

MARGOT ILSE HÜSCH

CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS
LEUCEMIAS LINFÓIDES AGUDAS NA INFÂNCIA

Dissertação ao Nível de Mestrado em Pe-
diatria apresentada à Universidade Federal
do Paraná.

— DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA —

CURITIBA
1989

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seu agradecimento a todos aqueles, que colaboraram na realização deste trabalho, e, de maneira particular:

Ao Prof. Dr. Raul Corrêa Ribeiro, pela orientação, apoio e estímulo.

Ao Prof. Dr. Izrail Cat, coordenador do curso de pós-graduação de Mestrado em Pediatria.

Aos Drs. Ricardo Pasquini, Eurípedes Ferreira, Carlos Roberto Medeiros, Waldir de Paula Furtado, Mara Albonei Dudeque Fianovski Kato, Carlos Morteau, Flora Hatanabe e Mauro Richartz, por terem gentilmente permitido a utilização, neste estudo, de dados clínicos e biológicos relativos a pacientes sob seus cuidados.

À equipe médica do Serviço de Hematologia, residentes do Departamento de Pediatria e Clínica Médica do Hospital de Clínicas da U.F.P., pela colaboração prestada no atendimento aos doentes.

Ao Prof. Dr. Paulo Barbosa, pela revisão de estudos morfológicos e citoquímicos.

Ao Dr. Joseph Mirro, do St. Jude Children's Research Hospital, Memphis(TN), pela análise crítica e sugestões apresentadas na realização do presente trabalho, bem como por ter cedido grande parte dos anticorpos monoclonais.

Às bioquímicas do setor de Imunogenética do Laboratório Central do Hospital de Clínicas da U.F.P., Maria Felicitas Niedfeld de Rodriguez, Noemi Farah Pereira, Sueli Galvão de Oliveira, Marina Katsue Ohashi, Mitoko Kuriki, e, em especial à Rosana Imara Cataneo, pela colaboração técnica, estímulo e amizade.

Às bioquímicas do setor de Hematologia do Laboratório Central do Hospital de Clínicas da U.F.P., e, em especial à Samira M. Fadel, pela realização das colorações citoquímicas.

À Srta. Elenice Mahana Daher, pelo auxílio na análise estatística dos resultados.

À Prof^ã Maria Inez de Abreu Sabatke, pelas sugestões e correção do texto.

Ao Sr. Celso Roberto Rocha, pela confecção das figuras.

SUMÁRIO

	Página
Lista de quadros	viii
Lista de ilustrações	ix
Lista de tabelas	xi
Lista de anexos	xiv
INTRODUÇÃO	1
1. Considerações gerais	2
2. Sistema imune	12
2. 1. Generalidades	12
2. 2. Participantes da resposta imune	16
2.2.1. Não específicos	16
2.2.2. Específicos	20
2. 3. Arranjo e rearranjo de imunoglobulinas e receptores de células T	32
2. 4. Fases funcionais da resposta imune	37
2.4.1. Indutiva	37
2.4.2. Efetora	38
2.4.3. Terminal	39
2. 5. Neoplasias do sistema imune	39
3. Classificação das LLA	41
3. 1. LLA não-T	42

3. 2. LLA T	45
OBJETIVOS	52
CASUÍSTICA	54
1. População de referência	55
2. População de estudo	55
2. 1. Fonte	55
2. 2. Critério de diagnóstico	56
2. 3. Critérios de exclusão dos pacientes	56
2. 4. Critérios de definição dos subgrupos de LLA ..	56
2.4.1. LLA T	56
2.4.2. LLA não-T	56
2.4.2.1. LLA B	57
2.4.2.2. LLA Comum	57
2.4.2.3. LLA Pré-Pré-B	57
2.4.2.4. LLA Indiferenciada	58
MATERIAL E MÉTODOS	59
1. Material	60
1. 1. Equipamentos	60
1. 2. Reagentes e soluções	61
2. Métodos	65
2. 1. Colheita do material.....	65

2. 2. Obtenção das células leucêmicas e ajuste da concentração.....	66
2. 3. Preparo das placas de microtitulação e de Terasaki	66
2. 4. Titulação dos anti-soros anti-IgM conjugados com fluoresceína	67
2. 5. Técnica de imunofluorescência indireta em placas de microtitulação	67
2. 6. Técnica de microlinfocitotoxicidade	69
2. 7. Formação de rosetas espontâneas com eritrócitos de carneiro	70
2. 8. Determinação da imunoglobulina de superfície .	71
2. 9. Determinação da imunoglobulina intracito- plasmática	72
2.10. Citoquímica	73
2.11. Morfologia celular	73
2.12. Outros exames complementares	75
2.13. Manifestações clínicas	75
2.12. Tratamento estatístico	76
 RESULTADOS	 77
1. Caracterização dos casos de LLA estudados	78
2. Comparação dos dados clínicos das LLA não-T com aqueles das LLA T	82
2.1. Sexo	82
2.2. Idade	85

2.3. Organomegalias	85
2.4. Massa mediastinal	88
2.5. Doença em Sistema Nervoso Central	89
2.6. Outros	89
3. Relação entre os valores hematimétricos ao diagnóstico e a classificação imunofenotípica dos pacientes estudados	91
3.1. Contagem leucocitária ao diagnóstico	91
3.2. Dosagem de hemoglobina	93
3.3. Contagem do número de plaquetas	93
4. Relação entre as características morfológicas, citoquímicas e imunofenotípicas das células leucêmicas dos pacientes estudados comparando as LLA não-T e T.....	96
4.1. Reação citoquímica do PAS	96
4.2. Morfologia das células leucêmicas	96
4.3. Microlinfocitotoxicidade	97
4.4. Imunofluorescência indireta e outros marcadores celulares	100
DISCUSSÃO	106
CONCLUSÕES	138
ANEXOS	141
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154

LISTA DE QUADROS

Quadros	Página
1. Anticorpos monoclonais que reagem com linfócitos T humanos.....	23
2. Anticorpos monoclonais que reagem com linfócitos B humanos.....	31
3. Classificação das LLA não-T.....	46
4. Classificação das LLA T.....	49

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	Fágina
1. Representação esquemática do rearranjo de segmentos gênicos de cadeia pesada da Ig.....	34
2. Representação esquemática da localização cromossômica das seqüências gênicas das cadeias leves e pesadas da imunoglobulina	35
3. Resposta Imune Humana - Imunidade humoral e mediada por célula	40
4. Representação esquemática da diferenciação do linfócito B normal	43
5. Representação esquemática da diferenciação do linfócito T normal	50
6. Representação esquemática da diferenciação linfóide humana associada às leucemias de linhagem B e T	51

7. Sequência na aplicação dos testes e reagentes
para a classificação das leucemias agudas na
infância 137

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
1. Características clínicas dos casos estudados...	80
2. Valores hematimétricos e características morfológicas e citoquímicas das células leucêmicas dos casos de LLA estudados.....	81
3. Classificação imunofenotípica dos pacientes com LLA estudados.....	83
4. Distribuição dos casos de LLA conforme o sexo dentro dos subgrupos	84
5. Distribuição segundo a idade dos casos de LLA nos subgrupos.....	86
6. Classificação imunofenotípica relacionada com a presença de organomegalias	87
7. Classificação imunofenotípica relacionada com	

presença de massa mediastinal, envolvimento de SNC e infiltração de outros órgãos e tecidos.....	90
8. Classificação imunofenotípica relacionada com valores hematimétricos - Contagem inicial de leucócitos em sangue periférico.....	92
9. Classificação imunofenotípica relacionada com valores hematimétricos - Dosagem de hemoglobina ao diagnóstico	94
10. Classificação imunofenotípica relacionada com valores hematimétricos - Contagem inicial de plaquetas.....	95
11. Relação entre a classificação imunofenotípica das LLA não-T e LLA T e intensidade da reação citoquímica do PAS.....	98
12. Relação entre a classificação imunofenotípica e a morfologia da célula leucêmica.....	99
13. Relação entre a classificação imunofenotípica e os resultados do teste de microlinfocito-toxicidade	101

14.	Marcadores celulares encontrados nos diferentes subgrupos de LLA T e não-T	102
15.	Resultado dos testes imunofenotípicos de marcadores celulares nas LLA T	105

LISTA DE ANEXOS

Anexos	Página
1. Idade, sexo e cor dos pacientes com LLA.....	142
2. Tamanho dos linfonodos, fígado, baço e outras características clínicas.....	144
3. Valores hematimétricos encontrados nos pacientes estudados	146
4. Características morfológicas e citoquímicas das células leucêmicas dos pacientes estudados.....	148
5. Marcadores imunológicos das células dos pacientes estudados.....	150

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Considerações gerais

Leucemia é uma doença maligna de células hematopoiéticas, caracterizada por acentuada proliferação e bloqueio da diferenciação e maturação das células sanguíneas ⁴⁵. Em 1847, com a descrição feita por Virchow na Alemanha e Bennett na Escócia, a leucemia foi reconhecida como uma entidade clínica definida ⁴⁶. Tradicionalmente, as leucemias têm sido agrupadas em agudas e crônicas com base na sua história natural e na morfologia das células neoplásicas envolvidas no processo. A leucemia aguda possui um curso clínico mais rápido e se não tratada leva ao óbito em poucas semanas ou meses. Em contraste, os pacientes com leucemia crônica podem sobreviver por tempo prolongado sem ou com tratamento mínimo.

A leucemia linfóide aguda (LLA) corresponde a 80% das leucemias em crianças e é a neoplasia mais frequente na infância ^{188, 194, 197, 198}. A LLA tem uma incidência de 2 a 3 casos para 100.000 habitantes na Europa e Estados Unidos ^{84, 88}, ou cerca de 2.000 casos novos por ano abaixo dos 15 anos de idade ^{188, 194, 888}. No Brasil, em estatística realizada há alguns anos na cidade de São Paulo, a incidência foi de 2,7

casos por 100.000 habitantes ²⁰⁰⁷. A LLA acomete discretamente mais o sexo masculino do que o sexo feminino ²⁰⁰⁸.

Recentemente, com a introdução da biologia molecular aplicada ao estudo das leucemias, uma quantidade enorme de informação tem possibilitado um melhor entendimento dos mecanismos de leucemogênese. Apesar disso, a etiologia dessa doença continua sendo um enigma. Fatores ambientais, genéticos e imunológicos são descritos em associação com a ocorrência da LLA, mas o significado da maioria deles é controverso ^{131,132}.

Até 1947 não havia tratamento específico para as leucemias, e a média de sobrevida dos pacientes, tanto crianças como adultos, era de 2 a 4 meses ²⁰⁰⁹. Há 40 anos Sidney Farber introduziu no tratamento das leucemias um antagonista do ácido fólico, a aminopterina, que induziu remissão temporária da doença em aproximadamente 50% dos pacientes ²⁰¹⁰.

A partir da observação de Farber ²⁰¹¹, de que as células leucêmicas poderiam ser significativamente diminuídas com a administração de quimioterápicos, o tratamento da LLA progrediu consideravelmente e a LLA passou, de uma doença fatal na totalidade dos casos, para uma doença potencialmente curável. Vários fatores contribuíram para este sucesso. Um deles foi a introdução de novas drogas quimioterápicas. Na década de 1950 estavam em uso, além do methotrexate, a 6-mercaptopurina e a prednisona. Na década seguinte já se dispunha de vincristina, adriamicina e L-asparaginase. No

final da década de 50 iniciou a utilização da terapia combinada ¹⁹². A formação de grupos cooperativos, que conduziram estudos clínicos prospectivos para tratar e ao mesmo tempo responder questões sobre a eficácia dos diferentes regimes terapêuticos, possibilitou o aumento da sobrevida livre de doença para a grande maioria das crianças com LLA.

No final da década de 60 e começo da seguinte, Pinkel e seu grupo no St. Jude Children's Research Hospital descreveram as primeiras crianças com cura definitiva da doença. Eles combinaram todos os agentes antineoplásicos conhecidos na época, na chamada "terapia total" ¹⁹³. Esta estratégia usa a administração de drogas na máxima dosagem tolerada durante a indução ¹⁹⁴, e introduziu o conceito da profilaxia para a leucemia do sistema nervoso central (SNC) com o uso da irradiação craniana e methotrexate intratecal ¹⁹⁴. Esta última estratégia de tratamento contribuiu de forma significativa para a melhor sobrevida dos pacientes com LLA, e foi incorporada aos estudos sistematizados subsequentes. Com isto, a taxa global de sobrevida livre de doença (mais de 5 anos após o término do tratamento) aumentou para cerca de 50% e a frequência de neuroleucemia diminuiu de 50% para menos de 10% ^{10, 25, 40, 115, 260}.

Apesar da melhoria dos índices de sobrevida, o maior obstáculo para a cura da LLA continua sendo a recidiva em medula óssea, que é considerada atualmente como um indicador da efetividade do tratamento. Por isso, surgiram outras combinações de drogas quimioterápicas administradas em menor

intervalo de tempo e, muitas vezes, com doses maiores que as convencionais, culminando com a chamada "máxima terapia de indução intensificada" ¹⁹⁴. Esta terapia intensiva adaptada ao tipo de manifestações clínicas do paciente resultou em sobrevida superior a 5 anos em cerca de 70% dos casos.

Desta forma o tratamento moderno da LLA modificou de maneira importante a história natural da doença. Para uma criança iniciando o tratamento nos anos 80 o índice de remissão é superior a 90% e mais de dois terços dos pacientes permanecem em remissão por mais de 5 anos após o término do tratamento ^{95, 195, 96}.

Entretanto, embora o tratamento tenha aumentado muito a sobrevida livre de doença, muitas crianças ainda apresentam recidiva ¹⁹⁴. Na metade da década de 1970, tornou-se evidente que a LLA na infância não era uma doença homogênea, respondendo de forma idêntica a uma mesma terapêutica ^{94, 98}. Inicialmente, vários autores propuseram a separação de grupos de pacientes com apresentações clínicas particulares, que estiveram relacionadas com recidiva da doença, estabelecendo a importância de certas manifestações clínicas para o prognóstico ^{94, 99}. Observou-se que o prognóstico estava diretamente associado com a dimensão da massa de tecido neoplásico ao diagnóstico. Pacientes com contagem de leucócitos acima de 100.000 por mm³, visceromegalia importante e linfonomegalia generalizada apresentavam pior prognóstico ^{95, 204, 205}.

Outras manifestações clínicas também associadas a um pior prognóstico não dependiam da massa neoplásica, mas provavelmente de alguma característica biológica. Assim, comprometimento do SNC ao diagnóstico, massa tumoral em mediastino, idade inferior a 2 e superior a 10 anos estiveram, em muitos estudos clínicos, associados a uma menor sobrevida ^{54,55,64,75,153,204,230}.

Essa aparente heterogeneidade clínica com importância prognóstica estimulou os investigadores a estudar as células leucêmicas procurando identificar diferenças morfológicas, citoquímicas e imunofenotípicas, que pudessem oferecer uma base celular para a heterogeneidade evidenciada clinicamente ⁷².

Uma classificação morfológica das leucemias agudas foi proposta em 1976 pelo grupo cooperativo Francês-Americano-Britânico (FAB) ⁸⁰, mas resultados controversos têm sido observados. A principal dificuldade encontrada nesses estudos decorre do alto grau de subjetividade na análise morfológica da célula leucêmica ^{81,84}. Mais tarde, em 1981, o grupo FAB propôs uma classificação das leucemias agudas linfoblásticas em três subgrupos: L1, L2 e L3, baseada num sistema de escores quanto à relação de tamanho do núcleo com o citoplasma, presença de nucléolos, regularidade da membrana nuclear e tamanho celular ⁸⁰. Vários investigadores têm considerado a classificação morfológica FAB reproduzível, útil e de valor prognóstico em crianças com LLA ^{40,107,143,144,147}. Crianças

com mais de 25% de linfoblastos L2 têm uma taxa de recidiva mais alta e sobrevida menor.

Além da morfologia, métodos que evidenciam a presença de determinados componentes intracitoplasmáticos também são empregados para separar subgrupos de LLA. A presença de glicogênio, detectada pela reação citoquímica do ácido periódico de Schieff (PAS), tem sido associada com o prognóstico. A maioria dos autores têm observado, que altos escores do PAS relacionam-se com uma maior duração da sobrevida não sendo, porém, uma variável independente do prognóstico ^{105, 120, 225}. Da mesma forma, a presença de certas enzimas, principalmente a transferase deoxinucleotidil terminal (TdT), que é encontrada em associação com certas subpopulações linfóides, não possui uma associação independente com o prognóstico ^{27, 112, 116, 142, 155, 247}.

Alterações citogenéticas repetitivas também têm sido demonstradas em associação com subgrupos de leucemias. O significado biológico dos rearranjos genéticos ainda não está bem estabelecido, mas os achados preliminares sugerem que as translocações oferecem uma vantagem proliferativa para a célula envolvida e, desta forma, um pior prognóstico ^{27, 54, 145, 146, 162, 200, 224}. As translocações são as anormalidades estruturais mais comumente encontradas ^{145, 174}. As mais frequentes incluem as translocações t(9;22)(q23;q11); t(8;14)(q24;q23); t(4;11)(q21;q23); t(12;v)(p;v) e a t(1;19)(q23;p13.3). A translocação t(8;14) parece ser específica e pode ser identificada em quase todos os casos de

LLA de células B. A translocação t(11;14)(p13;q13) é observada em casos de leucemia de células T. A translocação t(4;11)(q21;q23) ocorre mais comumente na LLA de células B precursoras, particularmente em crianças ^{27, 54, 107, 252}.

Além das características biológicas já citadas, a aplicação de métodos imunológicos no estudo da LLA permitiu uma nova dimensão no entendimento desta doença, assim como a obtenção de maiores informações sobre o prognóstico dos pacientes, resultando num planejamento terapêutico mais adequado para grupos de leucemia separados de acordo com o imunofenótipo ^{54, 74, 100, 105}.

Uma das primeiras evidências documentadas de uma diversidade imunofenotípica na LLA foi apresentada por Borella e Sen ²⁸, que demonstraram que os blastos leucêmicos de uma minoria de pacientes formavam rosetas em presença de eritrócitos de carneiro (ER) - uma propriedade dos linfócitos T ⁴. Isto levou a uma classificação imunológica da LLA em LLA-T e LLA-não T.

Observações subseqüentes demonstraram que a LLA T acomete cerca de 15 a 20% dos pacientes com LLA e está associada com maior freqüência em pacientes com idade superior a 10 anos, massa em mediastino, contagem leucocitária inicial elevada, comprometimento de SNC, organomegalias, que são manifestações clínicas relacionadas a pior prognóstico ^{28, 54, 223, 241}.

Posteriormente foi verificado que células de alguns pacientes com LLA expressavam imunoglobulina de superfície (IgS), que é uma propriedade dos linfócitos B ^{4,247}. Desta forma a LLA não-T foi subdividida em um pequeno grupo denominado LLA B e um grupo maior LLA não-T/não-B.

Em 1975 Greaves e cols. ⁹⁶ descreveram um antígeno associado à leucemia linfóide aguda comum (CALLA), cuja presença esteve relacionada a um melhor prognóstico ¹⁵⁸. O subgrupo LLA não-T/não-B, que corresponde a cerca de 80-85% dos casos pode, com base na expressão do CALLA, ser subdividido em LLA Comum (70-75%) e LLA Indiferenciada (5-10%) ^{56,95}.

Posteriormente verificou-se que cerca de um terço das LLA Comum apresentavam cadeias pesadas da Igm dentro do citoplasma (IgC) ^{97,71,848}. Este grupo foi denominado LLA Pré-B e está associado à uma duração da remissão mais curta ⁹⁷.

A caracterização das leucemias convencionalmente foi feita através da utilização de anti-soros heterólogos, que possuem sensibilidade e especificidade discutível ^{78,121,122,143,179,185,198,222,229,237,249}. Inicialmente foram utilizados para a caracterização das leucemias de células T e, posteriormente, foram sendo desenvolvidos reagentes dirigidos à linhagem celular B. Com o advento dos anticorpos monoclonais ficou evidente que, tanto o grupo de LLA T, como o não-T são heterogêneos, existindo vários subgrupos ^{94,109,138,141,209}.

Mais recentemente, estudos utilizando rearranjo de imunoglobulinas e anticorpos monoclonais, que identificam antígenos associados à célula B, têm demonstrado que a maioria dos casos de LLA não-T são derivados da linhagem de células B ^{5,9,49,76,178}. Dessa forma os avanços em várias áreas da imunologia e da biologia molecular aplicados ao estudo das leucemias confirmaram a impressão clínica, de que a LLA é um grupo heterogêneo de doenças com comportamento biológico diverso.

Alguns autores, em diferentes partes do mundo têm reportado resultados de estudos, que mostram uma variação da incidência dos diferentes subgrupos de LLA conforme a região geográfica ou etnia ^{53,150}. Estes estudos parecem indicar também uma menor frequência de LLA Comum em associação com condições sócio-econômicas baixas como ocorre na Nigéria, África do Sul e Arábia ^{87,155}.

No Brasil, em estudos realizados na Universidade Federal de São Paulo ⁴² e na Universidade Federal do Paraná ⁸¹¹, foi observada uma frequência maior de LLA T na infância, sugerindo que os índices mais elevados de mortalidade em nosso meio pudessem ser devidos à maior frequência de pacientes com LLA classicamente identificadas como tendo pior prognóstico.

Por outro lado, alguns autores ^{87,91} acreditam que essas variações de incidência da LLA, observadas em certos grupos étnicos e mudança na distribuição da faixa etária de maior incidência com a evolução das sociedades, não estão,

necessariamente, relacionadas com eventos genéticos ou ambientais, mas podem ser explicadas com base no proposto inicialmente por Stewart e cols. ²²⁶. Estes autores sugeriram, que a grande taxa de mortalidade infantil por doenças infecto-contagiosas endêmicas pode obscurecer a real incidência da leucemia em países ou regiões com menos facilidades médicas e diagnósticas.

Devido às manifestações clínicas das leucemias serem muito heterogêneas, muitos pacientes com a LLA Comum, que se apresentam com sintomas refletindo comprometimento da medula óssea incluindo anemia, sangramento e infecção, poderiam não ser diagnosticados como tendo LLA ²²⁷. Estes sintomas, principalmente a anemia, não atraem a atenção dos familiares, principalmente em áreas rurais ou em países subdesenvolvidos. Por outro lado, outros tipos de LLA, menos frequentes, apresentam-se com sinais e sintomas semelhantes àqueles dos linfomas, e devido à presença de massas tumorais, são mais facilmente identificados ²²⁸. Ocorre, por isso, que devido à sua história natural, muitos tipos de LLA não são corretamente diagnosticados, e poderiam ser exatamente aqueles que respondem melhor ao tratamento e dessa forma artificialmente aumentam a proporção de pacientes com subtipos de pior prognóstico ²²⁹.

Recentemente, com a disponibilidade de reagentes altamente específicos para subpopulações linfóides, tornou-se possível a caracterização de subgrupos de LLA sem as

desvantagens dos reagentes policlonais utilizados em muitos dos estudos iniciais.

A finalidade deste trabalho é a de estudar a frequência dos diferentes subgrupos de LLA em crianças do nosso meio, utilizando anticorpos monoclonais, e assim, testar a hipótese, de que existe aqui uma frequência maior de tipos de LLA com pior prognóstico, e verificar se o uso de um painel de anticorpos monoclonais associado às técnicas convencionais tem utilidade para uma melhor caracterização das células neoplásicas das leucemias agudas na infância.

2. Sistema Imune

2.1. Generalidades

A sobrevivência de todos os seres vivos depende da preservação do ambiente interno. Complexos mecanismos têm evoluído nos mamíferos, para eliminar partículas potencialmente prejudiciais ao organismo. O sistema imune depende da presença de proteínas solúveis ou integrantes das membranas celulares. Essas proteínas podem ligar-se a estruturas moleculares existentes nos parasitas multicelulares, fungos, bactérias e vírus. O repertório dessas proteínas, que funcionam como receptores, possibilita o reconhecimento de aproximadamente 10 milhões de estruturas diferentes, incluindo virtualmente qualquer configuração possível dentro do domínio do sistema imune ^{4, 242}.

O sistema imune é capaz de reconhecer todas as partículas dissolvidas em meio aquoso com dimensão variando entre 10 e 100 angstroms. Milhões de anos de evolução tornaram-no capaz de reconhecer milhares de determinantes antigênicos diferentes. Atualmente, com o desenvolvimento da biologia molecular, nossa capacidade de entendê-lo e caracterizá-lo aumentou consideravelmente ¹⁰⁹.

Os componentes do sistema imune, quando confrontados com determinantes antigênicos de peso molecular maior que 250 daltons, devem ser capazes de distinguir essas substâncias como estranhas ao organismo e montar uma resposta, quer para eliminá-las, quer para tolerá-las ¹⁰.

Desta forma, o sistema imune precisa distinguir o que é estranho e o que é próprio do organismo. Esta distinção é feita por um sistema de reconhecimento específico que, em última instância, é realizado pelos linfócitos T e B, os únicos componentes do mecanismo imune que são imunologicamente específicos. Este sistema também tem mecanismos efetores não específicos, que usualmente amplificam as funções específicas. Eles incluem os fagócitos mononucleares, leucócitos polimorfonucleares e o sistema de complemento ^{100, 107}.

Todas as células que compõem o sistema imune são derivadas de células hematopoéticas pluripotentes ("stem cells") ^{109, 100}. Estas células foram inicialmente reconhecidas em experimentos nos quais camundongos foram irradiados com doses subletais e posteriormente reconstituídos

com células autólogas de medula óssea ⁴⁶. Atualmente, já se conseguiu isolar e caracterizar a *stem cell* em camundongos através de ensaios de diluição limitada ^{43e}. A existência de um precursor comum para células mielóides e linfóides é indicada pelo achado de cariótipo anormal (induzido por radiação) em células de ambas as linhagens e também pela habilidade das colônias de células esplênicas reconstituírem a resposta imunológica dos animais. Além disso, pelo trabalho de Spandgrude e cols. ^{43e} infere-se que a *stem cell* dá origem a células mielóides ou linfóides, conforme o microambiente no qual ela se aloja: baço, timo ou medula óssea.

Pelo fato do sistema imune necessitar ser efetivo contra uma grande variedade de substâncias, ele precisou desenvolver vários tipos de respostas. Existem basicamente duas divisões principais do sistema de defesa orgânica, que é o *sistema imune inato* (não adaptativo) e o *sistema imune adaptativo*, sendo que este último é por sua vez dividido em *resposta humoral* e *resposta mediada por células* ⁴².

O sistema imune inato (não adaptativo ou fixo) consiste de uma série de barreiras, fatores solúveis e células, que o organismo sadio possui já ao nascimento e usa durante a vida. A primeira barreira de defesa do organismo é a pele e mucosas íntegras. Os cílios da árvore traqueobrônquica impedem a penetração de substâncias invasivas, assim como as secreções ácidas agem como barreira para microrganismos no estômago. Organismos não patogênicos também ajudam a prevenir infecções (intestino, vagina). A lisosima, uma enzima distribuída na

maioria das secreções funciona como barreira bioquímica, que protege a superfície epitelial da nasofaringe, intestino, pulmão e trato geniturinário. Dos fatores solúveis circulantes, alguns, como a properdina e lisosima, estão sempre presentes, enquanto outros têm a propriedade de serem induzidos quando a infecção ocorre, como a proteína C reativa e o interferon. Os fagócitos são células, que participam do sistema imune inato, embora alguns deles tenham ramificações no sistema imune adaptativo.

A entrada de uma partícula estranha com propriedades antigênicas no organismo desencadeia a resposta imune adquirida ou adaptativa. O grau e tipo de resposta induzida é determinada por fatores como: capacidade genética do hospedeiro, natureza do antígeno, dose e via de entrada no organismo. Existem dois tipos principais de resposta imune adaptativa. A primeira é a *resposta humoral*, que inicia com a ligação da imunoglobulina com o antígeno e continua com a síntese e liberação de anticorpos no sangue e secreções. A segunda é a *resposta mediada por célula*, que produz linfócitos efetores. Tanto a imunidade humoral como a mediada por célula têm três importantes características: 1) o *reconhecimento* de invasores estranhos; 2) *especificidade* na direção da resposta ao invasor; e 3) *memória* da interação com o antígeno.

2.2. Participantes da resposta imune.

2.2.1. Não específicos

Os linfócitos são os únicos componentes responsáveis pela especificidade imunológica, que depende de seus receptores antigênicos. O completo desenvolvimento e expressão da resposta imune, entretanto, requer componentes não específicos, para agir como amplificadores e modificadores ⁵².

2.2.1.1. Células apresentadoras de antígeno

As células apresentadoras de antígenos são células fagocíticas, geralmente macrófagos. Primeiramente pensava-se que estas células eram limitadas a células do sistema mononuclear fagocítico. Recentemente, entretanto, foi mostrado que outros tipos de células, como as endoteliais e gliais, podem "apresentar" antígeno ⁵³.

A apresentação do material antigênico pode ocorrer associada à estruturas existentes na membrana do macrófago, que são codificadas pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe I ou II. Quando os antígenos são apresentados na proximidade do MHC de classe II, a célula que reconhece este complexo é o linfócito T auxiliador ou "helper", enquanto que os antígenos apresentados na proximidade do MHC de classe I reagem com o linfócito T citotóxico ⁵⁴.

2.2.1.2. Leucócitos polimorfonucleares

Estas células podem ser essenciais para o completo desenvolvimento de reações inflamatórias mediadas por mecanismos imunes. Assim como os macrófagos, são responsáveis pela ingestão e digestão (fagocitose) de microrganismos. São células não divisíveis e de vida limitada a horas, com grânulos que contêm uma grande quantidade de fatores bactericidas e reservas de glicogênio, que podem ser utilizadas para produção de energia em condições anaeróbias ¹⁰.

As células fagocitárias têm um grande potencial antimicrobiano, mas quando um agente infeccioso entra no organismo, esse potencial mostra-se inútil até que seja encontrado um caminho que permita ao fagócito capturar o microrganismo. O organismo tem solucionado esse problema através de milhões de anos de evolução, pelo desenvolvimento do sistema do complemento ¹¹.

2.2.1.3. Complemento

A fagocitose é facilitada pela ativação do sistema de complemento, que é um sistema formado por 9 proteínas (C1-C9) algumas delas com subfrações, que são ativadas em seqüência. Quando o primeiro componente é ativado por um complexo imune adquire a capacidade de ativar diversas moléculas do componente seguinte na seqüência, cada um desses torna-se então capaz de atuar sobre o componente seguinte e assim

sucessivamente, produzindo um efeito de cascata com amplificação. Cada fator do complemento pode causar o processamento ou ativação de muitas moléculas do componente seguinte na seqüência. Os componentes terminais da cascata do complemento têm capacidade de lisar células, presumivelmente por alguma perturbação da estrutura fosfolipídica da membrana celular.

O sistema complemento, incluindo tanto a via clássica como alternativa, está intimamente envolvido na expressão completa de muitas reações imunológicas, incluindo atividade antimicrobiana e fenômenos auto-ímmes ²¹⁰.

2.2.1.4. Mediadores solúveis

Os mediadores solúveis, substâncias semelhantes a hormônios, são pequenas moléculas através das quais as células do sistema imune se comunicam e são moduladas. Não são antígeno-específicas, embora sua produção esteja relacionada com o estímulo antigênico. Coletivamente, elas são chamadas de citocinas, aquelas produzidas por linfócitos são chamadas de linfocinas, e alguns mediadores que agem entre leucócitos são chamados de interleucinas. A terminologia não está ainda padronizada, mas é evidente que estas substâncias desempenham um papel importante na imunorregulação ²¹⁰.

A interleucina 1 (IL-1) é uma linfocina que ajuda a iniciar a fase de indução da resposta imune (também chamada de fator ativador de linfócitos). Células apresentadoras de

antígeno produzem IL-1 quando elas interagem com o antígeno e a célula T apropriada. A IL-1 tem um grande número de outras atividades, incluindo sua função como pirogênio endógeno, como estimulador de fibroblasto, e outras ¹⁷⁴. A interleucina 2 (IL-2), antes chamada de fator de crescimento da célula T, é essencial no desenvolvimento de células T citotóxicas (Tc). Ela é secretada por células T ativadas durante a blastogênese e é crucial para a expansão clonal de células T e também contribui com células B em sistemas colaborativos T-B ^{174,217,244}. A interleucina 3 (IL-3) também é produzida por células T ativadas e tem a habilidade de agir como um promotor do crescimento celular ou um fator estimulador de colônias. Promove o crescimento de muitas células, principalmente mastócitos. A interleucina 4 (IL-4) é produzida por células T ativadas e parece ser como o fator estimulador de células B. Outras interleucinas estão sendo descobertas rapidamente. Estas, incluem fatores de reposição de células T e fatores de diferenciação de células B. As duas linfocinas que afetam a função de células B são o *fator de crescimento da célula B* (FCCB), que promove o crescimento e divisão celular destas células, e o *fator de diferenciação da célula B* (FDCB), que possibilita a diferenciação em células plasmáticas liberadoras de anticorpos ⁶⁰.

Os interferons (INFs) são um grupo de citocinas cuja natureza exata está sendo reconhecida atualmente. Eles foram descobertos no sobrenadante de cultura de células infectadas por vírus. Estes fluidos interferiam com a superinfecção das células por outros vírus, por isso o nome, interferon. Desde

então, três classes principais de INFs foram reconhecidas: alfa, beta e gama. Entretanto, é sabido que existem várias espécies de IFN em cada classe. Estas moléculas têm muitas funções. Uma substância reguladora importante é o gama interferon, especialmente em infecções virais. Pode ser produzido por células infectadas com vírus e por linfócitos. O interferon ativa as células "Natural Killer" (NK) e geralmente promove ativação de macrófagos, células B e células T citotóxicas durante a resposta imune. Ele pode também iniciar a eliminação de organismos invasivos ligando-se diretamente à sua superfície e criando um imunocomplexo, que é lisado pelo complemento ^{10,46}.

2.2.2. Específicos

A base da especificidade imunológica é a configuração única de receptores em linfócitos T (timo derivados) e B (medula óssea derivados). Estes receptores (imunoglobulina em células B e o receptor de célula T) são heterodímeros dissulfídicos, que podem reagir, cada um, com apenas um determinante antigênico.

2.2.2.1. Linfócitos T

Os linfócitos T são primariamente responsáveis pela resposta mediada por célula. Células T progenitoras são derivadas da medula óssea, migram para o timo onde se diferenciam e se tornam maduras ^{10,46}. Pouco se sabe sobre a natureza precisa da célula T pré-tímica progenitora ⁴⁶. Os

eventos intratímicos da diferenciação da célula T são relacionados com a compartimentalização dos linfócitos em duas regiões distintas dos lóbulos tímicos, córtex e medula. Os timócitos corticais representam 85 a 90% dos linfócitos tímicos, enquanto que os restantes estão na região medular 107, 107, 207.

Os linfócitos T foram inicialmente identificados por sua capacidade de ligarem-se espontaneamente a eritrócitos de carneiro 170. Os linfócitos T também são identificados por reagentes específicos. Estes foram, usualmente, obtidos pela imunização de coelhos com timócitos humanos e submetidos a adsorções extensivas com células não-T para torná-los mais específicos 99, 140. O desenvolvimento da tecnologia dos hibridomas para produção de anticorpos monoclonais 59, 120 tornou disponível vários reagentes monoclonais específicos para componentes da superfície celular. Muitos destes anticorpos reagem com células T em diferentes etapas da sua diferenciação. Alguns identificam antígenos encontrados em todas as células T, enquanto que outros, somente em determinados estágios da célula T (Quadro 1). Os anticorpos monoclonais têm provado serem mais sensitivos e discriminatórios que os chamados anti-soros heterólogos 75, 94, 250.

Com a utilização de um painel de reagentes tem sido proposto um esquema de maturação intratímica dos linfócitos T em 3 estágios, baseado nas alterações da expressão dos antígenos de superfície. De acordo com este modelo, três

estágios podem ser reconhecidos: timócitos imaturos, intermediários e maduros ^{54, 120}.

Linfócitos imaturos expressam receptor para eritrócitos de carneiro e antígenos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais T1 (CD5), T10 (CD38) e T9. Nenhum destes marcadores, entretanto, é específico da linhagem T, pois os receptores para eritrócitos de carneiro (T11/CD2) também são encontrados em células NK, e T9 é detectado nas células em divisão de várias linhagens. Timócitos intermediários são identificados pela expressão dos antígenos T6 (CD1), T4 (CD4) e T8 (CD8) expressos simultaneamente. Estes últimos marcadores (T4 e T8), que são co-expressos pelas mesmas células durante a fase intermediária da maturação tímica, são subsequentemente expressos individualmente por grupos de células T "helper" (Th/T4), supressoras (Ts/T8) ou citotóxicas (Tc/T8).

As células Th são as diretoras da resposta imune, reconhecendo o antígeno e iniciando a resposta. Elas têm moléculas de proteínas na sua superfície, chamadas T4 (CD4), que reconhecem a estrutura do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe II. Linfócitos T citotóxicos (Tc) também chamados de células efetoras ou ativadas, são os operadores na resposta mediada por célula e têm moléculas de proteína na sua superfície chamadas T8 (CD8), que reconhecem antígenos de classe I. A célula T supressora (Ts) inibe ou reduz a resposta imune ¹²⁴.

QUADRO 1

ANTICORPOS MONOCLONAIS QUE REAGEM COM LINFÓCITOS T HUMANOS

Adaptado de K.A.Foon e cols. 75

ANTICORPO	ESPECIFICIDADE	CD
OKT1, anti-T1, anti-Leu-1	Linfócitos Pan-T	CD5
OKT3, anti-T3, anti-Leu-4	Linfócitos Pan-T(mitogênico)	CD3
OKT11, anti-T11, anti-Leu-5	Linfócitos com receptor ER	CD2
3A1, anti-Leu-9	Linfócitos Pan-T	CD7
OKT4, anti-T4, anti-Leu-3	Linfócitos T <i>helper</i>	CD4
OKT8, anti-T8, anti-leu-2	Linfócitos T supressor ou citotóxico	CD8
OKT6, anti-Leu-6	Timócitos	CD1
OKT10	Timócitos	CD38
OKT9	Timócitos, linfoblastos	NA

CD = *cluster designation* ou designação de grupo;

NA = não aplicável;

OKT = Anticorpos da Ortho Systems, Inc., NJ.

anti-Leu = Anticorpos da Becton Dickinson Co., Calif.

anti-T = Anticorpos da Coulter Immunology, Flo.

Timócitos maduros também expressam o antígeno T3 (CD3) e perdem alguns marcadores detectados em estágios mais precoces como o T6 (CD1). Células T periféricas são similares aos timócitos medulares no seu fenótipo. Uma possível diferença está no antígeno T10 (CD38), não detectado na maioria das células circulantes e expressos pelos linfócitos medulares⁹⁴. Timócitos maduros, indistinguíveis funcionalmente dos linfócitos T periféricos, deixam o timo e dirigem-se aos órgãos linfóides, onde eles se localizam nas zonas T-dependentes (paracórtex dos linfonodos), e constituem uma população de células de vida longa, ativamente recirculantes.

Além das estruturas reveladas pelos reagentes acima descritos, as células T têm moléculas na sua superfície denominadas receptores de células T, que são específicas para cada antígeno. Intimamente associada com o receptor está outra molécula, chamada T3 (CD3), que participa do reconhecimento antigênico.

Diferentemente das células B, as células T precisam fazer um reconhecimento simultâneo, do antígeno e da molécula do complexo maior de histocompatibilidade (MHC). Devido ao fato de receptores de célula T e anticorpos terem sorologicamente determinantes comuns (idiotipos), alguns imunologistas propuseram que a imunoglobulina (Ig) também é o constituinte químico do receptor da célula T. Os determinantes antigênicos do receptor da célula T são moléculas de duas cadeias distintas, alfa e beta. Ambas possuem regiões constantes e variáveis, estas últimas sendo específicas para cada clone de

células T ¹⁹⁷. Estes genes têm sequência homóloga com genes da Ig, mas são distintos destes. Assim, células T e B usam a estratégia comum de recombinação genética para diversidade da informação genética. Atualmente se descobriu mais duas cadeias para receptor de célula T, chamadas gama e delta, porém sua expressão é dispensável para o funcionamento dos linfócitos T citotóxicos convencionais e células Th, têm uma função NK like e não são restritos pelo MHC ²⁰⁴. Além disso descobriu-se que o repertório genético destes genes é limitado ²⁴¹.

2.2.2.2. Célula K

A célula K ("killer") é um tipo especial de célula linfóide efetora, distinta da célula NK e da célula Tc. Ela funciona entre a resposta mediada por célula e a resposta humoral. Tem a habilidade de reconhecer o fragmento Fc da imunoglobulina e é capaz de eliminar células que foram reconhecidas pelo anticorpo. Desta forma, é responsável pela resposta imune chamada de citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (CCDA) ¹².

2.2.2.3. Célula NK

Uma célula que parece funcionar entre o sistema imune inato não-adaptativo e o sistema imune adaptativo é a célula "natural killer" (NK). Esta célula é um leucócito, que pode reconhecer, ligar-se, e destruir células infectadas por vírus e células neoplásicas. As células NK são ativadas por fatores derivados de linfócitos, entre eles, os interferons. São

células de morfologia linfóide, que não expressam marcadores específicos para células de linhagem B ou T. Possuem grânulos azurófilos no citoplasma que são peroxidase negativos. Acha-se que os grânulos estão envolvidos no processo citotóxico. As células NK expressam um marcador específico, que é o antígeno Leu-7. Além disso, uma proporção destas células tem marcadores inespecíficos associados à célula T (T4/Leu-3, T8/Leu-2) e formam rosetas instáveis com eritrócitos de carneiro. A origem das células NK não é conhecida ^{50, 174}.

2.2.2.4. Linfócitos B

A dicotomia entre o sistema imune humoral e mediado por célula foi primeiramente observado em aves, que possuem um órgão chamado bursa de Fabricius, responsável pela produção de células B. Em humanos e outros mamíferos, as células B são produzidas em tecidos hematopoiéticos (fígado fetal e medula óssea) ^{50, 100, 104}.

As células B se caracterizam pela expressão de imunoglobulina na superfície da membrana citoplasmática (IgS), que serve como um receptor para o antígeno. A IgS é adquirida no final de um processo de diferenciação independente de antígeno ^{50, 107}. Progenitoras de células B, comumente chamados de células pré-B são detectadas no fígado fetal de 8 semanas e posteriormente na medula óssea ¹⁰⁰. Estas células expressam somente a cadeia pesada da imunoglobulina intracitoplasmática (IgC).

A diferenciação da célula B ocorre em dois estágios. No primeiro, que é independente de antígeno, ocorre a ativação da expressão dos genes que codificam os aminoácidos para a síntese das cadeias da imunoglobulina. Nesta fase, essas células podem ser reconhecidas por uma série de anticorpos monoclonais como o Ia (HLA-DR), B4 (CD19), B1 (CD20), B2 (CD21), e por alguns outros que têm como antígenos células de leucemias ou linfomas, como o CALLA (CD10) e o p24/BA-2 78.76.154.

O segundo estágio de diferenciação é marcado pelo encontro de uma célula B com o antígeno. Dessa forma, as células B, que são preferencialmente ativadas pela estrutura antigênica proliferam e diferenciam em células plasmáticas. Estas células secretam moléculas de anticorpos da mesma especificidade daquela expressa na superfície da célula B que reagiu com o antígeno.

Um número muito grande de anticorpos monoclonais reagindo com estruturas de membrana de linfócitos B têm sido descritos (Quadro 2). Alguns destes anticorpos reagem com subpopulações de células B, outros reagem com precursores destas células, e outros, ainda, com linfócitos B transformados em células neoplásicas.

Estruturalmente as imunoglobulinas são formadas por 4 cadeias polipeptídicas, duas pesadas (H - "heavy") e duas leves (L - "light"). A molécula de Ig é também dividida em regiões funcionais. A região constante da cadeia H e L

consiste de uma sequência de aminoácidos que é a mesma em todas as imunoglobulinas de uma mesma classe. A região variável, entretanto, é feita de seqüências de aminoácidos que são diferentes de molécula para molécula. Estas regiões são os sítios de ligação com os antígenos.

Utilizando o método da digestão das imunoglobulinas pela pepsina, as cadeias podem ser seccionadas em dois fragmentos Fab, que são constituídos de áreas variáveis e parte da área constante de ambas as cadeias H e L, e em um fragmento Fc, que é composto somente de regiões constantes da cadeia pesada, sendo conhecido pela sua capacidade de se ligar ao complemento não ativado e iniciar a cascata de ativação.

Durante o processo de diferenciação dos linfócitos B a primeira classe de Ig a ser expressa na superfície da célula B é a IgM. Células com IgM estão presentes no fígado fetal a partir da 9ª semana de gestação ¹⁰⁷. Após a expressão da IgM, as células B expressam outras classes (isotipos) de Ig, que têm as mesmas regiões variáveis, porém cadeias constantes diferentes, desta forma possuindo a mesma especificidade antigênica da IgM expressa inicialmente. Os linfócitos do feto humano expressam IgM e IgD na superfície da membrana a partir de 13 semanas de gestação, porém, uma minoria de subpopulações de células B, ocasionalmente, expressam IgG concomitantemente com uma segunda classe de IgG ou IgA ¹⁰⁸.

Além da IgS, a célula B possui outras estruturas na sua superfície. Ela expressa glicoproteínas que podem ser de

importância funcional na sua interação com outras células e seus produtos solúveis. Em adição aos antígenos HLA de classe I (HLA-A,B,C), que são expressos em todos os tipos de células, a célula B tem também antígenos de classe II (HLA-D). Estes são expressos precocemente na diferenciação da célula B ^{107,108}. Os antígenos HLA de classe II são glicoproteínas polimórficas, homólogas aos genes que codificam os antígenos Ia do camundongo ^{107,108}, e têm função importante na interação de células B, T e macrófagos, resultando na ativação da célula B. Eles não são encontrados exclusivamente na célula de linhagem B, mas também são expressos em monócitos, células dendríticas, células T ativadas e em células precursoras mielóides e eritróides.

Células B também expressam receptores para complemento (C_{3b} e C_{3d}). O receptor C_{3b} é expresso precocemente na diferenciação da célula B e é encontrado em muitas células pré-B e quase todas as células B de sangue periférico. O receptor C_{3d} também é expresso em outras células (monócitos, neutrófilos, eritrócitos, células renais, e algumas células T), enquanto que, o receptor C_{3d} parece ser restrito às células B ^{107,108}.

Receptores para a região Fc da imunoglobulina são expressos na diferenciação da célula B após o estágio pré-B. Têm sido relatados receptores Fc para IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. Em adição a estes receptores, as células B podem exibir alguns outros receptores, que podem servir como marcadores celulares: receptor para eritrócito de camundongo e

receptores para algumas aglutininas. As células B têm também a propriedade exclusiva, pelo menos dentro do sistema linfóide, de expressar receptor para o vírus de Epstein-Barr ¹⁸⁷.

2.2.2.5. Células plasmáticas e células de memória

Quando uma célula B madura liga-se ao antígeno, ela é ativada e estimulada a entrar no ciclo celular e proliferar (expansão clonal) ²¹⁸. Algumas células da progênie começam a sintetizar Ig da mesma especificidade que a IgS que serviu como receptor de antígeno. Esta é a essência da teoria proposta por Burnet da "seleção clonal" ⁴². Eventualmente, estas células desenvolvem-se em células plasmáticas, que são células terminais de diferenciação e têm em média de 2 a 3 dias de vida.

Nem toda a progênie clonal de uma célula B ativada se transforma em célula plasmática. Algumas células reverterem a linfócitos pequenos, e esta população expandida de células de memória contribui, junto com as células T, para uma resposta rápida a um encontro futuro com um mesmo antígeno. As células de memória após certo tempo geralmente perdem IgM e IgD expressando apenas IgG ^{188,230}.

QUADRO 2

ANTICORPOS MONOCLONAIS QUE REAGEM COM LINFÓCITOS B HUMANOS

Adaptado de K.A.Foon e cols. ⁷⁸

ANTICORPO	ESPECIFICIDADE	CD
BA-3, J5, anti-CALLA	Antígeno associada à LLA Comum, presente em alguns linfomas e raras células normais	CD10
BA-1 (IgM)	Linfócitos B, células B malignas granulares	CD24
Anti-B1 (IgG _m)	Linfócitos B, células B malignas	CD20
Anti-B2 (IgM)	Linfócitos B, receptor para EBV e C _{3d}	CD21
Anti-B4 (IgG _a), MNM6, PL-13	Linfócitos B, células B malignas Células B germinativas, algumas células B malignas	CD22 CD23
Anti-BL3 (IgG ₁)	Subpopulações de linfócitos B, células plasmáticas, células T ativadas	NA
Anti-PC-1 (IgM)	Células plasmáticas	NA

CD = *Cluster designation*; NA = não aplicável;EBV = *Ebstein-Barr virus*;

Anti-B e PC-1 = Coulter Immunology, Hialeah, Flo.

BA-1 = Hybritech, Inc., San Diego

2.3. Arranjo e rearranjo das imunoglobulinas e receptores de células T.

Até recentemente, um dos maiores paradoxos da imunologia era explicar a capacidade quase ilimitada do sistema imune de produzir unidades de reconhecimento para aproximadamente 1 milhão de diferentes antígenos ^{10⁷, 10⁸}. A solução para este problema surgiu recentemente através de estudos empregando a tecnologia do DNA recombinante ²⁴². Estes estudos demonstram que os genes que codificam as imunoglobulinas e os receptores de células T estão organizados em segmentos descontínuos do DNA ¹²⁰. Esta configuração é chamada de linha germinativa (*germ line*), e é encontrada em todas as células do organismo, exceto nos linfócitos B e T. Nestes, a configuração do DNA é diferente daquela que é observada nas células do resto do organismo, sugerindo que o DNA das células do sistema imune é resultado de recombinação somática, que ocorre quando uma célula tronco hematopoiética diferencia-se no sentido da linhagem linfóide. A combinação desses segmentos de genes pode levar a milhões de diferentes células, cada uma com especificidade para uma determinada estrutura antigênica diferente ⁷.

Cada cadeia pesada é codificada por 4 segmentos de genes: V (variável), D (diversidade), J (junção) e C (constante). Os três primeiros segmentos codificam a região variável do polipeptídeo, enquanto que o segmento gênico C (um para cada classe ou subclasse de Ig) codifica a região constante. Na configuração "*germ line*", estes segmentos de genes estão

separados por longos trechos de DNA e precisam rearranjar antes que um RNAm possa transcrever uma cadeia pesada.

A cadeia leve de Ig é codificada por 3 segmentos: V, J e C, que, da mesma forma são rearranjados durante a diferenciação da célula B ⁴⁹. Os primeiros rearranjos ocorrem nas fases iniciais da diferenciação da célula B e resultam na justaposição, em um mesmo cromossoma homólogo, de segmentos de genes V, D e J. Embora o rearranjo genético possa ocorrer em ambos os cromossomas homólogos, rearranjo produtivo só ocorre em um deles. Isto resulta em exclusão alélica e previne a produção, por uma única célula B, de cadeias pesadas contendo duas regiões variáveis diferentes (figura 1).

Em face da recombinação somática ocorrida nas células do sistema imune, o DNA destas células é diferente daquele de outras células do mesmo indivíduo. Essa diferença do "tamanho" do DNA pode ser verificada laboratorialmente mediante o uso de enzimas de restrição e sondas de DNA marcados com elemento radiativo ³²P.

No homem o gene da cadeia pesada da imunoglobulina está localizado no braço longo do cromossoma 14, enquanto que os genes das cadeias leves kappa e lambda estão nos cromossomas 2 e 22 respectivamente (figura 2).

As células precursoras dos linfócitos B, que expressam cadeia Mu (M), rearranjam genes para cadeia leve. Primeiro ocorre o rearranjo V_L - J_L na família gênica kappa e então,

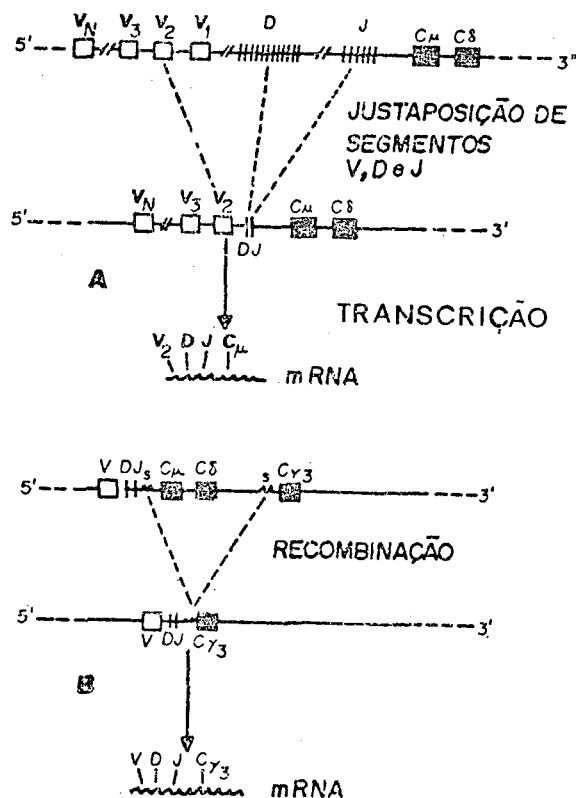
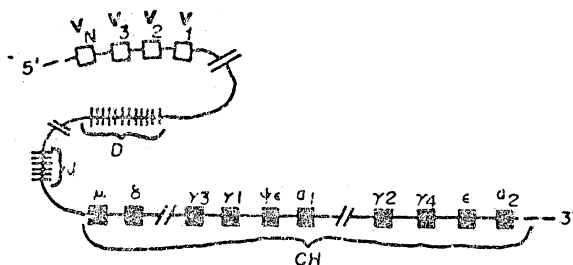


FIGURA 1. Representação esquemática do rearranjo de segmentos gênicos de cadeia pesada da Ig.
 A. Rearranjo de segmentos gênicos V_H , D e J_H em um cromossoma homólogo, resultando em transcrição de RNAm.
 B. Representa um possível mecanismo de recombinação de regiões de cadeia pesada e subsequente deleção do DNA.

(Adaptado de CALVERT⁴³)

V=variável; D=diversidade; J=junção; C=constante.

A GENES DE CADEIA PESADA NO CROMOSSOMA 14



B GENES DE CADEIA LEVE KAPPA NO CROMOSSOMA 2



C GENES DE CADEIA LEVE LAMBDA NO CROMOSSOMA 22

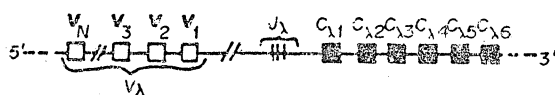


FIGURA 2. Representação esquemática da localização cromossômica das seqüências gênicas das cadeias leves e pesadas da imunoglobulina. (Adaptado de CALVERT⁴³).

V=variável; C=constante; J=junção;
D=diversidade.

se não resultar rearranjo produtivo, ocorre na família gênica lambda. Cada célula B produz somente um tipo de cadeia leve ⁴⁹.

Como existem 6 segmentos gênicos funcionais J_H , 10 a 20 segmentos D, e centenas de segmentos gênicos V_H , o número de combinações possíveis resultando em diferentes cadeias pesadas é muito grande. O potencial de diversidade de anticorpos aumenta com a combinação de uma cadeia pesada utilizando um determinado gene *germ line* V, com diferentes cadeias leves, resultando em especificidade de anticorpo diferente. O potencial de diversidade pode também ser aumentado por mutação somática na região V, mas não está claro, em que fase ou estágio da diferenciação da célula B isto ocorre ⁴⁹.

Da mesma forma que as imunoglobulinas, os linfócitos T possuem na membrana estruturas peculiares de reconhecimento imunológico que são específicos para cada clone de célula T e denominadas de receptores de célula T (RCT). Imunoprecipitados de estruturas de membrana de populações clonais de células T, demonstraram que o RCT é um heterodímero composto de duas subunidades, de 40 e 45 kilodaltons ligadas por pontes sulfídicas, denominadas alfa e beta. Os genes que codificam para essas cadeias apresentam significativa homologia com os genes que produzem as imunoglobulinas, mas são claramente distintas delas. Da mesma forma que os genes das Ig, os do RCT são organizados em segmentos descontínuos do DNA chamados V, J, C (para os da cadeia alfa) e V,D,J,C (para os da cadeia beta). Os eventos moleculares que determinam a combinação dos

segmentos V, D e J do RCT são provavelmente muito similares àqueles envolvendo os genes das imunoglobulinas. Essa premissa é baseada na verificação de que os sinais para a iniciação da recombinação encontrados adjacentes aos segmentos V, D e J do RCT são similares àqueles encontrados nos genes das imunoglobulinas. As células B e T, portanto, usam uma estratégia comum para eventos de recombinação com finalidade de estabelecer a diversidade do material genético herdado ¹⁷⁰. A similaridade da estrutura primária protéica das imunoglobulinas, receptores de células T e produtos dos genes do complexo maior de histocompatibilidade, sugere que esses genes originaram de um ancestral primordial comum ¹⁷⁰.

2.4. Fases funcionais da resposta imune ¹⁸

A resposta imune inicial básica, também chamada de fase indutiva ou aferente da resposta imune, começa com a fagocitose pelos macrófagos da partícula antigênica que foi previamente reconhecida pelas imunoglobulinas. Uma vez que os anticorpos e clones de células efetoras foram estabelecidos, a fase efetora ou eferente da resposta imune entra em ação, causando a destruição ou inativação do antígeno. A resposta imune passa então para uma fase de declínio e certas células suprimem ou modulam a resposta (Figura 3).

2.4.1. Indutiva

Após a ingestão do antígeno pelo macrófago ocorre o processamento do mesmo e expressão na superfície celular de

parte da molécula, que será reconhecida pelos linfócitos específicos. Estes estão preparados para reconhecer o antígeno estranho. Com a ligação da célula Th com o macrófago, a primeira interleucina, IL-1, é secretada pelo macrófago ativando a célula Th.

A célula T ativada secreta interleucinas que influenciam outros linfócitos a diferenciar. O fator de crescimento das células B (FCCB), secretado pela célula Th, ativa as células B a proliferarem e o fator de diferenciação de células B (FDCB) estimula a diferenciação em células plasmáticas produtoras de anticorpos, produzindo assim a resposta humoral. Adicionalmente, a célula Th secreta IL-2, que faz com que outras células Th cresçam e proliferem. Isto ativa a célula T citotóxica (Tc) a produzir clones de células idênticas. As células Tc são restringidas pelas moléculas de classe I, tanto no reconhecimento, como na fase efetora. Isto é, para a célula Tc ser efetiva, o antígeno estranho precisa ser visto em proximidade com moléculas de classe I. Células T também secretam interferon gama (INF), especialmente durante infecções virais. O interferon bloqueia viroses, ativa tanto células B como T na sua fase efetora, mantém os macrófagos no sítio de infecção e ajuda na digestão de partículas estranhas.

2.4.2. Efetora

Os efetores principais da resposta imune são as células plasmáticas produtoras de anticorpos e células Tc. Na resposta humoral, os anticorpos estão na circulação para

neutralizar vírus ou para formar complexos imunes com antígenos que serão eventualmente fagocitados e eliminados. O complemento pode também ligar-se ao complexo Ag/Ac para participar da eliminação do material estranho.

Na resposta celular, a célula T ativada vai ao sítio de infecção e combina com o antígeno, levando à eliminação de substâncias ou células. Suspeita-se, que a célula Tc reconhece o MHC de classe I e o antígeno, causa lesão na membrana da célula o que resulta em lise celular. Finalmente, células K podem eliminar células que já estão ligadas com anticorpo através da sua ligação com a porção Fc da imunoglobulina.

2.4.3. Terminal

Se a resposta imune foi efetiva, células supressoras modulam os sinais para que células Tc e B retornem ao estado de inatividade. Com o passar do tempo, os anticorpos vão desaparecendo, mas células de memória, que são um grande número de linfócitos T e B circulantes no sangue e linfonodos iniciam uma nova resposta imune no caso do antígeno aparecer novamente no organismo (resposta secundária).

2.5. Neoplasias do sistema imune

O grupo de neoplasias do sistema imune é extremamente variável e inclui as leucemias e os linfomas. Inicialmente as doenças neoplásicas do sistema imune foram classificadas com base na sua história natural, morfologia das células

envolvidas, distribuição tecidual e resposta às medidas terapêuticas. Entretanto, estas classificações são limitadas, porque não podem acomodar as descobertas importantes no campo da imunologia em geral. Com a utilização de metodologia empregada na investigação de populações linfocitárias normais, foi possível uma análise mais completa das leucemias e linfomas ^{22, 77, 81, 100, 111, 140, 166, 227, 234, 237.}

3. Classificação das LLA

Uma classificação mais completa das leucemias linfóides agudas e a confirmação de que esta é uma doença muito heterogênea foi possível utilizando a mesma metodologia empregada na identificação dos componentes do sistema linfóide normal ^{77, 231.} O desenvolvimento da tecnologia dos hibridomas, que resultou na produção de diferentes anticorpos monoclonais, e da genética molecular, que possibilitou a identificação de diferenças ao nível do DNA celular, permitiu o desenvolvimento de um modelo teórico de diferenciação dos linfócitos, no qual as células do tecido linfóide expressam de uma forma ordenada e sequencial uma série de estruturas de membrana que podem ser reconhecidas por esses anticorpos monoclonais ^{59, 235.}

Aplicando esta tecnologia ao estudo das leucemias, observou-se que para, praticamente, cada estágio de diferenciação de linfócitos normais existe um correspondente leucêmico. A identificação desses grupos diferentes de

leucemia possui uma importância mais do que acadêmica devido à associação que existe entre o prognóstico e grupos particulares de leucemias.

Um dos mais importantes avanços na classificação das leucemias linfóides agudas foi a caracterização de que a maioria das leucemias que não puderam ser classificadas como T ou B eram oriundas de linfócitos B imaturos ¹⁰⁴. Isto foi possível pelo estudo do DNA das células leucêmicas não-T/não-B, que evidenciou rearranjo do DNA idêntico àquele dos linfócitos B ^{41,100}. Além disso, a obtenção de anticorpos monoclonais que reagem especificamente com células da linhagem B corroborou a informação de que a natureza celular desse grupo de leucemias não-T/não-B pode ser atribuído a precursores dos linfócitos B.

3.1. LLA não-T (precursores de células B, Pré-B, Comum e B).

A figura 4 mostra de modo esquemático a distribuição dos diferentes antígenos presentes nos linfócitos B. Além destes, está também caracterizada a sequência de rearranjo do DNA até a produção da imunoglobulina completa ¹⁰⁰.

Muitos desses antígenos são detectados por anticorpos monoclonais (AcMo), embora a imunoglobulina de superfície e citoplasma sejam demonstradas por anti-soros heterólogos.

Quando aplicados ao estudo das leucemias não-T, o padrão de reatividade com os diferentes reagentes monoclonais permite

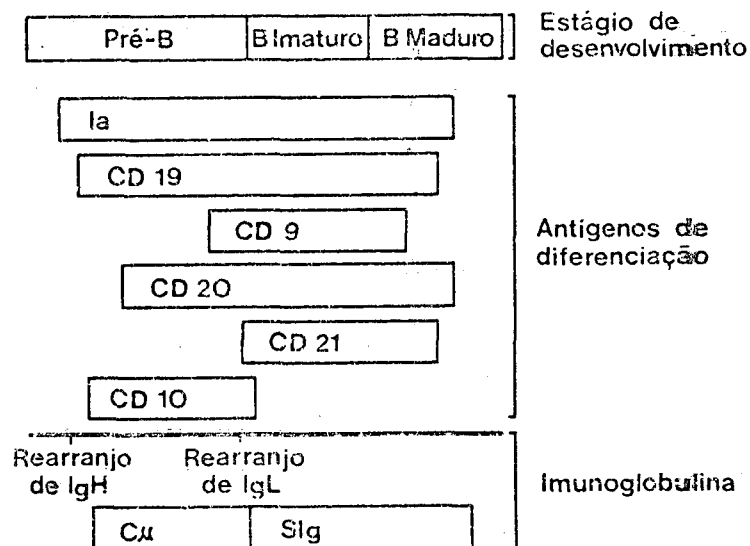


FIGURA 4. Representação esquemática da diferenciação do linfócito B normal mostrando a associação entre a expressão de antígenos de diferenciação, rearranjos da cadeia pesada (IgH) e leve (IgL) da imunoglobulina e a expressão da imunoglobulina intracitoplasmática (C μ) e de superfície (SIg).
 (Adaptado de Weinberg²⁵⁸).
 CD= Designação de grupo; Ia= HLA-DR.

a classificação desse grupo de leucemias. O quadro 3 apresenta uma classificação adaptada de Foon e cols.⁷⁶ para as LLA não-T. As leucemias classificadas como grupo I expressam apenas antígenos codificados pelos genes da resposta imune (Ia) e detectados por anticorpos anti-HLA-DR. Esse tipo de leucemia inicialmente foi considerada indiferenciada, porém com a técnica que demonstra o rearranjo de DNA para a produção de imunoglobulinas, muitos desses casos puderam ser classificados como de origem B^{61,100}. O prognóstico desse tipo de leucemia ainda não está completamente definido mas aparentemente está associado a uma menor sobrevida^{88,76}.

O grupo II inclui aqueles casos em que, além da presença do antígeno DR, também está presente o antígeno reconhecido pelo anticorpo monoclonal B4 (CD19), que é provavelmente o anticorpo monoclonal mais sensível e específico para as células da linhagem B. A importância prognóstica da presença desse antígeno em associação com o HLA-DR ainda não está bem definida.

Os grupos III e IV diferem apenas pela reatividade, no último, com o anticorpo monoclonal B1 (CD20) além do CALLA (CD10). Esses dois grupos contêm usualmente pacientes com manifestações clínicas e biológicas associadas à melhor resposta terapêutica e têm sido chamados de leucemia comum da infância.

A característica do grupo V é a presença da cadeia pesada da imunoglobulina M (IgM) no citoplasma. Esse achado tem sido

associado com a translocação $t(1;19)$ que, acredita-se, lhe confere pior prognóstico ²⁰.

Finalmente, o grupo VI inclui aquelas leucemias com células neoplásicas que expressam imunoglobulina na membrana citoplasmática e apresentam consistentemente translocações envolvendo os genes das cadeias pesadas e leves das imunoglobulinas como: $t(8;14)$, $t(2;14)$ e $t(14;22)$ ^{140, 147}. Clinicamente, esses pacientes apresentam com freqüência massa abdominal e tendência à disseminação precoce para o sistema nervoso central e órgãos extralinfáticos. O prognóstico desse grupo de pacientes, principalmente para aqueles com doença envolvendo o SNC é muito ruim ²⁰.

3.2. LLA T

Da mesma forma que as leucemias com marcadores de células B, as leucemias de células T são heterogêneas. Elas representam 15 a 25% dos casos de LLA. Foram originariamente identificadas pela presença de receptores para eritrócitos de carneiro (ER). O marcador mais sensível para os linfócitos T é provavelmente o antígeno pan-T identificado como Leu-9 ou CD7. Este antígeno está presente na maioria dos timócitos e células T, mas não em células B ou em leucemias ou linfomas não-T/não-B ²⁰. O antígeno identificado pelo AcMo Leu-1 ou CD5 também é expresso pela maioria das células T, porém não está presente nas células T mais imaturas.

QUADRO 3
CLASSIFICAÇÃO DAS LLA NÃO-T 76

GRUPO	REAGENTES					
	DR(Ia)	CD19(B4)	CD10(CALLA)	CD20(B1)	IgC	IgS
I	+	-	-	-	-	-
II	+	+	-	-	-	-
III	+	+	+	-	-	-
IV	+	+	+	+	-	-
V	+	+	+	+	+	-
VI	+	+	+/-	+	-	+

CD = *cluster designation* ; DR = HLA-DR ;

IgC = Imunoglobulina intracitoplasmática;

IgS = Imunoglobulina de superfície;

CALLA = Antígeno associado à LLA Comum.

Vários autores ~~74,207,200,200~~ têm proposto uma subclassificação da LLA-T de acordo com o nível de diferenciação intratímica. Os timócitos mais primitivos (pré-T), referidos como grupo I, reagem com os anticorpos monoclonais T9 e T10 (CD38) e representam cerca de 10% das células tímicas. No próximo nível da diferenciação tímica as células perdem T9, retêm T10 (CD38) e adquirem os antígenos CD1 (T6, leu-6), CD4 (T4, leu-3) e CD8 (T8, leu-2). Este tipo inclui a maioria dos timócitos e é referido como grupo II ou comum. Aproximadamente 20% das LLA-T expressam este fenótipo. No grupo III, mais maduro, os timócitos não expressam mais o CD1 (T6, leu-6) e expressam CD4 (T4, leu-3) e CD8 (T8, T5, leu-2) de forma semelhante aos linfócitos T circulantes. O marcador comum para todos os subgrupos é o Leu-9 ou CD7, mas quase todas as células também expressam T11/Leu-5 ou CD2, que é o receptor para eritrócito de carneiro. Um marcador frequentemente presente é o Leu-1 ou CD5.

No quadro 4 são resumidos estes dados e é proposto um esquema de classificação das LLA-T. Na figura 5 encontra-se a representação esquemática da diferenciação normal do linfócito T mostrando a associação do estágio de desenvolvimento da célula T, expressão do antígeno de superfície e rearranjo e expressão do receptor de célula T (TCR).

A classificação das leucemias linfoblásticas agudas passou por alterações de nomenclatura conforme se foi conhecendo melhor a superfície de membrana da célula leucêmica. Desta forma em 1975 a LLA era classificada em Não-

T/Não-B (85%), T (10%) e B (menos que 5%). Já em 1980 a LLA era subdividida em LLA Comum (70%), Não-T/Não-B (15%), T (10%) e B (menos que 5%). Em 1985, quando já se dispunha da determinação de IgC e anticorpos monoclonais para células de linhagem T e B, a LLA foi separada em LLA de células pré-pré-B (65%), LLA de células pré-B (18%), LLA de células T (15%) e LLA de células B (4%) ~~em. 70. 00.~~

A figura 6 é a representação esquemática da diferenciação linfóide normal associada com as leucemias de linhagem celular T e B.

QUADRO 4
CLASSIFICAÇÃO DAS LLA T 74

GRUPO	REAGENTES						
	CD7* (L9)	CD5 (L1,T1)	CD2 (L5,T11)	CD3 (L4,T3)	CD4 (L3,T4)	CD8 (L2,T8)	CD1 (L6,T6)
I	+	+(90%)	+(75%)	-	-	-	-
II	+	+	+	+(25%)	+(90%)	+(90%)	+
III	+	+	+	+	+/-**	+/-**	-

* = observado em todas as células T normais;

** = não há expressão simultânea de T4 e T8 como no grupo II

L = anti-Leu

T = OKT

CD = *cluster designation*

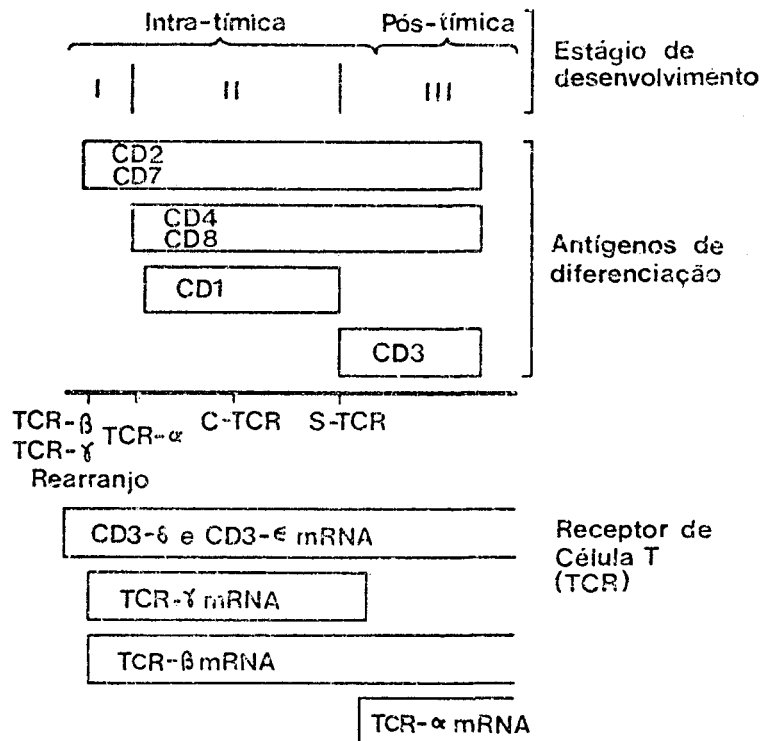
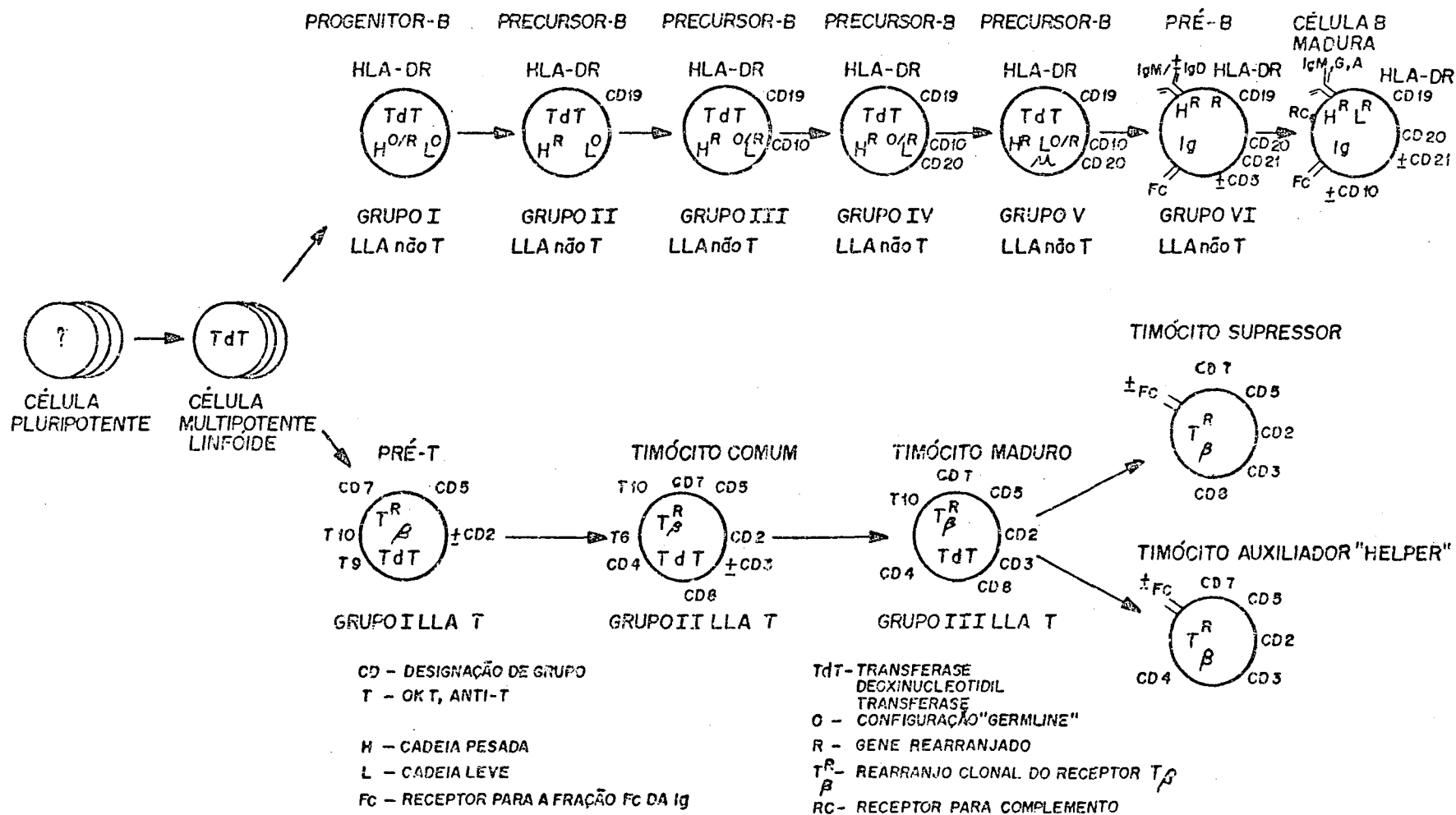


FIGURA 5. Representação esquemática da diferenciação do linfócito T normal mostrando a associação entre o estágio de desenvolvimento, expressão de antígenos de diferenciação e rearranjo e expressão do receptor de célula T (TCR). (Adaptado de Weinberg²⁵⁸).
 CD= designação de grupo; TCR= receptor de célula T.

FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DIFERENCIAÇÃO LINFÓIDE HUMANA E LEUCEMIAS DA LINHAGEM B e T



OBJETIVOS

OBJETIVOS

Determinar a frequência das leucemias linfóides agudas (LLA) do tipo T e na faixa etária de 0 a 20 anos com utilização de anticorpos monoclonais específicos.

Comparar a frequência dos subtipos determinados com esta metodologia com os resultados obtidos em trabalho anteriormente realizado em nosso meio utilizando anti-soros heterólogos.

Determinar o número mínimo de testes necessários para a identificação de subgrupos de leucemias conhecidamente associados com características clínicas e biológicas e com o prognóstico.

CASUÍSTICA

CASUÍSTICA

1. População de referência

A população de referência consistiu de pacientes com diagnóstico de LLA, com idade igual ou inferior a 21 anos.

2. População de estudo

Este grupo foi formado por 63 pacientes de ambos os sexos, com idade variando de 9 meses a 20 anos e 11 meses, com diagnóstico clínico e laboratorial de LLA, examinados no período de Março de 1987 a Março de 1988.

2.1. Fonte

Instituições da cidade de Curitiba que recebem este tipo de pacientes para tratamento: Hospital de Clínicas da UFP, Hospital de Crianças Cesar Fernetta, Hospital Infantil Pequeno Príncipe, Hospital Nossa Senhora das Graças e Hospital Erasto Gaertner.

2.2. Critério de diagnóstico.

Presença de mais de 25% de células leucêmicas no aspirado de medula óssea.

2.3. Critério de exclusão dos pacientes.

Positividade das células leucêmicas à reação citoquímica da mieloperoxidase e medicação citostática prévia.

2.4. Critérios de definição dos subgrupos de LLA.

2.4.1. LLA T

Chamou-se leucemia linfoblástica aguda de células T, quando 20% ou mais das células leucêmicas de aspirado de medula óssea expressavam receptor para eritrócito de carneiro (ER) a 4°C e 37°C e/ou, quando mais de 20% das células apresentavam imunofluorescência com pelo menos um dos anticorpos monoclonais específicos para a célula T. Foram excluídos deste grupo os casos que apresentavam concomitantemente um dos marcadores celulares de célula B, com exceção do HLA-DR.

2.4.2. LLA não-T

Chamou-se leucemia linfoblástica aguda não-T, quando as células leucêmicas de aspirado de medula óssea expressavam

antígenos de linhagem celular B ou quando não expressavam qualquer antígeno pelos métodos utilizados.

2.4.2.1. LLA B

Denominou-se leucemia linfoblástica aguda de células B, quando 20% ou mais das células leucêmicas de aspirado de medula óssea expressavam imunoglobulina de superfície (IgS).

2.4.2.2. LLA Comum

Denominou-se LLA Comum, quando 20% ou mais das células expressavam o antígeno associado à leucemia linfoblástica aguda comum (CALLA), sem expressar IgS mas podendo expressar outros antígenos de linhagem celular B.

2.4.2.3. LLA Pré-Pré-B

Denominou-se leucemia linfoblástica aguda Pré-Pré-B, quando mais de 20% das células apresentavam imunofluorescência com o anticorpo monoclonal CD19 (B4), sendo estas células negativas para ER, IgS, e para os outros anticorpos monoclonais estudados, com exceção do HLA-DR.

2.4.2.4. LLA Indiferenciada

Denominou-se LLA Indiferenciada, aquela na qual as células leucêmicas não apresentavam reação com nenhum dos testes ou anticorpos monoclonais utilizados, ou quando as células reagiam somente com o anticorpo monoclonal HLA-DR.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

1. 1. Equipamentos.

- Agitador magnético Mixtron, Toptronix, Ind. Brasileira.
- Agulhas descartáveis.
- Agulhas de metal para punção-aspirado de medula óssea.
- Balança Selecta Semi Mikro 100g, Sartorius Werke, Germany.
- Banho-Maria, Soc.Fabbe Ltda., Mod.169, SP., Brasil.
- Câmara de Neubauer.
- Câmara de Suta.
- Centrífuga Excelsa 2, Modelo 205 N, Fanen Ltda., Ind.Bras.
- Centrífuga Internacional tam. 2, Mod.V, International Equipment Co., Boston, Mass., USA.
- Contador automático de células sanguíneas, Coulter Counter Mod.S.Sr., Coulter Electronics, Inc.Florida, USA.
- Discos de papel de filtro quantitativo 11 cm, Hellma Sulamericana Ltda., SP., Brasil.
- Freezer -80°C Indrel Mod. IULT 200, Brasil.
- Freezer -20°C Prosdócimo, Ind.Brasileira.
- Geladeira (-2a-8°C) Prosdócimo, Ind.Brasileira.
- Lâminas de microscópio e lamínulas.
- Microscópio óptico Olympus CBA-K, Tokio, Japão.

- Microscópio de Imunofluorescência Olympus CBA, Tokio.
- Pipetas de vidro de 1 a 10 ml.
- Pipetas Pasteur, Fischer Scientific Co., Pittsburg, USA.
- Pipetadores automáticos com ponteiras descartáveis de 20, 25, 100 microlitros, Eppendorf 3130 (Germany), Gilson P200 (France).
- Placas de microtitulação de polivinil com 96 escavações e fundo em V (Costar).
- Placas de Terasaki-Microtest 3.034, Falcon, Div. Becton Dickinson, Oxnard, Ca., USA.
- Selos auto-adesivos de acetato para placas (*plate sealer*), Linbro/Titertek, Flow Laboratories, Inc., Virginia, USA.
- Seringas de precisão Hamilton de 1 e 5 microlitros, Hamilton Co., Reno, Nevada, USA.
- Seringas plásticas descartáveis de 5 e 10 ml, Plastipak BD
- Suportes de poliestireno para placas de microtitulação.
- Tubos cônicos de plástico graduados com capacidade de 50ml Falcon 2070, Becton Dickinson, Ca, USA.
- Tubos cônicos graduados de 15 ml, Corning, NY.
- Tubos de hemólise de vidro de 50x10mm.

1. 2. Reagentes e soluções.

- Acetona 100%
- Ácido acético glacial 95%
- Albumina bovina, Sigma Chemical Co., St.Louis, USA.
- Azida sódica 1% , Fischer Scientific Company.

- Azul de Tripán 1% (Trypan blue), K&K Laboratories, Inc., Plasmaview, NY, USA. Solução corante na proporção de 3:10 com EDTA sódico a 2% em soro fisiológico.
- Cloreto de sódio a 0,85 g%.
- Corante de May-Grünwald-Giemsa.
- Corante Azul de Metileno a 0,33 g% em PBS.
- Eritrócitos de carneiro em meio Aisilver.
- Etanol absoluto, Merck SA., Ind. Químicas, RJ, Brasil.
- Glicerina tamponada (60% glicerol em PBS + 0,1% azida sódica).
- Heparina, Liquevine Roche - 5000 UI de heparina/ml.
- Histopaque 1077 (*Lymphocyte separation medium*), Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA.

- Meios:

HANKS

RPMI Medium 1.640, Grand Island Biological Co., NY, USA.

PBS: Fosfato salino tamponado pH 7,2

Fosfato dissódico (Na_2HPO_4) 1,096 g

Fosfato monossódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,315 g

NaCl 8,500 g

Água destilada qsp. 1000 ml

SM (*Staining media*): HANKS ou PBS 100 ml

Azida sódica 1% 1 ml

Albumina bovina 0,1% 0,100 g

- Soros:

Soro AB inativado por 30 minutos a 56°C, obtido de doadores masculinos não transfundidos, junto ao Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da UFP, distribuído em alíquotas de 3ml e preservado a -20°C.

Soro AB adsorvido com eritrócitos de carneiro: Soro AB de indivíduos adultos normais adsorvido com eritrócitos de carneiro na proporção de 2 volumes de eritrócitos para um volume de soro previamente inativado. Esta mistura foi mantida 2 horas em banho-maria e 2 horas a 4°C, sendo então centrifugada e separado o soro adsorvido, que foi distribuído em alíquotas de 0,1 ml e estocado a -20°C.

Soro de coelho como fonte de complemento: adsorvido com células leucêmicas na hora do uso (para retirar a provável reatividade inespecífica do soro de coelho com as células leucêmicas).

Pool de soro humano fresco, de no mínimo 3 a 5 doadores.

- Tris cloreto de amônio - Tampão Tris com pH 7,2-7,4 em 9 volumes de cloreto de amônio, armazenado a 4°C.

- Conjugados de Imunofluorescência:

<u>Anticorpo</u>	<u>Procedência</u>
FITC* .Goat anti-mouse IgG&IgM	TAGO, Inc., Burlingame, CA Cod.6253 Lote 533101
FITC .Goat anti-human IgM mu chain	Cedido pelo Dr. Joseph Mirro**
FITC .Goat anti-human F(ab') ₂	Southern Biotechnology Associates, Inc.

* FITC -"fluorescein isothiocyanate"

** St.Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee.

- Anticorpos monoclonais utilizados nas placas de microtitulação para imunofluorescência indireta:

<u>Anticorpo Monoclonal</u>	<u>Procedência</u>
CD* 1 (T6A)	Coulter Clone
CD 2 (Leu 5b, T11)	Becton Dickinson
CD 3 (Leu 4, T3)	Becton Dickinson
CD 4 (Leu 3a, T4)	Coulter Clone
CD 5 (Leu 1)	Cedido pelo Dr.J.Mirro
CD 7 (T3-3A1)	Cedido pelo Dr.J.Mirro
CD 8 (Leu 2a, T8)	Coulter Clone
CD 10 (J5, CALLA)	Coulter Clone
CD 19 (B4)	Coulter Clone
HLA-DR (Ia)	Cedido pelo Dr.J.Mirro
UPC-10 (controle negativo)	Cedido pelo Dr.J.Mirro

*CD - "Cluster designation"

- Anticorpos monoclonais utilizados nas placas de Terasaki para o teste de microlinfocitotoxicidade:

<u>Anticorpo Monoclonal</u>	<u>Procedência</u>
Anti-HLA-DR : Du-ALL-1 (D8)	Duke University
Anti-T : Du-SKW3-1(16B2) (Pan-T = CD 5)	Duke University
Anti-B : 1.18.15 1xNaNg	Duke University

2. Métodos.

2.1. Colheita do material.

O material para os estudos morfológicos, citoquímicos e de marcadores de superfície foi obtido por punção aspirativa de medula óssea, sendo que, para os estudos imunofenotípicos foi colhido em seringa heparinizada.

Como controle positivo dos anticorpos monoclonais e para a titulação dos conjugados anti-IgM, foram utilizados linfócitos de sangue periférico de indivíduos adultos normais e de pacientes com leucemia linfocítica crônica.

2.2. Obtenção das células leucêmicas e ajuste da concentração ¹⁴.

O material obtido por punção de medula óssea em quantidades que variaram de 1 a 5 ml foi diluído em Hanks ou SM (*staining media*) até um volume de 24 ml em tubo cônico de plástico com capacidade de 50 ml. Após homogeneização, esta solução foi passada para dois tubos cônicos com capacidade de 15 ml, contendo 3 ml de Histopaque. Estes tubos foram centrifugados por 30 minutos a 1800 rpm. Com a centrifugação ocorre a formação de um anel de células mononucleares por gradiente de densidade ¹⁵. Os anéis de células mononucleares foram separados em tubo de hemólise e lavados 2 vezes com SM por 10 minutos a 1500 rpm. A concentração das células foi, então, ajustada com SM para $2 \cdot 10^4$ células/ml e $2 \cdot 10^7$ células/ml em 2 tubos de hemólise separados. A suspensão de células na concentração de $2 \cdot 10^4$ cél./ml foi utilizada para as técnicas de ER, IgS, IgC e microlinfocitotoxicidade, descritas a seguir. A suspensão de células na concentração de $2 \cdot 10^7$ cél./ml foi diluída em igual volume com uma solução a 40% de soro AB, resultando uma concentração final de $1 \cdot 10^7$ cél./ml com 20% de soro AB.

2.3. Preparo das placas de microtitulação e de Terasaki.

As placas de microtitulação de polivinil com 96 escavações foram lavadas com SM sendo, em seguida, acrescentado 25 microlitros de cada um dos reagentes em

escavações previamente definidas. Estas placas foram recobertas com selos auto-adesivos e estocadas a -70°C até o uso.

As placas de Terasaki são preparadas previamente com os anticorpos monoclonais relacionados anteriormente para o teste de microlinfocitotoxicidade colocados em escavações predeterminadas em sextuplicata e então estocadas a -70°C .

2.4. Titulação dos anti-soros anti-IgM conjugados com fluoresceína (utilizados nas técnicas de determinação de IgS e IgC).

Foi colhido sangue periférico de 3 doadores voluntários adultos e realizada a separação das células mononucleares por gradiente de densidade em Histopaque. O anel de células separado foi lavado 3 vezes por 10 minutos a 1500 rpm. As células foram ajustadas na concentração de 2.10^6 cél./ml e procedeu-se às técnicas para IgS e IgC nas seguintes diluições: 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 e 1:200. Foi considerada para uso a diluição em que houve melhor fluorescência.

2.5. Técnica de imunofluorescência indireta em placas de microtitulação ^{13, 14}

Retira-se do freezer a -70°C a placa contendo os anticorpos monoclonais, permitindo o descongelamento na temperatura de geladeira (4°C). A suspensão de células na concentração previamente ajustada de 1.10^7 cél./ml (em 20% de

soro AB) é incubada por 30 minutos à temperatura de 4°C. Após este tempo as células são lavadas duas vezes com SM por 10 minutos a 1500 rpm e ressuspendidas em SM na concentração de 1.10^7 cél/ml. Acrescenta-se, então, 25 microlitros da suspensão de células ($2,5.10^6$ células) em cada escavação da placa de microtitulação, que contém os anticorpos monoclonais, e incuba-se esta placa em câmara úmida por 30 minutos a 4°C. Decorrido este tempo, cada escavação da placa com a mistura é acrescida de 100 microlitros de SM gelado e a placa é centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm com auxílio de suporte de poliestireno, repetindo-se esta etapa de lavagem por 3 vezes. Após isto, acrescenta-se a cada escavação 25 microlitros de conjugado fluoresceinado (FITC, *Goat anti-mouse*), que é um anticorpo secundário anti-IgM e IgG previamente diluído e titulado. Incuba-se novamente em câmara úmida a 4°C por mais 45 minutos e, em seguida, lava-se as escavações 3 vezes com SM como mencionado anteriormente. Após a última lavagem acrescenta-se 10 microlitros de glicerina tamponada (60% de glicerol em PBS e 0,1% de Azida sódica) em cada escavação, ressuspende-se as células e transfere-se o conteúdo para uma lâmina de microscópio, que é recoberta com lamínula e vedada.

Procede-se, então, à avaliação da positividade de células em microscópio de imunofluorescência. Linfócitos positivos têm um anel fluorescente na sua superfície ou mostram um pontilhado brilhante na membrana da célula. A avaliação da positividade das células é obtida contando 100 a 200 células. O número de células obtidas é expresso como porcentagem do

número total de células da preparação. Considerou-se o teste positivo quando mais de 20% das células apresentavam imunofluorescência na membrana celular.

2.6. Técnica de microlinfocitotoxicidade - Técnica de Terasaki & McClelland ²³ modificada.

Utilizando-se seringa de Hamilton, 1 microlitro da suspensão de linfócitos ou células leucêmicas na concentração ajustada de $2 \cdot 10^6$ cél/ml, é adicionada às escavações da placa de Terasaki previamente preparada com os anti-soros anti-B, anti-T e anti-HLA-DR, estocada e descongelada antes do uso. A placa é agitada para homogeneização e, a seguir, a mistura é incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, adiciona-se 5 microlitros de SM em cada escavação, deixando em repouso por 10 minutos. Após este tempo, o meio SM é desprezado por flicagem e adiciona-se 5 microlitros de complemento de coelho previamente adsorvido com células leucêmicas do paciente, sendo a mistura incubada por mais 40 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo o sobrenadante é desprezado e acrescenta-se uma gota da solução corante de Azul Tripán em cada escavação da placa, que é deixada em repouso por 10 minutos. O excesso da solução corante é desprezado e acrescenta-se uma gota de SM em cada escavação, deixando em repouso por mais 10 minutos para sedimentação das células antes da leitura das reações. A placa é lida em microscópio óptico e a reação é considerada positiva quando as células lisarem e incorporaram em seu citoplasma o corante, evidenciando coloração azulada.

Todas as reações são feitas em sextuplicatas e é estabelecida a média aritmética dos escores baseado nas porcentagens de lise celular. Desse modo, é atribuído escore 6 quando mais de 81% das células são lisadas; escore 5 quando a lise atinge entre 61 e 80%; escore 4 quando é de 41 a 50%; escore 3 quando é de 21 a 40%; escore 2 quando é de 11 a 20% e escore 1, quando a lise celular atinge menos do que 10% das células. Considera-se reação positiva quando a lise celular é superior a 40% ~~mes, mes~~.

A toxicidade do complemento de coelho e do meio (SM) é controlada ou testada incubando-se células leucêmicas apenas com o complemento e o meio.

2.7. Formação de rosetas espontâneas com eritrócitos de carneiro (ER) - Técnica de Mendes e cols. ^{1961, 1962} modificada.

Meio mililitro de uma suspensão de eritrócitos de carneiro (estocados não mais do que uma semana em solução Alsever a 4°C), é lavado 2 vezes em tubo de hemólise com solução salina a 0,85 g% e uma terceira vez com SM. Prepara-se uma suspensão de eritrócitos a 0,5% em SM antes do uso. Um décimo de ml desta suspensão é centrifugada por 3 minutos a 1000 rpm e descartado o sobrenadante. Sobre o botão de eritrócitos é acrescido 0,1 ml de soro AB previamente adsorvido com eritrócitos de carneiro e 0,1 ml da suspensão de células ajustada na concentração de 2.10^6 cél/ml.

São preparados 2 tubos de hemólise de forma idêntica. Um deles é incubado a 37°C em banho-maria por 30 minutos, em seguida centrifugado a 800 rpm por 3 minutos e incubado a 4°C, no mínimo por 1 hora. O outro tubo é incubado a 37°C por 5 minutos, centrifugado a 800 rpm por 3 minutos para formar um botão de células no fundo do tubo, e então, deixado incubando a 37°C em banho-maria, por pelo menos mais 1 hora.

Para se fazer a contagem das rosáceas, ressuspende-se o botão de células suavemente com pipeta de Pasteur em uma gota de azul de metileno a 0,33 g% em FBS. As células são contadas em câmara de Neubauer, 100 células de cada tubo, para verificar a porcentagem de rosáceas presentes. Define-se rosácea a todo linfócito com 3 ou mais eritrócitos de carneiro aderidos. Os blastos com receptor para eritrócitos de carneiro, ao contrário dos linfócitos T normais, formam rosáceas estáveis a 37°C ^{21,223}.

2.8. Determinação das células com imunoglobulina de superfície (IgS) pela reação de anti-soros anti-imunoglobulinas humanas conjugadas com fluoresceína - Técnica de Gajl-Peczalska ²³ modificada.

Lava-se 0,2 ml da suspensão de células com concentração ajustada em $2 \cdot 10^6$ cél./ml com SM, centrifugando por 10 minutos a 1500 rpm. Despreza-se o sobrenadante, acrescenta-se 50 microlitros do anticorpo fluoresceinado previamente titulado e aliquotado, e incuba-se a 4°C por 45 minutos. Decorrido este

tempo, lavam-se as células com SM ou PBS acrescido de 0,4% de albumina bovina e 0,02% de azida sódica centrifugando 3 vezes por 10 minutos a 1500 rpm. Após desprezar o sobrenadante monta-se uma lâmina de microscópio colocando-se o sedimento e cobrindo com lamínula.

A leitura é feita em microscópio de imunofluorescência com objetiva de imersão. Contam-se 200 células e verifica-se a porcentagem de linfócitos com fluorescência. Considerou-se positivo o teste que mostrou mais de 20% de células com fluorescência na membrana.

2.9. Determinação das células com imunoglobulina intracitoplasmática (IgC) - Técnica de Pearl e cols.¹⁰⁰ modificada.

Em tubo de hemólise é colocado 0,3 ml da suspensão de células na concentração de $2 \cdot 10^6$ cél./ml e 0,3 ml de uma solução de albumina bovina a 4,5 g% em PBS (preparo diário). Transfere-se a mistura para uma câmara de Suta, previamente montada com lâmina e papel de filtro, para se obter o sedimento celular. Quando o sedimento está bem seco, ele é fixado por 15 minutos com etanol 95% + ácido acético glacial 5% ou acetona e, em seguida, lavado com PBS. Deixa-se secar o sedimento fixado e distribui-se sobre ele 50 microlitros do anticorpo fluoresceinado. A lâmina assim preparada é, então, incubada por 30 minutos em câmara úmida a 4°C. Decorrido este tempo o sedimento é lavado 3 vezes com PBS gelado durante 10 minutos sob agitação constante. Após secar o excesso de PBS em

torno do círculo formado pelo sedimento na lâmina, coloca-se uma gota de glicerina tamponada e cobre-se com lamínula.

A leitura é realizada em microscópio de imunofluorescência de forma semelhante a usada para IgG. Considera-se o teste positivo quando mais de 10% das células mostram imunofluorescência ^{108, 109}.

2.10. Citoquímica.

2.10.1. Reação do PAS ^{108, 109}.

Consiste na demonstração da presença de glicogênio na célula leucêmica. Considerou-se PAS fracamente positiva (+), quando menos que 20% das células leucêmicas apresentavam grânulos ou blocos avermelhados no citoplasma; moderadamente positiva (++), quando esta porcentagem estava entre 20 e 50%; e fortemente positiva (+++), quando a porcentagem era superior a 50%.

2.10.2. Reação da Peroxidase ^{108, 109}.

Consiste na demonstração da atividade das enzimas peroxidases da célula leucêmica. Considerou-se reação da mieloperoxidase positiva quando mais do que 5% das células leucêmicas apresentaram granulações marrom-esverdeadas.

2.11. Morfologia celular.

A caracterização morfológica das células foi realizada de acordo com as determinações do grupo colaborativo Francês-Americano-Britânico (FAB), que divide os linfoblastos em 3 tipos: L1, L2 e L3 ^{17, 20, 40, 51, 67, 100, 140, 144, 210, 245}.

Para a diferenciação entre leucemia com blastos L1 ou L2 foram utilizados os critérios do grupo FAB, através de um sistema de escores ¹⁴⁹:

Característica morfológica	Escore*
Relação núcleo-citoplasmática alta** em mais de 75% das células.	+1
Relação núcleo-citoplasmática baixa em mais de 25% das células.	-1
Nucléolos ausentes em mais de 75% das células.	+1
Nucléolos presentes em mais de 25% das células.	-1
Membrana nuclear irregular em menos de 25% das células.	0
Membrana nuclear irregular em mais de 25% das células.	-1
Células grandes*** em quantidade menor que 50%	0
Células grandes em quantidade maior que 50%	-1

* Totais possíveis: +2 a -4

L1= 0, +1, +2

L2= -1, -2, -3, -4

** Relação núcleo-citoplasmática alta: quando o citoplasma ocupa menos que 20% da área da célula.

*** Célula grande: célula com tamanho maior que 2 vezes o diâmetro do linfócito pequeno.

2.12. Outros exames complementares.

2.12.1. Contagem de células sanguíneas.

O sangue periférico dos pacientes foi coletado em vidros de 5 ml contendo EDTA potássico para a rotina de valores hematimétricos. A contagem de células sanguíneas e a determinação da hemoglobina foram realizadas com o Coulter Counter modelo S.Sr. A contagem diferencial das células do aspirado de medula óssea e do sangue periférico foi realizada em lâminas coradas pelo May-Grünwald-Giemsa.

2.12.2. Líquido céfalo-raquidiano (LCR).

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

2.12.3. Raio X de tórax e esqueleto.

O Rx de tórax foi realizado em todos os pacientes, porém o RX de esqueleto somente foi realizado quando havia manifestação óssea importante.

2.13. Manifestações clínicas.

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

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

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

Considerou-se comprometimento de SNC ao diagnóstico, quando havia mais de 5 células por mm^3 com características de imaturidade no LCR.

2.14. Tratamento estatístico.

Para testar a diferença entre as médias dos grupos de LLA foi utilizada a análise da variância (ANOVA) ou teste de hipótese F. Para variáveis dicotômicas foi utilizado o teste Qui-quadrado (χ^2) com correção de continuidade. Quando indicado, aplicou-se o teste exato de Fisher. Alguns parâmetros clínicos e laboratoriais foram submetidos ao cálculo da média aritmética, desvio-padrão da média e mediana. Foi considerado como estatisticamente significativo o limite de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Caracterização dos casos de LLA estudados

Os anexos 1 a 5 descrevem as características clínicas e biológicas dos pacientes estudados neste trabalho.

Foram estudados 63 pacientes com LLA, sendo 34 (54%) pertencentes ao sexo masculino e 29 (46%) ao sexo feminino. A idade dos pacientes variou de 9 meses a 20 anos e 11 meses, com uma idade média de 7 anos. Com relação à cor de pele, observou-se 56 casos de pacientes de cor branca (89%) e 7 de cor negra ou parda (11%).

Tamanho de linfonodos menor que 2 cm foi observado em 43 pacientes (68%) e linfonodomegalia generalizada maior que 2 cm em 20 pacientes (32%). Hepatomegalia ausente ou inferior a 5 cm do rebordo costal direito (RCD) foi observada em 38 pacientes (60%) e hepatomegalia maior que 5 cm do RCD em 25 pacientes (40%). Quanto ao tamanho do baço, observamos que, 31 pacientes (49%) apresentavam ausência de esplenomegalia ou baço menor que 5 cm do rebordo costal esquerdo (RCE) e 32 pacientes (51%) mostravam esplenomegalia maior que 5 cm do RCE. Massa mediastinal avaliada através de Raio X simples de tórax foi encontrada em 6 pacientes (10%). Envolvimento do SNC

ao diagnóstico foi observado em 3 pacientes (5%). Estes dados estão resumidos na tabela 1.

Com relação aos valores hematimétricos, características citoquímicas e morfológicas, observamos que a taxa de hemoglobina variou de 3,3 g/dl a 13 g/dl, com um valor médio de 7,55 g/dl e desvio padrão (DP) de 2,09. A contagem de leucócitos ao diagnóstico variou de 1.100 por mm^3 a 288.000 por mm^3 , com uma média de 44.550 por mm^3 , desvio padrão de 66.710 por mm^3 e mediana de 13.300 por mm^3 . A contagem de plaquetas variou de 2.000 a 390.000 por mm^3 , com uma média de 60.160 por mm^3 , desvio padrão de 89.980 e mediana de 22.000 por mm^3 . A porcentagem de blastos no sangue periférico ao diagnóstico variou de 0 a 98%, com uma média de 48,5% e desvio padrão de 33,75%. Estes dados estão resumidos na tabela 2.

As células leucêmicas da medula óssea analisadas em esfregaços corados pelo May-Grünwald-Giemsa foram agrupadas segundo a classificação FAB, tendo sido encontrados 50 casos de LLA com o tipo celular L1 (79,4%), 12 casos com o tipo celular L2 (19%) e 1 caso com L3 (1,6%). A coloração citoquímica para PAS foi intensa ou moderada em 24 casos (38,1%), fraca em 16 casos (25,4%) e ausente em 23 casos (36,5%). Estes dados também estão resumidos na tabela 2.

Para a caracterização dos marcadores imunofenotípicos, as células leucêmicas foram estudadas para ER 4°C e 37°C, IgS, IgC, microlinfocitotoxicidade com anticorpos monoclonais (AcMo) para Anti-B, Anti-T e Anti-HLA-DR, e com

TABELA 1
 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS CASOS ESTUDADOS (N = 63).

Característica clínica		n	%
Sexo (M:F=1,17:1)	masculino	34	54
	feminino	29	46
Idade V = 9m a 20a11m X = 7a1m DP = 5a2m M = 5a4m	< 2 anos	7	11
	2 - 6 anos	31	49
	6 - 10 anos	9	14
	> 10 anos	16	26
Cor	branca	56	89
	negra/parda	7	11
Linfonodos	< 2 cm	43	68
	> 2 cm	20	32
Fígado	< 5 cm RCD	38	60
	> 5 cm RCD	25	40
Baço	< 5 cm RCE	31	49
	> 5 cm RCE	32	51
Massa mediastinal	presente	6	10
	ausente	57	90
Doença em SNC	presente	3	5
	ausente	58	92
	sem informação	2	3

V= variação ; X= média ; DP= desvio padrão ; M= mediana

TABELA 2
VALORES HEMATIMÉTRICOS E CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
E CITOQUÍMICAS DAS CÉLULAS LEUCÊMICAS DOS CASOS DE LLA
ESTUDADOS (N=63).

DADOS			n	%
Hemoglobina (g/dl)	V = 3,3 a 13,0	< 6	17	27
	X = 7,55	6-10	40	63
	DP= 2,09	> 10	6	10
	M = 7,9			
Leucócitos (/mm ³)	V = 1.100-288.000	< 10.000	27	43
	X = 44.550	10- 25.000	14	22
	DP= 66.710	25-100.000	12	19
	M = 13.300	> 100.000	10	16
Plaquetas (/mm ³)	V = 2.000-390.000	< 20.000	31	49
	X = 60.160	20-100.000	20	32
	DP= 89.980	> 100.000	12	19
	M = 22.000			
Blastos (%) (sangue perif.)	V = 0-98	< 50	28	44,4
	X = 48,50	> 50	35	55,6
	DP= 33,75			
PAS (MO)		+++	14	22,2
		++	10	15,9
		+	16	25,4
		0	23	36,5
FAB (MO)		L 1	50	79,4
		L 2	12	19,0
		L 3	1	1,6

V= variação ; X= média ; DP= desvio padrão da amostra ;
M= mediana ; MO= medula óssea.

imunofluorescência indireta utilizando os AcMo: CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD19, HLA-DR (Anexo 5).

Com base nessa avaliação, os casos puderam ser classificados e separados em dois grupos principais, o maior, com 55 pacientes (87,31%) que denominamos LLA não-T, e um menor, com 8 pacientes (12,69%), que denominamos LLA T. Para os treze primeiros casos não possuíamos um CALLA (CD10) confiável, motivo pelo qual, onze destes casos (17,46%) puderam ser apenas classificados como LLA não-T e LLA T, já que os marcadores para a linhagem T tinham boa sensibilidade e especificidade. A partir do 14º caso, as LLA não-T puderam ser subdivididas de acordo com os achados imunofenotípicos em 4 subgrupos: LLA Comum, com 33 pacientes (66%); LLA B, com 1 paciente (2%); LLA Pré-Pré-B, com 4 pacientes (8%); e, LLA Indiferenciada, com 6 pacientes (12%). Estes dados estão resumidos na tabela 3.

2. Comparação dos dados clínicos das LLA não-T com LLA T.

2.1. Sexo

A tabela 4 mostra a distribuição dos casos de LLA quanto ao sexo. No grupo das LLA não-T não foi observada predominância de sexo (M:F=1:1,03). Entretanto, quando considerado o subgrupo que denominamos de LLA Indiferenciada, foi observada uma frequência discretamente maior do sexo masculino (M:F= 2:1). O grupo LLA T mostrou também um predomínio do sexo masculino em relação ao feminino (M:F=3:1).

TABELA 3
CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DOS PACIENTES COM LLA
ESTUDADOS.

GRUPOS	SUBGRUPOS	n	%(N=63)	%**(N=50)
LLA NÃO-T		55	87,31	-
	COMUM	33	52,38	66
	INDIFERENCIADA	6	9,52	12
	PRÉ-PRÉ-B	4	6,35	8
	B	1	1,60	2
	OUTROS*	11	17,46	-
LLA T		8	12,69	12
TOTAL		63	100,00	100

* Pacientes com LLA não-T cujo subgrupo não foi definido por falta de marcadores adequados.

** Porcentagens com a exclusão dos 13 primeiros casos (N=50)

TABELA 4
DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE LLA CONFORME O SEXO DENTRO DOS
SUBGRUPOS (N=63)

CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA	n	MASCULINO n(%)	FEMININO n(%)	RELAÇÃO M:F
LLA NÃO-T	55	28(50,9)	27(49,1)	1,03:1
COMUM	33	17(51,5)	16(48,5)	1,06:1
INDIFERENCIADA	6	4(66,7)	2(33,3)	2:1
PRÉ-PRÉ-B	4	0	4	0:4
B	1	0	1	0:1
OUTROS	11	7	4	1,75:1
LLA T	8	6(75,0)	2(25,0)	3:1

LLA não-T x T - $\chi^2 = 2,74$ (não significativo ao nível de 5%)

A diferença entre o grupo LLA não-T e LLA T, quanto ao sexo, não é estatisticamente significativa ($\chi^2=2,74$).

2.2. Idade

A idade dos pacientes no grupo LLA não-T (55 casos) variou de 9 meses a 20 anos e 11 meses, com uma média de 7 anos e 2 meses, sendo 7 pacientes com idade igual ou inferior a 2 anos (12,7%), 25 pacientes com idade entre 2 e 6 anos (45,5%), 9 pacientes com idade entre 6 e 10 anos (16,3%) e 14 pacientes com idade igual ou superior a 10 anos (25,5%).

A idade dos pacientes no grupo LLA T (8 casos) variou de 1 ano e 1 mês a 14 anos, com uma idade média de 6 anos e 10 meses. Quatro pacientes (50%) tinham idade entre 2 e 6 anos, 2 pacientes (25%) tinham idade entre 6 e 10 anos e 2 pacientes (25%) idade acima de 10 anos.

A análise da variância comparando a idade entre os grupos e subgrupos não evidenciou diferença estatisticamente significativa (Tabela 5).

2.3. Organomegalias

A tabela 6 mostra a frequência de organomegalias nos grupos e subgrupos. Vinte pacientes apresentavam ao diagnóstico linfonodomegalia generalizada, sendo 14 pertencentes ao grupo LLA não-T (25,5% de 55 casos) e 6 ao grupo LLA T (75% de 8 casos), portanto, existindo associação

TABELA 5
DISTRIBUIÇÃO SEGUNDO A IDADE DOS CASOS DE LLA NOS SUBGRUPOS
(N=63).

CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA	n	VARIACÃO MÉDIA DE	IDADE (anos)			
			<2	2-6	6-10	>10
LLA NÃO-T						
COMUM	33	1a4m-20a5m 7a2m 5a6m	3	15	5	10
INDIFERENCIADA	6	3a10m-20a11m 8a1m 6a6m	0	4	1	1
PRÉ-PRÉ-B	4	1a10m-9a8m 5a7m 3a7m	1	1	2	0
B	1	4a3m	0	1	0	0
OUTROS	11	9m-15a 6a1m 4a5m	3	4	1	3
SUBTOTAL	55	9m-20a11m 7a2m 5a3m	7	25	9	14
LLA T	8	1a1m-14a 6a10m 4a9m	0	4	2	2

ANOVA (49 casos)*	F	PROB.	
Comum x Indif.	0,0338	0,8570	(ns)
Comum x PPB**	0,5023	0,4907	(ns)
Indif. x PPB	0,4902	0,5109	(ns)
Comum x Indif. x PPB	0,2783	0,7585	(ns)
Comum+Indif.+PPB x T	0,1895	0,9030	(ns)

ANOVA (63 casos)	F	PROB.	
LLA NÃO-T x T	0,3114	0,8624	(ns)

* = excluídos os 13 primeiros casos e 1 caso de LLA B.

** = Pré-Pré-B

ns = estatisticamente não significativo

TABELA 6
CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA RELACIONADA COM A PRESENÇA DE
ORGANOMEGALIAS (N=63).

CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA	n	LINFONODOS >2CM	FÍGADO >5CM	BAÇO >5CM
LLA NÃO-T	55	14(25,5%)	20(36,4%)	24(43,6%)
COMUM	33	6(18,2%)	10(30,3%)	12(36,4%)
INDIFERENCIADA	6	3(50,0%)	3(50,0%)	4(66,7%)
PRÉ-PRÉ-B	4	0	0	0
B	1	0	1	1
OUTROS	11	5(45,5%)	6(54,5%)	7(63,6%)
LLA T	8	6(75,0%)	5(62,5%)	8(100,0%)
LLA NÃO-T x LLA T - χ^2 =		5,2(*)	1,1(ns)	6,8(**)

* = estatisticamente significativo ao nível de 5%

** = estatisticamente significativo ao nível de 1%

ns = não significativo.

entre linfonodomegalia generalizada e o grupo LLA T ($X^2=5,172$). Dentro do grupo LLA não-T havia 6 pacientes no subgrupo LLA Comum (18,2%) e 3 pacientes no subgrupo LLA Indiferenciada (50,0%), não havendo diferença estatisticamente significativa entre estes dois subgrupos de LLA não-T.

Vinte e cinco pacientes possuíam fígado medindo mais de 5 cm do rebordo costal direito, sendo 20 pertencentes ao grupo LLA não-T (36,4% de 55 casos) e 5 ao grupo LLA T (62,5% de 8 casos). Dentro do grupo LLA não-T, 10 pacientes pertenciam ao subgrupo Comum (30,3% de 33 casos) e 3 ao subgrupo Indiferenciado (50% de 6 casos). Hepatomegalia acentuada não esteve associada com qualquer tipo de LLA ($X^2=1,05$).

Trinta e dois pacientes possuíam baço medindo mais de 5 cm do rebordo costal esquerdo, sendo 24 pertencentes ao grupo LLA não-T. Dentro deste grupo, 12 pacientes pertenciam ao subgrupo Comum (36,4% de 33 casos) e 4 pacientes ao subgrupo Indiferenciado (66,7% de 6 casos). Todos os 8 pacientes pertencentes ao grupo LLA T tinham esplenomegalia acentuada. Houve associação entre esplenomegalia acentuada e o grupo LLA T ($X^2=6,76$) mas não houve diferença estatisticamente significativa entre o subgrupo LLA Comum e Indiferenciada.

2.4. Massa mediastinal

Seis pacientes em nossa casuística apresentaram massa mediastinal, 5 dos quais pertencentes ao grupo LLA T e 1 ao grupo LLA não-T. Dois pacientes eram ER negativos e 5 foram

classificados morfológicamente como L1. A reação citoquímica do PAS foi forte ou moderada em dois casos e fraca ou ausente nos demais. Cinco pacientes tinham idade entre 2 e 6 anos e um paciente tinha 14 anos. Esta manifestação clínica esteve relacionada, portanto, com o grupo LLA T, porém não foi possível considerar outras associações significativas quanto à morfologia celular ou idade dos pacientes. Ver tabela 7.

2.5. Doença em Sistema Nervoso Central (SNC)

Envolvimento do SNC ao diagnóstico foi observado em três pacientes, sendo dois casos no grupo LLA não-T (Nº 7 e 52) e um caso no grupo LLA T (Nº 41). Um dos pacientes do grupo LLA não-T tinha 8 anos, morfologia dos blastos L1, PAS fracamente positivo e contagem inicial de leucócitos de 150.000 por mm³ e o outro, 9 meses de idade, morfologia dos blastos L2, PAS fracamente positivo e 184.000 leucócitos por mm³ ao diagnóstico. O paciente pertencente ao grupo LLA T tinha 14 anos de idade, morfologia dos blastos L3, PAS ausente e 14.100 leucócitos por mm³ ao diagnóstico. Este último paciente apresentava também protrusão ocular, hipertrofia gengival e aumento de volume mamário (Tabela 7).

2.6. Outros

Massa abdominal foi observada em 2 pacientes (Nº 29 e 42). No primeiro caso havia massa abdominal extensa com ecografia sugerindo envolvimento de órgãos intra-abdominais e infiltração do fígado. No segundo caso não havia alteração do

TABELA 7
 CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA RELACIONADA COM PRESENÇA DE
 MASSA MEDIASTINAL, ENVOLVIMENTO DE SISTEMA NERVOSO CENTRAL
 E INFILTRAÇÃO DE OUTROS ORGÃOS E TECIDOS.

CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA	MASSA MEDIASTINAL	SNC (N=61)	OUTROS
LLA NÃO-T	1/55	2/53	3
COMUM	0/33	1/32	1/16*
INDIFERENCIADA	0/6	0/6	0
PRÉ-PRÉ-B	0/4	0/4	1 **
B	0/1	0/1	1 ***
OUTROS	1/11	1/10	0
LLA T	5/8	1/8	1****

- * Comprometimento de testículos + SNC ao diagnóstico.
 ** Massa abdominal - Infiltração de ovário D.
 *** Massa abdominal extensa infiltrando fígado.
 **** Protrusão ocular, hipertrofia gengival e aumento de volume mamário.

hemograma, mas a criança apresentava também massa abdominal pequena em hipogástrio, devida à infiltração linfóide de ovário direito, além de infiltração de medula óssea (40% de blastos). Apenas um paciente de nossa série tinha infiltração testicular ao diagnóstico (Nº 52). Este paciente pertence ao grupo LLA Comum, e chama a atenção o fato de também ter infiltração de SNC e leucócitos acima de 100.000 por mm³ (Tabela 7).

3. Relação entre os valores hematimétricos ao diagnóstico e a classificação imunofenotípica dos pacientes estudados.

3.1. Contagem leucocitária ao diagnóstico.

No grupo LLA não-T (55 casos) a contagem leucocitária ao diagnóstico variou de 1.100 a 214.000 leucócitos por mm³. Apenas 4 pacientes (7,3%) apresentaram leucócitos acima de 100.000 por mm³. No grupo LLA T (8 casos) a contagem leucocitária variou de 7.400 a 288.000 leucócitos por mm³. Apenas 2 pacientes (25%) apresentaram contagem abaixo de 25.000 e os seis restantes (75%), valores acima de 100.000 por mm³. A diferença entre os dois grupos pela análise da variância foi altamente significativa, havendo portanto associação entre contagem leucocitária acima de 100.000 por mm³ e o grupo LLA T. Dentro do grupo LLA não-T não foram observadas diferenças significativas entre os subgrupos. Estes dados estão resumidos na tabela 8.

TABELA 8
 CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA RELACIONADA COM VALORES
 HEMATIMÉTRICOS - CONTAGEM INICIAL DE LEUCÓCITOS EM SANGUE
 PERIFÉRICO (N=63).

CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA	n	VARIACÃO .10 ³ /mm ³	LEUCÓCITOS .10 ³ /mm ³		
			<25 (%)	25-100 (%)	>100 (%)
LLA NÃO-T	55	1.1 a 214.0	39 (70,9)	12 (21,8)	4 (7,3)
COMUM	33	1.1 a 214.0	24 (72,8)	7 (21,2)	2 (6,0)
INDIFERENCIADA	6	7.8 a 28.2	5 (83,3)	1 (16,7)	0
PRÉ-PRÉ-B	4	3.6 a 39.0	2	2	0
B	1	7.1	1	0	0
OUTROS	11	1.9 a 184.0	7 (63,6)	2 (18,2)	2 (18,2)
LLA T	8	7.4 a 288.0	2 (25,0)	0	6 (75,0)

ANOVA (49 casos)	F	PROB.	
Comum x Indif.	0,6017	0,4511	(ns)
Comum x PFB	0,0669	0,8001	(ns)
Indif. x PFB	1,1052	0,3239	(ns)
Comum x Indif. x PFB	0,3360	0,7166	(ns)
Comum + Indif. + PFB x T	15,8621	0,0000	(**)

ANOVA (63 casos)	F	PROB.	
LLA NÃO-T x LLA T	34,0503	0,0000	(**)

ns = não significativo

** estatisticamente significativo

3.2. Dosagem de hemoglobina

No grupo LLA não-T (55 casos) a dosagem de hemoglobina ao diagnóstico variou de 3,3 a 13,0 g/dl, com uma média de 7,5 g/dl e desvio padrão de 2,2 g/dl. Quatorze pacientes (25,5%) tinham hemoglobina abaixo de 6,0 g/dl, 34 pacientes (61,8%) tinham hemoglobina entre 6 e 10 g/dl e 7 (12,7%), hemoglobina acima de 10 g/dl. No grupo LLA T (8 casos) a variação foi de 5,5 a 9,5 g/dl, com uma média de 7,95 g/dl e desvio padrão de 1,5 g/dl. Seis pacientes (75%) tinham hemoglobina entre 6 e 10 g/dl e 2 pacientes (25%) abaixo de 6 g/dl. Chamaram atenção os pacientes dos subgrupos B e Pré-Pré-B, que, embora em pequeno número, apresentaram valores de hemoglobina mais elevados quando comparados aos subgrupos Comum e Indiferenciado e também ao grupo LLA T. Esta diferença foi estatisticamente significativa. Estes dados estão resumidos na tabela 9.

3.3. Contagem do número de plaquetas

A tabela 10 mostra a classificação imunofenotípica das LLA relacionada com a contagem de plaquetas ao diagnóstico. No grupo LLA não-T (55 casos) a contagem variou de 2.000 a 390.000 por mm^3 , com uma média de 66.000 por mm^3 . Neste grupo 25 pacientes (45,5%) apresentavam menos que 20.000 plaquetas, 18 pacientes (32,7%) entre 20 e 100.000 plaquetas e 12 (21,8%) mais que 100.000 plaquetas por mm^3 . No grupo LLA T (8 casos) o número de plaquetas variou de 2.000 a 71.000 por mm^3 , com uma média de 20.700 por mm^3 . Cinco pacientes (62,5%) tinham menos que 20.000 plaquetas ao diagnóstico e 3 pacientes (37,5%)

TABELA 9
 CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA RELACIONADA COM VALORES
 HEMATIMÉTRICOS - DOSAGEM DE HEMOGLOBINA (g/dl) AO
 DIAGNÓSTICO (N=63).

CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA	n	VARIACÃO MÉDIA DE	HEMOGLOBINA		
			<6 %	6-10 %	>10 %
LLA NÃO-T	55	3.3 a 13.0 7.5	14 (25,5)	34 (61,8)	7 (12,7)
COMUM	33	4.0 a 11.3 7.28 2.04	9 (27,3)	20 (60,6)	4 (12,1)
INDIFERENCIADA	6	6.6 a 9.4 8.02 0.89	0	6	0
PRÉ-PRÉ-B	4	8.2 a 13.0 10.48 2.08	0	2	2
B	1	10.5	0	0	1
OUTROS	11	3.3 a 10.0 6.51 2.10	5 (45,5)	6 (54,5)	0
LLA T	8	5.5 a 9.5 7.95 1.5	2 (25)	6 (75)	0

ANOVA (49 casos)	F	PROB.	
Comum x Indif.	0,0761	0,7871	(ns)
Comum x PPB	8,7006	0,0056	(**)
Indif. x PPB	5,1239	0,0534	(ns)
Comum x Indif. x PPB	4,2987	0,0204	(**)
Comum + Indif. + PPB x T	3,0181	0,0395	(**)
Comum + Indif. x T	0,1627	0,6504	(ns)

ANOVA (63 casos)	F	PROB.	
LLA NÃO-T x LLA T	0,4587	0,5030	(ns)

ns= não significativo ; ** = estatisticamente significativo.

TABELA 10
 CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍFICA RELACIONADA COM VALORES
 HEMATIMÉTRICOS - CONTAGEM INICIAL DE PLAQUETAS ($10^9/\text{mm}^3$).

CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍFICA	n	VARIACÃO MÉDIA DP	PLAQUETAS		
			<20 %	20-100 %	>100 %
LLA NÃO-T	55	2 a 390 66 95.6	25 (45,5)	18 (32,7)	12 (21,8)
COMUM	33	2 a 340 42.30 73.54	19 (57,6)	10 (30,3)	4 (12,1)
INDIFERENCIADA	6	22 a 280 127.83 100.68	0	3 (50,0)	3 (50,0)
PRÉ-PRÉ-B	4	11 a 270 170.25 118.44	1	0	3
B	1	390	0	0	1
OUTROS	11	2 a 146 35.45 42.39	5 (45,5)	5 (45,5)	1 (9,1)
LLA T	8	2 a 71 20.7 23.2	5 (62,5)	3 (37,5)	0

ANOVA (49 casos)	F	PROB.
Comum x Indif.	6,1415	0,0179 (**)
Comum x PFB	9,5008	0,0040 (**)
Indif. x PFB	0,3724	0,5650 (ns)
Comum x Indif. x PFB	6,3906	0,0039 (**)
Comum + Indif. + PFB x T	5,3435	0,0031 (**)
Comum x T	0,5060	0,4889 (ns)

ANOVA (63 casos)	F	PROB.
LLA NÃO-T x LLA T	1,7799	0,1871 (ns)

ns= não significativo; ** = estatisticamente significativo.

entre 20 e 100.000. Nenhum paciente tinha mais que 100.000 plaquetas.

Da mesma forma como ocorreu para a dosagem da hemoglobina, a contagem do número de plaquetas não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos LLA não-T e LLA T, entretanto parece haver uma associação entre contagem de plaquetas acima de 100.000 por mm^3 e os subgrupos de LLA Indiferenciada, Pré-Pré-B e B. Como o número de casos nestes subgrupos é pequeno, a importância dessa associação não pode ser completamente estabelecida.

4. Relação entre as características morfológicas, citoquímicas e imunofenotípicas das células leucêmicas dos pacientes estudados comparando as LLA não-T e LLA T.

4.1. Reação citoquímica do PAS

A tabela 11 mostra os resultados da reação citoquímica do PAS dentro dos diferentes grupos e subgrupos. Vinte e cinco pacientes apresentaram reação intensa ou moderada (+++/++) ao PAS. Destes, 22 eram do grupo LLA não-T e 3 do grupo LLA T, não se evidenciando diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($X^2=0,124$), assim como entre os subgrupos de LLA não-T:

4.2. Morfologia das células leucêmicas

Observamos que 79,4% dos casos estudados mostraram morfologia dos blastos L1, 19% morfologia L2 e 1,6% L3, de acordo com os critérios revisados do grupo FAB. A tabela 12 mostra os achados morfológicos das células leucêmicas separados conforme a classificação imunofenotípica. No grupo LLA não-T observou-se que dos 55 casos, 44 (80%) tinham morfologia L1 e 11 (20%), morfologia L2. Dos 33 casos de LLA Comum, 30 (91%) tinham morfologia L1 e 3 casos (9%) morfologia L2. Dos 6 casos de LLA Indiferenciada 3 (50%) eram L1 e 3 (50%) eram L2. No grupo LLA T (8 casos) observaram-se 6 casos (75%) com morfologia L1, 1 caso (12,5%) com morfologia L2 e 1 caso (12,5%) com morfologia L3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo LLA não-T e LLA T ($\chi^2=0,75$), porém houve associação ao nível de 5% de significância ($\chi^2=4,94$) entre os subgrupos de LLA Comum e Indiferenciada, este último mostrando um predomínio da morfologia celular do tipo L2.

4.3. Microlinfocitotoxicidade

O teste da microlinfocitotoxicidade foi realizado no material colhido de medula óssea de 58 pacientes com LLA. O teste com o AcMO Anti-T foi negativo em todos os casos de LLA não-T, assim como o teste com o AcMO Anti-B foi negativo em todos os casos de LLA T. Entretanto, apenas 10 em 31 (32,3%) casos de LLA Comum e 1 em 6 (16,6%) casos de LLA Indiferenciada reagiram com o AcMO Anti-B. Já em relação à LLA Pré-Pré-B, a positividade foi de 75% (3 em 4 casos). Quanto à LLA T, 4 em 6 casos mostraram reatividade com o AcMO Anti-T

TABELA 11
 RELAÇÃO ENTRE A CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS LLA NÃO-T
 E LLA T E A INTENSIDADE DA REAÇÃO CITOQUÍMICA DO PAS (N=63).

CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA	n	PAS			
		+++	++	+	0
LLA NÃO-T	55	12	10	12	21
COMUM	33	10	7	7	9
INDIFERENCIADA	6	0	1	1	4
PRÉ-PRÉ-B	4	1	0	3	0
B	1	0	0	0	1
OUTROS	11	1	2	1	7
LLA T	8	2	1	2	3

Análise estatística comparando a reação +++/++ com +/0:

LLA não-T x LLA T - $X^2 = 0,086$ (ns).

TABELA 12
 RELAÇÃO ENTRE A CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E A MORFOLOGIA
 DA CÉLULA LEUCÊMICA.

CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA	n	MORFOLOGIA		
		L1(%)	L2(%)	L3(%)
LLA NÃO-T	55	44(80,0)	11(20,0)	0
COMUM	33	30(91,0)	3(9,0)	0
INDIFERENCIADA	6	3(50,0)	3(50,0)	0
PRÉ-PRÉ-B	4	3	1	0
B	1	1	0	0
OUTROS	11	7(63,6)	4(36,4)	0
LLA T	8	6(75,0)	1(12,5)	1(12,5)
TOTAL	63	50(79,4)	12(19,0)	1(1,6)

Comum x Indiferenciada $\chi^2 = 4,94$ (** p=0,05)
 Comum x T $\chi^2 = 0,07$ (ns)
 LLA não-T x LLA T $\chi^2 = 0,75$ (ns)

utilizado no teste (56,7%). A reatividade com o AcMo Anti-HLA-DR foi de 45,2% para a LLA Comum, 50% para a LLA Indiferenciada, 75% para a LLA Pré-Pré-B e 33,3% para o grupo de LLA T. Estes dados estão resumidos na tabela 13. Os anticorpos monoclonais anti-T e anti-B utilizados neste teste são pan-B e pan-T. Um aspecto que deve ser lembrado é o de que o teste depende da viabilidade das células, por isso, embora aparentemente específico, é de sensibilidade discutível.

4.4. Imunofluorescência Indireta e outros marcadores celulares.

O anexo 5 mostra com detalhes os resultados de todos os testes imunofenotípicos. Na tabela 14 procuramos mostrar a positividade dos testes de acordo com a classificação imunofenotípica em que as LLA foram incluídas. Pode-se observar que no subgrupo de LLA Comum, além do marcador CD10 (CALLA) indispensável ao diagnóstico, 69% dos casos também mostraram o marcador CD19 (B4) e nos 31 casos em que foi testado o anticorpo monoclonal anti-HLA-DR este foi positivo em 27 (87%). Foram observados dois casos particulares (Nº 18 e 49) no subgrupo Comum. O primeiro (Nº18) é um paciente do sexo feminino, com 3 anos e 4 meses, apresentando apenas hepatomegalia, sem linfonodomegalia generalizada ou esplenomegalia, sem massa em mediastino ou comprometimento de SNC, 3.200 leucócitos por mm³ ao diagnóstico, morfologia L1, PAS fraco positivo, ER a 4°C e 37°C negativos, microlinfocitotoxicidade negativa para anti-B, anti-T e anti-HLA-DR, anticorpos monoclonais para a linhagem T negativos com

TABELA 13
 RELAÇÃO ENTRE A CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E OS
 RESULTADOS DO TESTE DE MICROLINFOCITOTOXICIDADE (N=58).

CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA	n	MICROLINFOCITOTOXICIDADE		
		ANTI-B	ANTI-T	ANTI-HLA-DR
LLA NÃO-T	52	15/52 (28,8%)	0/52	27/52 (51,9%)
COMUM	31	10/31 (32,3%)	0/31	14/31 (45,2%)
INDIFERENCIADA	6	1/6 (16,6%)	0/6	3/6 (50,0%)
PRÉ-PRÉ-B	4	3/4 (75,0%)	0/4	3/4 (75,0%)
B	1	0/1	0/1	0/1
OUTROS	10	1/10 (10,0%)	0/10	5/10 (50,0%)
LLA T	6	0/6	4/6 (56,7%)	2/6 (33,3%)

TABELA 14
 MARCADORES CELULARES ENCONTRADOS NOS DIFERENTES SUBGRUPOS DE
 LLA T E NÃO-T.

MARCADORES CELULARES	LLA NÃO-T					LLA T
	COM.	INDIF.	PPB	B	OUTROS	
ER 4° C	-	-	-	-	-	6/8
ER 37° C	-	-	-	-	-	6/8
IgS	-	-	-	1	-	-
IgC	1	1	1	-	-	-
CD1	-	-	-	-	-	3/5
CD2 (T11,ER)	-	-	-	-	-	5/7
CD3	-	-	-	-	-	2/8
CD4	1/16	-	-	-	-	3/8
CD5	-	-	-	-	-	0/4
CD7 (pan-T)	1/18	-	-	-	-	3/3
CD8	-	-	-	-	-	5/8
CD10 (CALLA)	33/33	-	-	1/1	1/11	-
CD19 (B4)	20/29	-	4/4	1/1	-	-
HLA-DR	27/31	2/3	4/4	1/1	7/11	-

COM. = Comum; PPB = Pré-Pré-B; INDIF. = Indiferenciada.

exceção de CD4 que mostrou uma positividade de células com imunofluorescência de 29%, CD10 de 60%, CD19 de 49% e Anti-HLA-DR de 57%. O segundo caso (Nº49) é também um paciente do sexo feminino, com 3 anos e 6 meses de idade, apresentando linfonodomegalia generalizada e hepato-esplenomegalia maior que 5 cm do RCD e RCE, sem comprometimento de mediastino ou SNC, 2.400 leucócitos por mm³ ao diagnóstico, morfologia celular L2, PAS fortemente positivo, ER a 4°C e 37°C negativos, microlinfocitotoxicidade negativa para anti-T, anti-B e anti-HLA-DR, CD3, CD4, CD8 negativos, CD7 (Pan-T) de 70%, CD10 de 61%, CD19 de 52%. Portanto, apesar dos dados clínicos e hematológicos serem mais sugestivos de LLA Comum, apresentaram também positividade com um anticorpo monoclonal para célula T.

No subgrupo que denominamos de Pré-Pré-B e que corresponde a 4 casos observa-se positividade com o anticorpo monoclonal CD 19 e anti-HLA-DR. Os demais testes foram negativos.

O único caso de LLA B (Nº29) além da presença da imunoglobulina de superfície (IgS) em 49% das células, tinha CD10 (CALLA) fracamente positivo (25%), CD19 positivo (47%) e anti HLA-DR positivo (81%). Clinicamente, caracterizava-se por ser uma criança do sexo feminino, com 4 anos e 3 meses de idade e no exame apresentava extensa massa abdominal de difícil delimitação. Apresentava uma hemoglobina inicial de 10,5 g/dl, uma leucometria de 7.100 por mm³ e 390.000 plaquetas, sem blastos percebidos em sangue periférico. A

medula óssea estava infiltrada por 40% de células leucêmicas com morfologia L1 e a coloração citoquímica pelo PAS foi negativa. Os níveis elevados de hemoglobina e plaquetas, e a ausência de linfoblastos em sangue periférico, sugerem tratar-se de um provável linfoma não-Hodgkin derivado de linfócitos B, de apresentação primária abdominal, e com invasão secundária da medula óssea.

Os dados de marcadores imunofenotípicos referentes ao grupo LLA T estão mais detalhados na tabela 15, onde se observa que 6 dos 8 pacientes com LLA T tiveram ER positivo (75%). Este dado correlaciona bem com o anticorpo monoclonal CD2 (T11), que corresponde ao receptor ER, e que foi positivo em 5 dos 7 casos analisados (71%). Os marcadores CD5 e CD7 são Pan-T. Não sabemos a razão de negatividade do CD5 nos quatro casos em que foi utilizado. Já o CD7 foi disponível em apenas 3 casos e foi positivo nos três. Em três casos o CD8 foi positivo isoladamente (sem CD4), tendo concomitantemente ER, CD2 e CD7 positivos, indicando tratar-se de uma célula T mais diferenciada (Nº41,54,62). O paciente Nº41 caracterizou-se clinicamente por ser do sexo feminino, com 14 anos de idade, por apresentar organomegalias, protrusão ocular, hipertrofia gengival e aumento de volume mamário, infiltração do SNC, morfologia celular L3 e 14.100 leucócitos por mm³ ao diagnóstico. Os dois outros, nº 54 e 62, são do sexo masculino com 3 anos e 6 meses, com organomegalias, ambos com massa de mediastino, leucometria acima de 100.000 por mm³, morfologia dos blastos L1, reação do PAS moderada e fracamente positiva, respectivamente.

TABELA 15
 RESULTADO DOS TESTES IMUNOFENOTÍPICOS DE MARCADORES CELULARES
 NAS LLA T (N= 8).

Nº	IDADE (anos)	LEUCÓCITOS .10 ⁹ /mm ³	ER	ER	CD	CD	CD	CD	CD	CD	CD
			4º	37º	1	2	3	4	5	7	8
			%	%	%	%	%	%	%	%	%
06	8a3m	7.4	45	40	-	39	-	-	-	NA	-
09	2a1m	144.8	45	60	-	38	-	-	-	NA	-
14	6a2m	188.0	-	-	24	10	12	38	NA	NA	75
22	14a1m	171.0	-	-	36	-	-	68	-	NA	34
34	3a4m	169.0	85	68	24	30	37	20	-	NA	-
41	13a10m	14.1	87	54	NA	NA	27	19	NA	32	37
54	3a6m	288.0	54	32	NA	73	-	-	NA	77	65
62	3a5m	205.0	85	71	NA	95	-	-	NA	86	61

NA = não analisado;

- = <1% de células com imunofluorescência

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Progresso considerável tem sido obtido no tratamento global da leucemia linfóide aguda na infância. Embora poucas drogas novas tenham sido incorporadas à terapêutica nos últimos dez anos, informações no campo da biologia celular²⁰ permitiram, que os quimioterápicos fossem usados de modo mais eficaz. Da mesma forma, avanços no controle de infecções e no tratamento suportivo foram importantes para a melhoria dos índices de cura²¹.

Entretanto, uma proporção significativa de pacientes ainda não são beneficiados pela terapêutica atual e, eventualmente, falecem em consequência da doença, ou de suas complicações. Também deve-se considerar os efeitos colaterais do tratamento e aqueles pacientes, que considerados curados, poderão apresentar, no futuro, seqüelas decorrentes da intensidade ou do tipo de tratamento empregado²².

Conseqüentemente, existe grande interesse em caracterizar subgrupos de LLA, objetivando, por um lado, o aumento da intensidade do tratamento ou da experimentação de novas drogas e/ou novas estratégias para o controle da doença e, por outro lado, a administração de tratamento de menor toxicidade para

aqueles pacientes, que tenham características clínicas e biológicas associadas à uma melhor resposta terapêutica ²⁰².

Infelizmente não existe nenhum dado isolado, que, por si, possa separar esses grupos de pacientes com prognóstico distinto. Porém, quando algumas características clínicas e biológicas são analisadas em conjunto, a evolução clínica dos pacientes poderá ser antecipada com razoável nível de segurança ²⁴. Um grande número de estudos recentes têm mostrado evidências de que o fenótipo imunológico da célula envolvida na transformação leucêmica tem significado prognóstico, independentemente de outras variáveis clínicas como idade e contagem inicial de leucócitos ^{72, 107, 214, 217, 242}.

Para uma melhor caracterização das LLÁ, é essencial o conhecimento de certos marcadores exibidos pela célula leucêmica, pois a linhagem e o estágio de maturação celular estão associados aos achados clínicos e ao prognóstico, e têm contribuído para a compreensão do desenvolvimento de precursores linfóides normais e a origem celular das doenças malignas linfóides ^{3, 11, 93, 152, 147, 123}.

Como exemplo da importância de tais estudos, a introdução de anticorpos monoclonais, que detectam antígenos expressos pela linhagem mielóide, permitiu a identificação de algumas leucemias anteriormente classificadas como linfóides ou indiferenciadas. Além disso, recentemente foi observado, que certas leucemias co-expressam antígenos de linhagem linfóide e

mielóide, na mesma célula ou em duas populações leucêmicas diferentes no mesmo paciente 147, 145, 171, 234, 177. É interessante observar, que a maioria apresentam uma doença mais resistente ao tratamento habitual, seja para leucemia linfóide ou mielóide, sugerindo que, uma estratégia alternativa de tratamento utilizando uma combinação de modalidades terapêuticas ou transplante de medula óssea deva ser explorada para esse grupo de pacientes. Esses estudos com emprego de reagentes mais específicos têm, também, possibilitado a resposta de muitas questões referentes à frequência dos diferentes subgrupos de LLA em várias regiões geográficas, podendo haver uma melhor apreciação da história natural dessas doenças em grupos populacionais distintos.

Os resultados de nossa investigação, utilizando anticorpos monoclonais para a caracterização e classificação das leucemias agudas em pacientes até 21 anos de idade, revelaram que não há diferença na frequência de leucemias de células T quando comparada àquela reportada pela maioria dos investigadores de diferentes países, que citam porcentagens de 12% 20,7%, 23% 205, 14,2% 24, 11,7% 23, 16,5% 24, 16% 23.

Foram observados 8 casos de LLA T (12,7%) entre 63 casos, consecutivamente estudados. Mesmo se outros dois pacientes (Nº18 e 49), cujas células co-expressavam antígenos associados à linhagem B e T fossem incluídos neste grupo, ainda assim, a frequência de casos (15,9%) estaria em concordância com os referidos pela maioria dos autores. Este resultado, entretanto, está em desacordo com aquele observado em trabalho

anterior realizado em nossa instituição ²¹², que verificou uma frequência de LLA T de 40%, e com outro investigador ²¹³ na Faculdade de Medicina de São Paulo, que encontrou uma frequência de 30% na faixa etária até 15 anos. Resultados semelhantes aos encontrados em Curitiba e São Paulo, foram descritos por Borella e cols. ²¹⁴ em 1977, que observaram uma porcentagem de LLA T de 33% em crianças tratadas no St. Jude Children's Research Hospital.

O grupo LLA não-T corresponde, em nossa casuística, a 87,3% dos casos. Cinquenta pacientes puderam ser subagrupados, sendo 66 % classificados como LLA Comum, 2% LLA B, 8% LLA Pré-Pré-B, 12% LLA Indiferenciada. Onze pacientes (17,46%) do grupo LLA não-T não foram subclassificados, porque, para os 13 primeiros casos de nossa série, não dispúnhamos de anticorpo monoclonal confiável para a detecção do antígeno associado à LLA Comum.

Os nossos resultados referentes à classificação dos subgrupos de LLA não-T também concordam com os reportados na literatura. A LLA Comum é a mais frequentemente encontrada em crianças, principalmente entre 2 e 10 anos de idade. A sua frequência tem variado de 63 a 80 % nos diferentes estudos ^{215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000}. Essa variação pode decorrer do fato de algumas instituições atenderem pacientes de várias faixas etárias. Este subgrupo está consistentemente associado a um melhor prognóstico.

O subgrupo de LLA, que não expressa o antígeno CALLA, mas possui marcadores de células B precursoras, denominado por nós de Pré-Pré-B, habitualmente não é considerado separadamente na maioria das classificações, onde se encontra normalmente incluído no grupo LLA não-T/não-B ou *null*. A frequência de 8% observada em nossa casuística é semelhante à reportada pela maioria dos investigadores.

O subgrupo LLA Pré-B (presença da cadeia pesada da imunoglobulina M no citoplasma), embora também pertença à chamada LLA não-T/não-B, em estudos mais recentes já é individualizado devido à sua possível associação com o prognóstico. Como não dispúnhamos de controle positivo para IgC, não incluímos o resultado dessa análise. Há relatos de que aproximadamente 11 a 24% ^{56,57,71,80,81,88,89,90} dos casos de LLA de linhagem B possuem imunoglobulina intracitoplasmática. A importância dessa verificação decorre da recente observação, de que isto implicaria em uma maior resistência da doença à quimioterapia convencional ^{97,98}. Pui e cols. ⁹⁹ observaram translocação $t(1;19)(q23;p13.3)$ em 23% dos casos de LLA Pré-B por eles estudados, além de outras alterações citogenéticas em menor proporção. Isto explicaria, em parte, o mau resultado da terapêutica reportado para este grupo de pacientes.

Apenas um caso de nossa série foi considerado como leucemia de células B, frequência semelhante àquela descrita em outras instituições, onde varia de 0,6 a 4% ^{17,34,56,58,71,79,92,93,100}.

Mesmo aplicando uma série de reagentes, alguns casos não puderam ser classificados de acordo com modelo da diferenciação linfóide normal. Esses casos foram classificados como LLA Indiferenciada. Esta foi, também, em muitos trabalhos, incluída no grupo LLA não-T/não-B ou *null*, mas em estudos mais recentes, os quais diferenciam este subgrupo, encontramos porcentagens variando de 4 a 11% ^{48,50,54,175}, portanto, concordantes com o nosso resultado.

A discrepância dos achados referentes à frequência de LLA T em trabalhos anteriores, pode ser devido à metodologia empregada ou à amostragem tendenciosa. No primeiro e terceiro estudos citados ^{21,22}, a técnica para detecção dos antígenos associados à linhagem de células T utilizou anti-soros heterólogos, o que pode ter superestimado a proporção de pacientes com leucemia de células T. Estes anti-soros foram preparados por uma variedade de processos de imunização, principalmente em coelhos. O reagente obtido requeria procedimentos de adsorção extensivos com uma variedade de células não-T, sem contudo haver garantia de especificidade, pois poderiam reconhecer antígenos diferentes e presumivelmente populações de células diversas, por não serem completamente específicos ^{24,152,172,173,185}. No segundo estudo citado ⁴³, a caracterização de leucemias de células T foi realizada empregando a técnica da formação de rosetas espontâneas em presença de eritrócitos de carneiro (ER), algumas vezes com material para estudo proveniente de sangue periférico. Como é frequente encontrar populações de

linfócitos T normais residuais circulantes, é possível que houvesse a inclusão de casos de LLA não-T como sendo T. Além disso, foram incluídos no grupo LLA T pacientes com ER negativo a 37°C. Quando se utiliza esta metodologia para o estudo de células leucêmicas é aconselhável usar material de aspirado de medula óssea para evitar falsos positivos como salienta Lauer e cols.¹⁰⁴. Além disso, desde o estudo realizado por Borella e Sen⁹¹ e Ishii e cols.¹¹⁹, ficou demonstrado que a temperatura de incubação da suspensão de células leucêmicas com eritrócitos de carneiro também tem importância na contagem final das células que formam rosetas, pois estas são formadas tanto a 4°C como a 37°C, enquanto que os linfócitos T circulantes perdem esta capacidade a 37°C.

Em nosso trabalho, procuramos incluir casos de várias instituições que assistem pacientes de diferentes grupos etários e todos aqueles com diagnóstico de leucemia aguda realizado no período desse estudo. Além disso, para todos os pacientes, a análise do imunofenótipo foi realizada em material colhido de aspirado de medula óssea e a técnica utilizada empregou reagentes monoclonais específicos concomitantemente com as técnicas convencionais anteriormente usadas.

A caracterização morfológica e o estudo citoquímico da célula leucêmica têm sido utilizados, tradicionalmente, para a separação dos grupos de leucemia mielóide e linfóide. Para a distinção de subgrupos linfóides, entretanto, têm mostrado resultados contraditórios. O grupo cooperativo FAB propôs

critérios morfológicos para a classificação das LLA, pois a uniformização desta, poderia resultar na identificação de subtipos clinicamente relevantes ⁵⁰. Como a classificação morfológica mostrou ser subjetiva na prática, o grupo FAB encontrou dificuldades persistentes em distinguir com precisão os dois subtipos principais (L1 e L2), principalmente, porque a reproduzibilidade das análises entre instituições era muito baixa. Com isto surgiu um sistema de escores ^{19,140}, que permitiu uma melhor uniformização e aumento da concordância quanto aos tipos morfológicos entre investigadores.

Vários autores têm utilizado essa classificação FAB modificada com o objetivo de estabelecer sua validade. Em relatos recentes, Head e cols. ¹⁰⁰ e Childs e cols. ⁵¹ chegaram à conclusão que, com um treinamento adequado, quanto aos critérios de classificação, bem como, com a associação de estudos citoquímicos da célula leucêmica, pode-se chegar a uma boa uniformização do diagnóstico morfológico e eliminar consideravelmente a subjetividade do método, obtendo níveis de concordância de até 92%.

Muitos estudos têm documentado a importância prognóstica dos diferentes tipos morfológicos. O tipo L1 está associado com alto índice de remissão completa e sobrevida livre de doença prolongada. Em contraste, o tipo L2 está frequentemente associado com duração da remissão mais curta ^{51,152,147,245}. Entretanto, a análise concomitante de várias características clínicas e biológicas, que possuem um efeito negativo sobre o prognóstico (análise multivariada) revelou, que os tipos

morfológicos não são determinantes independentes do prognóstico, quando outras variáveis como leucocitose, sexo, massa mediastinal e idade superior a 10 anos, são consideradas ^{40, 143}.

Em nosso estudo, utilizando a análise morfológica das células leucêmicas pelos critérios modificados do grupo FAB, verificamos que, de 63 pacientes com LLA, 79,4% eram do tipo morfológico L1, 19% do tipo L2 e 1,6% do tipo L3. Estes resultados estão de acordo com aqueles relatados por vários autores, que citam porcentagens de leucemia com morfologia dos blastos L1 variando de 60 a 86%, L2 variando de 13 a 34% e L3 variando de 0,7 a 6% ^{17, 27, 34, 100, 143, 144}.

De acordo, também, com dados já publicados, não houve associação entre tipos morfológicos e os marcadores fenotípicos das células leucêmicas. Dos 8 pacientes com LLA T, 6 (75%) apresentaram morfologia do tipo L1, 1 paciente (12,5%) do tipo L2, e 1 paciente (12,5%) com morfologia L3. No grupo LLA não-T (55 casos), 44 (80%) eram L1 e 11 (20%) eram L2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo LLA não-T e LLA T, o que concorda com o observado por outros autores ^{30, 43, 114, 211}. Entretanto, quando comparamos o subgrupo Comum com Indiferenciado, observamos, que este último, tem uma frequência de morfologia L2 proporcionalmente mais elevada (50% contra 9%) e que é estatisticamente significativa ao nível de 5%. Esse achado já foi descrito anteriormente e oferece uma explicação parcial para o pior prognóstico observado neste grupo de pacientes ²⁰.

A morfologia conhecida como L3 tem sido classicamente verificada em células leucêmicas que expressam imunoglobulina de superfície, característica do linfoma de Burkitt e da chamada leucemia de células B ^{17,47,73,107,222}. Mas nem todos os pacientes apresentam esta morfologia. Rugero e cols. ²¹⁶ descreveram 2 casos de LLA B como sendo L2, e Huhn e cols. ¹¹⁴ descreveram 2 casos de LLA T com morfologia L3. Em nossa casuística, o único caso com morfologia L3 pertencia ao grupo LLA T. Por outro lado, apenas um paciente apresentava células com imunoglobulina de superfície (leucemia de células B), porém a morfologia não foi considerada L3, mas L1. Este paciente também apresentava massa abdominal extensa ao diagnóstico, níveis de hemoglobina e plaquetas próximos dos valores normais e infiltração medular de cerca de 40%. Os dados sugerem que poderia ter havido progressão para a medula óssea de um linfoma não-Hodgkin primário abdominal, derivado de células B e provavelmente não-Burkitt ^{22,77,237}.

Apesar dos índices de remissão e tempo de sobrevida não terem sido analisados em nosso estudo, a falta de associação de tipos morfológicos com pacientes que possuíam variáveis clínicas que predizem uma determinada resposta ao tratamento, como leucocitose e idade abaixo de 2 anos e acima de 10 anos, concorda com o conceito de que a morfologia celular não é uma variável independente do prognóstico ^{40,47,144}.

Além da morfologia, marcadores bioquímicos têm sido estudados em leucemias agudas com o objetivo de aprimorar a classificação ou indicar formas seletivas de tratamento.

As reações citoquímicas têm sido utilizadas para indicar a linhagem celular e uma possível relação com o prognóstico. As reações da peroxidase, Sudan negro B e da esterase não específica são realizadas para a caracterização das leucemias não-linfóides^{252,251} e são especialmente úteis nos casos de LLA Indiferenciada²⁵¹. As reações citoquímicas do PAS e da fosfatase ácida^{105,104,230} identificam subgrupos de leucemia linfoblástica aguda.

Em nosso estudo, a positividade da reação da peroxidase foi utilizada como critério de exclusão. A reação citoquímica do PAS tem sido considerada por alguns investigadores como tendo valor prognóstico^{105,130,225}. Entretanto, Pesando e cols.¹⁷², Bennett e cols.²⁵¹, Greaves e cols.⁹⁵ e Lanham e cols.¹³⁵ verificaram, que não havia associação independente entre a positividade do PAS e características clínicas e biológicas classicamente relacionadas com o prognóstico.

Nos 63 pacientes estudados, 25 tiveram a reação do PAS positiva (+++/++). Destes, 3 pertenciam ao grupo LLA T e 22 ao grupo não-T, não havendo diferença estatística entre os dois grupos. Dos 33 pacientes com LLA Comum, 17 (51,5%) apresentaram reação positiva. Chamou a atenção, apenas, que de 6 pacientes classificados como LLA Indiferenciada, somente 1 (16,7%) mostrou reação do PAS positiva. Em relação a outras

variáveis como idade, sexo e contagem leucocitária ao diagnóstico não foram observadas diferenças que sugerissem que a reação do PAS contribui para informações clinicamente significativas.

A reação citoquímica da fosfatase ácida, que é descrita como sendo positiva em cerca de 75-90% dos casos de leucemia linfóide aguda de origem T ^{88,49,46,47,73,83}, foi analisada em trabalho anterior realizado em nossa instituição, sendo positiva em 2 de 4 pacientes com células leucêmicas expressando ER a 37°C. Crist e cols.⁵⁷ estudando 76 pacientes com LLA T observaram positividade da reação da fosfatase ácida em 50,8% dos casos. Devido a esta baixa sensibilidade e ao emprego de outros métodos mais sensíveis para a caracterização da leucemia de células T, não empregamos essa reação citoquímica em nosso estudo.

A comparação de dados clínicos com os marcadores celulares mostra evidências de que uma classificação imunofenotípica detalhada tem importância biológica revelando diferenças clínicas significativas entre o grupo de leucemias T e não-T.

Em nossa série, o número de leucócitos ao diagnóstico variou de 1.100 a 288.000 por mm³. Setenta e cinco por cento dos pacientes com LLA T apresentaram leucometria superior a 100.000 por mm³, enquanto que, apenas 5,4% no grupo não-T tiveram esta manifestação clínica. Estes dados concordam com os da literatura que menciona porcentagens de contagem de

leucócitos superior a 100.000 por mm^3 no grupo não-T, que variam de 2,7 a 11,3% e no grupo LLA T, que variam de 57,3% a 72,7% ^{34, 50, 55, 57, 64}.

Com relação à contagem de plaquetas se verificou níveis mais elevados de plaquetas no subgrupo Pré-Pré-B, porém não existe diferença estatisticamente significativa quando se compara o grupo LLA não-T como um todo e o grupo LLA T, o que também foi observado por Greaves e cols.⁷³.

O nível de leucócitos tem sido consistentemente associado com a resposta ao tratamento e sobrevida. Pacientes com contagem de leucócitos maior que 100.000 por mm^3 têm pior prognóstico ^{34, 50, 55}. A contagem de plaquetas também tem sido apontada, em alguns estudos, como tendo implicação prognóstica. Pacientes com contagem muito baixa (<25.000 por mm^3) teriam pior prognóstico, enquanto que pacientes com contagem acima de 100.000 por mm^3 teriam um prognóstico melhor ^{34, 55}.

Valores de hemoglobina elevados têm sido observados em associação, tanto com sobrevida prolongada como diminuída, em pacientes com leucemia linfóide aguda ³⁴. Níveis mais elevados de hemoglobina têm sido observados em associação com leucemias do tipo T ^{35, 55}. Em nossa série observamos valores mais elevados de hemoglobina no subgrupo LLA Pré-Pré-B, porém, devido ao pequeno número de pacientes, não sabemos se esta observação tem algum significado clínico. Além disso, alguns pacientes foram transfundidos antes de serem encaminhados para

receber tratamento específico, sendo portanto, uma causa de erro que não foi controlada nesse estudo.

A idade é uma das características mais consistentemente relacionadas com resposta ao tratamento e sobrevida e foi observada em quase todos os estudos sobre os fatores prognósticos. A sobrevida livre de doença parece diminuir nas crianças com menos de 2 anos e mais de 10 anos, sendo a mais prolongada em crianças entre 3 e 10 anos ^{34, 35}.

Muitos autores relatam, que, em crianças, a faixa etária para aparecimento da LLA T é superior a de aparecimento da LLA não-T ^{30, 32, 46, 217}. Entretanto, em nosso trabalho não pudemos observar associação entre idade acima de 10 anos e a origem celular. De 8 pacientes com LLA T apenas 2 (25%) tinham mais de 10 anos em comparação com 14 (25,5%) pacientes com LLA não-T (55 casos).

Deve-se levar em consideração, naturalmente, o tamanho da amostra, que é pequeno, porém outros autores também não encontraram esta diferença mesmo em casuística incluindo mais de 100 casos ^{30, 37}. Ressalta-se, entretanto, que a maioria dos investigadores observou uma associação entre leucemia de células T e idade superior a 10 anos. Nos trabalhos realizados no Brasil ^{40, 211} também se observou a ocorrência de LLA T em faixa etária significativamente mais baixa.

A associação entre frequência aumentada de uma mesma neoplasia em determinada faixa etária e em diferentes regiões

geográficas tem sido bem documentada na doença de Hodgkin. Foi observada uma maior frequência desta neoplasia em crianças de baixa idade em países subdesenvolvidos, porém a incidência global em indivíduos com idade abaixo de 20 anos não é diferente, sugerindo uma provável interação entre fatores genéticos, que seriam comuns a todas as populações, e fatores ambientais, que agiriam sobre o paciente em fases mais precoces do desenvolvimento, sugerindo, portanto, uma dependência de condições sócio-culturais ⁹⁷. É possível que a maior frequência de pacientes com leucemia de células T com baixa idade e a inexistência de associação dessa forma de leucemia com idade acima de 10 anos, observada consistentemente em nossas séries, pode apenas significar um desvio do pico máximo da incidência para uma idade mais precoce sem, entretanto, interferir na incidência global.

Em nossa casuística observamos um discreto predomínio do sexo masculino (M:F=3:1) no grupo LLA T, quando comparado com o grupo LLA não-T. Entretanto, não há diferença estatisticamente significativa, o mesmo tendo sido observado pela maioria dos autores ^{94,98,99,60,75,211}. Com relação à cor, não foi possível, em nossa casuística, estabelecer associação com o imunofenótipo porque a maioria dos pacientes era de cor branca.

A resposta ao tratamento de pacientes do sexo masculino e feminino é idêntica em vários estudos, com raras exceções ^{75,220}. Os resultados em negros foi consistentemente pior que em crianças brancas nos estudos realizados por Simone e cols.

***. A diferença de sobrevida nestes estudos foi estatisticamente muito significativa em favor da raça branca. A razão para esta maior resistência da leucemia na raça negra ainda não está bem definida ⁴¹.

Com relação à presença de linfonodomegalia generalizada e esplenomegalia além de 5 cm do RCE, encontramos associação entre esta manifestação clínica e o grupo LLA T, o que concorda com dados de literatura ⁷⁵. Com relação à hepatomegalia acentuada não observamos diferença significativa entre o grupo LLA T e não-T.

Em vários estudos, organomegalia, ou seja, fígado e baço bastante aumentados e linfonodomegalia generalizada, foi relacionada com sobrevida mais curta ^{55,64,66}.

Em nossa casuística, 5 dos 8 pacientes com LLA T (62,5%) apresentavam massa mediastinal. Apenas 1 paciente no grupo LLA não-T (1,8%) tinha esta manifestação clínica. Nossos achados concordam com os da literatura, onde se menciona que, entre 46,2 e 86% dos casos de LLA T possuem massa mediastinal, contra 0 a 3,3% nos demais grupos ^{14,34,37,44,75,88}.

É interessante observar que em nossa série, de 6 pacientes com massa mediastinal, 3 tinham idade inferior a 4 anos, 2 com idade entre 5 e 6 anos e apenas 1 com 14 anos. Na revisão de literatura ^{14,123,223} não se evidenciou nenhum paciente com esta manifestação clínica e idade inferior a 3 anos. Como este achado clínico é quase sempre associado à

leucemia T, a sua presença em crianças de baixa idade está de acordo com a observação de uma maior frequência em nosso meio de LLA T em crianças de baixa idade.

Considerável variabilidade também existe na composição fenotípica das células leucêmicas dos pacientes que apresentam massa mediastinal ao diagnóstico. Na série estudada por Kaplan e cols.¹²³, dos 4 pacientes que possuíam massa mediastinal, 2 não apresentaram ER acima de 20% e na de Bowman e cols.¹²⁴, com 12 pacientes, apenas 6 expressaram células leucêmicas com ER positivo. Estes dados concordam com os encontrados em nossa série, onde 2 dos 5 pacientes do grupo LLA T não expressavam ER (Nº 14 e 22).

Além disso, analisando o imunofenótipo das células leucêmicas de pacientes com massa mediastinal, Ha e cols.^{125, 126} observaram não apenas uma heterogeneidade ao nível imunofenotípico, definido por anticorpos monoclonais, como também ao nível de rearranjo de DNA correspondente ao gene da imunoglobulina. Estes achados sugerem que existe heterogeneidade entre as leucemias que se apresentam com massa mediastinal, e que esta manifestação clínica, embora quase sempre associada à LLA T, não indica necessariamente a origem das células de linhagem T.

Os três casos da nossa casuística com comprometimento de SNC ao diagnóstico não mostraram relação explícita com subgrupo de LLA. Dois deles (Nº 7 e 52), pertencentes ao grupo LLA não-T tinham leucócitos acima de 100.000 por mm³ e idade

de 9 meses e 8 anos respectivamente. O terceiro, pertencente ao grupo LLA T (Nº 41) tinha 14 anos, não apresentava leucocitose significativa, mas organomegalias importantes e morfologia celular L3. Estes dados sugerem que esta manifestação clínica está mais relacionada com o volume de tecido neoplásico presente ao diagnóstico. Entretanto, alguns autores sugerem que esta manifestação clínica seria uma propriedade biológica da célula leucêmica independente da contagem leucocitária ²⁵. Greaves e cols. ²⁶ observaram que mesmo afastando esta variável, ainda assim, existe associação entre a LLA T e o envolvimento de SNC, embora de forma menos significativa.

Muitos reagentes, procedimentos técnicos e protocolos para a manipulação da célula leucêmica têm sido desenvolvidos nos últimos anos com o objetivo de caracterizar a linhagem celular das leucemias. Os procedimentos técnicos variam consideravelmente e é muito grande o número de reagentes empregados.

Até recentemente, os antígenos de superfície das células leucêmicas eram detectados com anti-soros heterólogos utilizando a técnica da microlinfocitotoxicidade ou de imunofluorescência ^{27, 28, 29, 30}. Neste trabalho utilizamos as mesmas técnicas, porém, empregando reagentes monoclonais. A técnica da microlinfocitotoxicidade mostrou ser específica, ou seja, nenhum caso de LLA T reagiu com o AcMo Anti-B, assim como nenhum caso de LLA não-T reagiu com o AcMo anti-T. Já a sensibilidade é menor, pois se observa que a positividade do

teste nos casos definidos através de imunofluorescência indireta é de 32,3% e 45,2% em leucemias da linhagem B utilizando o AcMo anti-B e anti-HLA-DR respectivamente. Da mesma forma, apenas 56,7% de positividade é observada no grupo LLA T com o AcMo anti-T.

A baixa sensibilidade deste teste já foi observada por outros autores. Metzgar e Mohanakumar ¹⁴⁰ observaram um patamar na lise das células em torno de 60-70%, mesmo quando o número de células leucêmicas viáveis era maior que 90%. Este fato poderia indicar diferenças na intensidade da expressão antigênica de células individuais ou falta de lise celular em presença do anticorpo quando as células estão em suspensão ^{140, 141}.

A técnica de imunofluorescência indireta ^{10, 110, 111, 112} tem certas vantagens sobre a imunofluorescência direta usada para a determinação de IgS e IgC e sobre o teste de microlinfocitotoxicidade. É mais sensível, pois o anticorpo não marcado serve como antígeno, oferecendo, desta forma, mais sítios de combinação com o anticorpo conjugado com fluoresceína, e é mais facilmente controlada, já que mais reagentes são usados e suas concentrações são melhor ajustadas. Como desvantagens há o fato de requerer mais tempo e mais reagentes.

A formação de rosetas espontâneas em presença de eritrócitos de carneiro (ER) tem sido aceita como marcador para linfócitos T. Todos os casos analisados neste trabalho

foram testados em material de aspirado de medula óssea a 4 e 37°C. Houve seis casos (75%) com ER positivo, todos pertencentes ao grupo LLA T. Em todos eles a porcentagem de rosetas foi superior a 32%. Também expressaram positividade com os anticorpos monoclonais do grupo CD2 ou T11, que correspondem aos receptores para eritrócitos de carneiro. Nos dois casos com ER negativo, o CD2 também foi inferior a 20%. É interessante observar que estes casos com ER negativo mostravam simultaneamente CD4 e CD8, indicando tratar-se de um tímócito intermediário (ou comum). Casos semelhantes, de LLA T ER⁻, confirmadas através de reagentes específicos anti-T e/ou rearranjo do DNA que corresponde ao receptor de célula T, já foram relatados anteriormente por outros autores ^{101, 212}.

Há mais de 15 anos surgiram os primeiros dados sobre a heterogeneidade das leucemias linfóides agudas ^{90, 92, 122, 140}. Esses estudos iniciais demonstraram que aproximadamente 20% das leucemias linfoblásticas agudas derivavam dos linfócitos T. Estudos subseqüentes revelaram que a grande maioria das leucemias originavam-se de precursores de linfócitos B ^{11, 100}. Desde então, estudos mais refinados, caracterizando a célula leucêmica com anticorpos monoclonais, cariótipo e por métodos de DNA recombinante ^{59, 69, 254}, permitiram a elaboração de conceitos gerais sobre a fisiopatogenia das leucemias e a utilização desses mesmos achados como discriminantes do prognóstico.

O primeiro conceito é o de que a maioria das leucemias linfóides agudas originam de linfócitos T ou B durante a fase

de diversificação clonal e de rearranjo dos genes para produção das imunoglobulinas ou receptores de células T. Segundo, que um único clone celular é comprometido e, finalmente, que as células leucêmicas conservam e expressam as características próprias de células normais presentes no compartimento celular em que elas foram presumivelmente transformadas ^{79, 196, 198}.

Estudos de marcadores imunofenotípicos de superfície em células leucêmicas de pacientes com LLA têm revelado considerável heterogeneidade na expressão antigênica e na resposta ao tratamento ^{14, 54, 75, 76, 107, 196}. É bem conhecido que células leucêmicas, que exibem propriedades de superfície de membrana semelhantes às das células T ou B diferenciadas, são mais resistentes à eliminação pela quimioterapia, em contraste com aquelas que têm marcadores de superfície detectáveis para células linfóides imaturas, as quais podem, em muitas situações, ser erradicadas ^{54, 196}.

A análise sistemática dos nossos pacientes com um painel de anticorpos monoclonais e marcadores convencionais confirmou os resultados já publicados por outros autores sobre a extrema heterogeneidade das leucemias linfoblásticas agudas da infância. Contudo, a relação entre a expressão de marcadores da célula leucêmica e a possível origem baseada no modelo de desenvolvimento normal dos linfócitos T e B nem sempre está presente. A análise dos nossos casos revelou que, pelo menos 2 pacientes com leucemia T não obedecem a esse modelo, pois são ER negativos (confirmado com CD2 negativo) e têm

concomitantemente CD4/CD8. Da mesma forma 2 pacientes com leucemia não-T apresentaram concomitantemente um marcador de linhagem T.

Três casos de LLA T mostraram marcadores compatíveis com tímócitos mais diferenciados, pois além de CD2 e CD7, que aparecem em quase todas as células T normais, expressaram também CD8. Dois dos três casos tinham massa mediastinal e linfonomegalia generalizada e o terceiro, infiltração de SNC, organomegalia importante, protrusão ocular e hipertrofia gengival.

O marcador CD7 foi utilizado no painel de imunofluorescência indireta somente a partir do caso Nº 36, porém pode-se observar que nos três casos de LLA T em que foi utilizado mostrou positividade, o que concorda com vários autores ^{33, 110, 144, 144}, que sugerem que este reagente é sensível para este tipo de leucemia. Entretanto, outros investigadores ^{10, 40} têm reportado casos ocasionais de LMA com CD7 positivo, sugerindo que ele não pode ser utilizado isolado como critério de diagnóstico para classificar uma leucemia como sendo de linhagem T.

Cinco pacientes com LLA T foram analisados com o AcMo CD1(T6), presente no estágio I e II da diferenciação da célula T normal. Destes, 3 foram positivos e nenhum caso de LLA não-T expressou este marcador. Entretanto, Hutchinson e cols. ¹¹⁷ usaram este reagente em 60 casos consecutivos de LLA e observaram que ele foi positivo em 26% dos casos de LLA com

CALLA positivo e em 57% dos casos comprovadamente LLA T, concluindo que a expressão do antígeno T6(CD1) em células linfóides malignas não indica necessariamente a linhagem celular T.

Vários outros autores têm reportado resultados de estudos com utilização de anticorpos monoclonais que sugerem que a LLA T é, também, um grupo heterogêneo. Estes estudos, de um modo geral, utilizaram os reagentes que contribuíram para a análise da diferenciação das células de linhagem T normais ^{114, 129}. A diversidade clínica, histopatológica e imunológica, sugere que a heterogeneidade das doenças malignas de células T está relacionada com sua origem e qualidades funcionais distintas de célula T ^{102, 104, 109, 127, 136, 176, 212}.

Em recente estudo realizado por Foa e cols.⁷⁴, ficou estabelecida a importância do uso de um painel de reagentes para revelar os antígenos T, que possibilita a classificação dos casos de LLA T, principalmente aqueles com células T mais imaturas, que de outro modo seriam incluídos no grupo das LLA Indiferenciadas.

Portanto, devido à esta heterogeneidade do fenótipo da superfície das leucemias de célula T e da infidelidade de expressão destes antígenos em relação ao modelo teórico de desenvolvimento da célula T normal, conclui-se que é preciso mais de um reagente para identificar de forma mais precisa os pacientes com esta doença ^{10, 132, 144}.

Embora ainda não bem definido, é possível que as leucemias agudas de linhagem B também expressem antígenos de membrana que não obedecem ao modelo normal de desenvolvimento da célula B ^{44, 178}. O antígeno associado à LLA Comum (CALLA ou CD10) foi descrito inicialmente como um antígeno de superfície presente em células leucêmicas de pacientes com a forma comum de LLA ou na crise blástica da leucemia mielocítica crônica ⁷⁶, porém precursores linfóides normais podem expressar o CALLA, principalmente durante a regeneração da medula óssea ^{44, 78}. Com a utilização de técnicas de imunoperoxidase foi observado em células normais de rim humano e intestino delgado, e mais recentemente foi demonstrado em granulócitos, fibroblastos, alguns linfomas de linhagem B, linfomas linfoblásticos de linhagem T e algumas LLA T ^{15, 154, 174}.

Além de mostrar que o esquema de diferenciação dos linfócitos normais não é sempre seguido pelas células leucêmicas, a utilização sistemática de reagentes monoclonais no estudo das leucemias agudas, indicou a existência de casos com características imunofenotípicas de mais de uma linhagem celular.

A co-expressão de marcadores de linhagem celular T e B já foi verificado por vários autores ^{14, 33, 72, 80, 88, 89, 91, 93} e sugerem que a célula leucêmica poderia ter um programa de expressão gênica aberrante, resultante da transformação leucêmica de uma *stem cell* comum ou, alternativamente, que a célula leucêmica teria um fenótipo intermediário entre LLA T e LLA Comum (Não-T/não-B). Dowell e cols. ⁴⁷ encontraram 27% de

seus pacientes com LLA T expressando CALLA e HLA-DR, e observaram que estes pacientes tendiam a ter uma sobrevida livre de doença mais prolongada, embora clinicamente se assemelhassem à LLA T, ou seja, tinham, em geral, idade superior a 10 anos, contagem leucocitária elevada, esplenomegalia e linfonomegalia importantes e, freqüentemente, massa mediastinal. Por outro lado, San Miguel e cols.¹⁴⁶ sugerem a necessidade de se determinar o rearranjo genético que predomina (dos receptores de células T ou das cadeias leves e pesadas da imunoglobulina) para se estabelecer o prognóstico.

Cada vez mais freqüentes são os relatos de leucemias mistas ou bifenotípicas, cujas células expressam antígenos de linhagem linfóide e mielóide^{144,171,177}. Ludwig e cols.¹⁴⁷ analisando as células leucêmicas de 500 pacientes com diagnóstico de LLA, realizado pelos critérios clássicos, com um painel de anticorpos monoclonais, tanto da linhagem mielóide como linfóide, observaram que 3,2% (16 pacientes) expressavam antígenos associados com ambas as linhagens. Mirro e cols.¹⁷¹, na análise de 123 casos consecutivos de LLA em crianças observaram 19% expressando concomitantemente antígenos associados à leucemia mielóide. Meyer e cols.¹⁴⁸ na análise de 31 casos de LLA diagnosticados com base na morfologia e citoquímica, observaram, através de estudos imunofenotípicos, 8 casos que expressavam concomitantemente CALLA (CD10), HLA-DR e antígenos mielóides (anti-OKM1 e anti-Leu M-1).

Ainda existem controvérsias, se estes casos representam uma aberração da transformação neoplásica pela teoria da infidelidade de linhagem celular ou, por outro lado, se eles refletiriam a transformação leucêmica de progenitores hematopoiéticos multipotentes, que teriam certa promiscuidade de rearranjo genético ²⁰⁰. Isto decorre da observação de um grupo de LLA, cujas células expressam estruturas antigênicas presentes em células primitivas ou *stem cells* ^{180, 203}. Está se tornando aparente que é importante identificar e reconhecer este tipo de leucemia para alterar os regimes terapêuticos e identificar um grupo com prognóstico diferente ²⁰⁴.

A disponibilidade de reagentes específicos aumentou consideravelmente a possibilidade de classificação das leucemias. Porém, ainda existem situações em que os anticorpos monoclonais não esclarecem a origem celular. Já em 1980, Youness e cols. ²⁵⁰ evidenciaram que, com os métodos diagnósticos da época, permaneciam cerca de 10 % de leucemias não classificadas. Apesar das técnicas recentes, permanece ainda um grupo de leucemias agudas, que não podem ser classificadas com os reagentes atualmente disponíveis. Na maioria das vezes, estas leucemias parecem morfologicamente ser de origem linfóide ¹⁴⁰ e são mais frequentes em adultos do que em crianças (23% e 5% respectivamente) ²⁴⁰.

Nestes casos, a realização de estudos da configuração do DNA ou as propriedades físicas e químicas do RNA poderão estabelecer a origem celular ^{130, 131}. Assim, rearranjo do gene da imunoglobulina e do receptor de célula T tornou-se um

marcador preciso para os estágios precoces da diferenciação linfocitária, cujas células poderão estar envolvidas em alguns casos de leucemia linfoblástica e na crise blástica da LMC, que não puderam ser classificados com os métodos convencionais 101.

Da mesma forma, com essa nova metodologia foi possível verificar que muitas das LLA Indiferenciadas, ou que não demonstravam nenhum marcador na superfície das células leucêmicas tinham rearranjo genético da imunoglobulina, indicando a origem da linhagem B, ou expressavam receptor de célula T, indicando uma origem de linhagem T 74,89,100,254.

Matutes e cols.¹⁰² estudando células leucêmicas indiferenciadas de um número de casos de difícil classificação por imunofenotipagem, verificaram, que estas são heterogêneas do ponto de vista imunológico, citoquímico e molecular, e concluíram que, no presente, parece ser necessária uma análise multiparamétrica para compreender a natureza das células neoplásicas pouco diferenciadas das leucemias agudas. Parece que, nestes casos, a aplicação de análise do DNA ao estudo das células mielóides e a expressão do gene da mieloperoxidase ao nível do RNA mensageiro poderiam ajudar na determinação dos casos de linhagem mielóide, que muitas vezes são considerados como LLA Indiferenciada, assim como naqueles casos raros, em que somente a evidência de uma natureza granulocítica, foi a expressão de um antígeno mielóide.

Dúvidas, sobre a utilidade da classificação imunofenotípica das leucemias surgiram, por um lado, pela falta de associação independente com o prognóstico, no contexto de outras variáveis clínicas e biológicas ⁹⁵, e por outro, pela ausência de estudos controlados demonstrando sua utilidade clínica. Além disso, o grande número de reagentes monoclonais diferentes, com especificidade não completamente definida de alguns deles e com nomenclatura confusa, foram também fatores de desestímulo para seu uso mais amplo ⁴⁸. Também, como já referido anteriormente, casos de leucemia aguda têm sido relatados, nos quais as células leucêmicas expressam combinações aberrantes de positividade, colocando dúvidas sobre a utilidade dos reagentes ¹⁰⁴. Estas dificuldades estão provavelmente relacionadas com a heterogeneidade celular intrínseca tanto de populações hematopoiéticas normais, como malignas, e da compreensão incompleta dos fenótipos das células progenitoras das quais algumas leucemias originam.

Apesar destas limitações, a melhor aplicação de várias metodologias e a utilização de um número considerável de marcadores celulares têm produzido contribuições no entendimento da origem celular das leucemias e grupos de pacientes com prognóstico distintos. Os estudos iniciais, nos quais os resultados de imunofenótipo foram comparados com aqueles de células normais do timo, tecidos fetais e células da medula óssea em regeneração, levaram à conclusão de que as células da leucemia são usualmente estacionadas em uma fase de desenvolvimento dos linfócitos T ou B. Essas conclusões foram

corroboradas pela demonstração do rearranjo de imunoglobulinas e receptores de células T. Entretanto, o enorme número de reagentes e sondas de DNA aumentou a complexidade da caracterização das leucemias e reduziu consideravelmente a disponibilidade de laboratórios em condições de realizar a classificação.

Por outro lado, as informações geradas com essa metodologia mais elaborada, permitem deduções sobre o número mínimo de reagentes que podem ser utilizados para produzir informações clinicamente relevantes. Nesse contexto, a primeira etapa é a distinção entre a leucemia linfóide da não-linfóide. Muitas evidências sugerem que a morfologia é insuficiente para a separação destes dois grupos. A reação citoquímica da peroxidase, quando negativa, é aceita pela maioria dos investigadores como critério para a exclusão do grupo das não-linfóides. Contudo, casos de leucemia monoblástica e megacariocítica poderiam ser incluídas no grupo das leucemias linfóides se apenas a morfologia e reação citoquímica da peroxidase fossem utilizadas. A positividade à reação citoquímica da esterase não-específica poderá caracterizar a leucemia com um componente monocítico ou exclusivamente monocítica ²²². A inclusão dos anticorpos monoclonais na análise das leucemias contribui para a definição dos subgrupos de leucemias linfóides agudas e da leucemia megacariocítica. Os AcMo CD19 (B4), CD7 (Pan-T), CD10 (CALLA) e o anti-soro heterólogo para a caracterização da imunoglobulina de citoplasma ou de superfície possibilitam a caracterização das leucemias do grupo T, B, Pré-B e Comum,

todas com implicações clínicas relevantes. A utilização dos anticorpos monoclonais do grupo CD2 (ER), CD5, CD3, CD1, CD4 e CD8 tem importância para a categorização das leucemias do grupo T em subgrupos conforme o estágio de diferenciação, porém até o presente não existe informação sobre o valor prognóstico desses subgrupos. Recentemente, o emprego de anticorpos monoclonais associados à linhagem granulocítica permitiu a caracterização de um grupo de leucemias linfóides chamadas bifenotípicas ou mistas com aparente mau prognóstico. O número crescente de casos relatados deste tipo de leucemia sugere que uma análise, utilizando uma painel de reagentes tanto de linhagem linfóide como mielóide, deva ser realizada em pacientes pediátricos com leucemia aguda.

Considerando, portanto, as informações obtidas na literatura e em nosso estudo pode-se sugerir uma seqüência na aplicação dos reagentes que permite classificar a maioria das leucemias linfóides da infância (figura 7).

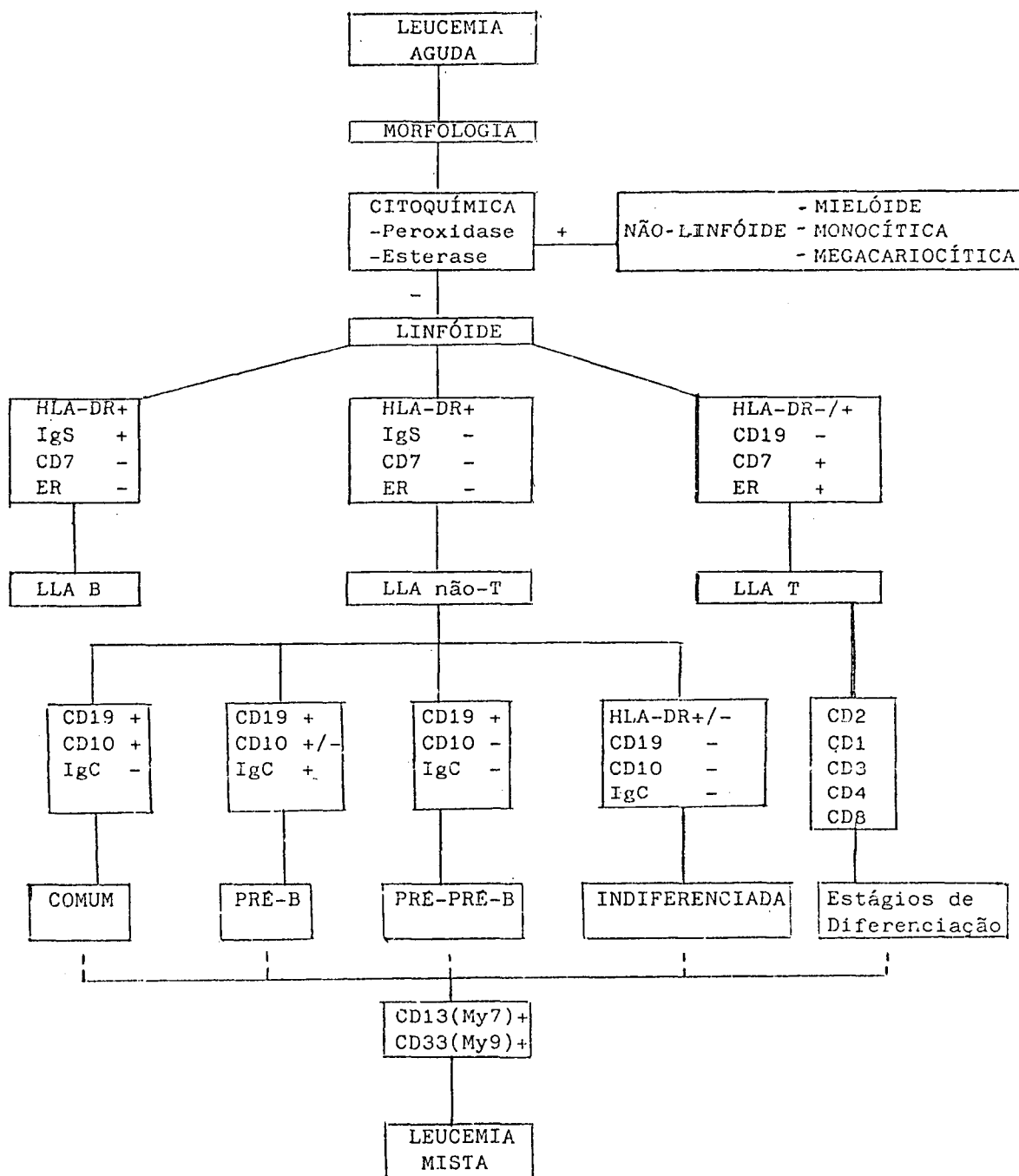


FIGURA 7. Modelo de seqüência na aplicação dos testes e reagentes para classificação das leucemias linfóides agudas na infância.

IgS= Imunoglobulina de superfície
 IgC= Imunoglobulina de citoplasma
 CD = Designação de grupo

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Os resultados desta investigação em pacientes abaixo de 20 anos, utilizando uma série de reagentes, revelaram que não há diferenças significativas na frequência de subgrupos de leucemia linfóide aguda, inclusive do tipo T, quando comparados com os reportados em diferentes instituições de outros países.

Não foi observada associação entre os tipos morfológicos L1, L2 e L3 e os grupos LLA não-T e LLA T definidos por marcadores de membrana. Contudo, foi observada uma associação entre a LLA com o tipo morfológico L2 e o subgrupo indiferenciado.

Não houve predominância de casos com positividade à reação citoquímica do PAS nos diferentes subgrupos.

O nosso estudo confirmou a associação, observada na maioria de outros trabalhos, entre a leucemia de células T e um elevado número de leucócitos ao diagnóstico e presença de massa mediastinal.

Não foi observada associação entre idade acima de 10 anos e leucemia de células T, o que conjuntamente com a presença de

massa mediastinal em crianças de baixa idade, sugere uma frequência aumentada deste tipo de leucemia em crianças abaixo de 10 anos.

Mesmo com o emprego de uma série de reagentes, um certo número de casos permanecerá não classificado, sugerindo a necessidade do uso de outras técnicas para o esclarecimento da origem celular de algumas leucemias.

O emprego de vários reagentes confirmou a heterogeneidade imunofenotípica das leucemias e a não concordância, em muitas circunstâncias, com o modelo teórico proposto para o desenvolvimento linfóide normal, sugerindo a necessidade de uma análise multiparamétrica para o esclarecimento da origem celular da maioria das leucemias.

A utilização coordenada e sequencial de técnicas convencionais e reagentes monoclonais poderá esclarecer a origem da maioria das leucemias com importância clínica e prognóstica.

ANEXOS

ANEXO 1. IDADE, SEXO E COR DOS PACIENTES COM LLA.

Nº	IDADE	SEXO	COR
01	5a 04m	M	B
02	1a 09m	F	B
03	1a 01m	M	B
04	10a 06m	F	B
05	10a 06m	M	B
06	8a 03m	M	B
07	0a 09m	M	B
08	15a 00m	M	B
09	2a 01m	M	B
10	5a 11m	M	B
11	5a 02m	F	B
12	6a 07m	M	B
13	5a 00m	F	B
14	6a 02m	M	F
15	3a 03m	M	F
16	20a 05m	F	B
17	3a 10m	M	B
18	3a 04m	F	B
19	12a 01m	F	F
20	3a 04m	F	B
21	13a 09m	F	F
22	14a 01m	M	F
23	4a 02m	F	B
24	13a 06m	F	B
25	2a 08m	M	F
26	19a 05m	M	B
27	2a 03m	M	B
28	16a 10m	M	B
29	4a 03m	F	B
30	1a 06m	F	B
31	16a 05m	M	B
32	5a 08m	M	B
33	2a 00m	F	B
34	3a 04m	F	B
35	20a 11m	M	B
36	6a 01m	F	B
37	2a 09m	M	B
38	2a 11m	F	B
39	2a 09m	M	B
40	3a 06m	F	B

ANEXO 1. IDADE, SEXO E COR DOS PACIENTES COM LLA

Nº	IDADE	SEXO	COR
41	13a 10m	F	B
42	1a 10m	F	B
43	4a 11m	M	B
44	10a 05m	M	B
45	7a 01m	M	B
46	9a 09m	F	B
47	1a 04m	F	F
48	6a 10m	F	B
49	3a 06m	F	B
50	16a 06m	M	B
51	12a 03m	M	B
52	8a 02m	M	B
53	5a 11m	F	B
54	3a 06m	M	B
55	8a 06m	M	B
56	9a 08m	F	B
57	5a 01m	F	B
58	5a 02m	M	B
59	6a 04m	M	B
60	5a 00m	M	B
61	3a 04m	F	B
62	3a 05m	M	B
63	7a 06m	F	B

ANEXO 2. TAMANHO DOS LINFONODOS, FÍGADO, BAÇO E OUTRAS
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

Nº	Linfonodos		Fígado		Baço		Outros
	<2cm	>2cm	<5cm	>5cm	<5cm	>5cm	
01	X		X		X		
02	X			X		X	
03	X		X		X		
04	X			X		X	
05		X	X		X		
06	X		X			X	
07	X		X		X		SNC
08		X		X		X	
09		X	X			X	Massa Mediastinal
10	X		X			X	
11		X		X		X	
12		X		X		X	
13		X		X		X	Massa Mediastinal
14		X		X		X	Massa Mediastinal
15		X	X			X	
16	X		X		X		
17	X			X		X	
18	X		X		X		
19		X		X	X		
20	X			X	X		
21	X		X		X		
22		X		X		X	Massa Mediastinal
23		X		X		X	
24	X		X		X		
25		X	X		X		
26	X		X		X		
27	X			X		X	
28	X		X		X		
29	X			X		X	Massa Abdominal *
30	X		X		X		
31	X		X		X		
32	X			X	X		
33	X		X			X	
34		X		X		X	
35		X	X		X		
36	X		X			X	
37	X			X	X		
38	X		X		X		
39	X		X		X		
40	X		X		X		

ANEXO 2. TAMANHO DOS LINFONODOS, FÍGADO, BAÇO E OUTRAS
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

Nº	Linfonodos		Fígado		Baço		Outros
	<2cm	>2cm	<5cm	>5cm	<5cm	>5cm	
41	X		X			X	SNC **
42	X		X		X		Massa Abdominal***
43		X		X		X	
44	X		X			X	
45	X		X			X	
46	X			X		X	
47	X		X			X	
48	X		X		X		
49		X		X		X	
50	X			X		X	
51	X		X			X	
52		X		X		X	SNC+Testículo
53	X		X		X		
54		X		X		X	Massa Mediastinal
55		X		X		X	
56	X		X		X		
57	X		X		X		
58	X		X		X		
59	X		X		X		
60	X		X		X		
61	X		X		X		
62		X		X		X	Massa Mediastinal
63	X		X		X		

* Massa abdominal extensa infiltrando fígado.

** Protrusão ocular + hipertrofia gengival + aumento de volume mamário.

*** Massa abdominal infiltrando ovário, sem outras visceromegalias.

ANEXO 3. VALORES HEMATIMÉTRICOS ENCONTRADOS NOS PACIENTES ESTUDIADOS.

Nº	HEMOGLOBINA g/dl	LEUCÓCITOS $\times 10^3/\text{mm}^3$	PLAQUETAS $\times 10^3/\text{mm}^3$	BLASTOS %
01	6.2	9.8	146	0
02	3.7	16.4	15	30
03	3.3	53.2	5	88
04	6.8	24.4	2	55
05	5.6	2.9	23	4
06	9.5	7.4	35	22
07	8.0	184.0	68	90
08	5.9	1.9	20	49
09	8.0	144.8	8	85
10	8.1	2.8	57	1
11	10.0	42.0	33	72
12	8.9	13.3	3	31
13	5.1	154.0	18	91
14	8.9	188.0	3	58
15	7.2	9.5	28	77
16	8.4	8.3	73	21
17	9.4	8.0	42	52
18	5.2	3.2	5	22
19	8.3	8.8	30	8
20	4.9	34.5	2	92
21	6.9	4.0	15	84
22	8.2	171.0	12	98
23	7.9	9.0	280	36
24	6.9	22.9	2	74
25	4.0	71.9	4	75
26	6.9	10.5	11	85
27	4.0	2.7	40	23
28	11.3	1.1	10	57
29	10.5	7.1	390	0
30	10.4	14.9	340	5
31	11.2	1.2	126	6
32	10.6	5.9	9	37
33	4.7	58.7	17	73
34	5.5	169.0	2	86
35	8.1	8.1	132	64
36	7.9	28.2	210	42
37	8.9	10.4	140	71
38	7.1	9.0	5	25
39	6.5	18.8	26	65
40	5.9	47.3	2	80

ANEXO 3. VALORES HEMATIMÉTRICOS ENCONTRADOS NOS PACIENTES ESTUDADOS.

Nº	HEMOGLOBINA g/dl	LEUCÓCITOS $\times 10^9/\text{mm}^3$	PLAQUETAS $\times 10^9/\text{mm}^3$	BLASTOS %
41	9.5	14.1	71	7
42	11.2	11.2	250	0
43	7.0	30.6	5	97
44	7.0	21.1	4	92
45	7.4	17.0	4	80
46	8.5	8.2	27	79
47	7.2	95.5	2	91
48	8.9	4.5	20	12
49	4.4	2.4	40	2
50	8.3	3.5	250	10
51	5.0	27.6	8	62
52	9.9	150.0	34	81
53	7.1	3.8	15	14
54	8.0	288.0	25	87
55	6.6	20.8	22	62
56	8.2	3.6	11	10
57	4.9	214.0	13	89
58	8.2	7.8	81	28
59	9.0	10.9	45	25
60	6.2	3.6	44	54
61	9.5	35.5	270	59
62	6.0	205.0	10	93
63	13.0	39.0	150	30

ANEXO 4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E CITOQUÍMICAS DAS CÉLULAS LEUCÊMICAS DOS PACIENTES ESTUDADOS (N=63).

Nº	CLASSIFICAÇÃO FAB	SCORE*	FAS**	CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA
01	L1	+2	0	NÃO-T
02	L1	+2	+	NÃO-T
03	L2	-3	++	NÃO-T
04	L1	+2	+++	NÃO-T
05	L1	+2	0	NÃO-T
06	L2	-1	+	T
07	L2	-3	+	NÃO-T
08	L1	+2	0	NÃO-T
09	L1	+2	0	T
10	L1	+2	++	NÃO-T
11	L2	-3	0	NÃO-T
12	L1	+1	0	NÃO-T
13	L2	-3	0	NÃO-T
14	L1	+2	+++	T
15	L1	+1	+	COMUM
16	L1	+2	0	COMUM
17	L1	+2	0	INDIFERENCIADA
18	L1	+2	+	COMUM
19	L1	+1	0	COMUM
20	L1	+2	++	COMUM
21	L1	+2	0	COMUM
22	L1	+2	0	T
23	L2	-4	+	INDIFERENCIADA
24	L1	+2	+++	COMUM
25	L1	+2	+	COMUM
26	L1	+2	+	COMUM
27	L1	+2	0	COMUM
28	L1	+1	0	COMUM
29	L1	+1	0	B
30	L2	-3	++	COMUM
31	L1	+1	++	COMUM
32	L1	+1	+++	COMUM
33	L1	+2	++	COMUM
34	L1	+2	+++	T
35	L1	+2	0	INDIFERENCIADA
36	L2	-1	0	INDIFERENCIADA
37	L1	+2	+++	COMUM
38	L1	+2	+	COMUM
39	L1	+2	+++	COMUM
40	L1	+2	++	COMUM

ANEXO 4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E CITOQUÍMICAS DAS CÉLULAS LEUCÊMICAS DOS PACIENTES ESTUDADOS (N=63).

Nº	CLASSIFICAÇÃO FAB	ESCORE*	PAS**	CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA
41	L3		0	T
42	L1	+2	+++	PRÉ-PRÉ-B
43	L1	+2	+++	COMUM
44	L1	+2	0	COMUM
45	L1	+2	0	COMUM
46	L1	+2	+++	COMUM
47	L1	+2	+	COMUM
48	L1	+2	++	COMUM
49	L2	-4	+++	COMUM
50	L2	-3	0	COMUM
51	L1	+2	+++	COMUM
52	L1	+2	+	COMUM
53	L1	+2	++	COMUM
54	L1	+2	+	T
55	L2	-3	++	INDIFERENCIADA
56	L1	+2	+	PRÉ-PRÉ-B
57	L1	+2	+++	COMUM
58	L1	+2	0	INDIFERENCIADA
59	L1	+2	0	COMUM
60	L1	+2	+++	COMUM
61	L1	+1	+	PRÉ-PRÉ-B
62	L1	+2	++	T
63	L2	-3	+	PRÉ-PRÉ-B

* SCORE : L1= 0 a +2
L2=-1 a -4

** PAS : 0= ausência de reação
+= reação fraca
++= reação moderada
+++= reação intensa

ANEXO 5 - MARCADORES IMUNOLÓGICOS DOS PACIENTES ESTUDADOS (N = 63)

Nº	ER	ER	IgS	IgC	Microlinfocitotoxicidade			Imunofluorescência Indireta										Subgrupo de LLA
	49C %	379C %	%	+/-	ANTI-B +/-	ANTI-T +/-	ANTI-DR +/-	CD1 %	CD2 %	CD3 %	CD4 %	CD5 %	CD7 %	CD8 %	CD10 %	CD19 %	DR %	
01	<1	<1	<1	-	-	-	-	1	3	15	6	2	NA	3	<1	<1	3	não-T
02	<1	<1	6	-	NA	NA	NA	1	<1	3	1	11	NA	<1	68	4	28	não-T
03	3	<1	<1	-	-	-	+	15	<1	<1	<1	1	NA	1	2	<1	5	não-T
04	<1	<1	<1	-	-	-	-	<1	<1	4	<1	<1	NA	<1	2	<1	40	não-T
05	1	<1	<1	-	-	-	+	<1	<1	8	<1	1	NA	<1	12	<1	32	não-T
06	45	40	<1	-	-	+	+	2	39	3	2	6	NA	<1	<1	<1	8	T
07	<1	2	<1	-	-	-	+	<1	<1	<1	<1	2	NA	<1	<1	<1	57	não-T
08	<1	<1	<1	-	-	-	+	<1	<1	<1	<1	<1	NA	<1	<1	<1	3	não-T
09	45	60	<1	-	-	+	-	1	38	4	<1	2	NA	5	NA	NA	<1	T
10	2	6	<1	-	-	-	-	1	<1	15	8	NA	NA	3	18	12	22	não-T
11	<1	<1	<1	-	+	-	+	<1	<1	<1	<1	NA	NA	<1	16	1	41	não-T
12	13	12	<1	-	-	-	-	4	2	3	2	6	NA	5	<1	3	64	não-T
13	<1	<1	<1	-	-	-	-	<1	<1	<1	<1	<1	NA	1	<1	NA	<1	não-T
14	<1	<1	<1	-	NA	NA	NA	24	10	12	38	NA	NA	75	17	1	2	T
15	1	<1	<1	-	+	-	+	<1	2	3	2	<1	NA	<1	85	12	79	C
16	<1	<1	<1	-	-	-	+	<1	<1	<1	<1	<1	NA	<1	51	<1	50	C
17	<1	<1	<1	-	-	-	+	<1	<1	4	<1	<1	NA	<1	<1	<1	33	I
18	<1	<1	<1	-	-	-	-	4	17	11	29	9	NA	5	60	49	57	C
19	<1	<1	<1	-	-	-	+	1	3	<1	2	1	NA	<1	85	45	74	C
20	<1	<1	<1	-	-	-	+	<1	<1	1	3	<1	NA	<1	79	4	67	C

ANEXO 5 - MARCADORES IMUNOLÓGICOS DOS PACIENTES ESTUDADOS (N = 63)

Nº	ER	ER	IgS	IgC	Microlinfocitotoxicidade			Imunofluorescência Indireta										Subgrupo de LLA
	40C	370C			ANTI-B	ANTI-T	ANTI-DR	CD1	CD2	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8	CD10	CD19	DR	
	%	%	%	+/-	+/-	+/-	+/-	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
21	<1	1	<1	-	-	-	-	<1	<1	10	7	11	NA	3	72	3	48	C
22	6	5	<1	-	-	-	-	36	3	7	68	1	NA	34	<1	NA	<1	T
23	1	<1	<1	+	-	-	-	2	3	1	1	4	NA	3	15	<1	8	I
24	<1	<1	<1	-	-	-	-	<1	<1	<1	1	<1	NA	<1	49	4	73	C
25	<1	<1	<1	-	-	-	+	<1	<1	<1	<1	1	NA	<1	86	NA	89	C
26	<1	<1	<1	-	+	-	+	<1	<1	<1	<1	<1	NA	<1	49	NA	73	C
27	<1	<1	<1	-	-	-	+	<1	<1	<1	<1	<1	NA	<1	80	56	75	C
28	<1	<1	<1	+	-	-	+	<1	1	<1	<1	1	NA	<1	66	NA	67	C
29	<1	<1	49	+	-	-	-	<1	2	<1	<1	2	NA	1	25	47	81	B
30	2	<1	1	-	-	-	+	<1	2	<1	<1	<1	NA	<1	70	65	74	C
31	1	2	1	-	-	-	+	<1	2	<1	1	<1	NA	<1	84	26	78	C
32	<1	<1	<1	-	+	-	+	1	<1	<1	<1	<1	NA	<1	88	46	80	C
33	<1	<1	<1	-	-	-	+	1	4	8	5	6	NA	9	63	NA	73	C
34	85	68	<1	-	-	+	+	24	30	37	20	<1	NA	17	<1	NA	2	T
35	<1	8	1	-	+	-	+	<1	<1	<1	<1	<1	NA	<1	18	19	89	I
36	<1	<1	<1	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	<1	NA	1	1	NA	I
37	<1	<1	<1	-	-	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	<1	NA	45	75	NA	C
38	<1	<1	<1	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	<1	NA	25	<1	NA	C
39	<1	<1	<1	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	<1	NA	30	10	NA	C
40	3	<1	<1	-	+	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	<1	NA	40	13	NA	C

ANEXO 5 - MARCADORES IMUNOLÓGICOS DOS PACIENTES ESTUDADOS (N = 63)

Nº	ER	ER	IgS	IgC	Microlinfocitotoxicidade			Imunofluorescência Indireta										Subgrupo de LLA
	40C	370C			ANTI-B	ANTI-T	ANTI-DR	CD1	CD2	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8	CD10	CD19	DR	
	%	%	%	+/-	+/-	+/-	+/-	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
41	87	54	<1	-	-	-	-	NA	NA	27	19	NA	32	37	<1	<1	NA	T
42	5	4	<1	-	+	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	<1	NA	10	38	NA	PPB
43	<1	<1	<1	-	-	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	<1	NA	66	53	NA	C
44	<1	<1	<1	-	-	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	12	NA	54	61	NA	C
45	<1	<1	<1	-	+	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	<1	NA	64	58	NA	C
46	<1	<1	<1	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	12	NA	95	56	NA	C
47	<1	<1	<1	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	<1	NA	68	70	NA	C
48	4	<1	<1	-	+	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	4	NA	100	95	NA	C
49	<1	<1	<1	-	-	-	-	NA	NA	2	<1	NA	70	<1	61	52	NA	C
50	<1	<1	<1	-	-	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	3	NA	92	81	NA	C
51	<1	<1	<1	-	-	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	6	NA	58	70	NA	C
52	5	2	<1	-	+	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	5	NA	93	88	NA	C
53	<1	<1	3	-	+	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	15	NA	60	84	NA	C
54	54	32	1	-	NA	NA	NA	NA	73	2	11	NA	77	65	<1	<1	NA	T
55	6	3	2	-	-	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	14	NA	<1	4	NA	I
56	1	<1	<1	-	+	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	10	NA	16	82	NA	PPB
57	<1	<1	<1	-	+	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	<1	NA	90	92	NA	C
58	<1	<1	<1	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	15	NA	<1	<1	NA	I
59	<1	<1	<1	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6	NA	72	48	NA	C
60	<1	<1	<1	-	+	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	<1	NA	33	14	NA	C

ANEXO 5 - MARCADORES IMUNOLÓGICOS DOS PACIENTES ESTUDADOS (N = 63)

Nº	ER	ER	IgS	IgC	Microlinfocitotoxicidade			Imunofluorescência Indireta										Subgrupo de LLA
	49°C	37°C			ANTI-B	ANTI-T	ANTI-DR	CD1	CD2	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8	CD10	CD19	DR	
	%	%	%	+/-	+/-	+/-	+/-	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
61	<1	<1	<1	-	+	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	5	NA	1	43	NA	PPB
62	85	71	1	-	-	+	-	NA	95	14	9	NA	86	61	<1	2	NA	T
63	<1	<1	5	+	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	<1	30	40	PPB

NA= não analisado; I= LLA indiferenciada; C= LLA comum; T= LLA T; B= LLA B; PPB= pré-pré-B

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

001. ABNEY, E.R. ; COOPER, M.D. ; KEARNEY, J.F. ; LAWTON, A.R. & PARKHOUSE, R.M.E. - Sequential expression of immunoglobulin on developing mouse B lymphocytes: a systematic survey that suggest a model for the generation of immunoglobulin isotype diversity. *J. Immunol.* 120:2041-2049, 1978.
002. ACCOLLA, R.S. ; MORETTA, A. & CARREL, S. - The human Ia system: an overview. *Sem. Hematol.* 21:287-295, 1984.
003. AISENBERG, A.C. - Cell-surface markers in lymphoproliferative disease. *N. Engl. J. Med.* 304:331-336, 1981.
004. AIUTI, F. ; CEROTTINI, J. ; COOMBS, R.R.A. ; COOPER, M. ; DICKLER, H.B. ; FROLAND, S. ; FUDENBERG, H.H. ; GREAVES, M.F. ; GREY, H.M. ; KUNKEL, H.G. ; NATVIG, J. ; FREUD'HOMME, J. ; RABELLINO, E. ; RITTS, R.E. ; ROWE, D.S. ; SELIGMANN, M. ; SIEGAL, F.P. ; STJERNSWARD, J. ; TERRY, W.D. & WYBRAN, J. - Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. International Union of Immunological Societies (IUIS). Report - July 1974. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 3:584-597, 1975.
005. AL-KATIB, A. ; WANG, C.Y. ; BARDALES, R. & KOZINER, B. - Phenotypic characterization of "non-T, non-B" acute lymphoblastic leukemia by a new panel (BL) of monoclonal antibodies. *Hematol. Oncol.* 3:271-281, 1985.
006. ALT, F.W. ; BLACKWELL, T.K. & YANCOPOULOS, G.D. - Development of the primary antibody repertoire. *Science* 238:1079-1087, 1987.
007. ALT, F.W. ; BLACKWELL, T.K. ; DePINHO, R.A. ; RETH, M.G. & YANCOPOULOS, G.D. - Regulation of genome rearrangement events during lymphocyte differentiation. *Immunol. Rev.* 87:5-30, 1986.
008. ANDERSON, J.K. & METZGAR, R.S. - Detection and partial characterization of human T and B lymphocyte membrane antigens with antisera to HBS and SB cell lines. *J. Immunol.* 120:262-271, 1978.
009. ARNOLD, A. ; COSSMAN, J. ; BAKHSHI, A. ; JAFFE, E.S. ; WALDMANN, T.A. & KORSMEYER, S.J. - Immunoglobulin gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. *N. Engl. J. Med.* 309:1593-1599, 1983.
010. 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 lymphocytic leukemia. *Cancer* 29:381-391, 1972.

011. AVNSTROM, S. ; RALFKIER, E. ; CLAUSEN, N. ; PLESNER, T. ; HANSEN, N.E. & NISSEN, N.I. - Immunological markers in acute leukaemia. *Scand.J.Haematol.* 34:16-21, 1985.
012. BALAKRISHNAN, K. - Functions of the immune system. In: MACQUEEN, J.M. (ed.). *Tissue typing reference manual*. 2nd ed., Richmond, Virginia, South-Eastern Organ Procurement Foundation - SEOPT, 1987, p. 7-12.
013. BARRETT, J.T. (ed.) - Radioimmunoassay, enzyme immunoassay and other binding reactions. In: *Textbook of Immunology. An introduction to immunochemistry and immunobiology*. 4th ed., St. Louis, The C.V. Mosby Co., 1983, p. 280-286.
014. BARRETT, S.G. ; SCHWADE, J.G. ; RANKEN, R. & KADIN, M.E. - Lymphoblasts with both T and B markers in childhood leukemia and lymphoma. *Blood* 50:71-79, 1977.
015. BASSO, G. ; CAPUZZO, F. ; SIMIONI, I. ; DESTRO, R. ; GAZZOLA, M.V. ; COCITO, M.G. ; COZZI, M. ; MILANESI, C. ; PUTTI, M.C. ; CARLI, M. & ZANESCO, L. - Immunocytochemical evidence of common-ALL antigen in null-ALL. *Scand.J.Haematol.* 35:536-542, 1985.
016. BÉLPOMME, D. ; BORELLA, L. ; BRAYLAN, R. ; GREAVES, M.F. ; HERBERMAN, R. ; HITZIG, W. ; KERSEY, J. ; PETROV, R. ; RITTS, R. ; SELIGMANN, M. ; SOBIN, L. ; THIERFELDER, S. & TORRIGIANI, G. - Immunological diagnosis of leukaemia and lymphoma: a World Health Organization /International Union of Immunological Societies technical report. *Brit.J.Haematol.* 38:85-98, 1978.
017. BÉLPOMME, D. ; MATHÉ, G. & DAVIES, A.J.S. - Clinical significance and prognostic value of the T-B immunological classification of human primary acute lymphoid leukaemias. *Lancet* i:555-558, 1977.
018. BEN-EZRA, J. ; WINBERG, C.D. ; WU, A. & RAPPAPORT, H. - Leu-9 (CD7) positivity in acute leukemias: a marker of T-cell lineage? *Hematologic Pathology* 1:147-156, 1987.
019. BENNETT, J.M. ; CATOVSKI, D. ; DANIEL, M.T. ; FLANDRIN, G. ; GALTON, D.A.G. ; GRALNICK, H.R. & SULTAN, C. - The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. *Brit.J.Haematol.* 47:553-561, 1981.
020. BENNETT, J.M. ; CATOVSKI, D. ; DANIEL, M.T. ; FLANDRIN, G. ; GALTON, D.A.G. ; GRALNICK, H.R. & SULTAN, C. - Proposals

for the classification of the acute leukaemias. *Brit.J.Haematol.* 33:451-458,1976.

021. BENNETT, J.M. & REED, C.E. - Acute leukemia cytochemical profile: diagnostic and clinical implications. *Blood cells* 1:101-108, 1975.
022. BERNARD, A. ; BOUMSELL, L.; REINHERZ, E.L.; NADLER, L.M.; RITZ, J.; COPPIN, H.; RICHARD, Y.; VALENSI, F.; DAUSSET, J.; FLANDRIN, G.; LEMERLE, J. & SCHLOSSMAN, S.F. - Cell surface characterization of malignant T cells from lymphoblastic lymphoma using monoclonal antibodies: evidence for phenotypic differences between malignant T cells from patients with acute lymphoblastic leukemia and lymphoblastic lymphoma. *Blood* 57:1105-1110, 1981.
023. BILLING, R.J. ; FOON, K.A. & LINKER-ISRAELI, M. - The immunological classification of leukaemia based on a rapid microcytotoxicity test. *Clin.Exp.Immunol.* 49:142-148, 1982.
024. BILLING, R.J.; CLARK, W. & TERASAKI, P.I. - Heteroantiserum against a subpopulation of human T lymphocytes. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 13:85-91, 1979.
025. BLEYER, W.A. - Central nervous system leukemia. *Fed. Clin. North Am.* 35:789-814, 1988.
026. BLEYER, W.A.; SATHER, H.; COCCIA, P.; LUKENS, J.; SIEGEL, S. & HAMMOND, G.D. - The staging of childhood acute lymphoblastic leukemia: strategies of the childrens cancer study group and a three-dimensional technic of multivariate analysis. *Med.Fed.Oncol.* 14: 271-280, 1986.
027. BLOOMFIELD, C.D. ; LINDQUIST, L.L. ; ARTHUR, D. ; MCKENNA, R.W.; LeBIEN, T.W.; PETERSON, B.A. & NESBIT, M.E. - Chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 41:4838-4843, 1981.
028. BOESEN, A.M.; ELLEGAARD, J.; HOKLAND, P. & LASSEN, L.B. - Subclassification in acute lymphoblastic leukaemia: acid phosphatase reaction and immunological markers in relation to clinical features. *Scand.J.Haematol.* 27: 87-98, 1981.
029. BOLLUM, F.J. - Terminal deoxynucleotidyl transferase as a hematopoietic cell marker. *Blood* 54:1203-1215, 1979.
030. BORELLA, L.; SEN, L.; CASPER, J.T. - Acute lymphoblastic leukemia (ALL) antigens detected with antisera to E rosette-forming and non-E rosette-forming ALL blasts. *J.Immunol.* 118:309-315, 1977.
031. BORELLA, L. & SEN, L. - E-receptors on blasts from

- untreated lymphocytic leukemia (ALL): comparison of temperature dependence of E-rosettes formed by normal and leukemic lymphoid cells. *J. Immunol.* *114*: 187-190, 1975.
032. BORELLA, L. & SEN, L. - T cell surface markers on lymphoblasts from acute lymphocytic leukemia. *J. Immunol.* *111*: 1257-1260, 1973.
033. BOROWITZ, M. J.; DOWELL, B. L.; BOYETT, J. M.; FALLETTA, J. M.; PULLEN, D. J.; CRIST, W. M.; HUMPHREY, G. B. & METZGAR, R. S. - Monoclonal antibody definition of T cell acute leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* *65*: 785-788, 1985.
034. BOWMAN, W. P.; MELVIN, S. L.; AUR, R. J. A. & MAUER, A. M. - A clinical perspective on cell markers in acute lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* *41*: 4794-4801, 1981.
035. BOYUM, A. - Ficoll-Hypaque separation cells. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* *21*(Suppl. 97): 51-76, 1968.
036. BRESLOW, N. E. & LANGHOLZ, B. - Childhood cancer incidence: geographical and temporal variations. *Intern. J. Cancer* *32*: 703-716, 1983.
037. BROUET, J. C. ; PREUD'HOMME, J. L. ; FENIT, C. ; VALENSI, F. ; ROUGET, P. & SELIGMANN, M. - Acute lymphoblastic leukemia with pre-B-cell characteristics. *Blood* *54*: 269-273, 1979.
038. BROUET, J. C. & SELIGMANN, M. - The immunological classification of acute lymphoblastic leukemias. *Cancer* *42*(Suppl 6): 817-827, 1978.
039. BROUET, J. C. ; VALENSI, F. ; DANIEL, M. T. ; FLANDRIN, G. ; PREUD'HOMME, J. L. & SELIGMANN, M. - Immunological classification of acute lymphoblastic leukaemias: evaluation of its clinical significance in a hundred patients. *Brit. J. Haematol.* *33*: 319-328, 1976.
040. BROWMAN, G. P. ; NEAME, P. B. & SOAMBOONSRUP, P. - The contribution of cytochemistry and immunophenotyping to the reproducibility of the FAB classification in acute leukemia. *Blood* *68*: 900-905, 1986.
041. BUDOWLE, B.; DEARTH, J.; BOWMAN, P.; MELVIN, S.; CRIST, W.; GO, R.; KIM, T.; IYER, R.; ROSEMAN, J.; BARGER, B. & ACTON, R. - Genetic predisposition to acute lymphocytic leukemia in american blacks. *Cancer* *55*: 2880-2882, 1985.
042. BURNET, M. F. - The clonal selection theory of immunity. Nashville, Tenn., Vanderbilt University Press, 1959. /citado por/ CALVERT et al. op.cit. N° 043.

043. CALVERT, J.E. ; MARUYAMA, S. ; TEDDER, T.F. ; WEBB, C.F. & COOPER, M.D. - Cellular events in the differentiation of antibody-secreting cells. *Sem. Hematol.* 21:226-243, 1984.
044. CARREL, S. ; BUCHEGGER, F. ; HEUMANN, D. ; GIRARDET, C. ; BARRAS, C. ; LOSA, G. ; MACH, J-P. & FLIEDNER, V. von - Detection of the common acute lymphoblastic leukemia antigen in the serum of leukemia patients. *J. Clin. Invest.* 74:1882-1885, 1984.
045. CATOVSKI, D. ; GREAVES, M.F. ; PAIN, C. ; CHERCHI, M. ; JANOSSY G. & KAY, H.E.M. - Acid-phosphatase reaction in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* :749-751, 1978.
046. CATOVSKI, D. - T-cell origin of acid-phosphatase-positive lymphoblasts. *Lancet* 2:327-328, 1975.
047. CATOVSKI, D. ; GALETTO, J. ; OKOS, A. ; MILIANI, E. & GALTON, A.G. - Cytochemical profile of B and T leukaemic lymphocytes with special reference to acute lymphoblastic leukaemia. *J. Clin. Pathol.* 27: 767-771, 1974.
048. CHAN, L.C. ; PEGRAM, S.M. & GREAVES, M.F. - Contribution of immunophenotype to the classification and differential diagnosis of acute leukaemia. *Lancet* 1:475-479, 1985.
049. CHESSELLS, J.M. - Acute leukaemia in children. *Clin. Haematol.* 15:727-753, 1986.
050. CHESSELLS, J.M. - Acute lymphoblastic leukemia. *Sem. Hematol.* 19:155-171, 1982.
051. CHILDS, C.C. ; STASS, S.A. & BENNETT, J.M. - The morphologic classification of acute lymphoblastic leukemia in childhood. Observations on concordance using a simple scoring system. *Am. J. Clin. Pathol.* 86:503-506, 1986.
052. CLAMAN, H.N. - The biology of the immune response. *Jama* 258(20):2834-2840, 1987.
053. COOPER, M.D. - Pre-B cells: normal and abnormal development. *J. Clin. Immunol.* 1:81-89, 1981.
054. CRIST, W.M. ; FURMAN, W. ; STROTHER, D. & FUI, C-H. - Acute lymphocytic leukemia in childhood: immunologic marker, cytogenetic and molecular studies. *South. Med. J.* 80:841-847, 1987.
055. CRIST, W. ; PULLEN, J. ; BOYETT, J. ; FALLETTA, J. ; EYS, J. van ; BOROWITZ, M. ; JACKSON, J. ; DOWELL, B. ; FRANKEL, L. ; QUDDUS, F. ; RAGAB, A. & VIETTI, T. - Clinical and biological features predict a poor prognosis in acute

- lymphoid leukemias in infants: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 67:135-140, 1986.
056. CRIST, W.M.; GROSSI, C.E.; PULLEN, D.J. & COOPER, M.D. - Immunologic markers in childhood acute lymphocytic leukemia. *Sem.Oncol.* 12:105-121, 1985.
057. CRIST, W.; BOYETT, J.; ROPER, M.; PULLEN, J.; METZGAR, R.; EYS, J. van; RAGAB, A.; STARLING, K.; VIETTI, T. & COOPER, M. - Pre-B cell leukemia responds poorly to treatment: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 63:407-414, 1984.
058. DAVIES, J.N.P. - Some variations in childhood cancers throughout the world. In: MARSDEN, H.B. & STEWARD, J.K. (eds.). *Tumours in children*. Berlin, Springer Verlag, 1973, p. 28-58.
059. DePINHO, R.A.; FELDMAN, L.B. & SCHARFF, M.D. - Tailor-made monoclonal antibodies. *Ann.Int.Med.* 104:225-233, 1986.
060. DINARELLO, C.A. & MIER, J.W. - Lymphokines. *N.Engl.J.Med.* 317:940-945, 1987.
061. DINNDORF, P.A. & REAMAN, G.H. - Acute lymphoblastic leukemia in infants: evidence for B cell origin of disease by use of monoclonal antibody phenotyping. *Blood* 68:975-978, 1986.
062. DONGEN, J.J.M. van ; QUERTERMOUS, T. ; BARTRAM, C.R.; GOLD, D.P.; WOLVERS-TETTERO, I.L.M.; COMANS-BITTER, W.M.; HOODIJKAS, H.; ADRIAANSEN, H.J.; KLEIN, A. de; RAGHAVACHAR, A.; GANSER, A.; DUBY, A.D.; SEIDMAN, J.G.; ELSEN, P. van den & TERHORST, C. - T cell receptor -CD3 complex during early T cell differentiation. Analysis of immature T cell acute lymphoblastic leukemias (T-ALL) at DNA, RNA, and cell membrane level. *J.Immunol.* 138:1260-1269, 1987.
063. DORLHIAC LLACER, P.E. - Marcadores imunológicos de superfície e caracteres citoquímicos das células blásticas nas leucemias agudas linfoblásticas. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, 1983, p.1-91.
064. DORKEN, B. & MOLDENHAUER, G. - Phenotypic analysis of the Third International Workshop B-cell panel. In: McMICHAEL, A.J. (ed). *Leukocyte typing III - White cell differentiation antigens*. Oxford, Oxford University Press, 1986, p.369-373
065. DOW, L.W. ; MARTIN, P. ; MOOHR, J. ; GREENBERG, M.; Mac DOUGALL, L.G.; NAJFELD, V. & FIALKOW, P.J. - Evidence for clonal development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 66:902-907, 1985.

066. DOW, L.W.; BORELLA, L.; SEN, L.; AUR, R.J.A.L. GEORGE, S.L.; MAUER, A.M. & SIMOME, J.V. - Initial prognostic factors and lymphoblast-erythrocyte rosette formation in 109 children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 50:671-682, 1977.
067. DOWELL, B.L. ; BOROWITZ, M.J. ; BOYETT, J.M.; PULLEN, D.J.; CRIST, W.M.; QUDDUS, F.F.; RUSSELL, E.C.; FALLETTA, J.M. & METZGAR, R.S. - Immunologic and clinicopathologic features of common acute lymphoblastic leukemia antigen-positive childhood T-cell leukemia. *Cancer* 59:2020-2026, 1987.
068. EVANS, A.E.; GILBERT, E.S. & ZANDSTRA, R. - The increasing incidence of central nervous system leukemia in children (Children's Cancer Study Group A). *Cancer* 26:404-409, 1970.
069. EYS, J. van ; PULLEN, J. ; HEAD, D.; BOYETT, J.; CRIST, W.; FALLETTA, J.; HUMPHREY, G.B.; JACKSON, J.; RICCARDI, V. & BROCK, B. - The French-American-British (FAB) classification of leukemia. The Pediatric Oncology Group experience with lymphocytic leukemia. *Cancer* 57:1046-1051, 1986.
070. FARBER, S.; DIAMOND, L.K.; MERCER, R.S.; SILVESTER, R.F. & WOLFF, J.A. - Temporary remission in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). *N. Engl. J. Med.* 238:787-793, 1948./citado por/ LAMPERT et al. op.cit. N° 134.
071. FINDLEY, H.W., Jr.; COOPER, M.D.; KIM, T.H.; ALVARADO, C. & RAGAB, A.H. - The new acute lymphoblastic leukemia cell lines with early B-cell phenotypes. *Blood* 60:1305-1309, 1982.
072. FISHLEDER, A.J. ; TUBBS, R.R. ; SAVAGE, R.A.; LUCAS, F.V.; NORRIS, D.; WEICK, J.K. & VALENZUELA, R. - Immunophenotypic characterization of acute leukemia by immunocytology. *Am. J. Clin. Pathol.* 81:611-617, 1984.
073. FLANDRIN, G.; BROUET, J.C.; DANIEL, M.T. & PREUD'HOMME, J.L. - Acute leukemia with Burkitt's tumor cells: a study of six cases with special reference to lymphocyte surface markers. *Blood* 45:183-188, 1975.
074. FOA, R. ; CAPPIO, F.C. ; CAMPANA, D. ; FIERRO, M.T. ; BERGUI, L.; GIUBELLINO, M.C. & LUSSO, P. - Relevance of monoclonal antibodies in the diagnosis of unusual T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Scand. J. Haematol.* 30:303-307, 1983.
075. FOON, K.A. & TODD, III, R.F. - Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 68:1-31, 1986.

076. FOON, K.A.; GALE, R.P. & TODD, III, R.F. - Recent advances in the immunologic classification of leukemia. *Sem.Hematol.* 23:257-283, 1986.
077. FOON, K.A.; SCHROFF, R.W. & GALE, R.P. - Surface markers on leukemia and lymphoma cells: recent advances. *Blood* 60:1-19, 1982.
078. FOON, K.A.; HERZOG, P.; BILLING, R.J.; TERASAKI, P.I. & FEIG, S.A. - Immunologic classification of childhood acute lymphocytic leukemia. *Cancer* 47:280-284, 1981.
079. FOON, K.A.; BILLING, R.J.; TERASAKI, P.I. & CLINE, M.J. - Immunologic classification of acute lymphoblastic leukemia. Implications for normal lymphoid differentiation. *Blood* 56:1120-1126, 1980.
080. FOON, K.A.; BILLING, R.J. & TERASAKI, P.I. - Dual B and T markers in acute and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 55:16-20, 1980.
081. FRAM, R.J.; SKARIN, A.T.; ROSENTHAL, D.S.; PINKUS, G. & NADLER, L.M. - Clinical, pathologic and immunologic features of patients with non-Hodgkin's lymphoma in a leukemic phase. A retrospective analysis of 34 patients. *Cancer* 52:1220-1228, 1983.
082. FREI, III, E.; HOLLAND, J.P.; SCHNEIDERMAN, M.A.; PINKEL, D.; SELKIRK, G.; FREIREICH, E.J.; SILVER, R.T.; GOLD, G.L. & REGELSON, W. - A comparative study of two regimens of combination chemotherapy in acute leukemia. *Blood* 13:1126-1148, 1958.
083. GAJL-PECZALSKA, K.J.; BLOOMFIELD, C.D.; NESBIT, M.E. & KERSEY, J.H. - B-Cell markers on lymphoblasts in acute lymphoblastic leukemia. *Clin.Exp.Immunol.* 17:561-67, 1974.
084. GEHAN, E.A.; SMITH, T.L.; FREIREICH, E.J.; BODEY, G.; RODRIGUEZ, V.; SPEER, J. & MCCREDIE, K. - Prognostic factors in acute leukemia. *Sem.Oncol.* 3:271-282, 1976.
085. GOLDIE, J.H. & COLDMAN, A.J. - The genetic origin of drug resistance in neoplasms: implications for systemic therapy. *Cancer Res.* 44:3643-3653, 1984.
086. GRALNICK, H.R.; GALTON, D.A.G.; CATOVSKI, D.; SULTAN, C. & BENNETT, J.M. - Classification of acute leukemia. *Ann.Int.Med.* 87:740-753, 1977.
087. GREAVES, M.F. & CHAN, L.C. - Is spontaneous mutation the major "cause" of childhood acute lymphoblastic leukaemia? The paucity of evidence for environmental and genetic factors in acute lymphoblastic leukaemia. *Brit.J.Haematol.* 64:1-13, 1986.

088. GREAVES, M.F. ; CHAN, L.C. ; FURLEY, A.J.W. ; WATT, S.M. & MOLGAARD, H.V. - Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia. *Blood* 67:1-11, 1986.
089. GREAVES, M.F. ; MIZUTANI, S. ; FURLEY, A.J.W. ; SUTHERLAND, D.R. ; CHAN, L.C. ; FORD, A.M. & MOLGAARD, H.V. - Differentiation-linked gene rearrangement and expression in acute lymphoblastic leukaemia. *Clin. Haematol.* 15:621-639, 1986.
090. GREAVES, M.F. ; PEGRAM, S. & CHAN, L.C. - Collaborative group study of the epidemiology of acute lymphoblastic leukemia subtypes: background and first report. *Leuk. Res.* 9:715-733, 1985.
091. GREAVES, M.F. - Phenotypic heterogeneity and the origins of lymphoid malignancy in man: biological and clinical implications. In: WEISSMAN, I.L. (ed.). *Leukemia*, New York, Springer Verlag, 1985, p.95-110.
092. GREAVES, M.F. ; DELIA, D. ; KATZ, F. ; SCHNEIDER, C. ; NEWMAN, R. & SUTHERLAND, R. - Biological diversity of acute lymphoblastic leukemia. In: MURPHY, S.B. & GILBERT, J.R. (eds.). - *Leukemia research: advances in cell biology and treatment*. N.Y., Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1983, p.97-116.
093. GREAVES, M.F. - Analysis of the clinical and biological significance of lymphoid phenotypes in acute leukemia. *Cancer Res.* 41:4752-4766, 1981.
094. GREAVES, M.F. ; RAO, J. ; HARIRI, G. ; VERBI, W. ; CATOVSKI, D. ; KUNG, P. & GOLDSTEIN, G. - Phenotypic heterogeneity and cellular origins of T cell malignancies. *Leuk. Res.* 5:281-299, 1981.
095. GREAVES, M.F. ; JANOSSY, G. ; PETO, J. & KAY, H. - Immunologically defined subclasses of acute lymphoblastic leukaemia in children: their relationship to presentation features and prognosis. *Brit. J. Haematol.* 48:179-197, 1981.
096. GREAVES, M.F. ; BROWN, G. ; RAPSON, N.T. & LISTER, T.A. - Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 4:67-84, 1975.
097. GRUFFERMAN, S.L. & DELZELL, E. - Epidemiology of Hodgkin's disease. *Epidemiol. Rev.* 6:76-106, 1984.
098. GUNZ, F.W. - Leukemia in the past. In: DAMESHEK, W. & GUNZ, F.W. (eds.). *Leukemia*, 4th ed., New York, Grune & Stratton, 1983, p.3-11.
099. GUPTA, S. & GOOD, R.A. - Markers of human lymphocyte subpopulations in primary immunodeficiency and

- lymphoproliferative disorders. *Sem.Hematol.* 17:1-29, 1980.
100. HA,K.; HOZUMI,N.; HRINCU,A. & GELFAND,E.W. - Lineage specific classification of leukemia: results of the analysis of sixty cases of childhood leukaemia. *Brit.J.Haematol.* 61:237-249, 1985.
 101. HA,K.; MINDEN,M.; HOZUMI,N. & GELFAND,E.W. - Phenotypic heterogeneity at the DNA level in childhood leukemia with a mediastinal mass. *Cancer* 56:509-513, 1985.
 102. HA,K.; MINDEN,M.; HOZUMI,N. & GELFAND,E.W. - Immunoglobulin Mu chain gene rearrangement in a patient with T cell acute lymphoblastic leukemia. *J.Clin. Invest.* 73:1232-1236, 1984.
 103. HARDEN,E.A. & HAYNES,B.F. - Phenotypic and functional characterization of human malignant T cells. *Sem.Hematol.* 22:13-26, 1985.
 104. HARDISTY,R.M.; TILL,M.M. & PETO,J. - Acute lymphoblastic leukaemia: four-year survivals old and new. *J.Clin.Pathol.* 34:249-253, 1981.
 105. HAYHOE,F.G.J. & CAWLEY,J.C. - Acute leukaemia: cellular morphology, cytochemistry and fine structure. *Clin.Haematol.* 1:49-94, 1972.
 106. 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. /citado por/ R.C.RIBEIRO op.cit. Nº 211.
 107. HEAD,D.R.; SAVAGE,R.A.; CEREZO,L.; CRAVEN,C.M.; BICKERS J.N.; HARTSOCK,R.; HOSTY,T.A.; SAIKI,J.H.; WILSON, H.E.; MORRISON,F.S.; COLTMAN,C.A.Jr. & HUTTON,J.J. - Reproducibility of the French-American-British classification of acute leukemia: the Southwest Oncology Group experience. *Am.J.Hematol.* 18:47-57, 1985.
 108. HEAD,D.R.; CEREZO,L.; SAVAGE,R.A.; CRAVEN,C.M.; BICKERS J.N.; HARTSOCK,R.; HOSTY,T.A.; SAIKI,J.H.; WILSON, H.E.; MORRISON,F.S.; COLTMAN,C.A.Jr. & HUTTON,J.J. - Institutional performance in application of the FAB classification of acute leukemia. The Southwest Oncology Group experience. *Cancer* 55:1979-1986, 1985.
 109. HERRMANN,F. ; SIEBER,G. ; KOMISCHKE,B. ; DESTREICH,R. & RUHL,H. - T-ALL related to intermediate cortical/medullary thymocytes displaying functional and surface characteristics of supressor T cells. *Acta Haematol.* 71:1-7, 1984.

110. HIRT, A. ; CARREL, S. ; FORSTER, H.K. ; BAUMGARTNER, C. ; IMBACH, P. ; SIGNER, E. & WAGNER, H.P. - Reactivity of monoclonal antibodies LAU-A1 and anti-Y 29/55 in T and B cell malignancies of children: correlation with immunological markers and clinical data. *Acta Haematol.* 76:9-15, 1986.
111. HIRT, A. ; BAUMGARTNER, C. ; IMBACH, P. ; LUETHY, A & WAGNER, H.P. - Differentiation and cytokinetic analyses of normal and neoplastic lymphoid cells in B and T malignancies of childhood. *Brit. J. Haematol.* 58:241-248, 1984.
112. HOFFBRAND, A.V. & JANOSSY, G. - Enzyme and membrane markers in leukaemia: recent developments. *J. Clin. Pathol.* 34:254-262, 1981.
113. HSU, C.C.S. & MORGAN, E.R. - Indirect immunofluorescent assays for acute lymphoblastic leukemia (ALL) cell-associated antigen. Elimination of nonspecific fluorescent stain on lymphoid cells. *Am. J. Clin. Pathol.* 73:633-638, 1980.
114. HUHN, D. ; THIEL, E. ; RODT, H. & ANDREEWA, P. - Cytochemistry and membrane markers in acute lymphatic leukaemia (ALL). *Scand. J. Haematol.* 26: 311-320, 1981.
115. HUSTU, H.O. & AUR, R.J.A. - Extramedullary leukaemia. *Clin. Haematol.* 7:313-337, 1978.
116. HUSTU, H.O. ; AUR, R.J.A. ; VERZOSA, M.S. ; SIMONE, J.V. ; & PINKEL, D. - Prevention of central nervous system leukemia by irradiation. *Cancer* 32:585-597, 1973.
117. HUTCHINSON, R.E. ; KUREC, A.S. ; DUBOWY, R.L. & DAVEY, F.R. - T6 monoclonal antibody reacts with blasts from cases of common antigen acute lymphocytic leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 88:83-86, 1987.
118. HUTTON, J.J. ; COLEMAN, M.S. ; MOFFITT, S. ; GREENWOOD, M.F. ; HOLLAND, P. ; LAMPKIN, B. ; KISKER, T. ; KRILL, C. ; KASTELIC, J.E. ; VALDEZ, L. & BOLLUM, F.J. - Prognostic significance of terminal transferase activity in childhood acute lymphoblastic leukemia: a prospective analysis of 164 patients. *Blood* 60:1267-1276, 1982.
119. ISHII, Y. ; FUJIMOTO, J. ; KON, S. ; OGASAWARA, M. ; KOSHIBA, H. ; MIKUNI, C. & KIKUCHI, K. - Surface antigenic phenotypes of human T-cell leukemia corresponding to those of post-thymic T cells. *Am. J. Hematol.* 12:251-260, 1982.
120. JAFFE, E.S. - Antigens related to lymphomas and leukemias. In: GHOSH, B.C. & GHOSH, L. (eds.). *Tumor markers and tumor-associated antigens.* McGraw Hill, Inc., 1987, p.286-312.

121. KADIN, M.E. & BILLING, R.J. - Immunofluorescent method for positive identification of null-cell type acute lymphocytic leukemias: use of heterologous antiserum. *Blood* 50:771-782, 1977.
122. KAMPS, W.A. & HUMPHREY, G.B. - Heterogeneity of childhood acute lymphoblastic leukemia - impact on prognosis and therapy. *Sem. Oncol.* 12:268-280, 1985.
123. KAPLAN, J.; RAVINDRANATH, Y. & PETERSON, W.D., Jr. - T and B lymphocyte antigen-positive null cell leukemias. *Blood* 49:371-378, 1977.
124. KAPLOW, L.S. - Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. *Blood* 26:215-219, 1965. /citado por/ R.C.RIBEIRO op.cit. Nº 211.
125. KERSEY, J.; ABRAMSON, C.; PERRY, G.; GOLDMAN, A.; NESBIT, M.; GAJL-PECZALSKA, K. & LeBIEN, T. - Clinical usefulness of monoclonal antibody phenotyping in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2:1419-1423, 1982.
126. KNOWLES, II, D.M. ; HALPER, J.P. ; AZZO, W. & WANG, C.Y. - Reactivity of monoclonal antibodies Leu 1 and OKT1 with malignant human lymphoid cells. Correlation with conventional cell markers. *Cancer* 52:1369-1377, 1983.
127. KNOWLES, II, D.M. & HALPER, J.O. - Human T-cell malignancies. Correlative clinical, histopathologic, immunologic and cytochemical analysis of 23 cases. *Am. J. Pathol.* 106:187-203, 1982.
128. KOHLER, G. & MILSTEIN, C. - Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497, 1975.
129. KOMADA, Y.; AZUMA, E.; TANAKA, S.; OCHIAI, H. & SAKURAI, M. - Immunological subclassification of non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Scand. J. Haematol.* 36:85-91, 1986.
130. KORSMEYER, S.J. & WALDMANN, T.A. - Immunoglobulin genes: rearrangement and translocation in human lymphoid malignancy. *J. Clin. Immunol.* 4:1-11, 1984.
131. KORSMEYER, S.J. ; ARNOLD, A. ; BAKSHI, A. ; RAVETCH, J.V. ; SIEBENLIST, U. ; HIETER, P.A. ; SHARROW, S.O. ; LeBIEN, T.W. ; KERSEY, J.H. ; POPLACK, D.G. ; LEDER, P. & WALDMANN, T.A. - Immunoglobulin gene rearrangement and cell surface antigen expression in acute lymphocytic leukemias of T cell and B cell precursor origins. *J. Clin. Invest.* 71:301-313, 1983.
132. KOZINER, B. ; GEBHARD, D. ; DENNY, T. ; MCKENZIE, S. ; CLARKSON B.D. ; MILLER, D.A. & EVANS, R.L. - Analysis of T-cell

- differentiation antigens in acute lymphatic leukemia using monoclonal antibodies. *Blood* 60:752-757, 1982.
133. KUBAGAWA, H.; MAYUMI, M.; GATHINGS, W.E.; KEARNEY, J.F. & COOPER, M.D. - Extent of clonal involvement in B-cell malignancies. In: MURPHY, S.B. & GILBERT, J.R. (eds.). *Leukemia research: advances in cell biology and treatment*. N.Y., Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1983, p.65-75.
 134. LAMPERT, F. ; HENZE, G. ; LANGERMANN, H-J.; SCHELLONG, G.; GADNER, H. & RIEHM, H-J. - Acute lymphoblastic leukemia: current status of therapy in children. *Recent Results in Cancer Research* 93:159-181, 1984.
 135. LANHAM, G.R.; KALWINSKI, D.K. & WILLIAMS, D. - PAS stain has no prognostic value in childhood ALL. *Blood* 62: 176, 1983.
 136. LAUER, S.; CASPER, J.T.; BORELLA, L.D. - Immunodiagnosis of childhood ALL: problems associated with the use of peripheral blood alone. *Med. Ped. Oncol.* 6:157-162, 1979.
 137. LAURENCE, J. - Lymphocyte markers in health and disease. *Disease-a-Month* :1-69, 1984.
 138. LAURIE, H.C. - Duration of remissions in lymphoblastic leukaemia of childhood. *Brit. Med. J.* 2:95-97, 1968.
 139. LAWTON, A.R.; SELF, K.S. & ROYAL, S.A. - Ontogeny of B-lymphocytes in the human fetus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1:84-93, 1972.
 140. LeBIEN, T.W.; BOUÉ, D.R.; BRADLEY, J.G. & KERSEY, J.H. - Antibody affinity may influence antigenic modulation of the common acute lymphoblastic leukemia antigen *in vitro*. *J. Immunol.* 129:2287-2292, 1982.
 141. LeBIEN, T.W.; MCKENNA, R.W.; ABRAMSON, C.S.; GAJL-PECZALSKA, K.J.; NESBIT, M.E.; COCCIA, P.F.; BLOOMFIELD, C.D.; BRUNNING, R.D. & KERSEY, J.H. - Use of monoclonal antibodies, morphology, and cytochemistry to probe the cellular heterogeneity of acute leukemia and lymphoma. *Cancer Res.* 41:4776-4780, 1981.
 142. LI, C-Y. - Immunocytochemical techniques for identifying leukemias. *Mayo Clin. Proc.* 59:185-188, 1984.
 143. LILLEYMAN, J.S. ; HANN, I.M. ; STEVENS, R.F.; EDEN, O.B. & RICHARDS, S.M. - French American British (FAB) morphological classification of childhood lymphoblastic leukaemia and its clinical importance. *J. Clin. Pathol.* 39:998-1002, 1986.
 144. LINK, M. ; WARNKE, R. ; FINLAY, J.; AMYLDON, M.; MILLER, R.;

- DILLEY, J. & LEVY, R. - A single monoclonal antibody identifies T-cell lineage of childhood lymphoid malignancies. *Blood* 62:722-728, 1983.
145. LOOK, A.T. - The cytogenetics of childhood leukemia: clinical and biologic implications. *Ped. Clin. North Am.* 35:723-741, 1988.
146. LOOK, A.T. - The emerging genetics of acute lymphoblastic leukemia: clinical and biologic implications. *Sem. Oncol.* 12:92-104, 1985.
147. LUDWIG, W-D. ; BARTRAM, C.R. ; RITTER, J. ; RAGHAVACHAR, A. ; HIDDENMANN, W. ; HEIL, G. ; HARBOTT, J. ; SEIBT-JUNG, H. ; TEICHMANN, J.V. & RIEHM, H. - Ambiguous phenotypes and genotypes in 16 children with acute leukemia as characterized by multiparameter analysis. *Blood* 71:1518-1528, 1988.
148. 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.* 90:461-484, 1978.
149. MacDONALD, H.R. & MORETTA, L. - The definition of lymphocyte subpopulations: new approaches to an old problem. *Sem. Hematol.* 21:223-225, 1984.
150. MacMAHON, B. & KOLLER, E.K. - Ethnic differences in the incidence of leukemia. *Blood* 12:1-10, 1957.
151. MAGRATH, I.T. ; O'CONNOR, G.T. & RAMOT, B. eds. *Pathogenesis of leukemias and lymphomas: environmental influences*. New York, Raven Press, 1984. /citado por/ M.F. GREAVES et al. op.cit. N° 87.
152. MAHEU, M. ; BAKER, M.A. ; FALK, J.A. & TAUB, R.N. - Immunologic diagnosis and monitoring of human acute leukemias. *Am. J. Pathol.* 103:139-158, 1981.
153. MASERA, G. ; CARNELLI, V. ; FERRARI, M. ; RECCHIA, M. & BELLINI, F. - Prognostic significance of radiological bone involvement in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Arch. Dis. Child.* 52:530-533, 1977.
154. MATSUZAKI, H. ; HARUTA, Y. ; FUKUKAWA, T. ; BARCOS, M.P. & SEON, B.K. - Unique epitopes of common acute lymphoblastic leukemia antigen detected by new monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 47:2160-2166, 1987.
155. MATUTES, E. ; OLIVEIRA, M.P. de ; FORONI, L. ; MORILLA, R. & CATOVSKI, D. - The role of ultrastructural cytochemistry and monoclonal antibodies in clarifying the nature of undifferentiated cells in acute leukaemia.

Brit. J. Haematol. 69:205-211, 1988.

156. MATUTES, E. ; PARREIRA, A. ; FOA, R. & CATOVSKI, D. - Monoclonal antibody OKT17 recognizes most cases of T-cell malignancy. *Brit. J. Haematol.* 61:649-656, 1985.
157. MAYUMI, M. ; KURITANI, T. ; KUBAGAWA, H. & COOPER, M. D. - IgG subclass expression by human B lymphocytes and plasma cells: B lymphocytes precommitted to IgG subclass can be preferentially induced by polyclonal mitogens with T cell help. *J. Immunol.* 130:671-677, 1983.
158. McCAFFREY, R. ; LILLQUIST, A. ; SALLAN, S. ; COHEN, E. & OSBAND, M. - Clinical utility of leukemia cell terminal transferase measurements. *Cancer Res.* 41:4814-4820, 1981.
159. McCULLOCH, E. A. - Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis (Henry Stratton Lecture, 1982). *Blood* 62: 1-13, 1983.
160. MELVIN, S. L. - Immunological definition of leukemic cell surface phenotypes. *Cancer Res.* 41:4790-4793, 1981.
161. MENDES, N. F. ; MIKI, S. S. & PEIXINHO, Z. F. - Combined detection of human T and B lymphocytes by rosette formation with sheep erythrocytes and zymosan-C3 complexes. *J. Immunol.* 113:531-536, 1974.
162. MENDES, N. F. ; TOLNAI, M. E. A. ; SILVEIRA, N. P. A. ; GILBERTSEN R. B. & METZGAR, R. S. - Technical aspects of the rosette tests used to detect human complement receptor (B) and sheep erythrocyte-binding (T) lymphocytes. *J. Immunol.* 111:860-867, 1973.
163. METZGAR, R. S. ; DOWELL, B. L. ; LACHMAN, L. B. ; JONES, N. H. & GEORGE, IV, F. W. - Classification of human leukemia by membrane antigen analysis with xenoantisera. *Cancer Res.* 41:4781-4785, 1981.
164. METZGAR, R. S. & MOHANAKUMAR, T. - Serologic studies of the diagnosis and nosology of human leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 68:699-705, 1977.
165. MEYER, P. R. ; KRUGLIAK, L. ; NEELY, S. ; LEVINE, A. ; PARKER, J. W. ; KAPLAN, B. & TAYLOR, C. R. - Acute leukemias with both myeloid and lymphoid surface markers. Cytoplasmic alpha-1-anti-chymotrypsin and alpha-1-trypsin as possible indicators of early granulocytic differentiation. *Am. J. Clin. Pathol.* 86:461-468, 1986.
166. MILLER, D. R. ; KRAILO, M. ; BLEYER, W. A. ; LUKENS, J. N. ; SIEGEL, S. E. ; COCCIA, P. R. ; WEINER, J. & HAMMOND, D. - Prognostic implications of blast cell morphology in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from

- the Childrens Cancer Study Group. *Cancer Treat. Rep.* 69:1211-1221, 1985.
167. MILLER, D.R.; LEIKIN, S.; ALBO, V.; SATHER, III, & HAMMOND, D. - Prognostic importance of morphology (FAB classification) in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Brit. J. Haematol.* 48:199-206, 1981.
 168. MILLS, B.; SEN, L. & BORELLA, L. - Reactivity of antihuman thymocytes serum with acute leukemia blasts. *J. Immunol.* 115:1038-1044, 1975. /citado por/ R.C.RIBEIRO op.cit. Nº 211.
 169. MILSTEIN, C. - From antibody structure to immunological diversification of immune response. *Science* 231: 1261-1268, 1986.
 170. MINDEN, M.D. & MAK, T.W. - The structure of the T-cell antigen receptor genes in normal and malignant T cells. *Blood* 68:327-336, 1986.
 171. MIRRO, J.; ZIFF, T.F.; PUI, C-H.; KITCHINGMAN, G.; WILLIAMS D.; MELVIN, S.; MURPHY, S.B. & STASS, S. - Acute mixed lineage leukemia: clinicopathologic correlations and prognostic significance. *Blood* 66:1115-1123, 1985.
 172. MOHANAKUMAR, T. & RANEY, R.B., Jr. - Leukaemia-associated antigen in man. *Clin. Haematol.* 7:363-394, 1979.
 173. MORETTA, L.; MINGARI, M.C.; MORETTA, A. & FAUCI, A.S. - Human lymphocyte surface markers. *Sem. Hematol.* 19:273-284, 1982.
 174. MORETTA, A.; PANTALEO, G.; MAGGI, E. & MINGARI, M.C. - Recent advances in the phenotypic and functional analysis of human T lymphocytes. *Sem. Hematol.* 21:257-269, 1984.
 175. NADLER, L.M.; KORSMEYER, S.J.; ANDERSON, K.C.; BOYD, A.W.; SLAUGHENHOPT, B.; PARK, E.; JENSEN, J.; CORAL, F.; MAYER, R.J.; SALLAN, S.E.; RITZ, J. & SCHLOSSMAN, S.F. - B cell origin of non-T cell acute lymphoblastic leukemia. A model for discrete stages of neoplastic and normal pre-B cell differentiation. *J. Clin. Invest.* 74:332-340, 1984.
 176. NADLER, L.M.; REINHERZ, E.L.; WEINSTEIN, H.J.; D'ORSI, C.J. & SCHLOSSMAN, S.F. - Heterogeneity of T-cell lymphoblastic malignancies. *Blood* 55:806-810, 1980.
 177. NEAME, P.B. ; SOAMBOONSRUP, P. ; BROWMAN, G. ; BARR, R.D. ; SAEED, N. ; CHAN, B. ; PAI, M. ; BENDER, A. ; WILSON, W.E.C. ; WALKER, I.R. & McBRIDE, J.A. - Simultaneous or sequential expression of lymphoid and myeloid phenotypes in acute leukemia. *Blood* 65:142-148, 1985.
 178. NEGORO, S. & SEON, B.K. - Strong, specific anti-human

- leukemia antisera prepared with the use of purified cell membrane antigen. *Cancer Res.* 41:2973-2976, 1981.
179. 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.* 61:177-183, 1979.
 180. NÚÑEZ, J.A. & MATHOV, E. - Subpoblaciones linfocitarias - marcadores de membrana. *Alergia* 26:87-99, 1979.
 181. OCHS, J. & MULHERN, R.K. - Late effects of antileukemia treatment. *Ped.Clin.North Am.* 35:815-833, 1988.
 182. OGAWA, M. ; PORTER, P.N. & NAKAHATA, T. - Renewal and commitment to differentiation of hemopoietic stem cells (an interpretative review). *Blood* 61:823-829, 1983.
 183. OSHIMURA, M.; FREEMAN, A.I. & SANDBERG, A. - Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XXVI. Banding studies in acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer* 40:1161-1172, 1977.
 184. OWEN, J.J.T.; WRIGHT, D.E.; HABU, S.; RAFF, M.C. & COOPER, M.D. - Studies on the generation of B lymphocytes in fetal liver and bone marrow. *J.Immunol.* 118:2067-2072, 1977.
 185. PANDOLFI, F. ; LUZI, G. ; TOZZI, M.C. & AIUTI, F. - Preparation, purification and *in vitro* properties of a serum against human lymphoblastic leukemia-associated antigens. *Acta Haematol.* 57:257-265, 1977.
 186. PATTEN, E. - Immunohematologic diseases. *Jama* 258: 2945-2951, 1987.
 187. PAUL, W.E.ed. - The immune system: an introduction. In:..... *Immunogenetics*. New York, Raven Press, 1984, p.1-14.
 188. 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.* 120:1169-1175, 1978.
 189. PEIFER, S.C. & STASS, S.A. - Markers of cellular differentiation in acute lymphoblastic leukemia. *Arch.Pathol.Lab.Med.* 106:3-8, 1982.
 190. PENDERGRASS, T.W. - Epidemiology of acute lymphoblastic leukemia. *Sem.Oncol.* 12:80-91, 1985.
 191. PESANDO, J.M.; TOMASELLI, K.J.; LAZARUS, H. & SCHLOSSMAN,

- S.F. - Distribution and modulation of a human leukemia-associated antigen (CALLA). *J. Immunol.* 131:2038-2045, 1983.
192. PESANDO, J.M. ; RITZ, J. ; LAZARUS, H. ; COSTELLO, S.B. ; SALLAN, S. & SCHLOSSMAN, S.F. - Leukemia-associated antigens in ALL. *Blood* 54:1240-1248, 1979.
193. PINKEL, D. - Five-year follow-up of "total therapy" of childhood lymphocytic leukemia. *Jama* 216:648-652, 1971.
194. PINKEL, D.; HERNANDEZ, K.; BORELLA, L.; HOLTON, C.; AUR, R.; SAMOY, G. & PRATT, C. - Drug dosage and remission duration in childhood lymphocytic leukemia. *Cancer* 27:247-256, 1971.
195. POLEDNAK, A.P. - Recent trends in incidence and mortality rates for leukemias and in survival rates for childhood acute lymphocytic leukemia, in upstate New York. *Cancer* 57:1850-1858, 1986.
196. POPLACK, D.G. - Acute lymphoblastic leukemia. In: PIZZO, P.A. & POPLACK, D.G. (eds). *Principles and practice of pediatric oncology*. Philadelphia, J.B. Lippincott, 1989, p.323.
197. POPLACK, D.G. & REAMAN, G. - Acute lymphoblastic leucemia in childhood. *Ped. Clin. North Am.* 35:903-932, 1988.
198. POPLACK, D.G. - Acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Ped. Clin. North Am.* 32:669-697, 1985.
199. PREUD'HOMME, J.L.; GUGLIELMI, P. & LABAUME, S. - Lymphocyte markers in human leukemias and lymphomas: methodologic remarks. *Sem. Hematol.* 21:296-301, 1984.
200. PRIEST, J.R. ; ROBISON, L.L. ; MCKENNA, R.W. ; LINDQUIST, L.L.; WARKENTIN, P.I.; LeBIEN, T.W.; WOODS, W.G.; KERSEY, J.H.; COCCIA, P.F. & NESBIT, M.E., Jr. - Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 56:15-22, 1980.
201. PUI, C-H. ; WILLIAMS, D.L. ; KALWINSKI, D.K. ; LOOK, A.T. ; MELVIN, S.L.; DODGE, R.K.; RIVERA, G.; MURPHY, S.B. & DAHL, G.V. - Cytogenetic features and serum lactic dehydrogenase level predict a poor treatment outcome for children with pre-B-cell leukemia. *Blood* 67:1688-1692, 1986.
202. PULLEN, D.J. - A pediatric oncology group classification protocol for acute lymphoblastic leukemia (ALinC 13): In: MURPHY, S.B. & GILBERT, J.R. (eds.). *Leukemia research: advances in cell biology and treatment*. N.Y., Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1983, p.221-239.

203. PULLEN, D.J. ; FALLETTA, J.M. ; CRIST, W.M.; VOGLER, L.B.; DOWELL, B.; HUMPHREY, G.B.; BLACKSTOCK, R.; EYS, J. van; COOPER, M.D.; METZGAR, R.S. & MEYDRECH, E.F. - Southwest oncology group experience with immunological phenotyping in acute lymphocytic leukemia of childhood. *Cancer Res.* 41:4802-4809, 1981.
204. RAVINDRANATH, Y. ; KAPLAN, J. & ZUELZER, W.W. - Significance of mediastinal mass in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatrics* 55:889-893, 1975.
205. REIJDEN, H.J. van der; WERING, E.R. van; RIJN, J.M. van der; MELIEF, C.J.M.; VEER, M.B. van; BEHRENDT, H. & BORNE, A.E.G. Kr. von dem. - Immunological typing of acute lymphoblastic leukaemia. *Scand. J. Haematol.* 30:356-366, 1983.
206. REINHERZ, E.L. - T-cell receptors. Wo needs more? *Nature* 325:660-663, 1987.
207. REINHERZ, E.L. & SCHLOSSMAN, S.F. - Human T-cell leukemias in the context of normal T-lineage ontogeny and function. In: MURPHY, S.B. & GILBERT, J.R. (eds.). *Leukemia research: advances in cell biology and treatment.* N.Y., Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1983, p.85-95.
208. REINHERZ, E.L. & SCHLOSSMAN, S.P. - Derivation of human T-cell leukemias. *Cancer Res.* 41:4767-4770, 1981.
209. REINHERZ, E.L.; KUNG, P.C.; GOLDSTEIN, G. & SCHLOSSMAN, S.F. - A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and ALL peripheral human T cells. *J. Immunol.* 123:1312-1317, 1979.
210. RHENEN, D.J. van ; VERHULST, J.C. ; HUIJGENS, P.C. & LANGENHUIJSEN, M.M.A.C. - Maturation index: a contribution to quantification in the FAB classification of acute leukaemia. *Brit. J. Haematol.* 46:581-586, 1980.
211. RIBEIRO, R.C. - Classificação das leucemias linfoblásticas agudas na infância. Dissertação ao nível de mestrado em pediatria apresentada à U.F.P., Curitiba, p.1-128, 1981.
212. RICHIE, E.R.; SULLIVAN, M.P. & EYS, J. van - A unique surface marker profile in T-cell acute lymphocytic leukemia. *Blood* 55:702-705, 1980.
213. ROITT, I. - Imunidade à infecção. In: *Imunologia*, R.J., Livraria Atheneu, 4ªed., 1983, p.157.
214. ROPER, M.; CRIST, W.M.; METZGAR, R.; RAGAB, A.H.; SMITH, S.; STARLING, K.; PULLEN, J.; LEVANTHAL, B.; BARTOLUCCI, A.A.

- & COOPER, M.D. - Monoclonal antibody characterization of surface antigens in childhood T-cell lymphoid malignancies. *Blood* 61:830-837, 1983.
215. ROSS, G.D. - Identification of human lymphocyte subpopulations by surface marker analysis. *Blood* 53:799-811, 1979.
216. RUGGERO, D.; BACCARINI, M.; GOBBI, M. & TURA, S. - Adult acute lymphoblastic leukaemia study of 32 patients and analysis of prognostic factors. *Scand. J. Haematol.* 22:154-164, 1979.
217. RUSCETTI, F.W. & GALLO, R.C. - Human T-lymphocyte growth factor: regulation of growth and function of T lymphocytes. *Blood* 57:379-394, 1981.
218. SALLAN, S.E. ; WEINSTEIN, H.J. & NATHAN, D.G. - The childhood leukemias. *J. Pediat.* 99:676-688, 1981.
219. SALLAN, S.E.; RITZ, J.; PESANDO, J.; GELBER, R.; O'BRIEN, C.; HITCHCOCK, S. CORAL, F. & SCHLOSSMAN, S.F. - Cell surface antigens: prognostic implications in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 55: 395-402, 1980.
220. SAN MIGUEL, J.F.; FORONI, L.; GONZALEZ, M.; CANIZO, M.C. del; SALAZAR, J.; RIOS, A.; MATUTES, E. & CATOVSKI, D. - Coexpression of T- and B-markers in a lymphoproliferative disorder. *Scand. J. Haematol.* 37:10-17, 1986.
221. SCHLESINGER, M. & GALILI, U. - Antigenic differences between T and B lymphocytes in man. *Israel J. Med. Sci.* 10:715-724, 1974.
222. SELIGMANN, M. ; PREUD'HOMME, J.L. ; GUGLIELMI, P.; VOGLER, L.B. & BROUET, J.C. - Immunobiology of human leukemias of B-cell lineage. In: MURPHY, S.B. & GILGERT, J.R.(eds.). *Leukemia research: advances in cell biology and treatment.* N.Y., Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1983, p.57-63,
223. SEN, L. & BORELLA, L. - Clinical importance of lymphoblast with T markers in childhood acute leukemia. *N.Engl. J. Med.* 292:828-832, 1975.
224. SEON, B.K.; NEGORO, S.; MINOWADA, J. & YOSHIZAKI, K. - Human T cell leukemia antigens on the cell membrane: purification, molecular characterization, and preparation of specific antisera. *J. Immunol.* 127:2580-2588, 1981.
225. SHAW, M.T. - The cytochemistry of acute leukemia: a diagnostic and prognostic evaluation. *Sem. Oncol.* 3:219-228, 1976.

226. SHIMA, E.A.; LE BEAU, M.M.; McKEITHAN, T.W.; MINOWADA, J.; SHOWE, L.C.; MAK, T.W.; MINDEN, M.D.; ROWLEY, J.D. & DIAZ, M.O. - Gene encoding the alpha chain of the T-cell receptor is moved immediately downstream of *c-myc* in a chromosomal 8;14 translocation in a cell line from a human T-cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:3439-3443, 1986.
227. SIEGAL, F.P.; FILIPPA, D.A. & KOZIMER, B. - Surface markers in leukemias and lymphomas. *Am. J. Pathol.* 90:451-459, 1978.
228. SIMONE, J.V.; VERZOSA, M.S. & RUDY, J.A. - Initial features and prognosis in 363 children with acute lymphocytic leukemia. *Cancer* 36:2099-2108, 1975.
229. SMITH, R.W.; TERRY, W.D.; BUELL, D.N. & SELL, K.W. - An antigenic marker for human thymic lymphocytes. *J. Immunol.* 110:884-887, 1973.
230. SMITHSON, W.A.; LI, C-Y.; PIERRE, R.V.; RITTS, R.E., Jr.; BURGERT, E.O., Jr.; ILSTRUP, D.M. & HOFFMAN, A.D. - Acute lymphoblastic leukemia in children: immunologic, cytochemical, morphologic, and cytogenetic studies in relation to pretreatment risk factors. *Med. Pediat. Oncol.* 7:83-93, 1979.
231. SONDEL, P.M.; BORCHERDING, W.; SHAHIDI, N.T.; GANICK, D.J.; SCHULTZ, J.C. & HONG, R. - Recategorizing childhood acute lymphoblastic leukemia with monoclonal antibodies to human T cells. *Blood* 57:1135-1137, 1981.
232. SPANGRUDE, G.J.; HEIMFELD, S. & WEISSMAN, I.L. - Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241:58-62, 1988.
233. SPIRA, T.J.; ADES, E.W. & GORDON, D.S. - The immunological and cytochemical characterization of T-cell lymphoproliferative diseases. *Am. J. Hematol.* 10:19-30, 1981.
234. STASS, S.A. & MIRRO, J., Jr. - Lineage heterogeneity in acute leukaemia: acute mixed-lineage leukaemia and lineage switch. *Clin. Haematol.* 15:811-827, 1986.
235. STEINHERZ, P.G. - Acute leukemia of childhood. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 1:549-566, 1987.
236. STEWART, A.; DAVIES, J.N.P.; DALLDORF, G. & BARNHART, F.E. - Malignant lymphoma of african children. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70:15-17, 1973.
237. STROBER, S. - T and B-cells in immunologic diseases. *Am. J. Clin. Pathol.* 68:671-678, 1977.
238. TERASAKI, P.I. & McCLELLAND, J.D. - Microdroplets assay of

- human serum cytotoxins. *Nature* 204:998-1000, 1964.
239. THIEL, E.; RODT, H.; HUHN, D.; NETZEL, B.; GROSSE-WILDE, H.; GANESHAGURU, K. & THIERFELDER, S. - Multimarker classification of acute lymphoblastic leukemia: evidence for further T subgroups and evaluation of their clinical significance. *Blood* 56:759-772, 1980.
240. THIEL, E.; RODT, H.; NETZEL, B.; HUHN, D.; WUNDISCH, G.F.; HAAS, R.J.; BENDER-GOTZE & THIERFELDER, S. - T-Zell-Antigen positive, E-Rosetten negative akute Lymphoblastenleukämie. *Blut* 36:363-369, 1978.
241. TONEGAWA, S. - Antibody and T-cell receptors. *Jama* 259:1845-1847, 1988.
242. TONEGAWA, S. - Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575-581, 1983.
243. TSUKIMOTO, I. ; WONG, K.Y. & LAMPKIN, B.C. - Surface markers and prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia. *N.Engl.J.Med.* 294:245-248, 1976.
244. VENUTA, S.; MERTELSMANN, R.; WELTE, K.; FELDMAN, S.P.; WANG C.Y. & MOORE, M.A.S. - Production and regulation of interleukin-2 in human lymphoblastic leukemias studied with T-cell monoclonal antibodies. *Blood* 61:781-789, 1983.
245. VIANA, M.B.; MAURER, H.S. & FERENC, C. - Subclassification of acute lymphoblastic leukaemia in children: analysis of the reproducibility of morphological criteria and prognostic implications. *Brit.J. Haematol.* 44:383-388, 1980.
246. VODINELICH, L. ; TAX, W. ; BAI, Y. ; PEGRAM, S. ; CAPEL, P. ; GREAVES, M.F. - A monoclonal antibody (WT1) for detecting leukemias of T-cell precursors (T-ALL). *Blood* 62:1108-1111, 1983.
247. VOGLER, L.B. ; GROSSI, C.E. & COOPER, M.D. - Human lymphocyte subpopulations. *Prog.Hematol.* 1:1-45, 1980.
248. 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.* 298:872-878, 1978.
249. YAMANAKA, N.; ISHII, Y.; KOSHIBA, H.; MIKUNI, C.; KONNO, M. & KIKUCHI, K. - A study of surface markers in acute lymphocytic leukemia by using anti-T and anti-B lymphocyte sera. *Cancer* 42:2641-2647, 1978.
250. YOUNESS, E.; TRUJILLO, J.M.; AHEARN, M.J.; MCCREDIE, K.B. & CORK, A. - Acute unclassified leukemia. A

- clinicopathologic study with diagnostic implications of electron microscopy. *Am.J.Hematol.* 9:79-88, 1980.
251. YOUNG, J.L., Jr. & MILLER, R.W. - Incidence of malignant tumors in U.S. children. *J.Pediat.* 86:254-258, 1975.
252. YOURNO, J. ; BURKART, P. ; LIZZI, F. & TARTAGLIA, A. - Enzymologic classification of acute leukemias: nonspecific esterase markers distinguish myeloid and lymphoid varieties. *Blood* 60:304-308, 1982.
253. YUNIS, J.J. & BRUNNING, R.D. - Prognostic significance of chromosomal abnormalities in acute leukaemias and myelodysplastic syndromes. *Clin.Haematol.* 15:597-620, 1986.
254. WALDMANN, T.A. - The arrangement of immunoglobulin and T cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders. *Adv.Immunol.* 40:247-321, 1987.
255. WALDMANN, T.A. & KORSMEYER, S. - Hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements and deletions in human lymphoid leukemias. In: MURPHY, S.B. & GILBERT, J.R., eds. - *Leukemia research: Advances in cell biology and treatment*. N.Y., Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1983, p.77-84.
256. WATANABE, S. ; SHIMOSATO, Y. ; SHIMOYAMA, M. & MINATO, K. - Studies with multiple markers on malignant lymphomas and lymphoid leukemias. *Cancer* 50:2372-2382, 1982.
257. WATERHOUSE, J. ; MUIR, C. ; CORREA, P. & POWELL, J. - Cancer incidence in five continents. In: DAMESHEK, W. & GUNZ, F. *Leukemia*, 4th ed., N.Y., Grune & Stratton, 1983, p.21.
258. WEINBERG, K.I. & PARKMAN, R. - Interface between immunodeficiency and pediatric cancer. In: PIZZO, P.A. & POPLACK, D.G.(eds). *Principles and practice of pediatric oncology*, Philadelphia, L.B. Lippincott, 1969, p.65.
259. WEISS, L.M. ; BINDL, J.M. ; PICOZZI, V.J. ; LINK, M.P. & WARNKE, R.A. - Lymphoblastic lymphoma: an immunophenotype study of 26 cases with comparison to T cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 67:474-478, 1986.
260. WEST, R.J. ; GRAHAM-POLE, J. ; HARDESTY, R.M. & PIKE, M.C. - Factors in pathogenesis of central-nervous-system leukemia. *Brit.Med.J.* 2:311-314, 1972.
261. WINCHESTER, R.J. ; FU, S.M. ; HOFFMAN, T. & KUNKEL, H.G. - IgG on lymphocyte surfaces: technical problems and the significance of a third cell population. *J.Immunol.* 114:1210-1212, 1975.

262. ZIFF, T.F.; FOX, R.I.; DILLEY, J. & LEVY, R. - Definition of the high-risk acute lymphoblastic leukemia patient by immunological phenotyping with monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 41:4786-4789, 1981.