17-41, 1976.
88. MACKENNA,R.W,; PARKIN,J.; BRUNNING,R.D. Morphological and ultrastructural characteristics of T-cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer, 44:1290-7, 1979.

89. MENDES, N.F.; MIKI, S.S.; PEIXINHO, Z.F. Combined detection of human T and B lymphocytes by rosette formation with sheep erythrocytes and Zynosan-complexes. J.immunol., 113:531-6, 1974.
90. MELVIN, S.L. Comparison of techniques for detecting T-cell acute lymphocytic leukemia. Blood, 54:210-5, 1979.
91. MILLER, D.R. Prognostic factors in childhood leukemia. J. pediatr., 87:672-6, 1975.
92. MILLS, B.; SEN, L.; BORELLA, L. Reactivity of antihuman thymocytes serum with acute leukemic blasts. J.immunol., 115:1038-44, 1975.
93. MORETTA, L.; FERRARINI, M.; MINGARI, M.C.; MORETTA, A.; WEBB, S.R. Subpopulations of human T cells identified by receptors for immunoglobulins and mitogen responsiveness. J.immunol., 117:2171-4, 1976.
94. MORETTA, L.; WEBB, S.R.; GROSSI, C.E.; LYDYARD, P.M.; COOPER, M.D. Functional analysis of two human T-cell subpopulations: Helper and suppression of B cell responses by T cells receptors for IgM (Tm) or IgH (Tg). J.exp.med., 146:184-200, 1977.
95. MUNOZ, N.; DAVIDSON, R.J.L.; WITTNOFF, B.; ERICSSON, J.E.; DE-THÉ, G. Infections mononucleosis and Hodgkin's disease. Int.j.cancer, 22:10-13, 1978.

96. NETZEL,B.; RODT,H.; THIEL,E.; HAAS,R.J.; THIERFELDER,S.
Use of specific antisera against leukemia-associated antigens in the diagnosis of childhood acute lymphoblastic Leukemia. Acta.haematol., 61:177-83, 1979.
97. OLIVE,D.; SABOLOVIC,D.; BEUGNOT,M.C.; BEANGNON,M. Immunological characteristics of lymphoblasts and lymphocytes in acute lymphoblastic leukaemia in children. Clin.exp. immunol., 29:220-8, 1977.
98. OSHIMURA,M.; FREEMAN,A.I.; SANDBERG,A.A. Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XXI. Banding studies in acute lymphoblastic leukemia (ALL). Cancer,40: 1161-72, 1977.
99. OWEN,J.J.T.; COOPER,M.D.; RAFF,M.C. In vitro generation of B lymphocyte in mouse fetal liver, a mammalian "bursa equivalent". Nature London, 249:361-3, 1974.
100. PANTAZOPOULOS,N. & SINKS,L.F. Morphological criteria for prognostication of acute lymphoblastic leukaemia. Br. j.haematol., 27:25-38, 1974.
101. PEARL,E.R.; VOGLER,L.B.; OKOS,A.J.; CRIST,W.M.; LAWTON III, A.R.; COOPER,M.D. B-lymphocyte precursors in human bone marrow: An analysis of normal individuals and patients with antibody deficiency states. J.immunol., 120:1169-75, 1978.
102. PINKEL,D. Five-year follow-up of "Total Therapy" of childhood lymphocytic leukemic. JAMA, 216:648-52, 1971.

103. PROSS, H.F. & JONDAL, M. Cytotoxic lymphocytes from normal donors - a functional marker of human non-T lymphocytes. Clin.exp.immunol., 21:226-36, 1975.
104. RAFF, M.C. T and B lymphocyte and immune response Nature London, 242:19-23, 1973.
105. RANEY, R.B.; MOHANAKUMAR, T.; METZGAR, R.S.; HANN, H.W.; DONALDSON, M.H. Childhood lymphoblastic cancer: Subgroups defined by non-human primate antisera to human lymphatic leukemia cell antigens. J.natl.cancer inst., 58:1217-20, 1977.
106. RAVINDRANATH, Y.; KAPLAN, J.; ZULZER, W.W. Significance of mediastinal mass in acute lymphoblastic leukemia. Pediatrics, 55:889-93, 1975.
107. RHOADS, C.P. Report on a cooperative study of nitrogen mustard (HN 2) therapy of neoplastic disease. Trans.assoc.am.physicians, 60, 1947./citado por/ Burchenal, H.J. The historical development of cancer chemotherapy. Semin.oncol, 4:135-46, 1977.
108. ROSS, G.D.; RABELLINO, M.; POLLEY, M.J.; GREY, H.M. Combined studies of complement receptor and surface immunoglobulin-bearing cells and sheep erythrocyte rosette-forming cells in normal and leukemic human lymphocytes. J.clin.invest., 52:377-85, 1973.
109. SAMARUT, C.; GEBUHRER, L.; BROCHIER, J.; BETUEL, H.; REVILLARD, J.P. Presence of "Ia-like" antigens on human T lympho

- cytes bearing receptors for IgG. Eur j.immunol., 7:908-10, 1977.
110. SCHEID, M.P.; HOFFMANN, M.K.; KOMURO, K.; HÄMMERLING, U.; BOYSE, E.A.; COHEN, G.H.; HOOPER, J.A.; SCHULOF, R.S.; GOOLDSTEIN, A.L. Differentiation of T cells induced by preparations from thymus and by nonthymic agents. J.exp.med., 138: 1027-32, 1973.
111. SCHLESINGER, M. & GALILI, U. Antigenic Differences between T and B lymphocytes in man. Israel j.med.sci., 10:715-24, 1974.
112. SCHWARTZ, R.; JEFFREY, P.; CALLEN, P.J.; SILVA, J. cluster of Hodgkin's disease in a small community. Amer.j.epidemiol., 108:19-26, 1978.
113. SEN, L. & BORELLA, L. Clinical importance of lymphoblasts with T marker in childhood acute leukemia. N.engl.j.med., 292:828-32, 1975.
114. SHAW, M.T. The cytochemistry of acute leukemia: A diagnostic and prognostic evaluation. Semin.oncol., 3:219-28, 1976.
115. SHAW, M.T.; HUMPHREY, G.B.; LAWRENCE, R.; FISCHER, D.B. Lack of prognostic value of the periodic acid-schiff reaction and blast cell size in childhood acute lymphocytic leukemia. Am.j.hematol., 2:237-43, 1977.
116. SHAW, M.T.; DWYER, J.M.; ALLAUDEEN, H.F.; WEITZMAN, H.A. Terminal deoxyribonucleotidyl transferase activity in B-cell

- acute lymphocytic leukemia. Blood, 51:181-7, 1978.
117. SHEEHAN, H.L. & STOREY, G.W. An improved method of staining leucocyte granules with sudan black B. J.pathol. bacteriol., 59:336-7, 1947.
118. SHEVACH, E.M.; GREEN, I.; HERBERMAN, R.; FRANK, M.M. Receptors for complement and immunoglobulin on human leukemic cells and human lymphoblastoid cell lines. J.clin.invest., 51:1933-8, 1972.
119. SHEVACH, E.M.; JAFFE, E.S.; GREEN, I. T and B lymphocytes in human: Receptors for complement receptor and surface immunoglobulin on human and animal lymphoid cells. Transplant rev., 16:3-28, 1973.
120. SIMONE, V.J.; VERZOSA, M.S.; RUDY, J.A. Initial features and prognosis in 363 children with acute lymphocytic leukemia. Cancer, 36:2099-108, 1975.
121. SMITH, R.W.; TERRY, W.D.; BUELL, D.N.; SELL, K.W. An antigenic marker for human thymic lymphocytes. J.immunol., 110:884-7, 1973.
122. STATHOPOULOS, G. & ELLIOTT, E.V. Formation of mouse or sheep red blood-cell rosettes by lymphocytes from normal and leukemic individuals. Lancet, 1:600-1, 1974.
123. STITES, D.P.; WYBRAN, J.; CARR, M.C.; et al. Development of cellular immunocompetence in man, in Porter, R.; Knight, J.

- (eds) Ciba Foundation Symposium on the Ontogeny of Acquired Immunity. London, Associated Scientific Publishers, 1972, pp.113-132/citado por/ Vogler, et al. op.cit. n^o 132.
124. TERASAKI,P.I. & McCLELLAND,J.D. Microdroplets assay of human serum cytotoxins. Nature (London), 204:998-1000, 1964.
125. THIEL,E.; RODT,H.; NETZEL,B.; HUHN,D.; WINDISCH,G.F.; HAAS, R.J.; BENDER-GÖTZE,CH.; THIERFELDER,S. T-zell-antigen positive, E-rosetten negative akute lymphoblasten leukämie. Blut, 38:363-6, 1978.
126. THÖTTERMAN,T.H.& RANKI,A.; HÄYRY,P. Expression of the acid α naphthyl acetate esterase marker by activated and secondary T lymphocytes in man. Scand.j.immunol., 6:305 - 10, 1977.
127. TSUKIMOTO,U.; WONG,K.J.; LAMPKIN,B.C. Surface markers and prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia. N. engl.j.med., 294:245-8, 1976.
128. UCHIYMA,T.; YODOI,J.; SAGAWA,K.; TAKATSUKI,K.; UCHIMA, H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic feature of 16 cases. Blood, 50:481-92, 1977.
129. VALDIMARSSON,H.; AGNARSDOTTIR,G.; LACHMANN,P.J. Measles virus receptor on human T lymphocytes. Nature London, 255:554-6, 1975.

130. van ROOD, J.J.; van LEEUWEN, A.; TERMIJTELEN, A.; KEUNING, J.J. B-cell antibodies, Ia-like determinants, and their relation to MLC determinants in man. Transplant.rev., 30: 122-39, 1976.
131. VOGLER, L.B.; CRIST, W.M.; BOCKMAN, D.E.; PEARL, E.R.; LAWTON, A.R.; COOPER, M.D. Pre-B cell leukemia: A new phenotype of childhood lymphoblastic leukemia. N.engl.j.med., 298: 872-8, 1978.
132. VOGLER, L.B.; GROSSI, E.C.; COOPER, M.D. Human lymphocyte subpopulations. Progr.hematol., 1:45, 1980.
133. VOSSEN, J.M. & HIJMAN, S.W. Membrane associated immunoglobulin determinants on bone marrow and blood lymphocytes in pediatric age group and in fetal tissues. Ann. NY. acad.sci., 254:262-79, 1975.
134. WARNER, N.L. The immunological role of different lymphoid organs in the chicken: IV. Functional difference between thymic and bursal cells. Aust.j.exp.biol.med.sci., 43: 439-50, 1965.
135. WERNET, P.; WINCHESTER, R.; KUNKEL, H.G.; WERNET, D.; GIPHART, M.; van LEEUWEN, A.; van ROOD, J.J. Serological detection and partial characterization of human MLC determinants with special reference to B cell specificity. Transp. proc., 7(suppl):193-202, 1975.
136. WILLIAMS, A.H.; TAYLOR, C.R.; BCHIR, M.B.; HIGGINS, G.R.; QUINN, J.J.; SCHNEIDER, B.K.; SWANSON, V.; PARKER, J.W.; PATTENGAL, E.

- P.K.; CHANDER,S.B.; POWARS,D.; LINCOLN,T.L.; TINDLE,B. H.; LUKES,R.J. Childhood lymphoma - leukemia I. Correlation of morphology and immunological studies. Cancer, 42:171-81, 1978.
137. WINCHESTER,R.J. & ROSS,G. Methods for enumerating lymphocyte populations. In: ROSE, N.R. & FRIEDMAN, H. eds. Manual of clinical immunology. Washington, American Society for Microbiology, 1976. p.64-76.
138. WINCHESTER,R.J.; FU,S.M.; HOFFMAN,T. IgG on lymphocyte surface; Technical problems and the significance of a third cell population. J.immunol., 114:1210-2, 1975.
139. WOOLF,L.J.; RICHARDSON,S.T.; NEIBURGER,J.B.; NEIBURGER,R. G.; IRWIN,D.S.; BAEMMER,R.L. Poor prognosis of children with acute lymphocytic leukemic and increased B cell markers. J.pediatr., 89:956-8, 1976.
140. WYBRAN,J. & FUDENBERG,H.H. Thymus- derived rosette-forming cells in various human disease states: cancer, lymphoma, bacterial and viral infection, and other diseases. J.clin.invest., 52:1026-32, 1973.
141. YAM,L.T.; LI,C.T.; CROSBY,W.H. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am.j.clin.pathol., 55:283-99, 1971.
142. YAMANAKA,N.; ISHII,Y.; KOSHIBA,H.; MIKUNI,C.; KONNO, M.; KIRUCHI,K. A study of surface makers in acute lymphocy

tic leukemia by using anti-T and anti-B lymphocyte sera.
Cancer, 42:2641-7, 1978.

ANEXO II - ACHADOS DE EXAME FÍSICO DOS
PACIENTES COM LLA.

Nº	FÍGADO			BAÇO	MASSA EM	OBSERVAÇÕES
	RCD	AX	HEPATIM.	RCE	MEDIASTINO	
1	5.5	6.0	10.0	1.0	Sim	
2	7.0	11.0	13.5	7.5		
3	6.0	5.0	15.5	0.0		
4	6.0	8.0	14.0	5.5		
5	5.5	6.0	9.0	4.0		
6	5.5	6.0	12.0	7.0		
7	7.0	5.0	11.0	6.0		
8	6.0	7.0	12.0	0.0		Rim direito palpável
9	2.0	3.0	8.0	0.0		
10	7.0	4.0	6.0	8.0		
11	2.0	4.0	7.0	0.5		
12	2.0	1.5	NR	0.0		
13	5.5	7.0	8.0	2.0		
14	6.0	5.0	8.0	6.0		
15	5.5	5.5	7.0	6.0		
16	5.5	5.0	8.0	2.5		
17	0.5	0.0	6.0	15.0	Sim	
18	8.0	7.0	11.0	8.0		
19	4.0	5.0	NR	8.0		
20	3.0	4.0	8.0	1.5		
21	4.0	5.0	7.5	4.0		
22	5.5	4.0	11.0	10.0		
23	4.5	6.0	8.0	7.0		
24	5.5	4.0	8.0	2.0		
25	7.0	7.0	10.5	4.5		
26	5.5	4.0	9.0	1.0	Sim	
27	7.0	6.0	12.0	8.0		
28	6.0	7.0	11.0	10.0		
29	7.0	3.0	11.0	2.0		
30	1.5	1.0	9.0	1.0		
31	6.0	4.0	14.0	9.0		
32	5.5	5.0	9.0	0.0		
33	0.0	0.0	8.0	0.0	Sim	
34	0.0	0.0	4.0	0.0		Tumorações de pele
35	7.0	6.5	9.0	7.0	Sim	
36	7.0	4.0	11.0	3.0		
37	8.0	6.0	15.0	4.0		
38	7.0	8.0	13.0	4.0		
39	6.0	8.0	10.5	10.0	Sim	
40	5.5	6.0	9.0	6.0		

RCD = Rebordo Costal Direito

RCE = Rebordo Costal Esquerdo

AX = Apêndice Xifóide

HEPATIM. = Hepatimetria

ANEXO I - DIMENSÕES E LOCALIZAÇÕES DOS LINFONODOS
DOS PACIENTES COM LLA.

Nº	CERVICAL	OCCIPAL	SUBMENT.	SUPRACLAV.	AXILAR	INGUINAL
1	1.0x1.0			1.5x1.5	0.5x0.5	0.5x0.5
2	1.0x1.0	1.0x1.0	1.5x1.5	1.0x1.0	2.0x2.0	1.5x1.5
3	0.5x0.5			0.5x0.5	2.0x3.0	3.0x3.0
4	2.5x2.5	2.0x2.0	2.0x2.0	1.5x1.5	2.0x2.0	2.0x2.0
5	0.5x0.5			1.0x1.5		0.5x0.5
6	3.0x2.0			1.0x1.5	2.5x2.5	
7	0.5x1.0		1.0x1.5		1.0x1.0	1.5x2.0
8	0.5x0.5		1.0x1.5		0.5x0.5	0.5x0.5
9	0.5x0.5				0.5x0.5	1.0x1.0
10	2.0x2.0	2.5x2.5		0.5x0.5	0.5x0.5	1.0x1.0
11	0.5x0.5		0.5x0.5	1.0x0.5		0.5x0.5
12				1.0x1.0		
13	1.0x1.0		1.5x1.5	1.0x1.0		0.5x0.5
14	0.5x0.5					0.5x0.5
15	3.0x2.0		2.0x2.0	1.0x1.0	2.0x2.5	2.5x2.0
16					0.5x0.5	0.5x0.5
17	3.0x3.0		2.0x2.0	3.0x2.0	3.0x3.0	4.0x3.0
18	2.0x2.0		2.5x2.5	1.0x1.0	1.5x1.5	2.5x2.5
19	1.0x1.5					1.4x1.0
20	1.5x1.5	1.0x1.0	1.0x1.0	1.5x1.5	1.5x1.5	1.0x1.0
21	1.0x1.5		1.5x1.0			
22	0.5x0.5		0.5x0.5		0.5x0.5	
23	2.5x2.0	1.0x1.0	1.0x1.0	1.0x1.0	1.0x1.5	2.5x2.0
24	1.0x1.0		0.5x0.5	1.0x1.0	0.5x0.5	1.0x1.0
25	1.0x1.0	1.0x1.0	1.0x1.0	1.5x1.5	1.5x1.5	1.5x1.5
26	2.0x2.0	1.0x1.0	2.5x2.5	0.5x0.5	4.0x2.0	3.0x3.0
27	3.0x2.0		2.5x2.0	1.0x1.5	2.0x2.0	3.0x2.0
28	1.0x1.0	0.5x0.5	2.0x1.5	0.5x0.5		0.5x0.5
29	3.0x2.0	1.0x1.0		1.0x1.0	3.0x2.0	3.0x3.0
30	1.5x2.0		2.0x2.5	1.0x1.0	2.5x2.0	1.5x1.5
31	4.5x5.0		4.5x5.0			0.5x0.5
32	0.5x0.5		0.5x0.5			0.5x0.5
33	0.5x1.0					1.0x1.0
34	1.0x1.0		1.0x1.0	0.5x0.5		1.0x1.0
35	2.0x1.5		2.5x1.0	1.5x1.5		2.0x1.5
36	1.0x0.5	1.0x1.0	0.5x0.5	0.5x0.5	1.0x0.5	1.0x1.0
37	0.5x0.5	0.5x0.5			1.5x1.5	1.0x1.0
38	1.0x1.5	0.5x1.0	2.5x1.0	0.5x0.5	0.5x0.5	2.5x1.5
39	1.5x1.5	1.0x1.0	2.0x1.0	1.0x1.0	3.0x2.0	3.0x3.0
40	0.5x0.5	1.0x0.5			0.5x0.5	0.5x0.5

Subment. = Submentoniana

Supraclav.= Supraclavicular

ANEXO III - ACHADOS MORFOLÓGICOS DAS CÉLULAS LEUCÊMICAS
DOS PACIENTES COM LLA.

Nº	TAM. CELULAR		CROMATINA		FORMA NUC.		NUCLEOLOS		CITOPLASMA		BASOFILIA		VACUOLIZAÇÃO		TIPO
	PEQ.	GRD.	HOMOG.	HET.	REG.	IRREG.	Ñ VIS.	PROEM.	ESCAS.	ABUND.	MOD.	ACEN.	VAR.	INT.	
1	x		x			x	x		x		x		x		L1
2	x		x		x		x		x		x		x		L1
3		x		x		x		x		x		x		x	L2
4	x		x		x		x		x		x		x		L1
5	x		x			x	x		x		x		x		L1
6	x		x		x		x		x		x		x		L1
7	x		x		x		x		x		x		x		L1
8		x	x		x			x	x		x	x		x	L3
9	x			x		x			x		x		x		L1
10	x		x		x				x		x		x		L1
11	x		x		x		x		x		x		x		L1
12		x	x		x		x			x		x		x	L2
13	x		x		x		x		x		x		x		L1
14		x		x		x		x	x		x		x		L2
15	x		x		x		x		x		x		x		L1
16		x		x		x		x	x		x	x	x		-
17	x		x		x		x		x		x		x		L1
18	x		x		x		x		x		x		x		L1
19	x		x		x		x		x		x		x		L1
20		x		x		x		x		x		x		x	L2
21	x		x		x		x		x		x		x		L1
22		x		x		x		x		x		x		x	L2
23	x		x		x		x		x		x		x		L1
24	x		x		x		x		x		x		x		L1
25	x		x		x		x		x		x		x		L1

ANEXO III - ACHADOS MORFOLÓGICOS DAS CÉLULAS LEUCÊMICAS
DOS PACIENTES COM LLA.

Nº	TAM. CELULAR		CROMATINA		FORMA NUC.		NUCLEOLOS		CITOPLASMA		BASOFILIA		VACUOLIZAÇÃO		TIPO
	PEQ.	GRD.	HOMOG.	HET.	REG.	IRREG.	Ñ VIS.	PROEM.	ESCAS.	ABUND.	MOD.	ACEN.	VAR.	INT.	
26		X		X		X		X		X		X		X	L2
27		X		X		X		X		X		X		X	L2
28		X		X		X		X		X		X		X	L2
29		X		X		X		X		X		X		X	L2
30	X		X		X		X		X		X		X		L1
31		X		X		X		X		X		X		X	L2
32		X		X		X		X		X		X ^{S.A.}		X ^{S.A.}	L2
33		X		X		X		X		X		X ^{S.A.}	X	X ^{S.A.}	L3
34	X		X		X		X		X		X		X		L1
35	X		X		X		X		X		X		X		L1
36	X		X		X		X		X		X		X		L1
37		X		X		X		X		X		X		X	L2
38	X		X		X		X		X		X		X		L1
39		X		X		X		X		X		X		X	L2
40	X		X		X		X		X		X		X		L1

TAM. = tamanho

PEQ. = pequena

GRD. = grande

HOMOG. = homogênea

HET. = heterogênea

NUC. = nuclear

REG. = regular

IRREG. = irregular

Ñ VIS. = não visível

PROEM. = proeminente

ESCAS. = escasso

ABUND. = abundante

MOD. = moderado

ACEN. = acentuado

VAR. = variável

INT. = intenso

ANEXO IV - ACHADOS CITOQUÍMICOS DAS CÉLULAS
LEUCÊMICAS DOS PACIENTES COM LLA.

Nº	PAS	PEROXIDASE	SUDAM	FA	ENE	EACA
1	F	N	N	I	NR	NR
2	N	N	N	NR	NR	NR
3	N	N	N	N	N	N
4	I	N	N	I	N	N
5	F	N	N	N	N	N
6	F	N	N	I	F	N
7	I	N	N	N	N	N
8	N	N	N	N	N	N
9	N	N	N	F	N	N
10	F	N	N	F	N	N
11	N	N	N	M	N	N
12	F	N	N	F	I	N
13	F	N	N	N	N	N
14	N	N	N	N	N	N
15	I	N	N	N	N	N
16	N	N	N	F	N	N
17	N	N	N	F	F	N
18	F	N	N	N	N	N
19	I	N	N	N	N	N
20	N	N	N	F	N	N
21	I	N	N	N	I	NR
22	F	N	N	N	N	N
23	I	N	N	N	N	N
24	N	N	N	N	N	N
25	N	N	N	M	N	N
26	I	N	N	M	M	N
27	N	N	N	I	N	N
28	N	N	N	M	I	N
29	N	N	N	N	N	N
30	I	N	N	N	N	N
31	N	N	N	N	N	N
32	I	N	N	N	N	N
33	N	N	N	I	N	N
34	N	N	N	I	N	N
35	N	N	N	I	N	N
36	N	N	N	N	N	N
37	N	N	N	N	N	N
38	F	N	N	N	F	N
39	N	N	N	I	N	N
40	N	N	N	N	N	N

PAS = Ácido Periódico de Schieff

FA = Fosfatase Ácida

ENE = Esterase Não-específica

EACA = Esterase Cloro-acetato

F = Fraca

M = Moderada

I = Intensa

ANEXO V - MARCADORES DE MEMBRANA DAS CÉLULAS
LEUCÊMICAS DOS PACIENTES COM LLA.

Nº	ER%			ZC%	IgS%	MR%	AALT ESCORES	AALB
	1h (40C)	18h (40C)	1h (370C)					
1	40	38	NR	14	2	4	6	1
2	38	32	NR	14	8	2	5	1
3	2	2	NR	3	2	2	1	6
4	82	63	NR	4	1	0	6	1
5	4	5	NR	16	11	4	1	1
6	NR	98	NR	2	2	0	6	1
7	3	2	NR	3	1	2	1	6
8	4	8	NR	2	82	6	1	6
9	8	10	NR	5	9	4	1	1
10	1	2	NR	22	3	3	1	6
11	52	45	NR	8	13	2	5	1
12	28	30	NR	20	7	4	6	6
13	7	5	NR	9	8	7	1	6
14	0	0	NR	3	2	2	1	6
15	3	2	NR	2	1	1	1	6
16	38	30	NR	5	9	2	3	1
17	8	5	NR	9	1	2	6	1
18	7	6	NR	3	2	6	1	6
19	1	2	NR	4	2	4	1	6
20	3	2	NR	2	4	8	1	6
21	8	13	NR	7	4	5	1	6
22	8	6	NR	2	2	1	1	6
23	51	43	NR	1	3	1	6	2
24	2	3	NR	1	4	2	1	6
25	20	20	NR	7	6	0	5	1
26	7	8	NR	7	1	0	6	1
27	17	8	NR	6	1	1	6	1
28	45	48	NR	20	3	1	5	1
29	12	13	NR	9	15	1	1	6
30	47	23	20	0	1	0	6	1
31	11	9	2	3	10	3	1	6
32	4	3	2	6	3	2	1	6
33	80	72	70	9	34	1	6	1
34	29	23	20	12	6	2	5	1
35	47	30	11	4	6	2	6	1
36	11	9	2	1	4	1	1	1
37	2	2	0	2	1	1	1	6
38	3	3	1	3	1	1	1	6
39	24	18	6	1	2	1	6	1
40	6	6	2	3	6	8	1	6

ER = Roseta com eritrócitos de carneiro

ZC = Roseta com zynosan tratado com complemento

IgS = Imunoglobulina de superfície

MR = Roseta com eritrócitos de camundongo

AALT = Anti-soro que detecta antígeno associado aos linfócitos T

AALB = Anti-soro que detecta antígeno Ia-like

NR = Não Reagiu

ANEXO VI - VALORES HEMATIMÉTRICOS DOS
PACIENTES COM LLA.

Nº	VG %	Hb g/dl	PLAQUETAS x 1.000/ μ l	LEUCÓCITOS x 1.000/ μ l	BLASTOS %
1	36	11,3	33,00	26,00	69
2	24	7,2	10,00	6,90	57
3	20	6,9	11,00	11,35	96
4	27	8,5	18,00	122,80	68
5	32	7,4	19,00	7,70	32
6	31	10,6	40,00	507,00	92
7	27	8,8	10,00	10,00	35
8	33	11,5	150,00	6,40	03
9	12	3,7	140,00	0,70	00
10	26	8,0	1,00	0,90	48
11	35	11,6	20,00	6,40	43
12	15	5,1	2,00	36,00	82
13	19	6,6	26,00	16,90	64
14	17	6,0	1,00	1.000,00	100
15	33	10,9	35,00	13,50	53
16	32	11,0	43,00	4,55	32
17	32	10,9	39,00	17,00	71
18	21	7,9	11,00	167,00	92
19	18	5,9	38,00	7,20	58
20	36	12,6	130,00	3,20	00
21	26	8,5	10,00	125,00	69
22	25	8,2	3,00	3,70	31
23	22	6,9	7,00	3,80	10
24	26	8,1	13,00	2,10	99
25	30	10,5	5,00	6,40	04
26	32	10,4	185,00	4,90	25
27	25	8,4	17,00	109,00	97
28	12	6,0	70,00	10,00	33
29	22	7,4	240,00	35,90	88
30	22	7,1	10,00	380,00	95
31	44	13,4	110,00	8,50	00
32	23	8,0	NR	11,30	70
33	32	10,8	200,00	26,60	02
34	32	9,2	125,00	17,40	49
35	30	10,0	2,00	33,40	60
36	21	7,3	6,00	3,00	18
37	13	4,2	23,00	60,50	80
38	24	8,0	52,00	24,80	85
39	34	11,0	32,00	170,00	73
40	20	6,7	NR	39,20	20

VG = Volume globular

Hb = Hemoglobina

NR = Não Realizada

ANEXO VII - ER, IgS e ZC DOS LINFÓCITOS
PERIFÉRICOS T e B.

LINFÓCITOS PERIFÉRICOS	EXPERI MENTOS	ER %	IgS %	ZC %
T	1	88	2	3
	2	82	3	1
B	1	33	35	20
	2	35	32	21
Controle	1	61	13	9
	2	64	14	11

ER = Roseta com eritrócitos de carneiro

IgS = Imunoglobulina de superfície

ZC = Roseta com Zynosan^M tratado com complemento

ANEXO VIII - GRUPOS DE LAL E OS RESPECTIVOS
MARCADORES DE MEMBRANA.

GRUPOS	ER	AALT	IgS	AALB	IgC	AALC
T						
Tímica	+	+				
Pré-tímica		+				
Intermediária		+				+
B						
			+	+		
Não-T, Não-B						
Comum				+		+
Pré-B				+	+	+
Indiferenciada				- ou +		

ER = Roseta com eritrócitos de carneiro

AALT = Anti-soro que detecta antígenos associados aos linfócitos T

AALB = Anti-soro que detecta antígenos associados aos linfócitos B

AALC = Anti-soro que detecta antígenos associados à leucemia comum

IgS = Imunoglobulina de superfície

IgC = Imunoglobulina intracitoplasmática