



**GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
SECRETARIA DE ESTADO DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO ESTADUAL DA ZONA OESTE**

**PADRONIZAÇÃO NO USO DO REAGENTE TRANSFIX™
+ EDTA K3 EM DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS
AGUDAS POR IMUNOFENOTIPAGEM**

Júlio César Santoro de Oliveira Assis

Rio de Janeiro

Julho – 2012

JÚLIO CÉSAR SANTORO DE OLIVEIRA ASSIS

Aluno do Curso de Ciências Biológicas

Matrícula: 0823800125

**PADRONIZAÇÃO NO USO DO REAGENTE TRANSFIX™
+ EDTA K3 EM DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS
AGUDAS POR IMUNOFENOTIPAGEM**

Trabalho de Conclusão de Curso II, TCC-II, apresentado ao curso de Graduação em Ciências Biológicas, da UEZO como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Biólogo, sob a orientação da Dra. Eugênia Granado e co-orientação da Dra. Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira.

Rio de Janeiro

Julho de 2012

A848 Assis, Júlio César Santoro de Oliveira.
Padronização no uso do reagente TransFix™ + EDTA K3 em diagnóstico de leucemias agudas por imunofenotipagem / Júlio César Santoro de Oliveira. — 2012.
76 f.; 30 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) — Centro Universitário Estadual da Zona oeste, Rio de Janeiro, 2012.
Bibliografia: f. 71-75.

1. Leucemia. 2. Imunofenotipagem. 3. Citometria de fluxo. TransFix™. I. Título.

CDD 616.994

**PADRONIZAÇÃO NO USO DO REAGENTE TRANSFIX™
+ EDTA K3 EM DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS
AGUDAS POR IMUNOFENOTIPAGEM**

Elaborado por Júlio César Santoro de Oliveira Assis

Aluno do Curso de Ciências Biológicas da UEZO

Este trabalho de Graduação foi analisado e aprovado com

Grau:

Rio de Janeiro, 09 de Julho de 2012

Examinadora - Dra Maria Cristina de Assis

Presidenta

Examinador – Dr. Fabio da Silva de Azevedo Fortes

Professora do TCC - II - Dra Maria Cristina de Assis

Orientadora: Dra. Eugênia Granado

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Julho de 2012

Dedico esta monografia a meus pais que desde a minha infância tem dado grande incentivo ao meu desenvolvimento intelectual, aos meus irmãos e amigos que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis, aos professores que me acompanharam nesta longa jornada acadêmica e a todas as pessoas que direta ou indiretamente tornaram possível este sonho. Sem vocês eu não teria compreendido a importância do SABER.

AGRADECIMENTO

Às minhas orientadoras Dra. Eugênia Granado e Dra. Maria do Socorro Pombo-de-Oliveira que acreditaram em mim e me forneceram orientações seguras e precisas para a realização deste trabalho;

À Dra Eugênia Granado, pela paciência e dedicação que teve comigo, em acreditar que era possível a realização deste trabalho, e principalmente por ser mais que uma orientadora, uma AMIGA!

À minha mãe, pela luta e dedicação em fazer com que este meu objetivo fosse alcançado, sem a senhora isso não seria possível;

À minha família, que me incentivou em todos os momentos difíceis, apoiando e dando-me todo o suporte necessário para que eu persistisse e não desistisse da realização deste sonho;

Aos meus professores, amigos e colegas pela companhia e caminhada solidária;

Á Deus e a Nossa Senhora de Fátima, que através de minha fé, obtive serenidade, equilíbrio e sabedoria para conduzir e enfrentar as adversidades;

Ao Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, principalmente ao Programa de Hematologia e Oncologia Pediátricos, a qual obtive uma grande experiência profissional e adquiri novos amigos que me ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO 1 – Introdução.....	1
1.1 Biologia das células hematopoéticas.....	2
1.2 Biologia das leucemias	2
1.3 Origem	5
1.4 Classificação	6
1.4.1 Leucemia crônica	6
1.4.2 Leucemia aguda	7
1.4.2.1 Leucemia linfóide aguda (LLA)	8
1.4.2.1.1 Alterações genéticas nas LLAs	14
1.4.2.2 Leucemia mielóide aguda (LMA)	15
1.4.2.2.1 Alterações genéticas nas LMAs	20
1.5 Diagnóstico das leucemias agudas	22
1.5.1 Análise morfológica	25
1.5.2 Análise imunofenotípica	28
1.5.3 Análise citogenética	31
1.5.4 Análise molecular	32
1.6 Amostra analisadas no Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrico	33
1.6.1 Reagente TransFix™ + EDTA K3.....	34
CAPÍTULO 2 – Justificativa	37
CAPÍTULO 3 – Objetivos.....	40
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41

CAPÍTULO 4 – Metodologia	42
4.1 Amostras	43
4.2 Envio das amostras	43
4.3 Tratamento com o Reagente TransFix™	43
4.4 Painéis de anticorpos monoclonais (AcMo) utilizados.....	44
4.5 Marcação de antígenos de membrana para análise por citometria de fluxo.....	44
4.6 Soluções de permeabilização.....	45
4.6.1 Permeabilização com o Tween ® 20.....	45
4.6.2 Permeabilização com Kit BD Cytotfix/Cytoperm™.....	46
4.6.3 Permeabilização com Saponina.....	46
4.7 Aquisição e análise por citometria de fluxo.....	47
4.8 Análise estatística.....	47
CAPÍTULO 5 – Resultados.....	48
5.1 Concentrações do Reagente TransFix™	49
5.2 Avaliação entre as soluções de permeabilização.....	55
CAPÍTULO 6 – Discussão.....	61
CAPÍTULO 7 – Conclusão.....	67
CAPÍTULO 8 – Perspectivas.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXO.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMo	Anticorpo monoclonal
CD	Cluster de diferenciação
CF	Citometria de fluxo ou citômetro de fluxo
CFU-S	Stem cell pluripotente
CPq	Centro de pesquisas
CY5	Cyanine
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAB	Grupo franco-americano-britânico
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FISH	Hibridização fluorescente in situ
FITC	Isocianeto de fluoresceína
FT	Fatores de transcrição
HLA-DR	Antígenos leucocitários humanos - DR
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INCA	Instituto nacional de câncer
LA	Leucemia aguda
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
MLL	Leucemia linhagem mista
MO	Medula óssea
MPO	Mielo peroxidase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina

PerCP	Peridinin protein complex clorofila
PHOP	Programa de hematologia e oncologia pediátrico
RARα	Ácido retinóico
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Transcrição reversa reação em cadeia da polimerase
SP	Sangue periférico
TCR$\alpha\beta$	T-cell receptor $\alpha\beta$
TCR$\gamma\delta$	T-cell receptor $\gamma\delta$
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Células tronco hematopoiéticas formando diversos tipos de células sangüíneas.....	3
Figura 2. Diferenciação celular e transformações leucêmicas em precursores linfóides e mielóides.....	4
Figura 3. Maturação das células B.....	9
Figura 4. Via de maturação de células T.....	12
Figura 5. Estrutura molecular da diferenciação alguns antígenos da linhagem mielóide.....	16
Figura 6. Análise por citometria de fluxo, de antígenos expressos na superfície de linfócitos T.....	36
Figura 7. <i>Forward Scatter</i> (FSC) e <i>Side Scatter</i> (SSC) de um experimento representativo.....	50
Figura 8. <i>Density Plot</i> com a combinação entre SSC e a expressão da molécula CD45.....	51
Figura 9. Gráfico com a média do percentual de MPO nos experimentos um, dois, três e quatro.....	52
Figura 10. <i>Density Plot</i> do percentual de MPO no experimento 4.....	53
Figura 11. Histograma com <i>Overlay</i> do percentual de MPO entre a amostra com EDTA K3 e a com a concentração de TransFix™ 1/10 em função do número de eventos.....	54
Figura 12. <i>Density Plot</i> de um experimento representativo.....	56
Figura 13. <i>Density Plot</i> com a combinação entre <i>Side Scatter</i> (SSC) e a expressão do CD45 em experimento representativo.....	57
Figura 14. Gráfico com o percentual de MPO entre as soluções de permeabilização.....	59
Figura 15. <i>Density Plot</i> do percentual de MPO entre as soluções de permeabilização.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação imunológica da linhagem LLA-B de acordo com a proposta EGIL.....	8
Tabela 2 - Classificação imunológica da linhagem LLA-T de acordo com a proposta EGIL.....	13
Tabela 3 - Classificação e características morfológicas das LLAs (Segundo a FAB).....	22
Tabela 4 - Classificação e características morfológicas LMAs (Segundo a FAB).....	23
Tabela 5 - Painel intracelular de marcação para imunofenotipagem.....	29
Tabela 6 - Painel de membrana de marcação para imunofenotipagem LLA-B.....	30
Tabela 7 - Painel de membrana de marcação para imunofenotipagem LLA-T.....	30
Tabela 8 - Painel de membrana de marcação para imunofenotipagem LMA.....	31
Tabela 9 - Percentual de alguns antígenos obtidos em testes preliminares.....	38
Tabela 10 - Painel de marcação intracelular para análise por citometria de fluxo.....	44
Tabela 11 - Percentual de MPO nos quatro experimentos.....	51
Tabela 12 - Percentual de MPO obtido com as diferentes soluções de permeabilização.....	58
Tabela 13 - Percentual de antígenos no período de 7 dias.....	76

RESUMO

A leucemia é definida como a proliferação ou expansão incontrolada de células hematopoéticas que não retêm a capacidade de se diferenciarem em células maduras. Uma das análises em amostras de medula óssea com suspeita de leucemia aguda é feito por citometria de fluxo. Visando manter a eficiência nas marcações imunofenotípicas nas amostras de medula com alguns dias após a coleta, foi necessário à busca de métodos que possibilitassem estabilizar essas amostras, permitindo assim uma análise posterior por citometria de fluxo. O reagente TransFix™ + EDTA K3 é uma solução de estabilização distribuída sob licença, pela Cytomark LTDA, que contém componentes ativos que estabilizam os antígenos celulares por um tempo maior que o convencional. Entretanto, existem raros estudos com este reagente em medula óssea, sendo mais utilizados em sangue total. Com base nisso, este estudo objetivou-se a padronizar o reagente TransFix™ + EDTA K3 em amostras de medula óssea. Para a padronização foram utilizadas quatro amostras de medula de pacientes não-leucêmicos nas concentrações de TransFix™ + EDTA K3 1/5, 1/10 e 1/20. Diferentes soluções de permeabilização, como o Tween ® 20, Kit BD Cytotfix/Cytoperm™ e a Saponina foram utilizadas também em quatro amostras de medula de pacientes não-leucêmicos para avaliar a melhor permeabilização. Nossos resultados mostraram que as amostras com a concentração 1/10 obteve bons percentuais de marcação e foi escolhida para a segunda etapa deste experimento. Na concentração de TransFix™ + EDTA K3 1/10, as amostras mostraram que a sensibilidade e a intensidade de detecção dos antígenos intracelulares não foram alteradas e nem apresentaram diferenças de marcação, pelo método de permeabilização utilizando as diferentes soluções.

Palavras-chave: Leucemia, Imunofenotipagem, Citometria de fluxo, TransFix™

ABSTRACT

Leukemia is defined as the uncontrolled proliferation or growth of hematopoietic cells that do not retain the ability to differentiate into mature cells. An analysis of bone marrow samples suspected of having acute leukemia is done by flow cytometry. In order to maintain efficiency in the immunophenotypic markers of bone samples with a few days after collection, it was necessary to search for methods that would enable to stabilize these samples, thus allowing further analysis by flow cytometry. The reagent is a solution TransFix™ + EDTA K3 stabilizing distributed under license by Cytomark LTDA, which contains active components that stabilize cellular antigens for a longer time than the conventional. However, there are few studies with this reagent in bone marrow, are more often used in whole blood. Based on this, this study aimed to standardize the reagent TransFix™ + EDTA K3 in bone marrow samples. Were used to standardize four marrow samples from patients non-leukemic TransFix™ + EDTA K3 at concentrations of 1/5, 1/10 and 1/20. Different solutions permeability, such as Tween ® 20, Kit BD Cytifix / Cytoperm™ and Saponin also were used in four samples of marrow non-leukemic patients to assess the best permeability. Our results showed that the concentration 1/10 obtained good percentage of markup and was chosen for the second stage of this experiment. TransFix™ + EDTA K3 at a concentration of 1/10, the samples showed that the intensity and sensitivity of detection of intracellular antigens was not altered, nor were there differences marking, by using the permeabilization method of different solutions.

Keywords: Leukemia, Immunophenotyping, Flow cytometry, TransFix™

CAPITULO 1

Introdução

1.1 Biologia das células hematopoéticas

O sistema hematopoético é caracterizado por um constante *turnover*, ou renovação de células, que necessita de um constante esforço de replicação para manter as populações de leucócitos, plaquetas e eritrócitos. Estímulos apropriados como hipóxia, sangramentos ou infecções geram respostas deste sistema, que aumenta substancialmente a produção de novos tipos celulares individuais. Esta excelente capacidade regenerativa depende de uma população relativamente pequena de células-tronco hematopoéticas ou HSCs (*Hematopoietic Stem Cells*). A célula-tronco ou stem cell é definida como uma célula com capacidade de renovar e produzir progênie destinada a diferenciar-se. Uma única célula-tronco é capaz de produzir cerca de 1.011 a 1.012 células sanguíneas maduras por dia. Uma das propriedades fundamentais das células-tronco, a auto-renovação, parece estar influenciada por mecanismos intrínsecos, como o potencial replicativo que ocorre durante a restrição.

As HSCs mantêm a hematopoese através da regulação de períodos de auto-renovação, diferenciação e morte celular durante todo o período de vida dos vertebrados. A hematopoese é iniciada em uma célula-tronco multipotente, com marcadores imunológicos CD34+, principalmente, que pode dar origem às distintas linhagens celulares. A diferenciação nas diferentes linhagens ocorre a partir de células-tronco progenitoras hematopoéticas, que passam por uma etapa de células comprometidas com o desenvolvimento restrito a somente uma das linhagens.

Com grande capacidade de auto-renovação, a HSC garante que a hematopoese permaneça constante em condições normais de saúde e possa gerar todas as linhagens celulares que constituem o compartimento hematopoético. As células precursoras, por sua vez, são capazes de responder a fatores de crescimento hematopoético com aumento de produção de uma ou outra linhagem celular restrita quando há necessidade; porém, estas células parecem perder a capacidade de auto-renovação.

1.2 Biologia das leucemias

As neoplasias hematológicas são distúrbios clonais originados a partir de uma célula da linhagem hematopoética que sofreu alterações genéticas em uma determinada fase ao longo de

sua via de diferenciação (Oliveira *et al*, 2004). Ocorrem como consequência de anormalidades em genes que controlam os mecanismos naturais de proliferação, diferenciação/maturação e/ou morte celular programada por apoptose (Oliveira *et al*, 2004). Uma leucemia pode emergir em quase qualquer estágio de uma célula sanguínea em desenvolvimento (Figura. 1). O ponto ao longo da via de diferenciação no qual tem início o processo, bem como a extensão da capacidade de maturação da célula são determinantes significativos no comportamento e entendimento da evolução clínica de cada subtipo de leucemia (Oliveira *et al*, 2004).

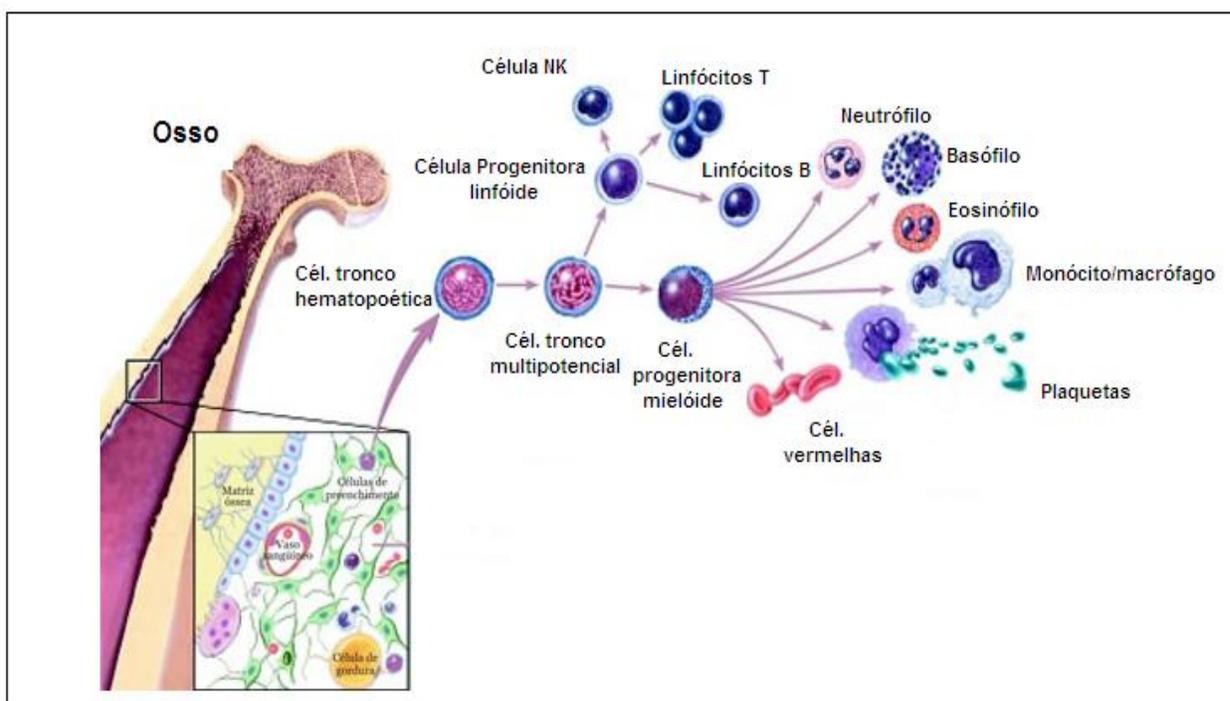


Figura 1. Células tronco hematopoiéticas formando diversos tipos de células sanguíneas (adaptada de Araújo *et al*, 2005)

A transformação leucêmica poderá ocorrer em um precursor linfóide, um mielóide (Figura 2) ou numa célula progenitora com capacidade pluripotente.

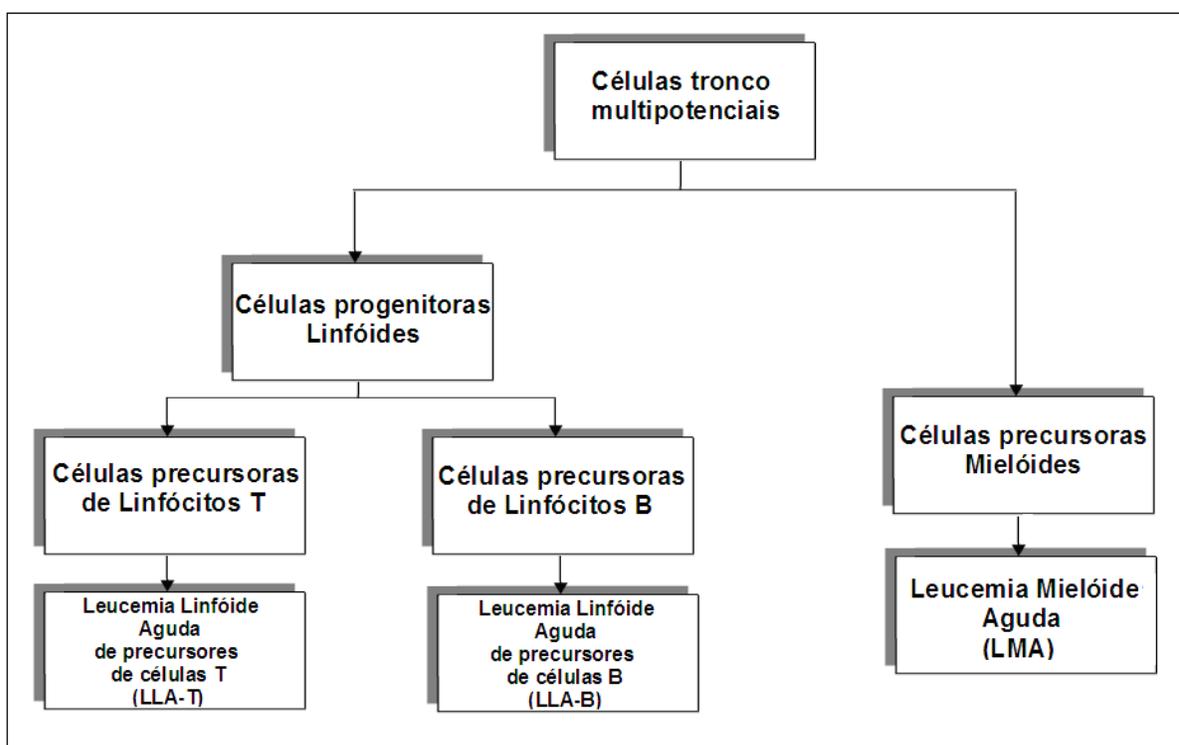


Figura 2. Diferenciação celular e transformações leucêmicas em precursors linfóides e mielóides

Tem sido reconhecido que a leucemia infantil não é uma doença homogênea. A grande divisão morfológica em leucemia linfóide aguda e leucemia mielóide aguda são completadas pela identificação de uma série de subconjuntos com base na expressão gênica nos antígenos que delineiam o tipo de célula, na diferenciação e nas anormalidades cromossômicas e moleculares (Greaves, 2002).

O acúmulo de alterações em genes que regulam os processos de diferenciação, proliferação, reparo e morte celular leva à aquisição de um fenótipo leucêmico em que as células adquirem vantagem de sobrevivência e deixam de exercer suas funções normais. A análise de clones leucêmicos fornece informações sobre o momento em que ocorreu a alteração e quais são os mecanismos moleculares envolvidos (Oliveira *et al*, 2004). Estes incluem translocações cromossômicas com trocas de faixas grandes de DNA entre os cromossomos, fusão de genes, e ainda mudanças no número de cromossomos (hiperdiploidia ou hipodiploidia). A um nível mais sutil, também pode haver a deleção do gene ou simples mudanças de base de nucleotídeos (Greaves, 2002).

Estudos comprovam que é necessária a ação colaborativa entre pelo menos duas classes de alterações genéticas para a formação da leucemia, as que conferem efeito proliferativo e vantagem de sobrevivência aos precursores hematopoéticos e as que funcionam bloqueando o processo de diferenciação normal, pela perda de função de fatores de transcrição atuantes nos precursores hematopoéticos (Oliveira *et al*, 2004).

Atualmente, há evidências convincentes de que translocações cromossômicas são frequentemente os primeiros eventos a iniciar a leucemia, e que ocorrem durante o período de desenvolvimento pré-natal (Gilliland e Griffin, 2002).

Aberrações cromossômicas recorrentes e específicas, e sua associação a subtipos de leucemia definidos por linhagem, tipo celular e estágio de diferenciação, oferecem a possibilidade de identificar os genes que estão envolvidos na perda do controle dos mecanismos reguladores do ciclo celular e na aquisição do fenótipo maligno (Oliveira *et al*, 2004). A mais comum anormalidade genética estrutural na leucemia infantil é uma translocação de dois genes, TEL e AML1. Estas quebras simultâneas no gene TEL (cromossomo 12) e no gene AML1 (cromossomo 21) são seguidas por erros na maquinaria de reparo do DNA. Como em outras translocações cromossômicas, as quebras no DNA ocorre sempre em regiões não codificadoras (íntrons) de genes. Os pontos precisos de interrupção nos genes TEL e AML1 podem ser identificados ou mapeados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Greaves, 2002).

1.3 Origem

A origem e a progressão das leucemias podem ser compreendidas ao se relacionar os mecanismos leucemogênicos às alterações dos mecanismos homeostáticos normais que regulam a produção e a diferenciação das células sanguíneas (Kirstem e Adrienne, 1988). Uma questão fundamental a resolver, seria que exposições ou eventos secundários poderiam precipitar as quebras cromossômicas, cujo reparação incorreta iniciaria ou promoveria a leucemia na infância. Não há fator externo único em que uma exposição possa levar ao desenvolvimento de leucemia. A única causa amplamente aceita é a exposição a radiações ionizantes (raios X e raios gama), porém isso não explica todos os casos. Outras causas

sugeridas incluem radiação não-ionizante, exposição química e exposição a infecções (Kirsten e Adrienne, 1988).

Dada à diversidade biológica da leucemia, é altamente improvável que haja uma única causa, mesmo para um subtipo definido da doença. Tal como acontece com outros tipos de câncer, é provável que envolva uma interação com a exposição (exógena ou endógena) com susceptibilidade genética inerente (Greaves, 2002).

1.4 Classificação

As Leucemias podem ser classificadas como agudas ou crônicas, de acordo com a fisiopatologia da doença, sendo que nas agudas as células leucêmicas pertencem ao compartimento de células progenitoras, enquanto que nas crônicas as células malignas se desenvolvem em estágios de maturação mais tardios (Kersey, 1997).

1.4.1 Leucemia crônica

As leucemias crônicas caracterizam-se pelo acúmulo lento e gradativo de clones neoplásicos leucocitários na medula óssea e no sangue. Ao contrário das leucemias agudas, as células que se acumulam estão numa fase tardia de maturação. Embora apresentem um curso clínico insidioso, as leucemias crônicas, se não tratadas trazem uma importante redução da sobrevida dos pacientes (Almeida *et al*, 2009). As leucemias crônicas são representadas pela Leucemia Mielóide Crônica (LMC), a Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), a Tricoleucemia (Leucemia de Células Pilosas), e outros tipos mais raros.

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença clonal com origem em células-tronco hematopoéticas, que são impulsionadas por translocações recíprocas entre os cromossomos 9 e 22 [t (9; 22) (q34; q11)], caracterizadas pela expressão da proteína oncogênica de fusão BCR-ABL, uma tirosina quinase com atividade enzimática desregulada.

A LMC apresenta várias fases, onde o início ou fase crônica é caracterizada por uma proliferação de células da linhagem mielóide, como eritróides e linhagens megacariocíticas, resultando em um excesso na produção de granulócitos. Através de mutações adicionais, esta doença progride com o comprometimento severo da hematopoiese normal, a medida que o

clone leucêmico perde a sua capacidade de diferenciar-se, levando com isso ao acúmulo de células imaturas ou blastos na medula óssea e sangue. Representam de 15–20% de todos os casos de leucemia entre a população ocidental. Os inibidores da tirosina quinase, e em particular o Imatinib, revolucionaram a terapêutica da LMC, tornando-se, na maioria dos casos, a terapêutica preferencial de primeira linha na fase crônica desta patologia (Zainab *et al*, 2010).

A Leucemia Linfocítica Crônica é a segunda leucemia crônica mais comum com cerca de 30% dos casos, e acontece caracteristicamente na população idosa, maior que 60 anos, com uma predominância de 2:1 no sexo masculino (Almeida *et al*, 2009). Trata-se de uma neoplasia hematológica de curso indolente, cujo clone neoplásico é um linfócito B maduro, porém, bloqueado em uma fase de diferenciação que impede a sua transformação em plasmócito.

A Tricoleucemia também chamada de leucemia de células pilosas é um tipo incomum de leucemia crônica com cerca de 1-2% dos casos. A doença acomete adultos, com média de idade em torno de 50 anos, e tem uma forte predominância no sexo masculino (4:1). As células B leucêmicas têm características projeções citoplasmáticas que infiltram a medula óssea e produzem fatores ativadores de fibrose, justificando o encontro freqüente de mielofibrose na biópsia. O nome Tricoleucemia é em virtude das projeções em forma de pêlo (Almeida *et al*, 2009).

1.4.2 Leucemia aguda

As leucemias agudas (LAs) caracterizam-se pela proliferação clonal e pelo bloqueio maturativo das células hematopoéticas, com substituição difusa de células em diferenciação na medula óssea por células neoplásicas. É uma doença bastante heterogênea e de progresso rápido que afeta a maior parte das células ainda não diferenciadas. Para o entendimento deste vasto grupo de entidades patológicas, são necessárias diferentes abordagens analíticas e associações de diversas modalidades de estudos (Oliveira *et al*, 2004). As leucemias agudas são classificadas em duas categorias, a Leucemia Linfóide Aguda (LLA) e a Leucemia Mielóide (LMA). Estas categorias são separadas em subtipos, sendo o diagnóstico diferencial de extrema importância na escolha do curso da terapia, bem como seu prognóstico (Lackritz *et al* 2003).

1.4.2.1 Leucemia linfóide aguda (LLA)

Através de centenas de estudos, uma seqüência bem estabelecida de passos de maturação de linfócitos foi estabelecido, primeiro em células leucêmicas ou linhagens celulares, em seguida, validado em amostras de medula óssea normal. Um resumo razoável e simples foi concebido tanto para maturação de células B, como para as células T. Curiosamente, existem muitas semelhanças nestas duas vias que conduzem ao desenvolvimento das células da imunidade cognitiva. Com base nas etapas de maturação e diferenciação celular, durante a qual ocorre uma diferencial de antígenos, o grupo EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemias) propôs em 1995, uma classificação para Leucemia Linfóide Aguda de células B e T precursoras (Béné, 2005), como mostram as tabelas I e II, com a classificação da linhagem LLA-B e LLA-T, respectivamente. Em ambos os casos, quatro etapas são identificadas, respectivamente, B-I a B-IV e T-I a T-IV, a partir do imunofenótipo mais imaturo para o mais maduro, como mostra a figura 3.

TABELA I – Classificação imunológica da linhagem LLA-B de acordo com a proposta EGIL

	cCD79, CD19, c or s CD22	CD10	c μ	sIg
B-I	+	–	–	–
B-II	+	+	–	–
B-III	+	+	+	–
B-IV	+	+	+	+

(Béné, 2005)

O subtipo mais frequente, tanto em crianças como em adultos é chamada “LLA-B-comum”, caracterizada por uma proliferação inicial de células B, também conhecida como B-II. Nas LLAs a linhagem T é muito menos frequente do que a linhagem B, sendo o subtipo T-III o mais frequente entre as LLA-T. As formas mais raras de ambas as linhagens B e T são, em uma extremidade do espectro, B-I e T-I, ou seja, aqueles com o imunofenótipo mais imaturo, e na outra extremidade, B-IV e T-IV, ou seja, os mais maduros (Béné, 2005).

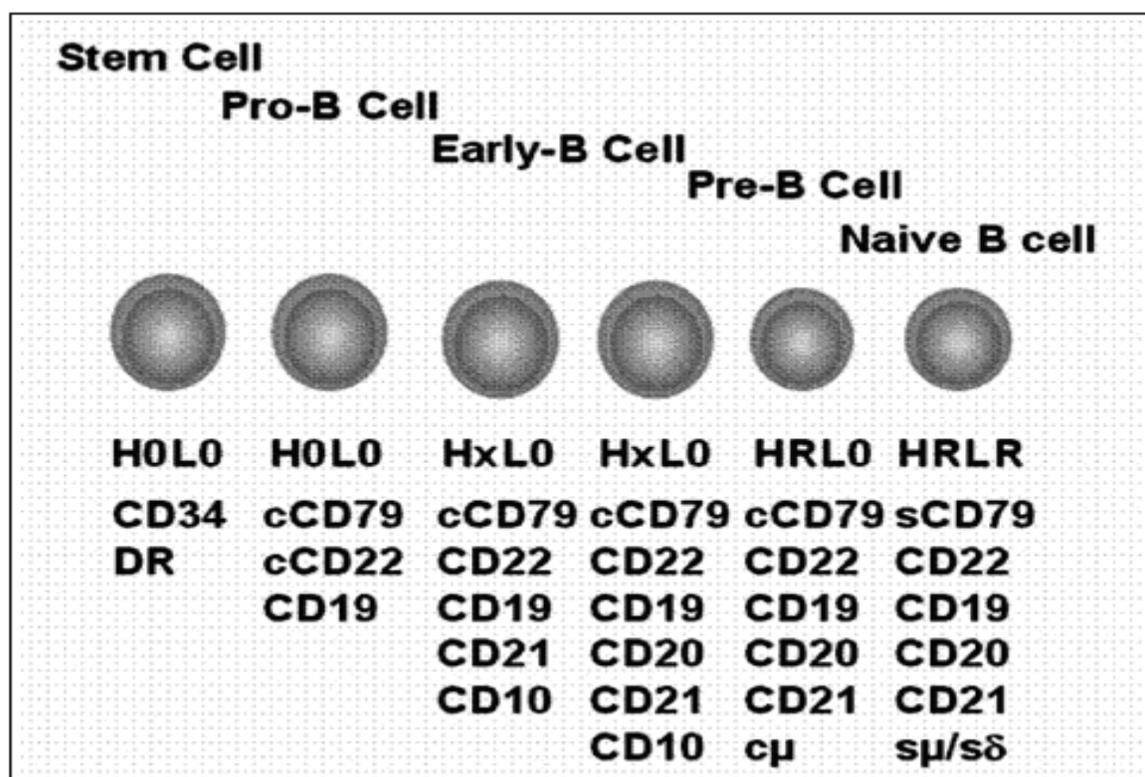


Figura 3. Maturação das células B. A sequência de diferenciação da linhagem B envolve a expressão progressiva de um grande número de antígenos (Béné, 2005)

Como mostrado na figura 3, durante o processo de diferenciação de células B ocorre a expressão diferencial de um grande número de moléculas. Algumas delas são utilizadas como marcadores para a definição dos estágios de diferenciação celular normal, assim como para a definição dos estágios leucêmicos, já mostrados na tabela I. Desse modo, alguns antígenos são muito utilizados na classificação dos subtipos de LLA de células B precursoras, tais como os que serão brevemente descritos abaixo.

A primeira indicação de compromisso com a linhagem B é a expressão intracitoplasmática de CD79a, que começa a ser expressa na fase Pró- B. Esta molécula faz parte do complexo de reconhecimento de antígeno, o qual é composto de uma imunoglobulina de superfície, com uma cauda intracitoplasmática muito curta, associada a dois heterodímeros de CD79a e CD79b (Béné, 2005).

O CD19 é um dos primeiros antígenos de diferenciação da linhagem B. Compreende dois domínios extracelulares da superfamília das imunoglobulinas (IgSF) separados por um

domínio menor e uma longa cauda intracitoplasmática, transportando uma ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based activation motif*). Esta é uma molécula chave no desenvolvimento e na activação de células B (Béné, 2005).

O CD22 existe em duas isoformas, uma com sete domínios e uma cauda intracitoplasmática levando três ITIMs (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) e uma ITAM, e uma variante por splicing com cinco domínios extracelulares e uma cauda intracitoplasmática, com um domínio ITIM. Acredita-se que esses sinais inibitórios estejam envolvidos no controle de respostas de células B a antígenos (Béné, 2005).

O CD10 foi inicialmente previsto ser um antígeno comum de Leucemia Linfóide Aguda ou também chamado de *Calla*. É uma enzima conhecida como a endopeptidase neutra a ou encefalinase. Este cliva pequenos péptidos (3aa) no NH₂ final de aminoácidos hidrofóbicos (Val, Ile, Phe, Leu, Ala). É amplamente expresso por enterócitos do intestino, células epiteliais dos túbulos renais, como também de tecidos polimorfonucleares e cerebrais. Seu papel na maturação das células B é ainda obscuro, porém, podem estar envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação de células B progenitoras, interferindo como fatores ativos ou pró-ativos. A expressão de CD10 é transitória durante a maturação das células B, desaparecendo durante o estágio de maturação pré-B (Béné, 2005).

O estágio de diferenciação B-III ou pré-B é caracterizado pela presença das cadeias intracitoplasmáticas *mu* (μ), cadeia pesada da imunoglobulina IgM, a qual é prontamente detectável por anticorpos policlonais em células permeabilizadas. É também conhecido que uma pequena quantidade das cadeias μ , irão alcançar a superfície das células, em conjunto com as pseudo cadeias leves, em um primeiro passo de selecção e, possivelmente, também para iniciar o rearranjo da cadeia leve de imunoglobulina. As transcrições dos genes rearranjados ocorrem no citoplasma para formar uma imunoglobulina completa, que é transportada para a superfície pelos heterodímeros de CD79 (Béné, 2005). A Imunoglobulina M (IgM) é um anticorpo que perfaz aproximadamente 10% do conjunto de imunoglobulinas. Esta proteína é encontrada também na superfície dos linfócitos B de forma monomérica, realizando a função de receptor de antígenos (Bennett *et al*, 1982).

O CD9 pertence à família das tetraspaninas, e é expresso numa variedade de células hematopoéticas e epiteliais, como células precursoras B, linfócitos B, monócitos, megacariócitos, entre outros. Pode desencadear a ativação e agregação plaquetária, além de

modular a adesão e migração celular. O CD9 tem sido relatado ser associado com a progressão do tumor e metástases (Béné, 2005).

O CD20 está presente em células B normais do sangue periférico e tecidos linfóides. Ausente em linfócitos T periféricos, monócitos e granulócitos. Na ontogenia das células B, o CD20 se expressa após HLA-DR, TdT, CD19 e CD10, coincidindo com o estágio pré-B na maturação celular (Bennett *et al*, 1982).

A *deoxinucleotidil-transferase terminal* (TdT) é uma enzima de replicação (DNA polimerase) que se liga a desoxinucleotídeos na terminação 3' do DNA e atua no rearranjo dos genes que codificam as imunoglobulinas e os receptores de células T. Está presente nos estágios iniciais da diferenciação celular de linfócitos, participando na determinação da diversidade antigênica dos receptores de células precursoras T e B por ocasião da recombinação somática em algumas células mielóides (Béné, 2005).

Assim como ocorre para a classificação dos subtipos de LLA de células B precursoras, algumas moléculas também são utilizadas na classificação dos subtipos de LLA de células T precursoras, onde a sequência de maturação envolve a expressão progressiva destas durante a diferenciação, tais como as que serão brevemente descritas abaixo.

Os receptores de células T (TCR) são os que mais especificam essas células, e sua estrutura multimolecular de reconhecimento de antígeno específico é composta da molécula heterodimérica TCR, com uma cauda intracitoplasmática muito curta, associada a componentes CD3. O heterodímero TCR é constituído pela associação de duas moléculas da superfamília das imunoglobulinas com um domínio constante perto da membrana, e um domínio variável na extremidade N-terminal. Este domínio é constituído pelo rearranjo de genes de TCR-específicos VDJ e VJ. Existem dois tipos de TCR, um heterodímero $\alpha\beta$ em mais de 95% de células-T maduras, e um TCR $\gamma\delta$ em cerca de 5% (Béné, 2005).

O complexo CD3 (cCD3) compreende quatro cadeias com um domínio extracelular e longas caudas intracitoplasmáticas com ITAM, respectivamente nomeadas γ , δ e ϵ , a última presente duas vezes provavelmente em cada lado do TCR. O CD3 constitui o primeiro conjunto de marcadores citoplasmáticos propostos nas células T, como mostra a figura 4. Na diferenciação normal, este antígeno é utilizado para trazer o receptor de células T para a superfície do linfócitos T maduro (Béné, 2005).

O CD7 assina a fase Pró-T da célula, sendo um marcador detectável na membrana. Existem outros marcadores na fase Pró-T, caracterizada por uma expressão de superfície mais completa na linhagem T, onde CD7 pode ser detectada juntamente com o CD2 e CD5 como mostra a tabela ii e a figura 4. Esta é a última etapa de maturação onde as células T podem ser encontradas na medula óssea. Suspeita-se que as propriedades de adesão de CD7 e CD2 são utilizadas por estas células para alcançar o sangue periférico, embora os mecanismos envolvidos ainda não estejam claros (Béné, 2005).

O CD2 é uma molécula de adesão celular encontrada na superfície de linfócito T e células NK (Natural Killer). Apresenta dois domínios extracelulares e é chamado de antígeno de superfície de células T. Interage com outras moléculas de adesão, como o antígeno-3 linfócito-funcional (LFA-3/CD58) e atua como molécula co-estimulatória no linfócito T e NK. (Béné, 2005).

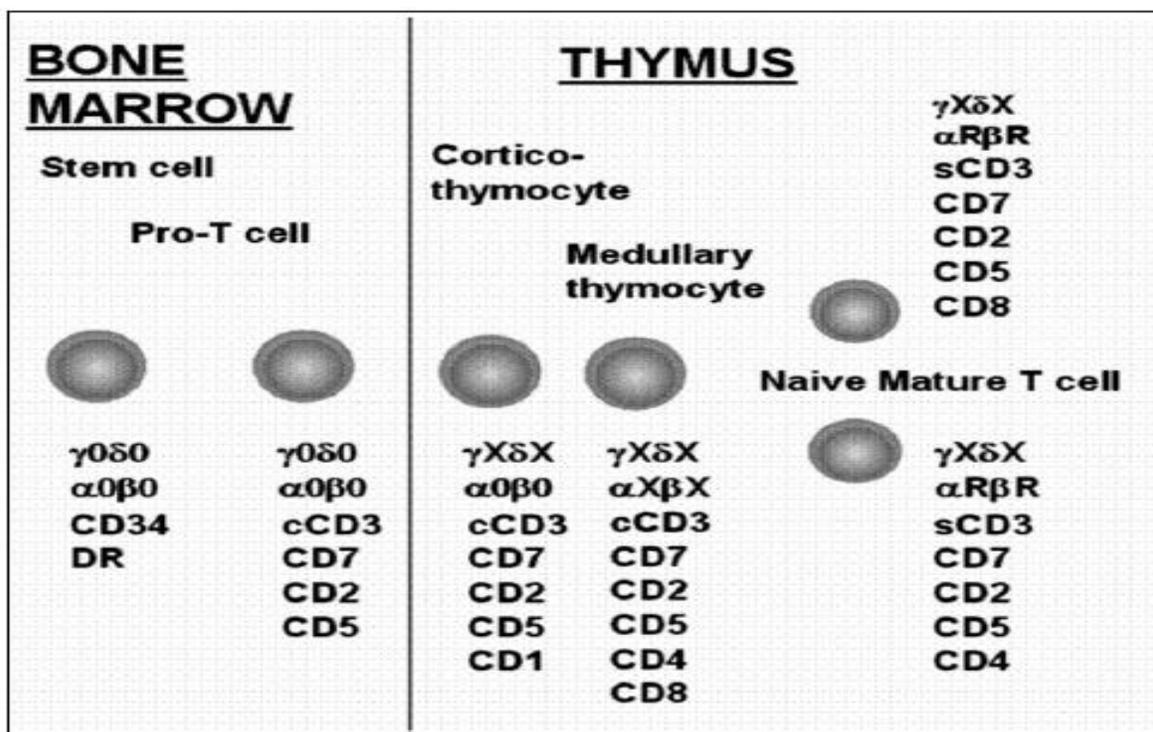


Figura 4. Via de maturação de células T. A sequência de diferenciação da linhagem T envolvendo a expressão progressiva de um grande número de antígenos (Béné, 2005)

O CD5 é um receptor de atividade dupla, dando sinais tanto estimulatórios como inibitórios dependendo do tipo de célula (T ou B) ou a fase do desenvolvimento (timócitos T ou madura) sobre o qual ela é expressa (Béné, 2005).

O CD1 é uma molécula de expressão restrita nos timócitos. Quando as células pró- T interagem com as células epiteliais do córtex do timo, elas adquirem a expressão transitória da molécula CD1, característica destes timócitos corticais, como também mostra a figura 4 (Béné, 2005).

TABELA II – Classificação imunológica da linhagem LLA-T de acordo com a proposta EGIL

	cCD3	CD7	CD2, CD5, CD8	CD1a	CD3+/CD1a-
T-I	+	+	-	-	-
T-II	+	+	+	-	-
T-III	+	+	+	+	-
T-IV	+	+	+	-	+

(Béné, 2005)

A molécula CD4 é uma glicoprotéica de 62kDa e com cadeia simples expressa na superfície celular, sendo expressa em uma subpopulação de linfócitos T (*helper/inducer*) e monócitos/macrófagos. Tem papel nas interações entre células T-T, T-B ou T-macrófago, via reconhecimento da molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II. As células T-helper são essenciais na indução e regulação da resposta imune T e B (Bennett *et al*, 1982).

O CD8 é uma molécula de membrana com aproximadamente 32-34kDa, que identifica os linfócitos T CD8+, também conhecidos como células T citotóxicas. Esta molécula interage com o TCR como co-receptor para o complexo principal de histocompatibilidade (MHC), classe I, no reconhecimento antigênico (Bennett *et al*, 1982).

A subunidade alfa do receptor de interleucina 7 (IL7R- α) também conhecida como CD127, é uma proteína que, em humanos é codificada pelo IL7R- α gene. Desempenha um papel crítico no desenvolvimento de linfócitos, durante a recombinação V (D) J (Béné, 2005).

A Imunoglobulina G (IgG) é um isotipo de anticorpo complexa composta por quatro cadeias peptídicas - duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas dispostas numa forma de “Y” típico de monômeros de anticorpos. O Controle IgG destina-se a ser utilizado como um controle negativo de anticorpos monoclonais. A IgG é usada em lugar de um anticorpo monoclonal primário com uma parte de cada amostra de paciente para avaliar a coloração não específica. Isto permite uma melhor interpretação da coloração específica no local. Este controle é fácil de atingir e pode ser usado rotineiramente na coloração imuno-histoquímica (Béné, 2005).

1.4.2.1.1 Alterações genéticas nas LLAs

Muitas alterações gênicas já foram descritas em LLA, no entanto, mudanças na expressão e ativação de certos genes responsáveis por codificar fatores de transcrição (FT) têm sido reconhecidas como o mecanismo mais freqüente envolvido nesta patologia (Biondi e Masera *et al*, 1998).

Os Fatores de Transcrição são proteínas que regulam a expressão gênica através da ligação a regiões promotoras do DNA, levando ao início ou à inibição da transcrição. Estudos com camundongos transgênicos demonstraram a importância dos FT para a hematopoiese normal, mostrando as alterações no ciclo celular e a perda da funcionalidade de uma ou mais linhagens (Look *et al*, 1997).

As translocações nas leucemias agudas mostram uma especificidade para progenitores hematopoéticos bloqueados em um determinado estágio de diferenciação. Esta propriedade sugere que as diferentes oncoproteínas produzidas interferem significativamente com redes transcricionais, as quais normalmente funcionam em colaboração com fatores de crescimento e seus receptores regulando a hematopoese (Rabbits *et al*, 1999). Em seguida, algumas translocações comumente encontradas em pacientes com LLA:

- t(12; 21) (p13; q22) com o gene de fusão *TEL-AML*:

A maioria dos casos citados na literatura associa a presença da translocação *TEL-AML1* ao imunofenótipo B (Van Dongen *et al*, 1999).

- t(1;19) (q23;p13) com o gene de fusão *PBX1-E2A*:

A translocação t(1;19) (q23;p13) foi descrita em 1984 por diferentes grupos que estudavam LLA pré-B (Borkhardt *et al*, 1997).

- t(4;11)(q21;q23) com o gene de fusão *MLL-AF4*:

O gene de fusão *MLL-AF4* envolve a banda 11q23 do gene *MLL* (também denominado *ALL-1*, *HRX*, *HTRX1*) e o gene *AF4* (cromossomo 4). Tem sido associada com o fenótipo pró-B, e é indicativa de mau prognóstico (Druker *et al*, 2001).

1.4.2.2 Leucemia mielóide aguda (LMA)

A LMA é uma neoplasia hematológica que representa 15-20% de todas as leucemias agudas da infância e é responsável por 30-40% das mortes de todos os pacientes pediátricos com leucemia aguda. Atualmente, a sobrevida livre de eventos em crianças com LMA é de cinco anos com taxas entre 49% e 63%. Em adultos representa cerca de 80% dos casos. A LMA é decorrente do bloqueio no processo de diferenciação terminal que leva ao acúmulo progressivo de precursores granulocíticos e monocitóides na medula óssea e sangue periférico, com inibição da função hematopoética normal (Ferretti *et al*, 2012).

A distinção entre os diversos subgrupos morfológicos depende da proporção de células com evidência de maturação granulocítica, monocítica, eritrocítica e/ou megacariocítica.

De acordo com a classificação FAB, casos de LMA são classificados em 11 subtipos com base na morfologia, grau de maturação dos blastos, e características citoquímicas. Os 11 grupos diferentes estão indicadas como M0 (leucemia mielóide indiferenciada ou minimamente indiferenciada), M1 (leucemia mielóide sem maturação), M2 (leucemia mielóide com maturação granulocítica), M3 (leucemia promielocítica hipergranular), M3v (leucemia promielocítica microgranular) M4 (leucemia mielomonocítica), M4Eo (mielomonocítica juntamente com eosinofilia), M5a (leucemia monoblástica), M5b (leucemia

monocítica), M6 (leucemia eritróide), e M7 (leucemia megacarioblástica) (Ferretti *et al*, 2012).

A LMA-M0 é caracterizada pela infiltração da medula óssea por células blásticas, as quais possuem reação positiva por citoquímica para mieloperoxidase (MPO). Apesar da análise morfológica e citoquímica serem mais utilizadas no diagnóstico de LMA, a análise imunofenotípica é essencial no diagnóstico de LMA-M0 e LMA-M7, e na distinção desses subtipos com LLA. Além disso, a análise imunofenotípica auxilia no diagnóstico de casos morfológicamente mais difíceis de elucidar, assim como na confirmação do subtipo leucêmico (Varma e Naseem, 2011). O estudo imunofenotípico revela população blástica com positividade para pelo menos um dos antígenos de linhagem mielóide CD33, CD13 e/ou CD11b (Bennett *et al*, 1982).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima expressa em quase todos os níveis de células mielóides. Tem uma localização intracitoplasmática, dentro de fagossomos celulares, e está envolvida na geração de peróxido de hidrogênio. É composto por duas cadeias longas e duas cadeias curtas, ligadas por um domínio globular, como mostrado na figura 5 (Bennett *et al*, 1982).

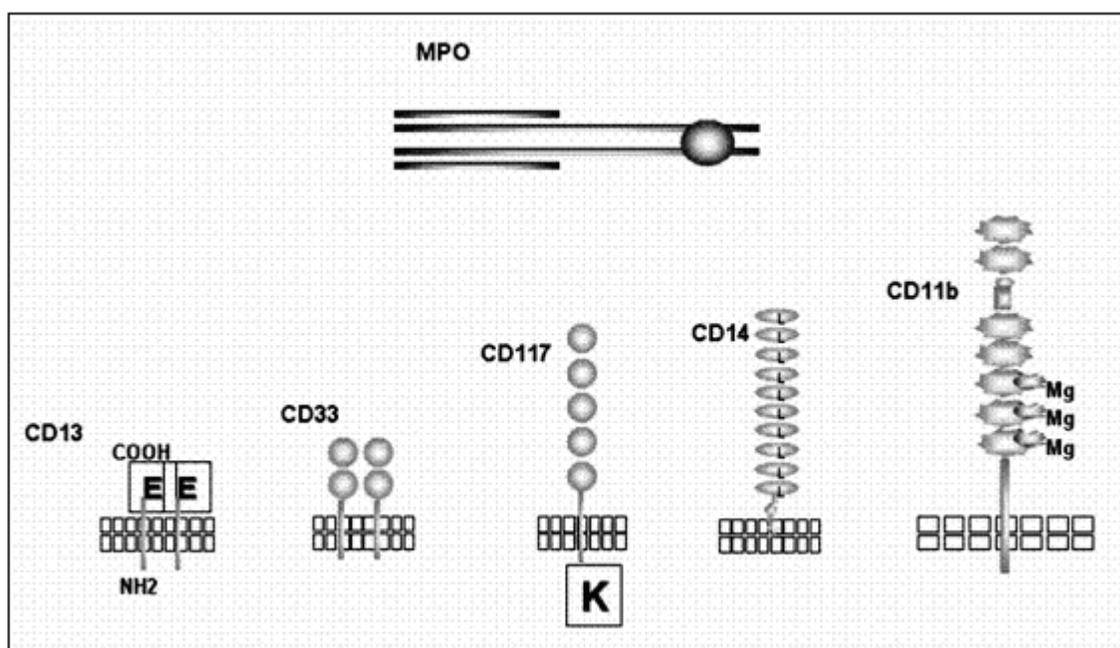


Figura 5. Estrutura molecular da diferenciação alguns antígenos da linhagem mielóide (Béné, 2005)

A integrina CD11b é um receptor de complemento CR3. Ela também exerce uma função de molécula de adesão, capaz de se ligar extracelularmente aos componentes da matriz extracelular, e intracelularmente a moléculas do citoesqueleto. Ela contribui para a mobilidade das células mielóides, onde estas se movem rapidamente para locais de inflamação (Bennett *et al*, 1982).

O CD13 é um ectopeptidase que partilha muitas características com CD10, embora seja um homodímero com dois domínios enzimáticos. Também é fortemente expresso na borda de enterócitos e células epiteliais tubulares renais (Bennett *et al*, 1982).

O CD33 é um homodímero membro da IgSF, com dois domínios extracelulares para cada monômero. Isso provavelmente faz com que a molécula esteja envolvida em interações célula-célula. Os dois marcadores da linhagem mielóide CD13 e CD33 associados, geralmente em conjunto com MPO, mas na ausência de marcadores associados da linhagem linfóide, permitem confirmar ou identificar a LMA (Bennett *et al*, 1982).

A LMA-M1 é caracterizada por células imaturas, com sinais mínimos de diferenciação granulocítica, com o MPO positivo (Bennett *et al*, 1982).

A LMA-M2 é um subtipo definido pela FAB com a presença de pelo menos 30% de blastos na medula óssea, associados a mais de 10% de maturação da série granulocítica. Os blastos são positivos para os antígenos de linhagem mielóide CD13, CD33, CD65w e anti-MPO. No entanto, o achado imunofenotípico comum nesse subtipo é a presença dos antígenos de linhagem linfóide (CD19) ou linhagem NK (CD56) associados aos antígenos CD33 e CD34 (Bennett *et al*, 1982).

O CD34 é um marcador de imaturidade, que muitas vezes ainda é expresso por blastos leucêmicos. Apresenta-se em raros casos de leucemia aguda indiferenciada, onde a sua presença como antígeno de diferenciação, em conjunto com positividade fraca para CD45, confirmam a origem hematopoética das células (Bennett *et al*, 1982).

O CD56 é uma molécula de adesão neuronal celular, normalmente expresso em algumas células NK e linfócitos. Por vezes apresenta-se em monócitos, e são frequentemente expressos em blastos de LMA (Bennett *et al*, 1982).

O CD65w é mais uma característica de blastos envolvidos em diferenciação granulocítica. Está presente em alguns casos de LLA da linhagem B- I, bem como durante a diferenciação mielomonocítica, juntamente com CD15 (Bennett *et al*, 1982).

A leucemia aguda promielocítica ou LMA-M3 é caracterizada pela presença de promielócitos atípicos em mais de 50% da celularidade total da medula óssea e corresponde a 5-10% dos casos de LMA (Bennett *et al*, 1982). Os blastos apresentam auto-fluorescência, e positividade para os marcadores de linhagem mielóide CD13 e CD33. Caracteristicamente, os antígenos CD34, HLA-DR e CD14 são negativos (Bennett *et al*, 1982).

O CD14 é raramente observado em blastos de LMA, mas pode estar presente em alguns casos raros com diferenciação mielomonocítica. No entanto, CD14 é útil para a separação das células blásticas do restante de monócitos, que co-expressam fisiologicamente o CD33 e CD13 (Bennett *et al*, 1982).

A expressão do antígeno HLA DR de classe II, também é uma característica das células estaminais, e podem ajudar na identificação de leucemias agudas indiferenciadas. É quase sempre presente em todas as células B e muitas vezes na LMA, com exceção a LMA promielocítica M3 (Bennett *et al*, 1982).

A LMA-M4 é definida pela presença de um componente de células monocíticas entre 20% e 80% das células blásticas na medula óssea, podendo apresentar mais que 5.000 monócitos/mm³ no sangue periférico, associado a um aumento do componente eosinofílico anormal. Apresentam marcação positiva para os antígenos de linhagem mielóide CD13 e CD33, assim como para os antígenos de linhagem monocítica CD14, CD15 e CD11b. Caracteristicamente, pode ocorrer expressão anômala do antígeno de linhagem linfóide CD2 (Bennett *et al*, 1982).

O CD15 é um antígeno útil na identificação da LMA com diferenciação granulocítica ou monocítica. Também pode ser utilizado para excluir neutrófilos maduros ou identificar a hemodiluição de uma amostra de medula óssea (Bennett *et al*, 1982).

A LMA-M5 é definida quando 80% ou mais das células não eritróides da medula óssea são compostas por monoblastos, promonócitos ou monócitos. O subtipo LMA-M5a apresenta > 80% de monoblastos, enquanto o subtipo LMA-M5b tem < 80% de monoblastos. Os antígenos de linhagem mielóide CD33 são positivos e os CD13, negativos. Os antígenos CD14 e CD15 são positivos. É comum a expressão fraca do antígeno CD4. O marcador CD34 geralmente é negativo (Bennett *et al*, 1982).

A LMA-M6 é uma forma de apresentação de neoplasia do sistema hematopoético em que há envolvimento de células imaturas do compartimento eritróide (Valli *et al*, 2002). É

também denominada de eritroleucemia, e consiste em uma neoplasia que envolve mieloblastos e eritroblastos (Bennett *et al*, 1976). O estudo imunofenotípico revela uma população blástica com positividade para pelo menos um dos antígenos de linhagem mielóide como CD13, CD33, CD36 e a Glicoforina A (Valli *et al*, 2002).

O CD36 identifica uma glicoproteína de peso molecular de 90kDa expressa na superfície celular. É utilizado na caracterização da LMA-M6, associado a CD71 e glicoforina-A (CD235) (Valli *et al*, 2002).

O CD235 (glicoforina-A) é o mais abundante dos cinco tipos de sialoglicoproteínas transmembranares presentes em eritroblastos e em eritrócitos. As glicoforinas A são homólogas e codificadas por dois genes estreitamente relacionados. A precisa função biológica da glicoforina não é bem compreendida. Sabe-se que o alto conteúdo de ácido siálico da superfície da hemácia lhe dá cargas negativas, sugerindo papel importante na modulação da interação entre hemácias e o endotélio (Bennett *et al*, 1982).

A LMA-M7 é um subtipo raro originado a partir de megacarioblastos primitivos que corresponde a menos de 5% dos casos de LMA, e está freqüentemente associada a mielofibrose. É definida pela presença de >30% de megacarioblastos entre as células nucleadas na medula óssea. O diagnóstico é definido pela positividade para os antígenos de linhagem megacariocítica CD41a (complexo glicoprotéico IIb/IIIa), CD42b (glicoproteína Ib) e a CD61 (glicoproteína IIIa). Alguns casos podem ser HLA-DR negativo (Bennett *et al*, 1982).

O CD41a identifica a cadeia α 2a da integrina que se liga covalentemente à cadeia β 3 (CD61), formando um complexo glicoprotéico na superfície celular (GP IIb). O GP IIb é denominado receptor panplaquetário, se ligando ao fibrinogênio, fibronectina e trombospondina. É expresso em plaquetas, megacariócitos e células endoteliais, participando na agregação plaquetária. O CD41 é útil para o diagnóstico de leucemia megacarioblástica LMA-M7 (Bennett *et al*, 1982).

O CD42b identifica uma glicoproteína transmembrana de 170kDa, composta de cadeias α e β . O antígeno é encontrado em plaquetas, megacariócitos e células endoteliais. É utilizado para caracterização de leucemia megacarioblástica e síndrome de Bernard-Soulier (Bennett *et al*, 1982).

O CD61 é a subunidade $\beta 3$ de integrina, de composição glicoprotéica, e peso molecular de 110kDa. Está envolvida na agregação e adesão plaquetária à matriz extracelular. Sua expressão é relativamente específica para megacariócitos, plaquetas e macrófagos. O CD61 é utilizado no diagnóstico da leucemia megacarioblástica M7 (Bennett *et al*, 1982).

O CD64 identifica uma glicoproteína monomérica de 75kDa com alta afinidade por IgG. Se expressa em macrófagos, monócitos e neutrófilos induzidos por interferon γ , resultando em células que são ativadas no mecanismo oxidativo (Bennett *et al*, 1982).

O CD117 reconhece um epítipo extracelular de proto-oncogene (C-KIT) pertencente à família dos receptores tirosinoquinase. O antígeno é o receptor para o fator de crescimento SCF (Stem Cell Factor), sendo expresso em poucas células da medula óssea normal. A maioria das células CD117+ co-expressam CD34. É utilizado na identificação de células hematopoéticas progenitoras nas leucemias mielóides (Béné, 2005).

Algumas células precursoras podem ser diferenciadas pela expressão de marcadores celulares, assim como pela fase de rearranjo das cadeias de imunoglobulinas. O CD45 também chamado de antígeno leucocitário comum (LCA), é encontrado em células de origem hematopoiética, exceto eritrócitos e plaquetas. Tem papel em vários processos imunológicos como interação célula-célula, diferenciação e ativação de linfócitos T e B, citólise por células NK e por linfócito T citotóxico (Béné, 2005).

1.4.2.2.1 Alterações genéticas nas LMAs

Várias alterações cromossômicas foram descritas na LMA e algumas alterações recorrentes associam-se a um subtipo FAB particular. A partir da clonagem dos genes presentes nas translocações cromossômicas recorrentes na LMA foram possíveis caracterizar três grupos distintos com base nos mecanismos moleculares envolvidos: o fator de ligação ao núcleo (“Core Binding Factor” / CBF), o receptor α do ácido retinóico, (RAR α) e o gene MLL (Myeloid / Lymphoid Leukemia) (Hayashi *et al*, 2000).

- Translocações envolvendo genes codificantes de CBF:

As translocações que envolvem genes que codificam fatores de transcrição com atividade nuclear envolvem principalmente os genes AML1 e CBF β , os quais produzem subunidades de um complexo regulador da transcrição, essencial para a ativação de vários genes (Downing *et al*, 2001).

- Translocações envolvendo o receptor α do ácido retinóico (RAR α):

As alterações envolvendo o gene RAR α também afetam a ativação de genes responsáveis pelo remodelamento da cromatina. Este gene codifica um receptor nuclear, dependente de ácido retinóico, com domínio de ligação ao DNA e outro domínio responsável pela ligação ao ácido retinóico e pela dimerização do receptor. A regulação positiva de RAR α em presença de ácido retinóico é feita pela ligação de co-ativadores a RAR α . Esta interação leva ao aumento de acetilação das histonas, com remodelamento da cromatina, e conseqüente aumento da transcrição (Huang *et al*, 1993).

- Translocações envolvendo o gene MLL:

O gene MLL codifica uma proteína de estrutura complexa com um domínio de ligação ao DNA e outro com homologia a reguladores de genes importantes nos processos básicos do desenvolvimento normal e da hematopoese. O gene MLL foi identificado nas translocações recorrentes envolvendo o cromossomo 11 locus q23 (11q23), descritas em síndromes mielodisplásicas e leucemias agudas, especialmente nas LLAs de lactentes como já foi abordado na descrição da t(4;11) (Ferrando *et al*, 2003).

Nas LMAs as alterações envolvendo MLL podem ser encontradas em qualquer subtipo FAB, mas predominam no subtipos M4 e M5 e são frequentemente associadas à LMAs secundárias a terapias. Existem ainda relatos de duplicação parcial ou em tandem do gene MLL, tendo sido o primeiro marcador observado em LMAs com citogenética normal (Schoch *et al*, 2003).

1.5 Diagnóstico das leucemias agudas

1.5.1 Análise citomorfológica

A análise morfológica das células hematopoéticas é a etapa inicial para a identificação dos subtipos de leucemias linfóides e mielóides, onde a visualização das características celulares direcionará o painel imunofenotípico adequado aos subtipos leucêmicos. De acordo com a classificação proposta pela FAB em 1982, as leucemias agudas apresentam características morfológicas distintas, como mostram as tabelas III e IV, respectivamente.

As LLAs apresentam pouco citoplasma, com basofilia variada. Os bastões de Auer nunca estão presentes e, geralmente não são encontradas outras granulações citoplasmáticas. São subdivididas morfológicamente em três tipos distintos: L1, L2 e L3 (Bennett *et al*, 1982).

TABELA III: Classificação e características morfológicas das LLAs (Segundo a FAB)

Tipo de LLA	Definição	Características Morfológicas
L1	Leucemia linfóide com diâmetro celular pequeno.	Apresentam forma nuclear regular com fenda ocasional e sem nucléolos. A maioria das células é pequena e homogênea, com cromatina fina ou aglomerada. Os conteúdos nucleares são raramente visíveis. O citoplasma é escasso e moderadamente basofílico.
L2	Leucemia linfóide com diâmetro celular grande.	As células são heterogêneas, apresentam forma nuclear irregular e com cromatina fina. Algumas fissuras no núcleo são comuns. Um ou mais nucléolos grandes são visíveis. O citoplasma é abundante e varia de cor. Algumas irregularidades na membrana podem

		ocorrer. Alguns blastos L2 podem ser confundidos com os de LMA.
--	--	---

(Bennett *et al*, 1982)

L3	Leucemia linfóide com diâmetro celular grande	As células são grandes e homogêneas. Apresentam forma nuclear redonda ou oval, com cromatina fina. Ocorre a presença visível de 1 a 3 nucléolos proeminentes. O citoplasma é profundamente basofílico com vacúolos visíveis na maioria das células.
-----------	---	---

(Bennett *et al*, 1982)

Como já mencionado no item 3.2.2, as LMAs são classificados em 11 subtipos com base na morfologia, grau de maturação dos blastos, e características citoquímicas. Os 11 grupos diferentes estão indicadas como: M0, M1, M2, M3, M3v M4, M4Eo, M5a, M5b, M6 e M7 (Ferretti *et al*, 2012).

TABELA IV: Classificação e características morfológicas LMAs (Segundo a FAB)

Tipo de LMA	Definição	Características Morfológicas
M0	Leucemia mielóide de blastos indiferenciados ou minimamente indiferenciados.	Predomínio de mieloblastos pequenos com diferenciação mínima ou indiferenciada, com cromatina frouxa e nucléolo evidente, apresentando citoplasma agranular, sem bastonete de Auer. Morfológicamente assemelham-se aos blastos linfóides.

(Bennett *et al*, 1982; adaptado de Pombo-de-Oliveira *et al*, 2008)

M1	Leucemia mielóide sem maturação.	Apresentam mieloblastos pouco diferenciados, com alguns grânulos azurofílicos no citoplasma e raros bastonetes de Auer, as células são imaturas, com sinais mínimos de diferenciação granulocítica.
M2	Leucemia mielóide com maturação granulocítica.	Caracterizam-se por apresentar mieloblastos com diferenciação até prómielócito grandes com abundante citoplasma basofílico, freqüentemente contendo numerosos grânulos azurofílicos. Em alguns casos os blastos podem apresentar grânulos grandes (pseudo-Chediak-Higashi). Os bastonetes de Auer são freqüentes. Promielócitos, mielócitos e granulócitos maduros com variados graus de displasia são vistos na medula óssea. Estas células podem mostrar segmentação nuclear anormal e/ou disgranulopose. Os precursores eosinofílicos freqüentemente estão aumentados, mas não exibem anormalidades citológicas, citoquímicas ou citogenéticas.

(Bennett *et al*, 1982; adaptado de Pombo-de-Oliveira *et al*, 2008)

M3	Leucemia promielocítica hipergranular.	É caracterizada pela presença de promielócitos atípicos e núcleo excêntrico ou pleomórfico. O citoplasma apresenta abundante granulação grosseira, róseos, púrpuros e numerosos bastonetes de Auer formando feixes e fagots. Em alguns casos, os grânulos citoplasmáticos são tão numerosos e grandes que tornam difícil distinguir o núcleo do citoplasma.
M3v	Leucemia promielocítica microgranular (M3v-variante).	Apresentam blastos com núcleo volumoso, convoluto, irregular e lobulado, lembrando o núcleo de um precursor monocítico, em forma de ampulheta. O citoplasma é basofílico com granulação escassa e poucos Bastonetes de Auer. Ocasionalmente podem ocorrer projeções citoplasmáticas, lembrando megacarioblastos.
M4	Leucemia mielomonocítica aguda	Caracterizam-se pela presença de componentes granulocítico como promielócitos e monocítico imaturos em proporções variáveis na medula óssea. Podem ocasionalmente conter bastonetes de Auer. Morfologia semelhante ao subtipo M2. O diagnóstico baseia-se na presença de pelo menos 20% de precursores de monócitos dentre as células não eritróides na medula óssea.

(Bennett *et al*, 1982; adaptado de Pombo-de-Oliveira *et al*, 2008)

M4Eo	Leucemia mielomonocítica com eosinofilia	<p>Apresentam proliferação medular de células dismórficas com granulações anormais e bastonetes de Auer. No entanto, o achado morfológico típico é a presença de eosinofilia em variados estágios de maturação. Os grânulos eosinofílicos são maiores que os normalmente observados em precursores eosinófilos normais, têm coloração alaranjado, e, em algumas células, são tão densos que podem obscurecer o núcleo. Os eosinófilos maduros ocasionalmente podem apresentar hiposegmentação nuclear (<i>pseudo Pelger-Huet</i>). A série neutrofílica na medula óssea é escassa. Ausência dos cristais eosinofílicos normais.</p>
M5a	Leucemia monoblástica pouco diferenciada.	<p>Os monoblastos são células grandes com citoplasma abundante e basofilia acentuada. Finos grânulos azurofílicos e vacúolos podem estar presentes, lembrando o subtipo L2 das LLAs. Frequentemente o núcleo é redondo com cromatina frouxa e presença de um ou mais nucléolos proeminentes. A presença de bastonete de Auer é incomum.</p>

(Bennett *et al*, 1982; adaptado de Pombo-de-Oliveira *et al*, 2008)

M5b	Leucemia monocítica diferenciada	Os promonócitos têm núcleo convoluto, lobulado e irregular. A presença de nucléolo ocasional. O citoplasma é cinzento, menos basofílico e algumas vezes têm grânulos e vacúolos mais evidentes. Não há bastonetes de Auer. A reação citoquímica para MPO geralmente é negativa. A reação da esterase é positiva e forte, podendo ser inibida pelo fluoreto de sódio, ao contrário das células mielóides não monocíticas.
M6	Leucemia eritróide (eritroleucemia)	Caracterizam-se pela proliferação de precursores eritoblásticos na medula óssea igual ou superior a 50% do total das células mononucleares. Presença de proeritroblastos anormais e gigantes com núcleos polilobulados. A proporção de promielócitos e mieloblastos podem ser superiores a 30%.

(Bennett *et al*, 1982; adaptado de Pombo-de-Oliveira *et al*, 2008)

M7	Leucemia megacarioblástica	<p>Os blastos podem variar de pequenas células arredondadas com alta relação núcleo/citoplasma (N/C), assemelhando-se a linfoblastos de L1, a células um pouco maiores com relação N/C mais variada, assemelhando-se aos linfoblastos de L2.</p> <p>A cromatina, algumas vezes, é relativamente densa; outras vezes, o padrão aparenta ser bem mais delicado. O núcleo é geralmente arredondado ou com contorno discretamente irregular, com cromatina frouxa, contendo um a três nucléolos. O citoplasma é tipicamente basofílico, e pode, ou não, ser vacuolado ou apresentar projeções. Algumas vezes exhibe uma fina granulação.</p>
----	----------------------------	--

(Bennett *et al*, 1982; adaptado de Pombo-de-Oliveira *et al*, 2008)

1.5.2 Análise imunofenotípica

A citometria de fluxo (CF) é um método rápido que permite a determinação simultânea de múltiplas propriedades físicas de partículas isoladas em suspensão, como as células leucêmicas. Este método permite a identificação de marcadores celulares expressos em cada tipo e subtipo de leucemias agudas, mostrando em que estágio de desenvolvimento se encontra o clone leucêmico, através de anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados a um determinado fluorocromo (Ahluwalia *et al*, 2012).

A classificação imunofenotípica das leucemias baseou-se na marcação de células em suspensão incubadas com anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados a um determinado fluorocromo. A detecção dessas células ocorre através de imunofluorescência direta com

leitura por citometria de fluxo. Os sinais fluorescentes são decorrentes da positividade dos antígenos de membrana e intracelulares nas células examinadas, ou seja, emite os sinais dos marcadores celulares. Muito usado atualmente, os citômetros com um laser único permitem a detecção simultânea de pelo menos 3 fluorocromos (Ahluwalia *et al*, 2012).

Os mais comuns são isocianeto de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e a proteína peridina clorofilada (PerCP). Os citômetros equipados com segundo ou terceiro laser, estão sendo cada vez mais incorporados nos laboratórios de diagnóstico hematológico, permitindo análises adicionais de fluorocromos como APC, APC-Cy-7, Azul Pacífico e Cascata amarela, o que implica que pelo menos 6 fluorocromos podem ser analisados simultaneamente (Ahluwalia *et al*, 2012).

Essa metodologia é capaz de detectar antígenos intracitoplasmáticos ou de membrana, de acordo com o tipo de preparação da amostra. O perfil imunofenotípico dos pacientes é estudado por citometria a partir de suas amostras de medula óssea (MO) ou sangue periférico (SP). A caracterização das leucemias por imunofenotipagem é particularmente útil quando a morfologia é de difícil interpretação, permitindo a identificação dos subtipos particulares de leucemias não reconhecidos pelos critérios morfológicos, que podem ter significância prognóstica (Drexler *et al*, 1988).

Com base na eficiência desta metodologia, e nos marcadores para cada tipo, subtipo e estágio maturativo pelas quais as células passam, vários painéis para marcação imunofenotípica de citoplasma e de superfície celular foram elaborados para auxiliar na confirmação do diagnóstico das leucemias agudas, pois se sabendo a origem, se linfóide ou mielóide, a conduta terapêutica será diferente, como mostram as tabelas V, VI, VII e VIII elaboradas pelo PHOP.

TABELA V - Painel intracelular de marcação para imunofenotipagem

Tubo	FITC	PE	CY5/PerCP
1	IgG	IgG	IgG
2	TdT	CD22+CD79	CD45
3	TdT	CD3	CD45
4	aMPO	IgM	CD45

(adaptada de Pombo-de-Oliveira *et al*, 2008)

TABELA VI - Pannel de membrana de marcação para imunofenotipagem LLA-B

Tubo	FITC	PE	CY5/PerCP	APC
1	IgG	IgG	IgG	-
2	CD9	CD10	CD19	CD45
3	HLA-DR	CD34	CD45	-
4	CD4	CD8	CD45	-
5	CD7	CD20	CD45	-
6	CD13+CD33	CD19	CD45	-

(adaptada de Pombo-de-Oliveira *et al*, 2008)

OBS: Em casos suspeitos de LLA-B do tipo IV (L3), esses anticorpos deverão ser acrescentado

Tubo	FITC	PE	CY5/PerCP
1	CD19	IgM	CD45
2	Cadeia κ	Cadeia λ	CD45

(adaptada de Pombo-de-Oliveira *et al*, 2008)

TABELA VII - Pannel de membrana de marcação para imunofenotipagem LLA-T

Tubo	FITC	PE	CY5/PerCP	APC
1	IgG	IgG	IgG	-
2	CD1a	CD3	CD45	-
3	CD10	CD19	CD45	-
4	CD4	CD8	CD45	-
5	TCR $\gamma\delta$	TCR $\alpha\beta$	CD45	-
6	CD5	CD117	CD45	-
7	CD1a	CD7	CD45	-
8	HLA-DR	CD34	CD45	-
9	CD5	CD117	CD45	-
10	CD2	CD135	CD45	-
11	CD7	CD10	CD127	CD45

(adaptada de Pombo-de-Oliveira *et al*, 2008)

TABELA VIII - Pannel de membrana de marcação para imunofenotipagem LMA

Tubo	FITC	PE	CY5/PerCP
1	IgG	IgG	IgG
2	CD10	CD19	CD45
3	CD4	CD8	CD45
4	CD7	CD3	CD45
5	CD41+CD61	CD42	CD45
6	CD34	HLA-DR	CD45
7	CD13+CD33	CD117	CD45
8	CD64	CD14	CD45
9	CD15	CD11b	CD45

(adaptada de Pombo-de-Oliveira *et al*, 2008)

1.5.3 Análise citogenética

Os avanços nos estudos citogenéticos contribuíram para a detecção de anomalias cromossômicas específicas associadas aos aspectos morfológicos e perfis imunofenotípicos das LLAs e LMAs. Além disso, estas anomalias cromossômicas adquiridas são as maiores evidências de que mudanças genéticas na transformação da célula normal para neoplásica poderia ser o primeiro passo nos mecanismos leucemogênicos (Pombo-de-Oliveira *et al*, 2008).

A citogenética convencional permite a detecção de anomalias recorrentes, numéricas e/ou estruturais, alterações adicionais e complexas. Algumas alterações citogenéticas crípticas, não visualizáveis pelo procedimento convencional, podem ser identificadas pela citogenética molecular através da técnica de FISH (Hibridização in situ por fluorescência), com o uso de sondas (Pombo-de-Oliveira *et al*, 2008).

As LLAs podem ter cariótipo normal, 46 cromossomos sem anomalias estruturais evidentes, cariótipo pseudodiplóide, 46 cromossomos com anomalias estruturais, e podem ser classificadas de acordo com o número cromossômico modal (Pombo-de-Oliveira *et al*, 2008). Quanto ao número modal são divididas em hiperdiploides (hiperdiploidia moderada com numero cromossômico entre 47 e 50, e hiperdiploidia acentuada com numero cromossômico maior que 51 cromossomos) ou hipodiploides (com número cromossômico menor do que 45

cromossomos). O número modal pode ser expresso como um intervalo entre dois números cromossômicos.

A ocorrência de anomalias cromossômicas recorrentes na LMA é muito freqüente, atingindo mais de 80% dos casos quando analisados pelos métodos disponíveis. Algumas das anomalias mais conhecidas e de importância para a LMA são descritas como:

- Translocação t(1;22)(p13;q13): Esta relacionada à leucemia megacariocítica de lactentes
- Translocação t(9;22): É de ocorrência muito rara na leucemia mielocítica aguda
- Translocações t(8;21): Responsável pela regulação da transcrição de vários genes envolvidos na diferenciação de células hematopoéticas.
- Inversão do cromossomo 16 e t(16; 16)
- Translocação envolvendo a banda 11q23
- Translocação t(15; 17)
- Anomalias numéricas

1.5.4 Análise molecular

Uma vez que as alterações genéticas são os principais fatores prognósticos utilizados no estabelecimento de terapias atuais contra a leucemia aguda, é fundamental a análise molecular de alterações genéticas ao diagnóstico. A importância da biologia molecular se deve à independência desta metodologia do sucesso de culturas celulares e obtenção de metáfases, que provoca falhas freqüentes na análise citogenética, além da possibilidade de detectar alterações crípticas. A translocação TEL/AML1 ou t(12; 21) foi um dos primeiros exemplos descritos desta situação, na qual, mediante o emprego de métodos moleculares, foi observado que 15 a 25% dos pacientes com LLA apresentam esta alteração cromossômica. Outras translocações

para as quais foram evidenciados alguns casos com a mesma situação são a t(8;21), a t(4;11), e a t(15;17) (Fernando *et al*, 2000).

Os métodos moleculares mais utilizados para a identificação de marcadores de prognóstico e grupos de risco terapêutico nas leucemias agudas são baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do DNA ou RNA (RT-PCR). O PCR pode ser de dois tipos: qualitativo, para detecção ou quantitativo, para aferição de carga tumoral utilizando, preferencialmente, a tecnologia de PCR em tempo real (Real-time PCR).

1.6 Amostras analisadas no Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrico (PHOP)

O PHOP, localizado no Centro de Pesquisas, no Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA), recebe amostras oriundas de vários estados do Brasil, as quais são encaminhadas para projetos de pesquisa.

As amostras recebidas pelo laboratório são analisadas quanto à morfologia, ao imunofenótipo e a alterações moleculares encontradas nas células de medula óssea, sendo assim realizado o diagnóstico das leucemias agudas, definindo o tipo e subtipo. Essas amostras são enviadas pelos hospitais de origem por SEDEX, à temperatura ambiente, chegando em torno de 24 horas após o envio.

Para o diagnóstico imunofenotípico, as amostras são enviadas em EDTA K3, uma solução anticoagulante para hematologia composto de sais de sódio e de potássio e do ácido etilenodiaminotetracético. Estes componentes inibem a participação do íon cálcio na cascata de coagulação do sangue. O EDTA K3 é utilizado na rotina hematológica, pois não afeta a morfologia das células hematopoéticas, e nem altera a velocidade de sedimentação globular (Oliveira *et al*, 2010). As amostras em EDTA K3 para as determinações hematológicas podem ser preservadas por 24 horas à temperatura ambiente ou até 48 horas a 4° C. As análises imunofenotípicas também apresentam ótimos percentuais de marcação nessas amostras por esse tempo (Oliveira *et al*, 2010).

Em vários casos ocorre atraso no recebimento dessas amostras, o que causa uma dificuldade na análise ou sua inviabilidade. Amostras recebidas após 48 horas de colhidas, não são processadas e analisadas, devido à inviabilidade das amostras após esse período. Dessa forma, a utilização de uma substância capaz de manter a estabilidade da amostra seria de

grande importância na rotina, pois permitiria que amostras com mais tempo de colhidas fossem também avaliadas (Oliveira *et al*, 2010). Devido a essa necessidade, a presente pesquisa se direcionou a avaliar a expressão de marcadores imunofenotípicos, utilizando o reagente denominado TransFix™ + EDTA K3, no diagnóstico das leucemias agudas por citometria de fluxo.

1.6.1 Reagente TransFix™ + EDTA K3

O reagente TransFix™ + EDTA K3 é uma solução de estabilização do sangue, patenteada e desenvolvida pelo *Sheffield Teaching Hospitals NHS Foundation Trust* e distribuída sob licença, pela Cytomark LTDA, a qual permite a distribuição por outras empresas. As alíquotas de TransFix™ + EDTA K3 analisadas nesse estudo foram adquiridas por nosso laboratório da empresa ImmunoStep. Os componentes ativos do TransFix™ + EDTA K3 estabilizam antígenos celulares por um tempo maior que o convencional, permitindo assim uma análise posterior por citometria de fluxo (Cytomark Ltda, 2012). No tubo a vácuo vendido com o reagente, também é fornecido o anticoagulante EDTA K3, não sendo necessária a sua adição (ou de outro anticoagulante) anteriormente à coleta. O reagente TransFix™ + EDTA K3 tem a capacidade de preservar e estabilizar amostras por até 10 dias, como mostra a figura 6, preservando uma vasta gama de marcadores celulares (Barnett *et al*, 1999), isso permite que as amostras tratadas sejam armazenadas ou transportadas com segurança.

Em pesquisas clínicas, tem sido estudada a capacidade do reagente TransFix™ + EDTA K3 em preservar a integridade das amostras para a análise imunofenotípica em citometria de fluxo, por mais de 7 dias. Um desses estudos visavam manter a quantificação de células T-CD4+ em amostras de sangue total HIV- positivas por um período de 7 dias (Plate *et al*, 2009), em outro trabalho foram avaliados aspectos biomoleculares e morfológicos de células fixadas para determinar o comportamento do DNA por esse tempo (Canônico *et al*, 2010). Esses protocolos de estabilização foram desenvolvidos inicialmente para criar padrões biológicos e avaliar o desempenho por citometria de fluxo das amostras com mais de 7 dias de colhidas, em diferentes testes de imunofluorescência, e para treinar os técnicos (Barnett *et al*, 1996).

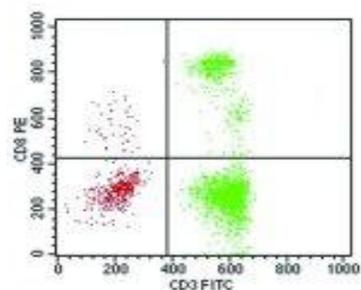
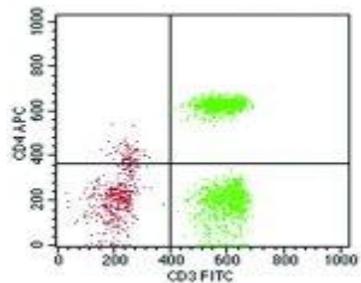
No site do distribuidor e na bula que acompanha o produto, é sugerido que se utilize o reagente numa concentração de 1:5 para as amostras de sangue periférico e de medula óssea. Entretanto, a ImmunoStep orienta que se estabeleça um volume apropriado do reagente TransFix™ + EDTA K3 em amostras de pacientes leucêmicos, pois seu efeito estabilizador pode ser diferente para o referido neste procedimento.

Alguns trabalhos publicados sobre a utilização do TransFix™ + EDTA K3 em amostras de sangue periférico, a concentração 1/5 apresentou bons resultados (Canônico *et al*, 2010; Bergaron *et al*, 2002). Outros estudos demonstraram a eficiência do reagente TransFix™ 1/10 + EDTA K3 na estabilidade das amostras de sangue total (Canônico *et al*, 2010; Barnett *et al*, 1998). Nestes estudos foram avaliadas as características de estabilização e dispersão dos leucócitos, permeabilidade da membrana e contagem de células na mesma concentração de TransFix™ + EDTA K3.

Assim como para a concentração de reagente TransFix™ 1/5 + EDTA K3, uma melhor análise em medula óssea pode ser estendida para a concentração 1/10, pois há em outros estudos o uso bem sucedido de outras temperaturas com esta concentração de TransFix™ + EDTA K3 (Plate *et al*, 2009; Canônico *et al*, 2010), com a preservação das características de dispersão e de imunofenotipagem nas amostras avaliadas nestas condições. Estes estudos demonstraram também que o uso das concentrações de TransFix™ 1/5 + EDTA K3 e TransFix™ 1/10 + EDTA K3 em temperaturas de 25°C e 37°C conseguem estabilizar as amostras de sangue total por até 7 dias.

Sendo assim, em virtude da ausência de trabalhos em medula óssea envolvendo o reagente TransFix™ + EDTA K3, foi necessário um estudo mais apurado em medula óssea para a averiguar a melhor otimização deste, visto que em sangue periférico se têm bons resultados com este reagente. Para isso, será necessário uma padronização deste em amostras de medula óssea seguindo protocolos indicados e sugeridos pelo fabricante e por estudos, respectivamente.

Amostras de sangue fresco
Dia 0 (Sem o reagente TransFix™ + EDTA K3)



Amostras de sangue
Dia 10 (Com o reagente TransFix™ + EDTA K3)

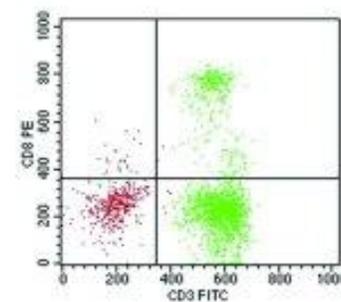
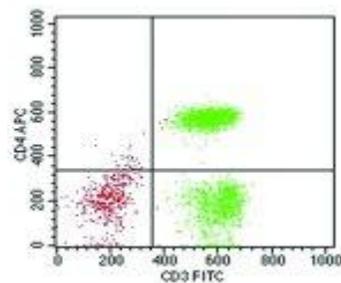


Figura. 6: Análise por citometria de fluxo, de antígenos expressos na superfície de linfócitos T (CD3, CD4, CD8), em amostras de sangue periférico recém coletadas (dia 0) ou após 10 dias em presença do reagente TransFix™ + EDTA K3 (Cytomark Ltda, 2012)

CAPÍTULO 2

Justificativa

Seguindo as orientações do fabricante, que indicava o uso do reagente TransFix™ + EDTA K3 na concentração 1/5 em sangue periférico e medula óssea, foram realizados no PHOP alguns testes preliminares nesta concentração em medula óssea (Cytomark Ltda, 2012; Bergaron *et al*, 2002). Porém nessas análises foram encontrados problemas na sensibilidade e na intensidade de detecção de alguns antígenos de superfície e intracelulares, com percentuais bem abaixo do encontrado em amostras de medula óssea do mesmo paciente, com o anticoagulante EDTA K3, como mostra a tabela IX.

TABELA IX - Percentual de alguns antígenos obtidos em testes preliminares

	EDTA K3	TRANSFIX™ 1/5 + EDTA K3
CD10	96,8%	84,6%
CD19	87,6%	73,7%
CD20	55,9%	41,6%
CD34	85,2%	61,9%
CD22+CD79	91,7%	13,7%
7.1	70,0%	32,7%
TdT	87,2%	1,5%
MPO	17,3%	1,7%

Mediante esses dados e a necessidade em se analisar amostras viajadas que podem chegar ao laboratório com mais de 48 horas de colhidas, fez-se necessário à busca de métodos que possibilitem uma maior qualidade na análise imunofenotípica. Entretanto, em virtude da escassez de relatos na literatura com a utilização do reagente TransFix™ + EDTA K3 em medula óssea, onde todos os estudos envolvendo o reagente são em sangue periférico, e com base nas orientações do fabricante para o procedimento nas amostras com suspeita de leucemia, foi indispensável a padronização no uso do reagente TransFix™ + EDTA K3 em aspirados de medula óssea para o diagnóstico das leucemias agudas.

Visando também avaliar e quantificar amostras de doença residual mínima (DRM) no Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrico, onde a caracterização biológica precisa das Leucemias Agudas por determinados marcadores biológicos, sejam capazes de indicar com precisão quais casos necessitarão de tratamentos mais intensos, faz se necessário que as amostras estejam em excelentes condições de análise. Sendo assim, o uso do reagente TransFix™ + EDTA K3 seria importante para preservar a integridade das amostras para a análise imunofenotípica em citometria de fluxo, pois permitiria a identificação de fenótipos expressos na célula leucêmica, ou seja, a DRM.

Dessa forma, a padronização deste, poderá ser útil nas análises imunofenotípicas, pois possivelmente evitará que novas coletas sejam necessárias, propiciando um diagnóstico mais rápido e preciso.

CAPÍTULO 3

Objetivos

3.1 Objetivo geral

Padronizar o uso da solução de estabilização de sangue total, o reagente TransFix™ + EDTA K3, em amostras de medula óssea, avaliadas por citometria de fluxo para diagnóstico em leucemias agudas pediátricas.

3.2 Objetivos específicos

- Definir a melhor concentração do reagente TransFix™ + EDTA K3 a ser utilizada nas amostras de medula óssea;
- Padronizar a solução de permeabilização mais adequada às amostras transportadas com o reagente TransFix™ + EDTA K3.

CAPÍTULO 4

Metodologia

4.1 Amostras

Foram utilizadas amostras de medula óssea de cinco doadores não-leucêmicos. Essas amostras foram obtidas com o consentimento dos representantes legais dos pacientes, no Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva e analisadas no PHOP, localizado no Centro de Pesquisa do INCA, no período de janeiro de 2012 a abril de 2012.

O aspirado de medula óssea foi obtido através de uma seringa sem anticoagulante, e imediatamente colocado em tubos devidamente identificados contendo o anticoagulante EDTA K3 ou reagente TransFix™ + EDTA K3 nas concentrações de 1/5, 1/10 e 1/20. Após as coletas, os tubos foram homogeneizados por inversão para evitar a formação de coágulos.

4.2 Envio das amostras

As amostras encaminhadas ao Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrico vieram em dois tubos, um contendo 2mL do aspirado de MO em EDTA K3 e outro contendo 600µL do aspirado, além de 60µL do reagente TransFix™ + EDTA K3 (concentração final do reagente em medula óssea de 1/10). Também foram encaminhadas lâminas de esfregaços de MO e SP. Todas as amostras vieram identificadas de forma legível com o nome do paciente, tipo de material (MO/SP) e data de coleta. Um resumo com informações como data de nascimento, sexo, cor da pele, hemograma, uso de medicamento, ou presença de síndrome congênita, também foram encaminhadas. Depois de coletadas, as amostras foram acondicionadas e, embaladas em caixas de isopor adequadas ao volume a ser transportado, estas por sua vez foram colocadas nas caixas do Sedex. A postagem foi feita à temperatura ambiente.

4.3 Tratamento com o reagente TransFix™ + EDTA K3

As amostras de medula óssea foram separadas em quatro tubos com 600µL cada, um com o anticoagulante EDTA K3 e outros três nas diferentes concentrações do reagente TransFix™ + EDTA K3: 1/5; 1/10 e 1/20. As amostras foram mantidas à temperatura

ambiente, com o intuito de reproduzirem uma situação semelhante à que ocorre com amostras recebidas para diagnóstico. As análises imunofenotípicas foram realizadas nas amostras após 24 horas.

4.4 Painéis de anticorpos monoclonais (AcMo) utilizados

Para avaliar a melhor concentração do reagente TransFix™ + EDTA K3 e a solução de permeabilização mais eficaz nas amostras de pacientes não-leucêmicos, foram utilizados os seguintes antígenos conjugados a diferentes fluorocromos: anti-MPO FITC, anti-CD22 PE + anti-CD79 PE e anti-CD45 PerCP, como mostra a tabela X.

TABELA X - Paineis de marcação intracelular para análise por citometria de fluxo

Quantidade	Reagente	Anticorpo
1	EDTA K 3	10 µL - MPO FITC/ CD22+CD79 PE/CD45 PerCP
1	TransFix™ [1/5] + EDTA K3	10 µL - MPO FITC/ CD22+CD79 PE/CD45 PerCP
1	TransFix™ [1/10] + EDTA K3	10 µL - MPO FITC/ CD22+CD79 PE/CD45 PerCP
1	TransFix™ [1/20] + EDTA K3	10 µL - MPO FITC/ CD22+CD79 PE/CD45 PerCP

4.5 Marcação de antígenos de membrana para análise por citometria de fluxo

A marcação das células foi efetuada com base nos painéis propostos e definidos no item 4.4. Os quatro tubos cônicos de 5 mL, utilizados em citometria de fluxo, foram nomeados

com anticorpos intracelulares específicos para detectar células granulocíticas, e separados tanto para a amostra de medula óssea (MO) em EDTA K3, como para cada concentração do reagente TransFix™ + EDTA K3 (1/5, 1/10, 1/20). Foram adicionados 50 µl das amostras de medula óssea em cada tubo marcado, de acordo com o seu reagente e a sua respectiva concentração. O anticorpo anti-CD45 PerCP foi acrescentado às amostras de acordo com a diluição de anticorpos que é utilizada no laboratório. Em seguida as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 20 minutos no escuro com auxílio de papel laminado. Após o tempo decorrido foram adicionados 500 µL da solução de lise de hemácias FACS (BD Biosciences) em cada tubo. Em seguida os tubos foram homogeneizados e incubados por 15 minutos no escuro. Após o tempo decorrido, as amostras foram lavadas com 3mL de PBS [1X]. Depois os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm e tiveram o sobrenadante descartado. A partir desta etapa, seguiu-se aos protocolos de permeabilização com as diferentes soluções.

4.6 Soluções de permeabilização

Foram testadas diferentes soluções de permeabilização, para avaliação intracelular por citometria de fluxo. Essas soluções foram: Tween ® 20 (*Sigma*); Kit BD Cytotfix/Cytoperm™ (*BD biosciences*) e a Saponina (*Sigma*). Todas as marcações com as soluções de permeabilização seguiram os seus respectivos protocolos.

4.6.1 Permeabilização com Tween ® 20

Após as marcações com antígenos de membrana, foi realizada a permeabilização com o Tween ® 20. Foram adicionados 500 µl da solução Tween ® 20 a 0,5% diluído em PBS. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados por 5 minutos e tiveram o sobrenadante descartado novamente. Depois foram adicionados os AcMo para antígenos intracitoplasmáticos, anti-MPO FITC e anti-CD22 PE + CD79 PE, como mostrado na tabela x, em cada tudo previamente nomeado. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 20 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Após o tempo decorrido, as amostras foram lavadas com 3ml de PBS [1X]. Em seguida os tubos foram centrifugados por

5 minutos a 1500 rpm e o seu sobrenadante foi descartado. Depois as amostras foram ressuspensas com 500 µl da solução PBS + Paraformaldeído 1% para fixação das células e armazenadas em refrigeração a 4°C até que fosse realizada a aquisição por citometria de fluxo.

4.6.2 Permeabilização com Kit BD Cytotfix/Cytoperm™

Após a marcação de membrana, seguiu-se o protocolo de permeabilização do Kit BD Cytotfix/Cytoperm™, seguindo as recomendações do fabricante. Adicionou-se em cada tubo marcado, 250µL da solução de Fixação/permeabilização por 20 minutos a 4°C. Em seguida, os tubos foram lavados, duas vezes, com 1mL da solução 1X BD Perm/Wash™. Após a centrifugação, os tubos tiveram o sobrenadante descartado. Depois foram adicionados os AcMo para antígenos intracitoplasmáticos em cada tudo previamente nomeado, como também mostrado na tabela ix, Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 30 minutos no escuro a 4°C. Após o tempo de incubação, os tubos foram lavados novamente, duas vezes, com 1mL da solução 1X BD Perm/Wash™. Em seguida, os tubos tiveram o sobrenadante descartado e foram ressuspensos com 500 µl da solução PBS + paraformaldeído 1 % para fixação das células e armazenadas em refrigeração a 4°C até que fosse realizada a aquisição por um citômetro de fluxo.

4.6.3 Permeabilização com Saponina

Após a marcação de membrana, seguiu-se o protocolo de permeabilização da Saponina. Aos tubos foram adicionados 500 µL de PBS/ Paraformaldeído 4% por 5 minutos a 4°C. Após o tempo decorrido, os tubos foram lavados com 3mL da solução PBS 1X e centrifugados. Em seguida, tiveram o sobrenadante descartado e foram lavados com a solução PBS/Albumina Bovina Sérica (BSA) 1% / Saponina 0,1%. Depois da centrifugação, os AcMo para antígenos intracitoplasmáticos foram adicionados em cada tudo previamente nomeado, como mostrado na tabela x e incubados por 30 minutos a 4°C. Após o tempo de incubação, os tubos foram lavados com 3mL da solução PBS 1X e centrifugados. Em seguida, os sobrenadantes dos tubos foram descartados e tiveram adicionados aos mesmos,

500 μ L da solução PBS/BSA 1% por 30 minutos a 4°C. Após o tempo decorrido, os tubos foram lavados sob centrifugação com 3mL da solução PBS 1X. Em seguida, os tubos tiveram o sobrenadante descartado e foram ressuspensos com 500 μ l da solução PBS + paraformaldeído 1% para fixação das células e armazenadas em refrigeração a 4°C, até que fosse realizada a aquisição por citometria de fluxo.

4.7 Aquisição e análise por citometria de fluxo

As aquisições dessas amostras foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (*BD Biosciences- Becton Dickinson, San José, CA, EUA*). Durante a aquisição foi utilizada a plataforma CellQuest (*BD Biosciences*), sendo adquiridos pelo menos, 10.000 eventos na área de células viáveis.

4.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 3. Foi utilizado teste One-Way (ANOVA) e pós-teste por Tukey de comparação múltipla. Os dados foram mostrados como média \pm erro padrão e considerados estatisticamente significativos quando os valores de p foram menores que 0,05.

CAPÍTULO 5

Resultados

5.1 Concentração do reagente TransFix™ + EDTA K3

Após os testes preliminares, as avaliações seguintes tiveram como um dos objetivos, definir a melhor concentração do reagente TransFix™ + EDTA K3 a ser utilizada nas amostras de medula óssea analisadas por citometria de fluxo. Desse modo, cinco experimentos com amostras de pacientes não-leucêmicos foram realizados com amostras obtidas no Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Nos experimentos foram utilizadas três concentrações diferentes do reagente TransFix™ + EDTA K3, 1/5, 1/10 e 1/20, e um tubo contendo apenas o anticoagulante EDTA K3, como controle. Nestes testes, foram observadas as semelhanças nos percentuais de marcação intracelular ocorridas entre o EDTA K3 e as diferentes concentrações de TransFix™ + EDTA K3, onde a concentração com o percentual mais próximo ao EDTA K3 seria utilizada na segunda etapa do projeto. Nos quatro experimentos foi utilizado o protocolo de permeabilização com Tween® 20, o qual é usado nas marcações intracelulares, nos diagnósticos de leucemias agudas, no PHOP.

As análises dos quatro experimentos foram feitas por citometria de fluxo, onde alguns parâmetros auxiliaram a avaliação dos mesmos. Primeiro, uma parte da luz é espalhada (*scatter*) de acordo com as características estruturais da célula. O *Forward Scatter* (FSC) se relaciona com o tamanho e o *Side Scatter* (SSC) com a granularidade da célula. Como mostra a figura 7, foram observadas diferenças na dispersão e definição das populações de células entre as diferentes concentrações do TransFix™ + EDTA K3, em comparação com o EDTA K3.

Não foram observadas diferenças drásticas nos parâmetros FSC X SSC, entre as diferentes soluções, no entanto, pôde-se observar que as amostras mantidas na concentração 1/20 apresentaram um FSC semelhante ao EDTA K3, embora o SSC das amostras apresentou-se um pouco mais baixo, principalmente para a população de granulócitos. Esses resultados apresentados na concentração 1/20, é devido à agregação celular, ocorridas nas amostras desta concentração. Já na concentração 1/10 as populações celulares ficaram mais bem definidas, apresentando um FSC mais alto para todas as populações e um SSC semelhante ao EDTA K3.

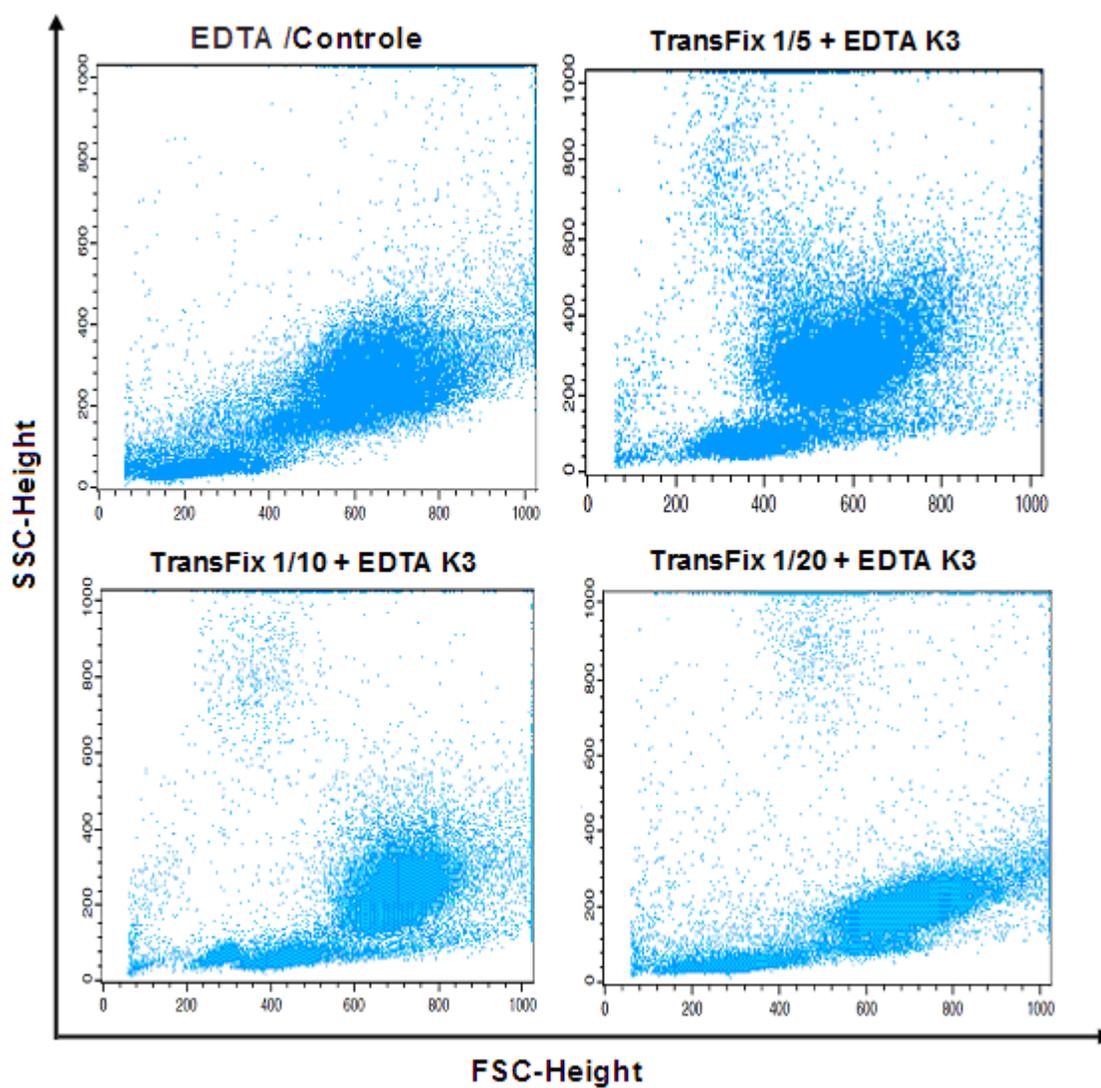


Figura 7. Dot plot com *Forward Scatter* (FSC) e *Side Scatter* (SSC) de um experimento representativo. São observadas características morfológicas e estruturais de células de medula óssea por citometria de fluxo. Em diferentes concentrações do reagente TransFixTM + EDTA K3 verifica-se a dispersão e definição das populações celulares, e diferentes entre si e em relação ao controle apenas com o EDTA K3

A combinação entre *Side Scatter* (SSC) e a expressão do CD45 PerCP, foi utilizada para identificar a distribuição das células hematopoéticas. Para avaliar o percentual de MPO (Mieloperoxidase), a qual está presente em células granulocíticas, foi definida a população de granulócitos, que apresenta expressão baixa de anti-CD45, juntamente com granularidade mais

elevada, como pode ser observado na figura 8, onde foi desenhado um *gate* para cada situação avaliada.

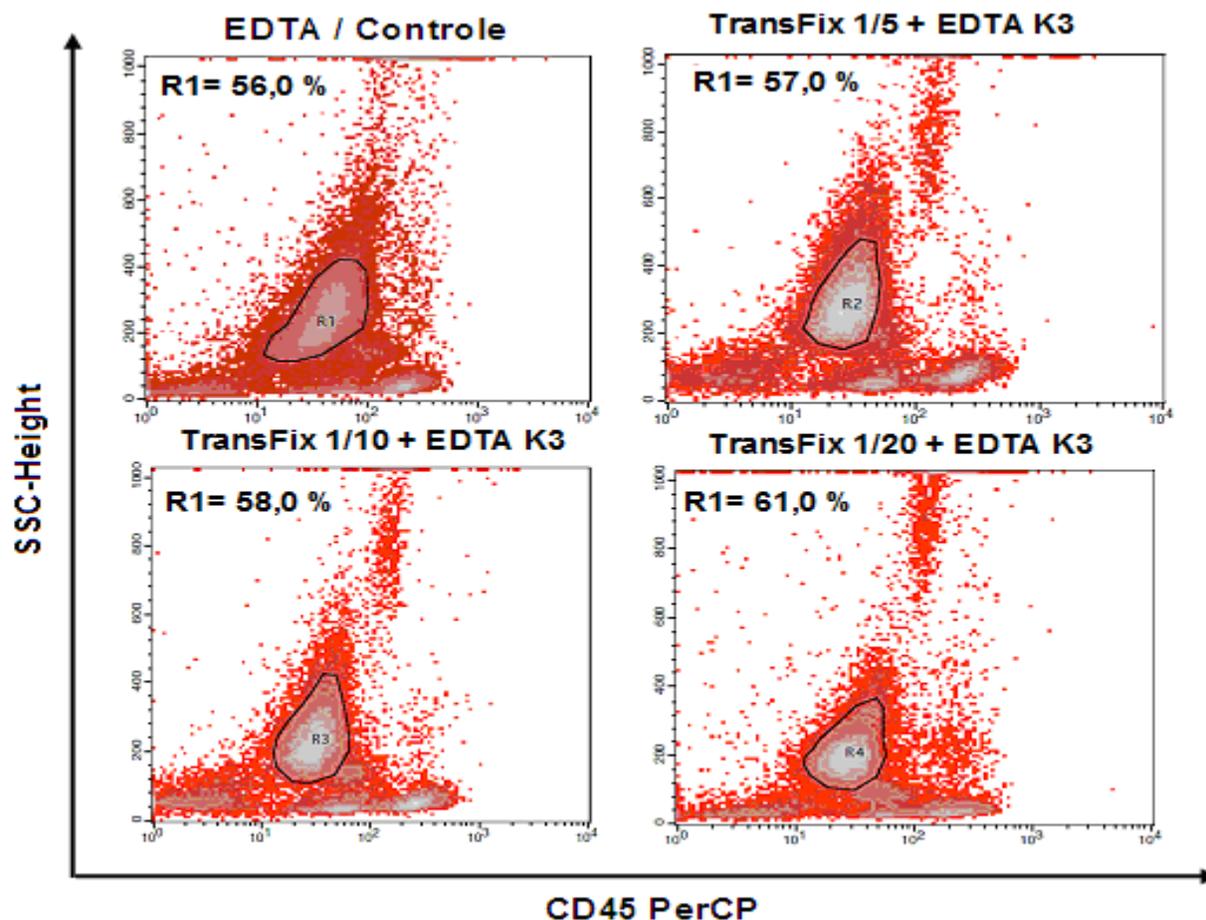


Figura 8. *Density Plot* com a combinação entre SSC e a expressão da molécula CD45. Identificação da distribuição das células granulocíticas, para avaliar o percentual de MPO (Mieloperoxidase) em EDTA K3 e nas diferentes concentrações de TransFix™ + EDTA K3

Dentro de cada *gate* selecionado nas células granulocíticas, houve semelhante percentual de células nestas regiões, como ilustrado na figura 8, que mostra os percentuais de EDTA K3 com 56,0%, de células granulocíticas e das diferentes concentrações do reagente TransFix™ + EDTA K3, 1/5, 1/10 e 1/20, com 57,0%; 58,0% e 61,0%, respectivamente. Este estudo indica que o TransFix™ + EDTA K3, em suas diferentes concentrações, não causou grandes alterações na identificação de populações celulares, quando comparado ao EDTA K3.

Em relação à marcação para a enzima mieloperoxidase (MPO), observou-se que as amostras contendo o reagente TransFix™ 1/5 + EDTA K3 não apresentaram o percentual de marcação para o MPO semelhante ao controle EDTA K3, com um percentual bem abaixo deste, e significância estatística (* $P < 0,01$), assim como também menor do que as concentrações dos reagentes TransFix™ 1/10 + EDTA K3 e TransFix™ 1/20 + EDTA K3, como podem ser vistos na tabela XI e na figura 9.

TABELA XI – Percentual de MPO nos cinco experimentos

Experimento	EDTA K3	TransFix 1/5 + EDTA K3	TransFix 1/10 + EDTA K3	TransFix 1/20 + EDTA K3
1	58,26%	18,51%	53,91%	69,23%
2	91,63%	35,85%	93,46%	97,76%
3	91,78%	50,89%	89,87%	97,05%
4	76,45%	17,39%	92,68%	99,26%

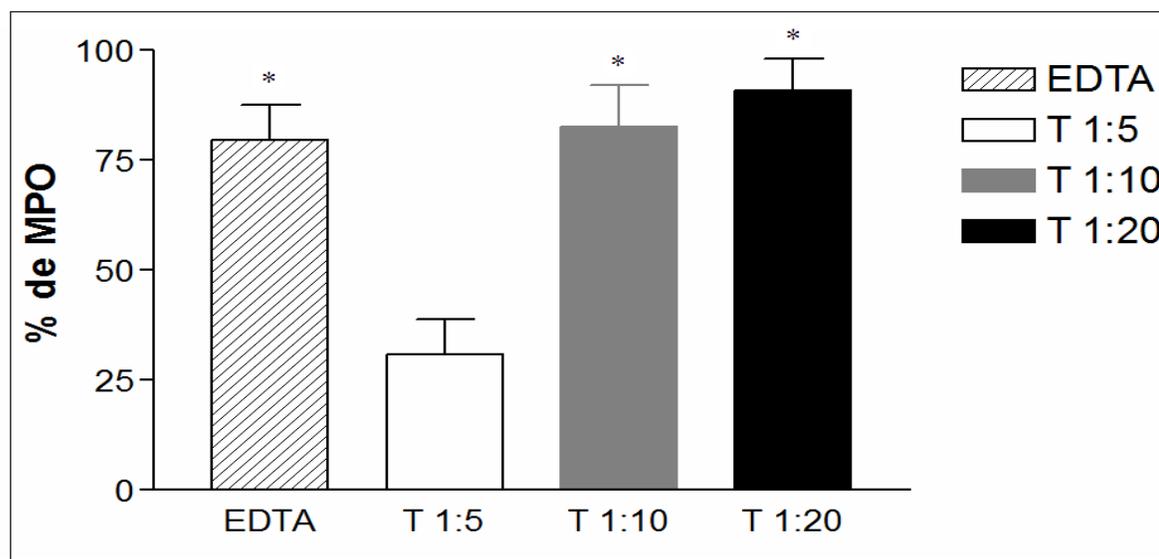


Figura 9. Gráfico com a média do percentual de MPO nos experimentos dois, três, quatro e cinco. A concentração de TransFix™ 1/5 + EDTA K3 apresentou diferença estatística (* $P < 0,01$), quando foi comparada com o EDTA K3 e os reagentes TransFix™ 1/10 + EDTA K3 e TransFix™ 1/20 + EDTA K3, pelo teste One-Way (ANOVA) e pós-teste de Tukey de comparação múltipla, em um número total de quatro amostras.

As amostras contendo a concentração de TransFix™ 1/20 + EDTA K3 nos quatro experimentos apresentaram um percentual de MPO superior ao do anticoagulante EDTA K3. Porém, esta concentração não preservava as amostras de medula óssea em condições de análise. Após a adição de 600µL de medula óssea nesta concentração de TransFix™ + EDTA K3, as amostras iniciaram um processo de coagulação, minutos depois de adicionadas ao reagente. Em virtude deste processo, esta concentração apesar dos melhores percentuais de marcação, foi descartada para ser utilizada na segunda parte deste estudo. Assim, a concentração de TransFix™ 1/10 + EDTA K3 com a qual se obteve bons percentuais de marcação para MPO, como mostra a figura 10, foi escolhida para a segunda etapa deste trabalho. Em conjunto com esses dados, a dispersão e a definição das populações de células granulocíticas, também corroboraram para a escolha dessa concentração, pois apresentaram importante semelhança morfológica ao controle com EDTA K3.

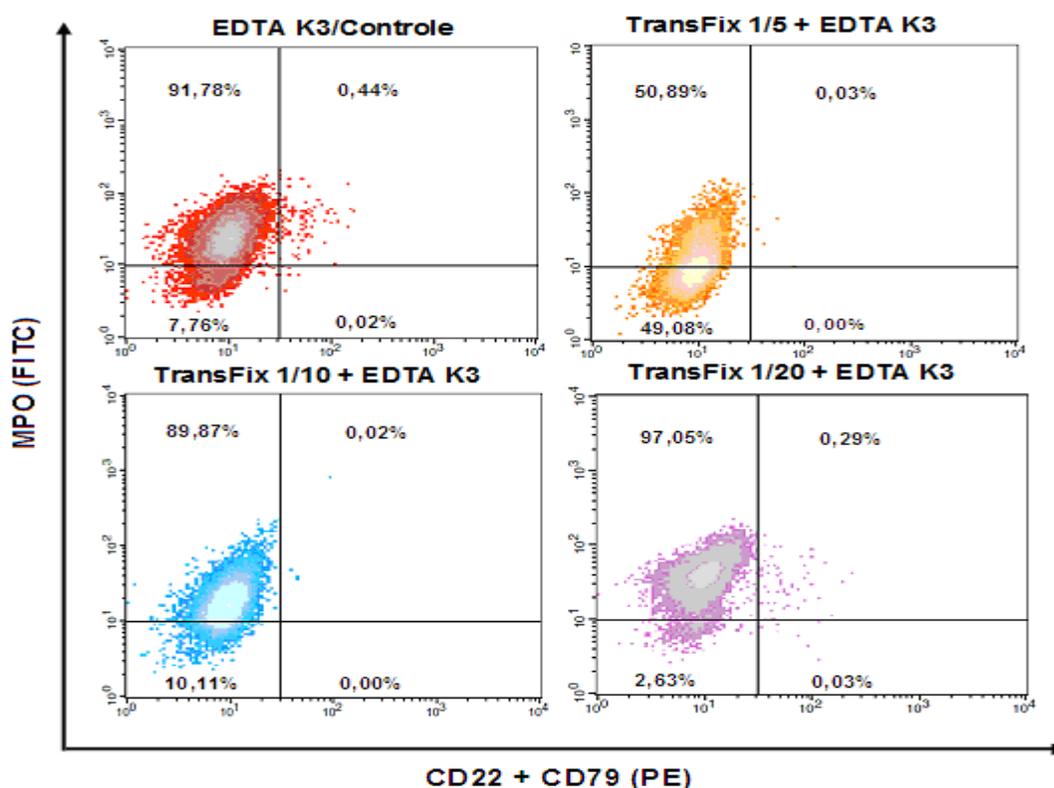


Figura 10. *Density Plot* do percentual de MPO no experimento 4. Esta figura ilustra os resultados apresentados nos experimentos, nos quais foi observada uma baixa marcação intracelular de MPO na concentração de TransFix™ 1/5 + EDTA K3

As isoformas CD22 e CD79 foram utilizadas neste estudo porque indicam compromisso com a linhagem de células B, e não são expressos pela linhagem granulocítica. Sendo assim, como o foco de nosso estudo foi averiguar o percentual de MPO nesta linhagem, estas isoformas serviram como controle negativo nesta população.

Para evidenciar as semelhanças na intensidade de fluorescência dos percentuais de MPO entre as amostras com EDTA K3 e com a concentração de TransFix™ 1/10 + EDTA K3, utilizou-se um histograma com a marcação de MPO, feito a partir da região de granulócitos (figura 11). Foram avaliados os picos nos percentuais de MPO, tanto em EDTA K3 quanto em TransFix™ 1/10 + EDTA K3 em função do número de eventos, sendo feita uma sobreposição ou *overlay* das curvas dos histogramas. O perfil de marcação semelhante obtido indica que o reagente TransFix™ + EDTA K3 na concentração 1/10 não interfere na ligação do anticorpo anti-MPO em relação ao antígeno expresso no interior da célula, como mostra a figura 11.

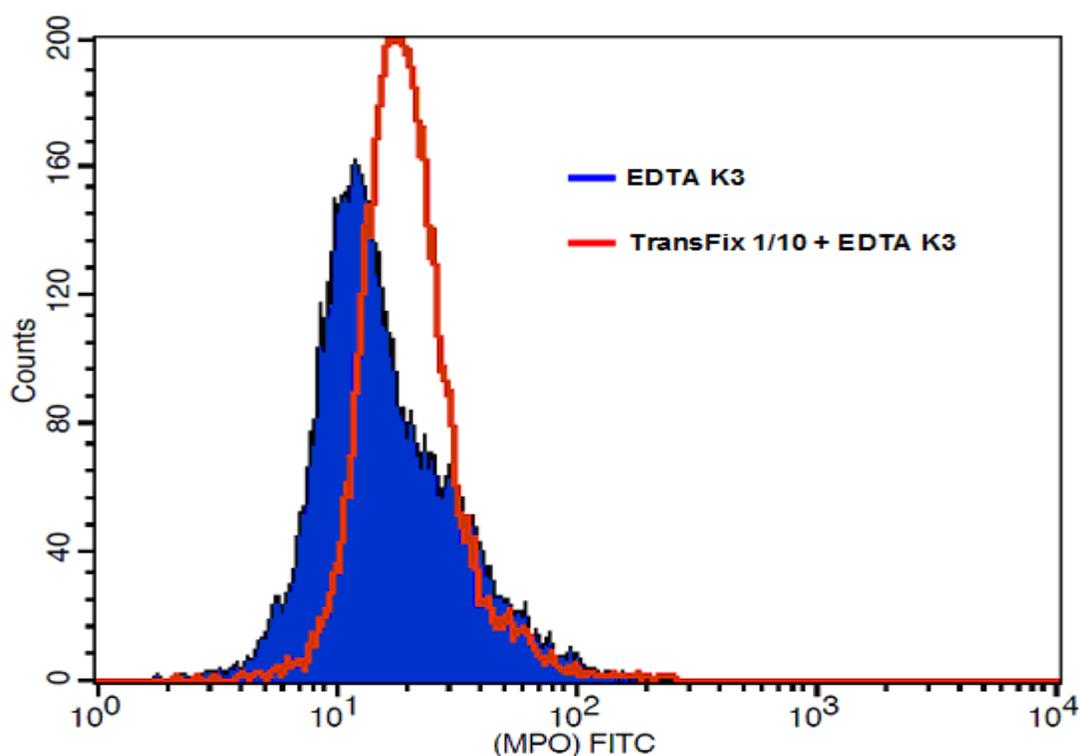


Figura 11. Histograma com *Overlay* do percentual de MPO entre a amostra com EDTA K3 e a com a concentração de TransFix™ 1/10 + EDTA K3 em função do número de eventos. A concentração de TransFix™ 1/10 + EDTA K3 apresentou um perfil semelhante ao obtido com EDTA K3, apenas com um pequeno aumento na intensidade de fluorescência

Com a definição da concentração de TransFix™ 1/10 + EDTA K3 para a segunda parte deste estudo, a mesma foi utilizada para avaliar se haveria diferença no percentual de marcação de MPO utilizando-se diferentes soluções de permeabilização, observando qual solução tem maior ação de permeabilização nesta concentração de TransFix™ + EDTA K3.

5.2 Avaliação entre as soluções de permeabilização

Após a definição da melhor concentração de TransFix™ + EDTA K3, um outro objetivo deste estudo era avaliar a solução de permeabilização que gerasse a melhor permeabilização, tendo como parâmetro o maior percentual de marcação de MPO. Para isso, utilizou-se a concentração de TransFix™ 1/10 + EDTA K3 em quatro amostras de medula óssea de pacientes não-leucêmicos, obtidas através de mielogramas realizados no Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Nos quatro experimentos foram utilizados os protocolos de permeabilização com Tween ® 20, o Kit BD Cytotfix/Cytoperm™ e a Saponina, no Centro de Pesquisa do INCA, no Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrico (PHOP).

As análises entre as soluções de permeabilização dos cinco experimentos foram feitas por citometria de fluxo, onde as relações entre o tamanho (FSC) e a granularidade (SSC) das células, não apresentaram diferenças significativas, tanto na dispersão como na definição das populações, como mostra a figura 12.

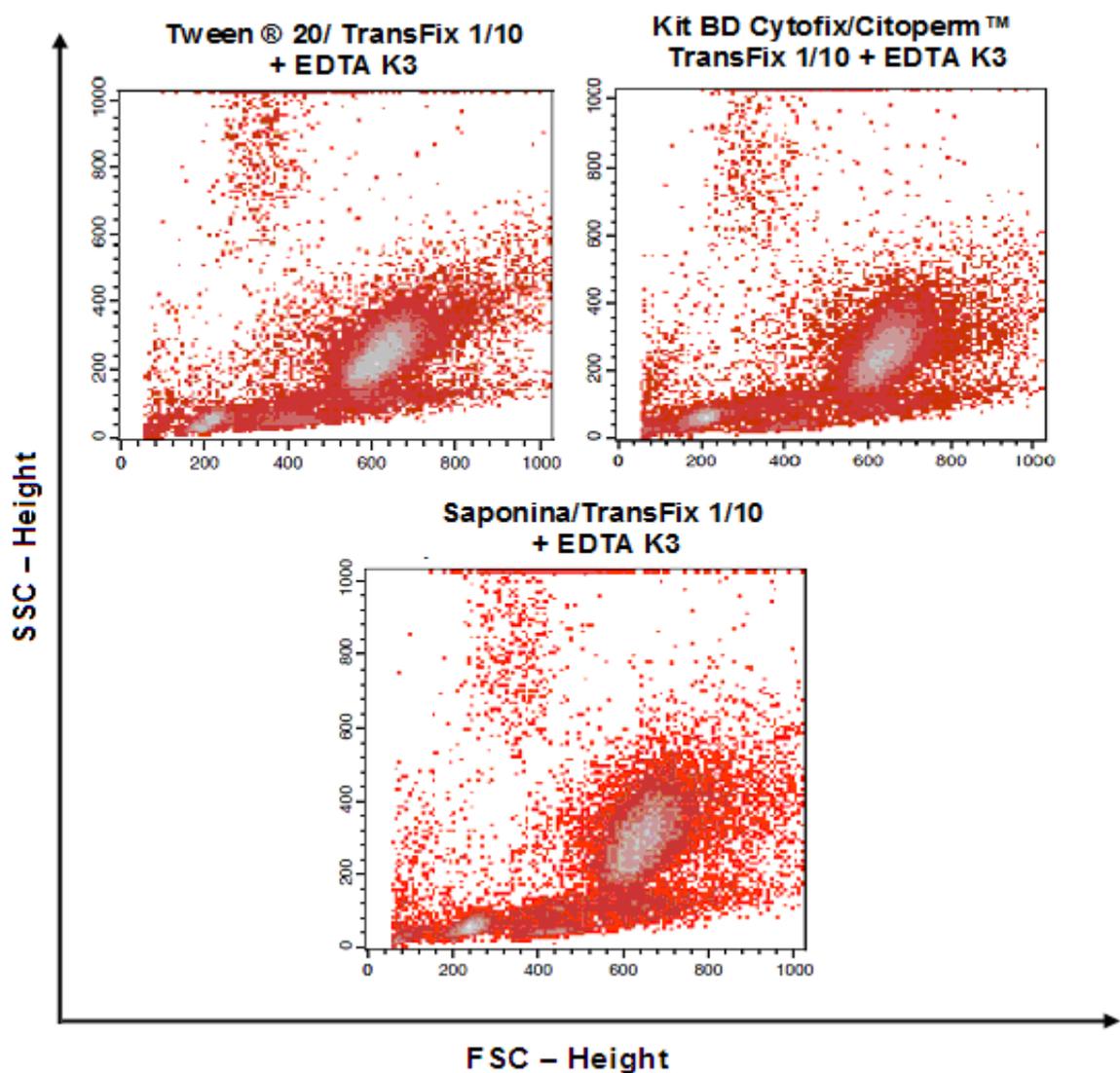


Figura 12. *Density Plot* de um experimento representativo. As características morfológicas e estruturais das células não apresentaram diferenças entre as soluções de permeabilização testadas

Em seguida, da mesma forma como ocorreu com as concentrações de TransFix™ + EDTA K3, foi feita uma análise baseada no SSC e na expressão de CD45, para identificar a distribuição das células hematopoéticas. Após a definição da população de granulócitos, foi feito um *gate* nesta região, como mostra a figura 13, dentro dos quais foram analisados os percentuais de MPO, para as três soluções de permeabilização testadas.

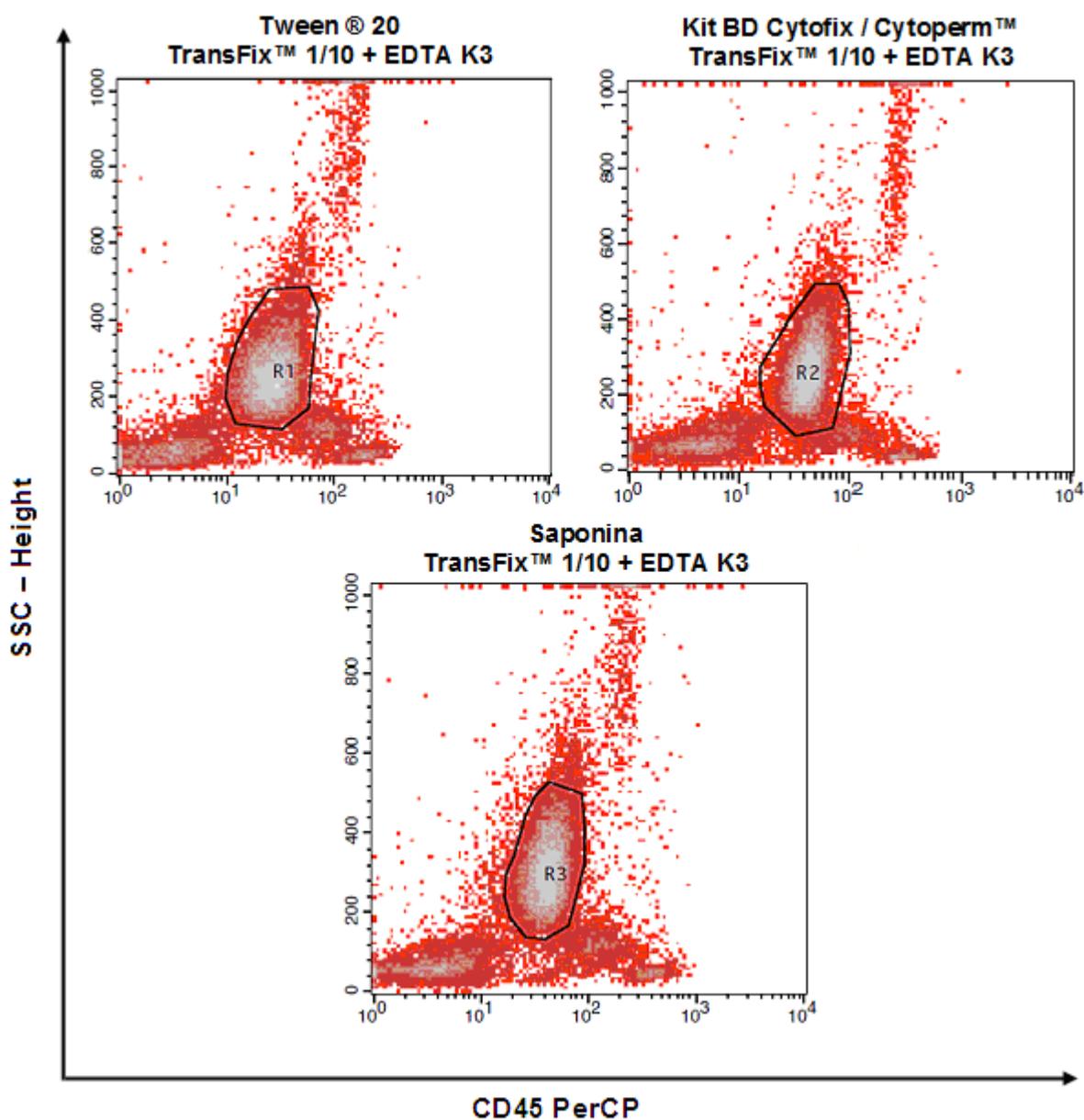


Figura 13. *Density Plot* com a combinação entre *Side Scatter* (SSC) e a expressão do CD45 em experimento representativo. Foram definidos *gates* na região de células granulócíticas para cada uma das diferentes soluções de permeabilização. Não houve diferença na distribuição dessas populações entre as soluções avaliadas

Com base nos percentuais apresentados nas amostras dos experimentos um, dois, três e quatro, e na análise estatística feita, pôde-se concluir que as amostras permeabilizadas com as diferentes soluções de permeabilização, apresentaram um percentual de marcação para MPO bem próximos. No entanto, as amostras permeabilizadas com o Kit BD Cytotfix/Cytoperm™

mostraram um pequeno aumento, porém significativo, no percentual de células marcadas com MPO em relação às amostras permeabilizadas com o Tween ® 20, como demonstra a tabela XII.

TABELA XII – Percentual de MPO obtido com as diferentes soluções de permeabilização

Experimento	Tween ® 20 TransFix™ 1/10 + EDTA K3	Kit BD Cytifix / Cytoperm™ TransFix™ 1/10 + EDTA K3	Saponina TransFix™ 1/10 + EDTA K3
1	89,4%	99,0%	96,0%
2	91,4%	97,0%	95,0%
3	95,0%	96,0%	87,5%
4	92,0%	99,4%	95,3%

Portanto, com base nos percentuais apresentados nas amostras dos experimentos um, dois, três e quatro, e na análise estatística feita, pôde-se concluir que as amostras permeabilizadas com as diferentes soluções de permeabilização, apresentam um percentual de marcação para MPO bem próximos. No entanto, as amostras permeabilizadas com o Kit BD Cytifix/Cytoperm™ mostraram um pequeno aumento, porém significativo, no percentual de células marcadas com MPO em relação às amostras permeabilizadas com o Tween ® 20, como demonstra a figura 14.

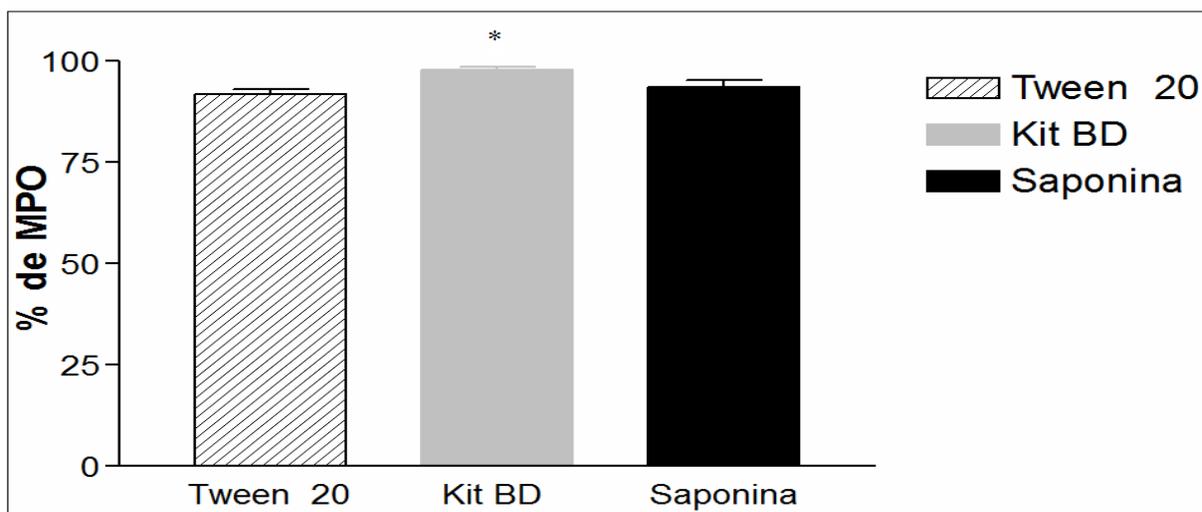


Figura 14. Gráfico com o percentual de MPO entre as soluções de permeabilização. A solução de permeabilização do Kit BD Cytofix/Cytoperm™ apresentou diferença estatística (* $P < 0,05$) quando foi comparada com o Tween ® 20, pelo teste One-Way (ANOVA) e pós-teste por Tukey de comparação múltipla, em um número total de quatro amostras

Para ilustrar as semelhanças nos percentuais de MPO entre as soluções de permeabilização, utilizou-se as amostras de um experimento representativo, apesar das amostras permeabilizadas pelo Kit BD Cytofix/Cytoperm™ terem apresentado em todos os experimentos, um percentual de marcação superior em relação as outras soluções de permeabilização, como mostra a figura 15, com os percentuais de marcação de MPO.

Portanto, com base nos dados e avaliações acerca das soluções de permeabilização, pôde-se concluir que apesar das amostras permeabilizadas pelo Kit BD Cytofix/Cytoperm™ terem apresentado maiores percentuais de marcação, não pode ser considerado um melhor agente permeabilizador, visto que as amostras permeabilizadas pelo Tween ® 20 e pela Saponina também apresentaram ótimos percentuais de marcação para o MPO, com resultados muito semelhantes nos quatro experimentos.

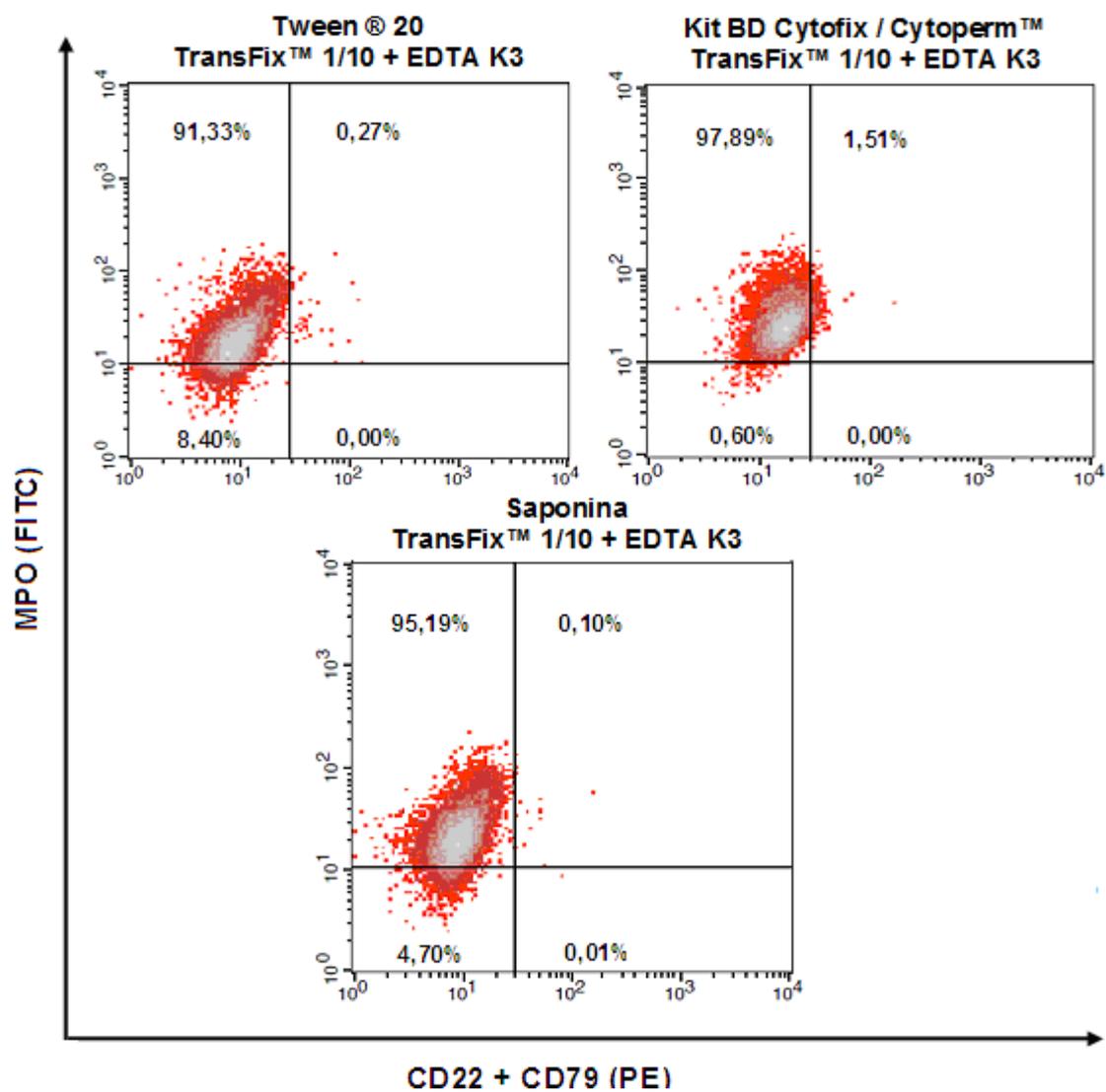


Figura 15. *Density Plot* do percentual de MPO nas amostras submetidas à permeabilização com as diferentes soluções de permeabilização avaliadas. Esta figura demonstra a semelhança entre os percentuais de marcação de MPO entre as soluções.

CAPÍTULO 6

Discussão

A possibilidade de atraso no recebimento das amostras de medula óssea com suspeita de leucemia aguda fez com que o Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrico (PHOP) buscasse alternativas capazes de manter a estabilidade das amostras para análise por citometria de fluxo, por um tempo maior após a sua coleta. Neste contexto, pesquisaram-se em meios científicos, protocolos com algumas soluções capazes de preservar a viabilidade das amostras por um tempo maior que 24 horas e, chegou-se ao reagente TransFix™ + EDTA K3, que é uma solução de estabilização do sangue desenvolvida e patenteada pelo *Sheffield Teaching Hospitals NHS Foundation Trust Trust*, e comercializada sob licença, pela Cytomark LTDA, a qual permite a distribuição por outras empresas. As alíquotas de TransFix™ + EDTA K3 analisadas nesse estudo foram adquiridas por nosso laboratório da empresa ImmunoStep (Cytomark LTDA, 2012; Barnett *et al*, 1998).

No site do distribuidor e na bula que acompanha o produto, é sugerido que se utilize o reagente numa concentração de 1/5 para sangue total e medula óssea (ImmunoStep, 2012). Porém, a ImmunoStep orienta que antes de se utilizar o reagente TransFix™ + EDTA K3 em amostras de medula óssea de pacientes leucêmicos, se estabeleça um volume apropriado para o procedimento. No entanto, em análises preliminares com esta concentração em amostras de medula óssea, encontramos dificuldades na marcação de alguns antígenos de superfície e principalmente de citoplasma, com percentual abaixo do avaliado com o anticoagulante EDTA K3. Em virtude disso, fez-se necessário determinar a concentração ideal do reagente TransFix™ + EDTA K3 e a melhor solução de permeabilização a ser utilizada nas marcações imunofenotípicas nas amostras de medula óssea.

Nossos resultados mostraram que a utilização da concentração do reagente TransFix™ 1/5 + EDTA K3 não apresentou um percentual de marcação para MPO semelhante ao obtido com o controle apenas com o anticoagulante EDTA K3, apresentando também diferenças significativas entre as outras concentrações testadas. Em trabalhos publicados sobre a utilização do TransFix™ + EDTA K3 em amostras de sangue periférico, a concentração 1/5 apresentou bons resultados (Canônico *et al*, 2010; Bergaron *et al*, 2002). Essa diferença nos dados obtidos poderia ser explicada pela diferença no material biológico testado, assim como nos antígenos que foram analisados. Nessa etapa do nosso trabalho avaliamos a expressão das moléculas CD45 e MPO, uma extracelular e outra intracelular. Na marcação para CD45 não observamos diferenças entre as diferentes concentrações de TransFix™ + EDTA K3, ao passo

que para MPO obtivemos piores resultados. As moléculas avaliadas nos trabalhos citados são antígenos de superfície com alta densidade de expressão, semelhantes ao CD45, com o qual também não tivemos problemas de marcação.

Embora a utilização da concentração do reagente TransFix™ 1/20 + EDTA K3 tenha gerado os melhores resultados de marcação na maior parte dos testes, sua utilização ficou inviável em virtude do processo de coagulação que as amostras com esta concentração apresentaram minutos depois de sua adição ao reagente. Uma alternativa seria a coleta da amostra em tubos contendo apenas EDTA K3, com o acréscimo logo em seguida do volume de Transfix™ + EDTA K3 necessário para se obter a concentração 1/20. Ou ainda, a compra de tubos já prontos para coleta a vácuo, contendo EDTA K3 e um volume menor de TransFix™ + EDTA K3 suficiente para se alcançar a concentração de 1/20, o que já está disponível no mercado.

As amostras de medula óssea com a concentração do reagente TransFix™ 1/10 + EDTA K3 apresentaram percentuais de marcação para MPO semelhantes aos obtidos com EDTA K3, preservando a integridade biológica, morfológica e de dispersão da população granulocítica. Nossos estudos estão de acordo com relatos anteriores que demonstraram a eficiência do reagente TransFix™ 1/10 + EDTA K3 na estabilidade das amostras de sangue total (Canônico *et al*, 2010; Barnett *et al*, 1998). Nestes estudos foram avaliadas as características de estabilização e dispersão dos leucócitos, permeabilidade da membrana e contagem de células na mesma concentração de TransFix™ + EDTA K3 utilizada nesta pesquisa.

A metodologia utilizada para avaliar a melhor concentração do reagente TransFix™ + EDTA K3 em nossa pesquisa foi semelhante a de outros estudos, onde foram avaliadas as concentrações 1/5 e 1/10 de TransFix™ + EDTA K3 em amostras de sangue total (Jani *et al*, 2001; Canônico *et al*, 2010), sendo também obtidos bons resultados com a concentração 1/10. Nossos dados validam as informações desses estudos, uma vez que reproduzimos suas afirmações agora em medula óssea.

Nos primeiros testes utilizando o reagente TransFix™ + EDTA K3, marcadores intracelulares essenciais no diagnóstico de leucemia não apresentaram uma boa marcação, como TdT, CD22 e CD79, comparando-se as amostras apenas com EDTA K3. Dessa forma, um dos objetivos desse estudo visava melhorar a marcação intracelular em amostras tratadas

com o reagente TransFixTM + EDTA K3. Por esse motivo incluímos nesta pesquisa testes com diferentes soluções de permeabilização, para analisar a eficácia da técnica de permeabilização de amostras tratadas com o reagente, objetivando-se assim melhorar as marcações intracelulares das amostras de medula óssea. É importante salientar que as amostras mantidas com TransFixTM + EDTA K3 estão fixadas, sendo necessária uma permeabilização bastante eficiente para a análise de antígenos intracelulares. O Tween ® 20 por apresentar baixo custo e protocolos mais rápidos na rotina da imunofenotipagem, é o agente permeabilizador utilizado no PHOP. A utilização de saponina para permeabilização celular tem se mostrado eficaz e de menor custo em relação aos *kits* disponíveis no mercado. Com suas propriedades detergentes, permeabiliza a membrana citoplasmática sem danificá-la ou alterar a expressão dos antígenos de membrana, permitindo a detecção simultânea de antígenos intracelulares e de superfície (Jacob *et al*, 1991). Existem vários protocolos e *kits* de permeabilização disponíveis, como o da BD Cytotfix/CytopermTM, porém nenhum é apropriado para a pesquisa de todos os antígenos intracelulares, sendo inviável recomendarem um único método (Clevenger *et al*, 1993). Assim, cada laboratório deve avaliar o melhor método a ser utilizado na sua rotina, de acordo com os marcadores que analisa.

Nossos resultados mostraram que a sensibilidade e a intensidade de detecção dos antígenos intracelulares não foram alteradas pelos métodos de permeabilização utilizando saponina e o Kit da BD Cytotfix/CytopermTM quando comparados à técnica padrão do nosso laboratório. Assim nossos dados se assemelham e corroboram com outros estudos que demonstraram a semelhança de marcação entre as soluções de permeabilização testadas (Pereira *et al*, 2007), porém alguns estudos relatam uma pequena modificação nos parâmetros de dispersão de luz quando utilizaram essas soluções para a permeabilização e marcação de antígenos intracelulares (Koester *et al*, 2000; Jacob *et al* 1991).

A eficiência na marcação para MPO nas amostras de medula óssea em todas as soluções de permeabilização apresenta-se como importante dado científico, pois não foram encontrados outros trabalhos na literatura verificando a eficiência dessas soluções em amostras de medula óssea com o reagente TransFixTM + EDTA K3. Dessa forma, os nossos resultados dão opção de escolha do agente permeabilizador que for mais satisfatório, pois é essencial avaliar o custo/benefício de cada protocolo.

Embora as análises com a concentração do reagente TransFix™ 1/5 + EDTA K3 não tenham apresentado os resultados que outros estudos mostraram (Canônico *et al*, 2010; Bergaron *et al*, 2002), esta concentração pode ser melhor estudada. Alguns estudos avaliando sangue total têm encontrado resultados satisfatórios com esta concentração quando as amostras foram mantidas em temperaturas mais baixas e/ou altas (em torno de 4°C, 25°C e 37°C) do que a temperatura utilizada neste estudo (Canônico *et al*, 2010). Contudo, o nosso estudo pode ser aprimorado e incluir a temperatura como método de análise desta concentração, rever e avaliar a sensibilidade e a intensidade de detecção dos antígenos intracelulares em diferentes temperaturas de armazenamento e incubação. Assim como para a concentração de reagente TransFix™ 1/5 + EDTA K3, essa análise pode ser estendida para a concentração 1/10, pois há em outros estudos o uso bem sucedido de outras temperaturas com esta concentração de TransFix™ + EDTA K3 (Plate *et al*, 2009; Canônico *et al*, 2010), com a preservação das características de dispersão e de imunofenotipagem nas amostras avaliadas nestas condições. Estes estudos demonstraram também que o uso das concentrações de TransFix™ 1/5 + EDTA K3 e TransFix™ 1/10 + EDTA K3 em temperaturas de 25°C e 37°C conseguem estabilizar as amostras de sangue total por até 7 dias.

A partir dos resultados deste estudo, começamos a investigar a possibilidade de analisar por citometria de fluxo de amostras de medula óssea com o reagente Transfix™ 1/10 + EDTA K3 após 3 e 7 dias de colhidas, visto que muitos estudos em sangue total mostram que esse reagente mantém a viabilidade das amostras neste período (Canônico *et al*, 2010; Jani *et al*, 2001). Assim, com dados preliminares, vimos que o reagente TransFix™ + EDTA K3 mantém consideravelmente as marcações de alguns antígenos nas amostras avaliadas num período de 7 dias, e que em outras esse percentual é reduzido drasticamente no 3º e 7º dias (tabela XIII em anexo I) quando comparadas com o EDTA K3. Estes dados sugerem a necessidade de avaliação do uso do reagente em temperaturas mais baixas e/ou mais alta, para que seja possível a análise de amostras após mais dias de coleta, além de ser necessário aumentar o número de amostras e a gama de marcadores avaliados.

Os dados apresentados nesse trabalho representam uma etapa de um estudo mais extenso que está sendo realizado no PHOP. Nesta etapa conseguimos eleger uma concentração de uso do reagente TransFix™ + EDTA K3, além de validar o método de permeabilização utilizado em nosso laboratório para as amostras previamente tratadas com o reagente. Novas

etapas já estão em andamento para definir as melhores condições para o uso do reagente em amostras viajadas, enviadas ao PHOP para diagnóstico e pesquisa em Leucemias Agudas Infantis. Com base nisto, estamos aumentando o número de amostras de medula óssea em TransFix™ 1/10 + EDTA K3 e analisando a sua funcionalidade por um período de 7 dias, à temperatura ambiente ou a 4°C.

CAPÍTULO 7

Conclusão

Após a análise dos resultados, pode-se concluir que:

- A concentração do reagente TransFix™ 1/20 + EDTA K3, apesar de ter apresentado bons percentuais de marcação não foi considerada uma concentração ideal para a análise imunofenotípica em medula óssea, em virtude do processo de coagulação iniciado minutos depois da adição deste sobre a amostra, sendo necessária sua avaliação em presença de uma quantidade ideal de anticoagulante;
- As amostras de medula óssea contendo o reagente TransFix™ + EDTA K3 na concentração 1/10 apresentaram similaridade nos percentuais de MPO em relação às amostras contendo apenas EDTA K3 e não apresentaram nenhum sinal de coagulação . Em virtude disso, foi eleita a melhor concentração a ser utilizada nas amostras de medula óssea;
- As soluções de permeabilização utilizadas neste estudo não apresentaram diferenças significativas na sensibilidade e na intensidade de detecção dos antígenos intracelulares, sendo todas consideradas aptas para a utilização em amostras de medula óssea com o reagente TransFix™ + EDTA K3 na concentração 1/10.

CAPÍTULO 8

Perspectivas

Como perspectivas temos:

- Averiguar a possibilidade da utilização da concentração 1/10 do reagente TransFix™ + EDTA K3, em amostras de medula óssea com suspeita de leucemia aguda com mais de 7 dias de colhida;
- A utilização do reagente TransFix™ + EDTA K3 em futuros projetos do laboratório;
- Implantação dos protocolos avaliados no Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrico;
- Divulgação Científica dos dados em publicação da área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALMEIDA, A.; CASTRO, I.; COUTINHO, J. *et al*, Recomendações para o diagnóstico, tratamento e monitorização da leucemia mielóide crônica, **Acta Med Port**, vol. 22, n°5, p.537-544, Sep. 2009.

AHLUWALIA, M.S.; PAUL, K.; DAVID M.P. Flow cytometry as a diagnostic tool in lymphomatous or leukemic meningitis. **Cancer**, Vol.118, p. 1747-1753, April 2012.

ARAÚJO, J.D.; JOSÉ D.A.F.; EMERSON C. *et al*, Cell therapy for the treatment of critical ischemia of the lower limbs. **J. vasc. bras**, vol.4, n°4, p.357-365, Oct. 2005.

BARNETT, J.K.; BARNETT, D.; BOLIN, C.A. *et al*, Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. **Infect. Immunol**, vol.67, p 853-861, Sep.1998.

BÉNÉ, M.C. Immunophenotyping of acute leukaemias. **Immunology Letters**, vol. 98, p 9–21, April 2005.

BENNETT, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M. T. *et al*, Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **Br. J. Haematol.**, vol. 51, p.189–199, 1982.

BERGARON, M. *et al*, Evaluation of stabilised blood cell products as candidate preparations for quality assessment programs for CD4 T-cell counting. **Cytometry**, vol. 50: p. 86–91, April 2002.

BIONDI, A. and MASERA. Molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica, Blood**, vol. 83: p. 651-659, Jul.1998.

BORKHARDT, A. ; CAZZANIGA G., VIEHMANN, S. *et al*, A Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. **Blood**, vol.90, n°2, p. 571-577, Jul.1997.

CANÔNICO, B. ; BETTI, M. ; LUCHETTI, F. *et al*, Flow Cytometric Profiles, Biomolecular and Morphological Aspects of Transfixed Leukocytes and Red Cells. **Cytometry Part B (Clinical Cytometry)**, vol.78, n°4, p. 267–278, Jul. 2010.

CLEVINGER, C.V. ; SHANKEY, T.V. **Clinical Flow Cytometry: Principles and Application**. Baltimore: Immunofluorescence measurement of intracellular antigens. In: Bauer KD, Duque RE, Shankey TV Williams and Wilkins, cap.2 p. 157, 1993.

CYTOMARK, W.B. Manufacturer of high quality reagents for Flow Cytometry. Disponível em: <<http://www.cytomark.co.uk/transfix.htm>>. Acesso em: 29 de junho 2012.

DOWNING, J.R. AML1/CBF transcription complex: its role in normal hematopoiesis and leukemia. **Leukemia**, vol.15: p.664-665, Jul. 2001.

DREXLER, H.G. ; GIGNAC, S.M. ; MINOWADA, J. Routine immunophenotyping of acute leukemias. **Annals of Hematology**, vol.57, n°6, p.327-339, 1988.

DRUKER, B.J. ; SAWYERS, C.L. ; KANTARJIAN, H. *et al*. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. **New England Journal of Medicine**, vol. 344, p. 1038-1042, April 2001.

FERRANDO A.A. and LOOK, A.T. Clinical implications of recurring chromosomal and associated molecular abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. **Seminars in Hematology**, vol. 37, p. 381-395, Oct. 2000.

FERRANDO, A.A. ; ARMSTRONG S.A.; NEUBERG, D.S. *et al.* Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B- precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. **Blood**, vol 102, p. 262-268, Jul. 2003.

FERRETTI, E. ; COCCO, C. ; AIROLDI I. *et al*, Targeting acute myeloid leukemia cells with cytokines. **J Leukoc Biol/ jlb**, May 2012.

GREAVES, M. Childhood leukaemia. **Bmj**, vol. 324, p. 283-287, Febr.2002.

GILLILAND, D.G. and GRIFFIN, J.D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. **Blood**, vol.100, p.1532-1542, May 2002.

HAYASHI, Y. The molecular genetics of recurring chromosome abnormalities in acute myeloid leukemia. **Seminars in Hematology**, vol. 37, p.368-380, Oct.2000.

HUANG, W. ; SUN, G.L *et al.* Clinical relevance of two major PML-RAR α isoforms and detection of minimal residual disease by retrotranscriptase polymerase chain reaction. **Blood**, vol. 82, p.1264-1269, 1993.

IMMUNOSTEP, S.L. Hold a wide range of antibodies for use in research and diagnosis in flow cytometry applications. Disponível em <http://www.immunostep.com/products.php?id_load=filt&Busqueda=21> Acesso em: 29 de junho de 2012.

JANI, L.V. ; JANOSSY, G. ; IQBAL, A. *et al*, Affordable CD4q T cell counts by flow cytometry II. The use of fixed whole blood in resource-poor settings. **Journal of Immunological Methods**, vol. 257, p.145–154, Jul. 2001.

JACOB, M.C, FAVRE, M. ; BENZA, J.C. Membrane cell permeabilisation with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. **Cytometry**, vol. 12, p.550–558, Mar. 1991.

KERSEY, J.H. Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. **Blood**, vol. 90, p.4243-425, Dec.1997.

KIRSTEM and ADRIENNE. Does Infection Cause or Prevent Childhood Leukaemia? **A review of the scientific evidence, Children with Leukaemia**, April 1988.

KOESTER, S.K. ; BOLTON, W.E. Intracellular markers. **J Immunol Methods**, vol. 243, p.99-106, Sep. 2000.

LACKRITZ, B. Leukemia Introduction. **CancerLynx**, vol. 112, p. 215-219, Jun. 2003.

LOOK, A.T. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. **Science**, vol. 278, p.1059-1064, Nov. 1997.

OLIVEIRA, A.C. ; RIBEIRO FILHO, J.D. ; GUIMARÃES, J.D. *et al*, Concentração de anticoagulante, tempo e temperatura de armazenagem sobre os parâmetros hematológicos no hemograma automatizado. **Rev.Ciên. Rural**, vol.40, n°12, p. 2521-2526, Dez. 2010.

OLIVEIRA, B.M. ; DENIZ, M.S. ; VIANA, M.B. Leucemias agudas na infância. **Rev Méd Minas Gerais**, vol.14, p.33-39, 2004.

Plate M.M., Raul L., Pauline M.S. *et al*, Evaluation of the Blood Stabilizers TransFix_ and Cyto-Chex_ BCT for Low-Cost CD4 T-Cell Methodologies. **Viral immunology**, vol.22, n° 5, p.329-332, Jun. 2009.

PEREIRA, J. ; GRACIELA, A. ; BROCARD, L. *et al*, Utilização de saponina em citometria de fluxo: uma alternativa factível para permeabilização celular. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, vol.29 n°2 , 2007.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S. **Leucemias Infantis**: Abordagem Imuno-molecular no Diagnóstico e nas Pesquisas, Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, p.27-78, Feb. 2008.

RABBITS, T.H. Chromosomal translocations in human cancer. **Nature**, vol.372, p.143-149, Nov.1999.

SCHOCH, C. ; SCHNITTGER, S. ; KLAUS, S.M. *et al.* AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. **Blood**, vol.102, p.2395-2402, Oct. 2003.

VAN DONGEN, J.J. ; MACINTYRE, E.A. ; GABERT, J.A *et al.* Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. report of the BIOMED-1 concerted action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. **Leukemia**, vol.13, p.1901-1928, Aug. 1999.

VALLI, V.E. ; JACOBS, R.M. ; PARODI, A.L. Solid myeloid proliferations. In: Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals. **Who/Afip**, 2^a ed, p.58-61, 2002.

VARMA, N. e NASEEM, S. Application of Flow Cytometry in Pediatric Hematology-Oncology. **Pediatr. Blood Cancer**, vol. 57, p.18–29, July 2011.

ZAINAD, J. ; KELI, S. ; JEFFERY, L.K. *et al.* Proteasome Inhibition Causes Regression of Leukemia and Abrogates BCR-ABL-Induced Evasion of Apoptosis in Part Through Regulation of Forkhead Tumor Suppressors. **Cancer Res.** vol, 69 , n°16, p.6546-6555, Dec. 2009.

ANEXO I

TABELA XIII - Percentual de antígenos no período de 7 dias

	1 DIA		3 DIAS		7 DIAS	
	EDTA K3	TransFix™ 1/10 + EDTA K3				
CD22+CD79	30,2%	26,7%	24,8%	23,3%		
MPO	49,3%	54,6%	17,4%	13,7%		
CD3	65,3%	59,3%	63,4%	61,5%		
Granulócitos	2,7%	5,8%	3,5%	0,02%		
Linfócitos	45,2%	39,0%	25,5%	0,05%		