



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DA CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E HEMATOLÓGICA DE
PACIENTES IDOSOS COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA NO RIO GRANDE
DO NORTE**

LEONARDO DE LIMA FERNANDES

NATAL-RN

2016

LEONARDO DE LIMA FERNANDES

**ESTUDO DA CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E HEMATÓLOGICA DE
PACIENTES IDOSOS COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA NO RIO GRANDE
DO NORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Junior

NATAL-RN

2016

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Fernandes, Leonardo de Lima.

Estudo da caracterização imunofenotípica e hematológica de pacientes idosos com leucemia mielóide aguda no Rio Grande do Norte / Leonardo de Lima Fernandes. - Natal, 2017.

84f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Orientador: Geraldo Barroso Cavalcanti Junior.

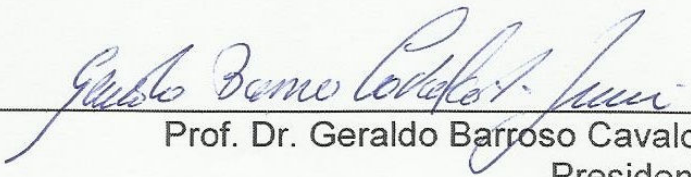
1. Leucemia Mielóide Aguda - Dissertação. 2. Síndrome Mielodisplásica - Dissertação. 3. Imunofenotipagem - Dissertação. 4. Idosos - Dissertação. 5. Prognóstico - Dissertação. I. Junior, Geraldo Barroso Cavalcanti. II. Título.

RN/UF/BS-CCS


CDU 616.15

**ESTUDO DA CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E HEMATOLÓGICA
DE PACIENTES IDOSOS COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA NO RIO
GRANDE DO NORTE.**

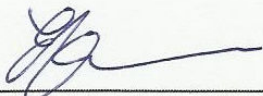
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Geraldo Barroso Cavalcanti Junior
Presidente – UFRN



Profa. Dra. Amália Cinthia Menezes do Rêgo
Examinador Externo – UNP



Prof. Dr. Euzébio Guimarães Barbosa
Examinador Interno – UFRN

Natal, 31 de Outubro de 2016.

Dedico este trabalho a Deus e a minha família, por toda ajuda, apoio e compreensão nos momentos ausentes e de dificuldades. Essa conquista também é de vocês!

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus por estar sempre ao meu lado e com sua imensa misericórdia e bondade me ajudou a superar as dificuldades encontradas no caminho e me fortaleceu para vencer os obstáculos e os momentos difíceis.

Agradeço também a minha família. A minha esposa Wigna Fernandes que sempre esteve ao meu lado durante essa jornada. Pela sua compreensão e companheirismo durante esses dois anos. Aos meus pais pelo incentivo e educação que me deram durante toda minha formação escolar e acadêmica e pela compreensão aos momentos de ausência.

Quero agradecer ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRN, em nome do coordenador Prof. Dr. Matheus Pedrosa, bem como todos os membros do colegiado, pelo suporte intelectual e desenvolvimento do senso crítico obtido durante o curso das diversas disciplinas oferecidas pelo programa.

Sou grato também ao Hemocentro Dalton Cunha (Hemonorte) pela possibilidade de realização e obtenção dos dados de imunofenotipagem dos pacientes utilizados no desenvolvimento desse estudo.

A realização desse trabalho também não teria sido possível sem o apoio do Prof. Ciro Gonçalves, do Departamento de Educação Física da UFRN, que me ajudou nas análises estatísticas dos dados.

Quero agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Geraldo Barroso pela orientação, por toda ajuda e apoio para desenvolver esse trabalho, assim como pela oportunidade e confiança depositada em mim.

Agradeço também àqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e finalização desse trabalho.

O caminho percorrido durante esses dois anos foi de grande crescimento profissional, intelectual e pessoal. Obrigado a todos por tudo.

RESUMO

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é a leucemia mais frequente em adultos acima de 60 anos de idade, em mais de 50% dos casos, representando 15 a 20% das leucemias da infância e 80% das leucemias dos adultos, apresentando um prognóstico pobre, especialmente em pacientes idosos. As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) compreendem outro espectro de neoplasias clonais agudas que, também, preferencialmente acometem indivíduos de faixa etária mais avançada e caracterizam-se por uma hematopoese ineficaz, citopenias periféricas, anormalidades cromossômicas e uma predileção variável de evolução para LMA. Pacientes idosos com Leucemia Mielóide Aguda fazem parte de um grupo biológica e clinicamente distinto apresentando uma resposta diminuída a quimioterapia. Esse trabalho teve por objetivo realizar um estudo investigativo das Leucemias Mielóides Agudas em um grupo de pacientes idosos no momento do diagnóstico, visando determinar as características clínicas e biológicas. A análise dos dados mostrou que 56 pacientes tinham diagnóstico recente de LMA (70%), 6 com doença recorrente (7,5%), 15 tinham SMD transformada (18,7%) e 3 LMA refratária (3,7%). Em relação aos aspectos clínicos, houve uma predominância de esplenomegalia (91,2%), seguido por hepatomegalia (76,2%). Os achados laboratoriais mostraram predomínio de hiperleucocitose (91,3%), trombocitopenia (85%) e anemia (86,2%). A maioria dos casos tinham classificação FAB M1 (36,6%), M2 (17,5%) e M4 (23,7%). A análise dos dados foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e mostrou correlação da frequência dos marcadores CD7 (25%), PgP (45%), p53 (30%) e Bcl-2 (30%) com o aumento do status da doença, provavelmente contribuindo para um pior prognóstico nesse grupo de pacientes. Nossos resultados demonstram a importância da investigação clínico-laboratorial destes grupos de pacientes, a fim de obter mais informações sobre esses tipos de câncer. Esse trabalho foi submetido ao comitê de ética do Hospital Universitário Onofre Lopes e obteve aprovação sob o número 359/09.

Palavras Chaves: Leucemia Mielóide Aguda, Síndrome Mielodisplásica, Imunofenotipagem, Idosos, Prognóstico.

ABSCTRAT

Acute Myeloid Leukemia (AML) is the most frequent leukemia in adult over 60 years of age in more than 50% of the cases represented 15 to 20% of childhood leukemias and 80% of adult leukemias, with a poor prognosis, especially in elderly patients. The Myelodysplastic Syndromes (MDS) comprise another spectrum of acute clonal cancers that also involve mainly older age group of individuals and are characterized by ineffective hematopoiesis, peripheral cytopenia, chromosomal abnormalities and a variable predilection of progression to AML. Elderly patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) is part of a biological and clinically distinct group having a decreased response to chemotherapy. This study aimed to carry out an investigative study of Acute Myeloid Leukemias in a group of elderly patients at the diagnosis, to determine the clinical and biological characteristics of these leukemias. The data analysis showed that 56 patients had newly diagnosed AML (70%) 6 with recurrent disease (7.5%), 15 had transformed MDS (18.7%) and refractory AML 3 (3.7%). About clinical aspects, there was a predominance of splenomegaly (91.2%), followed by hepatomegaly (76.2%). Laboratory findings showed predominance of hyperleukocytosis (91.3%), thrombocytopenia (85%) and anemia (86.2%). Most cases had FAB classification M1 (36.6%), M2 (17.5%) and M4 (23.7%). Our Data analysis was statistically significant ($p < 0.05$) and showed correlation of CD7 (25%), PgP (45%), p53 (30%) and Bcl-2 (30%) with increasing disease status, likely contributing to a worse prognosis in this group of patients. Our results demonstrate the importance of clinical and laboratory investigation of these groups of patients in order to obtain more information about these cancers. This work was submitted to the ethics committee of the University Hospital Onofre Lopes and obtained approval under number 359/09.

Key Words: Acute Myeloid Leukemia, Myelodysplastic Syndrome, Immunophenotyping, Elderly, Prognosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AcMo** - Anticorpos Monoclonais
- AR** - Anemia Refratária
- AREB** - Anemia Refratária com Excesso de Blastos
- AREB-t** - Anemia Refratária com Excesso de Blastos em transformação
- ARSA** - Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel
- BAD** – *Bcl-2 antagonist of the cell death*
- BAX** – *BCL-2 associated X protein*
- BCL-2** - *B Cell Lymphoma 2*
- BCL-XL** – *Bcl-2 extra large*
- BCRP/MXT** - Proteína relacionada a Resistência a Mitoxantrona
- BID** – *BH3-interacting domain agonist*
- CD** - *Clustter of differentiation*
- CF** – Citometria de Fluxo
- EGIL** - Grupo Europeu de Imunofenotipagem de Leucemias
- FAB** - Grupo Franco-Americano-Britânico
- FISH** - Hibridização in situ por Fluorescência
- FITC** – Fluorescein Isothiocyanate
- FSC** - *Foward Scatter*
- HLA-DR** - *Human leukocyte antigen*
- IPSS** - *International Prognostic Scoring System*
- LA** - Leucemia aguda
- LLA** - Leucemia Linfóide Aguda
- LMA** - Leucemia Mielóide Aguda
- LMMC** - Leucemia Mielomonocítica Crônica
- MDR** - Resistência a Múltiplas Drogas
- MDR-LMA** - Mielodisplasia Relacionada à Leucemia Mieloide Aguda
- MO** – Medula Óssea
- MPO** - Mieloperoxidase
- MRP** - Proteína associada a Multirresistência
- OMS** - Organização Mundial de Saúde
- OR** - *Oddes ratio*

P53 - Proteína p53

PAS - *Periodic Acid Schiff*

PE – Phicoeritrina

PerCP - Proteína do chlorophyll de Peridinin

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PgP - Glicoproteína P

SBF - Soro Bovino Fetal

SMD - Síndrome Mielodisplástica

SMD-t - Síndrome Mielodisplástica secundária ou transformada

SNC – Sistema Nervoso Central

SP – Sangue Periférico

SSC - *Side Scatter*

WPSS - *World Health Prognostic Scoring System*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Painel de Anticorpos utilizados no estudo de caracterização imunofenotípica.	pag. 35
Tabela 2. Anticorpos monoclonais empregados neste estudo.	pag. 36
Tabela 3. Medidas da tendência central e dispersão de acordo com a idade.	pag. 38
Tabela 4. Distribuição de frequências da amostra segundo o gênero.	pag. 39
Tabela 5. Distribuição de frequências da amostra segundo os dados clínicos.	pag. 39
Tabela 6. Distribuição de frequências da amostra segundo a classificação FAB.	pag. 39
Tabela 7. Correlação das características fenotípicas de acordo com grupos etários.	pag. 41
Tabela 8. Correlações entre as características laboratoriais e o status de doença.	pag. 42
Tabela 9. Medidas de frequência e tendência central e dispersão dos marcadores.	pag. 44
Tabela 10. Correlações entre os marcadores mais frequentes e o status de doença.	pag. 45
Tabela 11. Correlação entre o status da doença e os marcadores: análise contínua.	pag. 45
Tabela 12. Correlação entre o status da doença e os marcadores: análise categórica.	pag. 45
Tabela 13. Regressão linear segundo o Status.	pag. 48
Tabela 14. Variância das médias nas variáveis preditoras segundo o Status.	pag. 48
Tabela 15. Coeficientes dos níveis de aderências das variáveis independentes no Status.	pag. 48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Sobrevida de pacientes com LMA de acordo com a idade (JULIUSSON et al, 2012).	pag. 23
Gráfico 2. Análise da distribuição de gênero por grupos etários.	pag. 40
Gráfico 3. Análise da distribuição dos valores de leucócitos de acordo com status.	pag. 43
Gráfico 4. Análise da distribuição dos valores de hemoglobina de acordo com status.	pag. 43
Gráfico 5. Análise da distribuição dos valores de plaquetas de acordo com status.	pag. 44
Gráfico 6. Distribuição da frequência de CD7 de acordo com status.	pag. 46
Gráfico 7. Distribuição da frequência de Pgp de acordo com status.	pag. 46
Gráfico 8. Distribuição da frequência de p53 de acordo com status.	pag. 47
Gráfico 9. Distribuição da frequência de Bcl-2 de acordo com status.	pag. 47
Gráfico 10. Análise da regressão linear de CD7 e p53 pelo status.	pag. 49
Gráfico 11. Análise da regressão linear de Bcl-2 e Pgp pelo status.	pag. 49
Gráfico 12. Análise da regressão linear de CD7, p53 e Pgp pelo status.	pag. 50
Gráfico 13. Análise da regressão linear de CD7, p53 e Bcl-2 pelo status.	pag. 50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sistema hematopoiético normal e na LMA (Retirado e Modificado de Majeti Lab, Stanford, School of Medicine, 2012). pag. 19
- Figura 2.** Classificação das Leucemias Mielóides Agudas (Fonte: http://images.slideplayer.com.br/2/356142/slides/slide_20.jpg). pag. 20
- Figura 3.** Vias de sinalização envolvidas na morte celular (Adaptado de Fulda, S. & Vivic, D., 2012). pag. 27
- Figura 4.** Imunofenotipagem e maturação mielóide (Fonte: <http://www.abcam.com>). pag. 30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Principal	31
3.2 Específicos	31
4. JUSTIFICATIVA	31
5. MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1 Caracterização do estudo	32
5.2 Seleção das amostras de pacientes.....	32
5.3 Métodos.....	33
5.3.1 Hemograma e estudo citomorfológico	33
5.3.2 Marcação de antígenos de superfície	34
5.3.3 Marcação de antígenos intracitoplasmáticos e nucleares	34
5.3.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF).....	37
5.4 Análise estatística	37
6. RESULTADOS	38
7. DISCUSSÃO	51
8. CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO A – Certificado Comitê de Ética.....	65
ANEXO B - Artigo.....	66

1. INTRODUÇÃO

As leucemias agudas (LAs) são neoplasias monoclonais que se caracterizam pela proliferação de células anormais do sistema hematopoiético, chamados blastos, na medula óssea, nos nódulos linfáticos, no baço, no sangue e outros órgãos. As LAs acometem qualquer tipo de célula sanguínea, como hemácias, leucócitos e plaquetas, alterando suas funções normais. A leucemia origina-se de uma anormalidade na célula progenitora pluripotente do sistema hematopoiético (célula tronco-hematopoiética) e o tipo celular envolvido irá determinar o tipo de leucemia (SILVEIRA; ARRAES, 2008). Essas células ocupam o ambiente da medula óssea e inibem o crescimento e maturação normal dos precursores eritróides, mielóides e megacariocíticos. De acordo com a célula de origem, a apresentação clínica, curso e resposta terapêutica, as leucemias agudas se diferenciam entre si (ABDUL-HAMID, 2011).

A medula óssea normalmente contém menos de 5% de blastos (precursores hematopoiéticos), com proliferação e maturação das séries eritrocitárias, megacariocitárias e granulocitárias bem caracterizadas. Nas leucemias ocorre uma substituição difusa dos elementos celulares normais por células neoplásicas com processo maturativo lento e incompleto (ASTER, 2005).

Nas leucemias agudas, os dois prováveis alvos para a transformação neoplásica são: a célula tronco-hematopoiética e as células precursoras linfóides e não linfóides (B e T), dando origem a Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Leucemia Linfóide Aguda (LLA), respectivamente (GREAVES, 1993).

A etiologia da doença não está clara. Alguns fatores como exposição a irradiações e a substâncias químicas carcinogênicas, drogas antineoplásicas, fatores hereditários, mielodisplasias, síndrome de Down e viroses, podem aumentar o risco (SILVEIRA; ARRAES, 2008). As mudanças moleculares responsáveis pelas alterações leucêmicas não são bem esclarecidas, entretanto o resultado final é a proliferação de células hematopoiéticas imaturas que perdem sua capacidade de diferenciação normal (GOLDMAN et al, 2005). Acredita-se que ativações de proto-oncogenes e mutações em genes supressores de tumor possam estar envolvidos na perda do controle do ciclo celular e na morte celular programada (apoptose), tornando o clone neoplásico imortal (WEIR et al, 2007).

No início da doença, a quantidade de células leucêmicas é insuficiente para causar alterações clínicas evidentes, por isso muitas vezes não se detecta sintomatologia específica. Contudo, quando a quantidade de células anormais atinge 10^{11} a $10^{13}/\text{ml}^3$, os primeiros sintomas começam a manifestar-se. Quando o clone maligno de células se multiplica e se infiltra na medula óssea e na circulação periférica, as infecções começam a tornar-se evidentes, além de aparecerem também hemorragias, neutropenias, plaquetopenias, palidez, fadiga, perda de peso, dor lombar, edema glandular e abdominal, visão turva e comprometimento do sistema nervoso central (SILVEIRA; ARRAES, 2008).

O número de mutações necessárias para o desenvolvimento de uma leucemia aguda não é bem definido. Acredita-se que a ocorrência de duas mutações (excepcionalmente uma), pode acarretar no desenvolvimento de um fenótipo leucêmico. Não há consenso quanto ao momento que possa ocorrer a transformação neoplásica, sendo a hipótese mais aceita, que a mutação ocorra em nível da célula tronco-hematopoiética (KRESO; DICK, 2014).

A heterogeneidade na LMA deve-se ao fato de que a transformação maligna possa ocorrer em diversos estágios da linhagem mielóide, cada um com marcadores celulares e características clínicas específicas (KLCO et al, 2014).

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é a leucemia mais frequente em adultos acima de 60 anos de idade, em mais de 50% dos casos, representado 15 a 20% das leucemias da infância e 80% das leucemias dos adultos. A LMA apresenta um prognóstico pobre, especialmente em pacientes idosos (SILVA, 2006).

A classificação das leucemias agudas utiliza critérios morfológicos para detectar elementos leucemogênicos. A análise dos esfregaços de sangue periférico e de medula óssea, através de colorações específicas, tem um papel crucial na categorização inicial entre leucemias mielóides e linfóides (SILVA, 2006).

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) compreendem outro espectro de neoplasias clonais agudas. A SMD acomete, também, preferencialmente indivíduos de faixa etária mais avançada e caracteriza-se por uma hematopoese ineficaz, citopenias periféricas, anormalidades cromossômicas e uma predileção variável de evolução para leucemia mielóide aguda (VECINA et al, 2013).

A SMD pode se iniciar como doença primária (de novo), de causa desconhecida, ou secundária, após tratamento quimioterápico ou radioterapia. Há grandes diferenças entre SMD primária e secundária (SMD-t), como, por exemplo, a taxa de transformação para leucemia aguda e o grau de displasia celular, ambas maiores na SMD-t (VECINA et al, 2013).

A maior parte dos casos de SMD é adquirida e se desenvolve devido a acúmulos de danos no DNA das células hematopoiéticas, ocasionando mutações. Esses danos podem ocorrer através de alterações cromossômicas como deleções, inserções, translocações e mutações pontuais (VECINA et al, 2013).

O diagnóstico baseia-se em dados clínicos, morfológicos e citogenéticos, além da exclusão de outras doenças como deficiência de vitamina B12 e folato, infecções virais, uso de drogas quimioterápicas, doenças renais e hepáticas, dentre outros (VECINA et al, 2013).

As leucemias, assim como as síndromes mielodisplásicas, são alterações malignas do tecido hematopoiético. Elas são diferentes dos outros tipos de neoplasias do ponto de vista evolutivo, uma vez que para sua disseminação não são necessários mecanismos de angiogênese e formação de metástases, visto que as células neoplásicas já são encontradas nas vias de circulação sanguínea. Apesar dessas diferenças, as leucemias também constituem na alteração do desenvolvimento celular normal, devido a mutações que alteram as células tronco hematopoiéticas (GOLDMAN et al, 2005).

As leucemias e mielodisplasias podem ser classificadas e diagnosticadas de acordo com a morfologia e citoquímica, complementada pela imunofenotipagem e citogenética, tendo a maior parte de suas classificações sendo feitas de acordos com critérios estabelecidos pelos grupo Franco-Americano-Britânico (FAB), Grupo Europeu de Imunofenotipagem de Leucemias (EGIL) e atualmente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (O'DONNELL et al, 2012).

A classificação das leucemias baseia-se em métodos morfológicos e imunofenotípicos. Esta classificação é de grande importância para definir a terapêutica a ser empregada (SILVEIRA; ARRAES, 2008).

Apesar do diagnóstico das síndromes mielodisplásicas ser comumente baseado nos achados do hemograma, citologia da medula óssea e cariótipo, há casos que o emprego da imunofenotipagem vem para solucionar algumas dúvidas que a citologia e a citogenética não esclarecem (LORAND-METZE, 2006).

Todas as células possuem proteínas específicas que são capazes de serem reconhecidas por anticorpos sintetizados em laboratório – anticorpos monoclonais. Essas proteínas reconhecidas pelos anticorpos monoclonais são identificadas como antígenos celulares, e estão presentes em todas as células hematológicas derivadas da stem cell medular. Porém, observou-se que esse grupo de diferentes anticorpos monoclonais eram capazes de reconhecer o mesmo antígeno celular presente em mais de uma célula, sendo essa célula normal ou maligna. Esses antígenos de diferenciação celular reconhecidos por esse grupo de anticorpos foram denominados por *cluster of differentiation* ou CD (GIVAN, 2013).

Algumas células leucêmicas apresentam resistência ao tratamento com determinados quimioterápicos, caracterizando assim a doença refratária. A Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) é, na atualidade, umas das principais causas de falha na terapêutica de muitas neoplasias. A presença de moléculas como a glicoproteína P (PgP), a proteína associada a multirresistência (MRP) e a proteína relacionada a resistência a mitoxantrona (BCRP/MXT) estão relacionados com os mecanismos de efluxo, presentes nesses casos (STAVROVSKAYA, 2002).

No Brasil, a estimativa para o biênio 2016/2017, aponta para a ocorrência de aproximadamente 596 mil casos novos de câncer, sendo as leucemias responsáveis por 5.540 casos, com maior prevalência no sexo masculino. No Nordeste, as leucemias são o oitavo câncer mais prevalente, enquanto que em todo o Brasil são a nona neoplasia mais presente na população. O crescimento da incidência do câncer está relacionado ao envelhecimento da população, presente em todas as camadas sociais, mas em cada uma delas a doença apresenta características distintas (INCA, 2016).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As leucemias mielóides agudas (LMA) representam aproximadamente de 15 a 20% das doenças mielóides clonais agudas em crianças e 80% em adultos, não havendo diferenças de incidência entre as populações americanas, africanas ou caucasianas, sendo bastante frequentes em países industrializados (DESCHLER, 2008).

Na infância, a baixa incidência da LMA está relacionada a menos de 1/100.000/ano. Nos adultos, a incidência aumenta rapidamente com a idade: variando de 1/100.000/ano na quarta década de vida, até aproximadamente 10/100.000/ano nos indivíduos acima de 70 anos. A idade média de diagnóstico é de 63 anos, sendo ligeiramente mais comum em indivíduos do sexo masculino, na proporção de 1,3 indivíduos masculinos para cada feminino. (SILVA et al, 2006).

A LMA contribui com cerca de 25% de todas as leucemias no adulto nos países ocidentais, sendo, portanto, a mais frequente forma de leucemia. A incidência de LMA é mais alta nos EUA, Austrália e Oeste Europeu. A leucemia não tratada é uniformemente uma doença fatal. Embora seja possíveis medidas de suporte por um certo período (entre 11 e 20 semanas), os pacientes terminam indo a óbito por complicações decorrentes da falência medular, como infecções e hemorragias (DESCHLER; LÜBBERT, 2006).

O desenvolvimento da leucemia vem sendo associado a vários fatores de risco, dos quais incluem idade, antecedente de doença hematológica, desordens genéticas, assim como exposições a infecções virais, radiação e compostos químicos ocupacionais, além do prévio tratamento quimioterápico. Alterações na hematopoese normal iram provocar o aparecimento de células tronco leucêmica com capacidade de auto-renovação (Figura 1). A leucemogênese é um processo de várias etapas que requer a susceptibilidade da célula progenitora hematológica a agentes indutores em múltiplos estágios. Os diferentes tipos de LMA podem ter distintas causas e mecanismos, sugerindo uma ligação entre anormalidades moleculares ou mutações e o agente causador. A maioria dos casos de LMA são “de novo” sem, relativamente, haver exposição leucemogênica (DESCHLER; LÜBBERT, 2006).

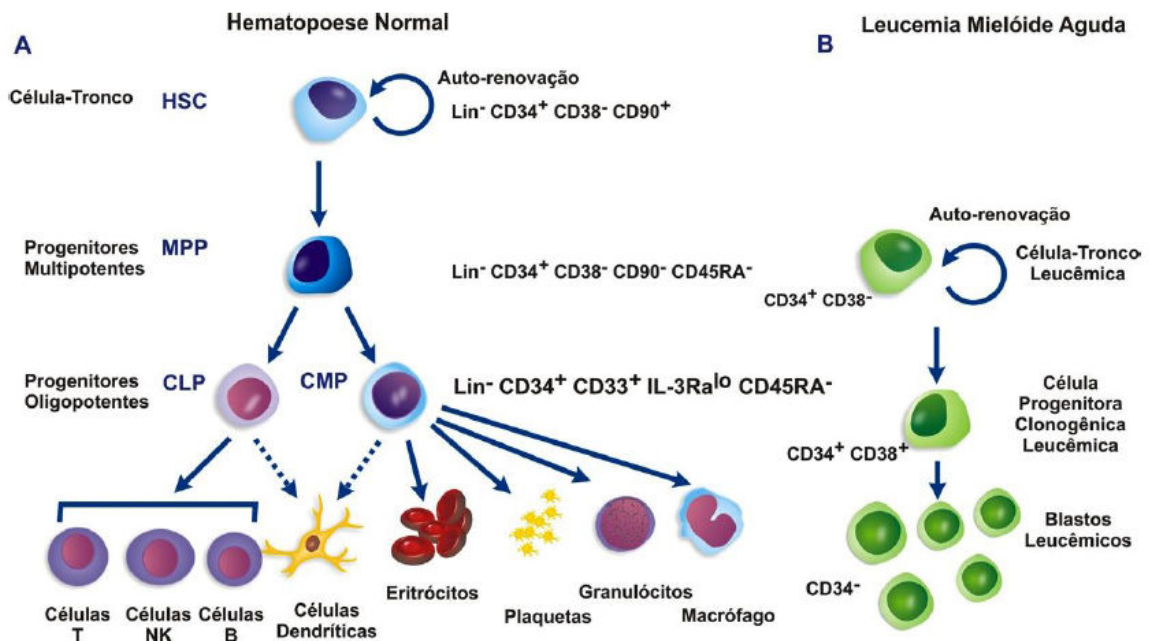


Figura 1. Sistema hematopoiético normal e na LMA (Retirado e Modificado de Majeti Lab, Stanford, School of Medicine, 2012).

A heterogeneidade da LMA motivou ao estabelecimento de uma classificação. Em 1975, o grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) propôs uma proposta de classificação em seis diferentes subtipos. Esta classificação baseia-se em critérios morfológicos e citoquímicos. O diagnóstico morfológico da LMA é baseado na morfologia dos blastos, além de seu grau de maturação.

Em 1985, com o advento da imunofenotipagem por citometria de fluxo, as leucemias agudas passaram se classificadas em alguns subtipos, cuja identificação antes só era possível, pelos critérios morfológicos e citoquímicos. Assim, foram definidos dois novos subtipos de leucemias mielóides agudas, que são: LMA-M0 e LMA-M7. (MARTINS, 2000; BENNETT et al, 1990, 1985, 1981, 1976).

As LMAs são classificadas pelo grupo Franco-Americano-Britânico em: leucemia mielobástica aguda minimamente diferenciada (LMA-M0), leucemia mielobástica aguda sem maturação (LMA-M1) e com maturação (LMA-M2), leucemia promielocítica aguda (LMA-M3), leucemia mielomonocítica aguda (LMA-M4), leucemia monoblástica aguda sem diferenciação (LMA-M5a) e com diferenciação (LMA-M5b), eritroleucemia aguda (LMA-M6) e leucemia megacarioblástica aguda (LMA-M7) (Figura 2).

A LMA-M1 é caracterizada pela alta quantidade de blastos na medula óssea, com maturação mínima. Eles compreendem pelo menos 90% das células nucleadas encontradas na medula óssea. Sendo geralmente de tamanho médio a grande, com relação núcleo-citoplasmática variável, um núcleo redondo ou oval, um ou mais nucléolos, que podem ser pouco aparentes ou evidentes, e citoplasma que muitas vezes podem apresentar bastonetes de Auer (LUSIS, 2000, MARTINS, FALCÃO, 2000).

A LMA-M2 é caracterizada pela presença de 20% a 90% de mieloblastos na medula óssea; a percentagem de células monocíticas deve ser inferior a 20% diferenciando-a do subtipo M4. Os blastos apresentam granulação azurofilas citoplasmática com forte reação positiva para MPO. As células blásticas apresentam positividade para os antígenos da linhagem mielóide: MPO, CD13, CD33, CDw65 além do CD117, podendo apresentar reatividade ao CD34 fracamente positivo (MARTINS, FALCÃO, 2000).

Na LMA-M3, a célula predominante é um promielócito anormal. Os mieloblastos representam menos de 30% das células nucleadas da medula óssea. O promielócito é uma célula de grande tamanho, citoplasma abundante de tonalidade azulada contendo numerosos grânulos vermelhos ou púrpuras grosseiros que podem dificultar a visualização do núcleo. O núcleo pode se mostra reniforme ou bilobulado, com apenas uma estreita ponte entre os dois lóbulos. É comum a presença de bastonetes de Auer, em forma de feixe (células de fagot). Em alguns casos os promielócitos apresentam-se sem grânulos com o núcleo bilobulado lembrando uma amпуlqueta sendo assim denominados de LMA M3v. A LMA-M3 está associada a uma anomalia citogenética, a translocação entre os cromossomos 15 e 17 além de distúrbios de coagulação levando a um quadro hemorrágico grave (LUSIS, 2000).

A LMA-M4 caracteriza-se pela presença de componentes granulocítico e monocítico, nas células leucêmicas do sangue periférico e da medula óssea. Os monócitos e os precursores monocíticos na medula óssea constituem de 20% a 80% das células. A LMA-M4 apresenta os antígenos de linhagem mielóide CD13 e CD33. Os antígenos de linhagem monocítica CD4, CD14, CD15 e CD11b podem estar expressos em porcentagem variável (MARTINS; FALCÃO, 2000).

Na LMA-M5, 80% ou mais das células não eritróides da medula são monoblastos, promonócitos ou monócitos. O subtipo LMA-M5a (sem diferenciação) apresenta mais de 80% de células grandes, com cromatina frouxa e citoplasma agranular. E no subtipo LMA-5b (com diferenciação) acima de 20% dos blastos apresentam maturação. A imunofenotipagem mostra positividade para CD33, mas o CD13 é negativo. Os antígenos CD14 e CD15 são positivos. O marcador CD34 geralmente é negativo (MARTINS; FALCÃO, 2000).

A LMA-M6 é diagnosticada quando os eritroblastos na medula óssea constituem mais de 50% de todas as células nucleadas e a porcentagem de blastos, entre as células não eritróides, for maior que 20% (MARTINS; FALCÃO, 2000). É comum a displasia eritróide de grau moderado a acentuado, com os precursores eritróides apresentando características como assincronia núcleo-citoplasmática, lobulação nuclear, binuclearidade e vacuolização citoplasmática. O PAS (Ácido Periorico de Schiff) apresenta uma positividade difusa ou finamente granular ou em blocos nos eritroblastos (LUSIS, 2000). Os blastos não-eritroides apresentam positividade para antígenos associados à linhagem mielóide, como o CD13 e CD33. As células eritroblásticas mais diferenciadas podem ser identificadas pela expressão de glicoforina (MARTINS; FALCÃO, 2000).

A LMA-M7 é definida pela presença de mais de 20% de megacarioblastos entre as células nucleadas na medula óssea. Os blastos são de tamanhos variáveis, com citoplasma geralmente agranular, podendo apresentar protrusões. Os marcadores de linhagem mielóide, CD13 e CD33, frequentemente estão presentes e o diagnóstico de LMA-M7 é definido pela positividade para os antígenos de linhagem megacariocítica; CD41, CD42 ou CD61 (MARTINS; FALCÃO, 2000).

Vários fatores influenciam o prognóstico da LMA, incluindo idade, morfologia da medula óssea, alterações cromossômicas, parâmetros laboratoriais, dentre outros. Esses fatores são importantes a medida em que a heterogeneidade da patologia indica uma individualização dos tratamentos, tendo exemplo típico a leucemia promielocítica, que evolui para um tratamento bastante diferente das demais, com dramático incremento na sobrevida (GRIMWADE, 2009).

Pacientes idosos com LMA fazem parte de um grupo biológica e clinicamente distinto apresentando uma resposta diminuída a quimioterapia. Ensaios clínicos mostram que a taxa de remissão completa gira em torno de 50% e a taxa de sobrevida a longo prazo fica em torno de 10%, pior do que nos pacientes mais jovens (Gráfico 1). Esse prognóstico adverso nos idosos pode ser atribuído tanto aos fatores relacionados a doença, como aos relacionados ao paciente (YANADA, 2012).

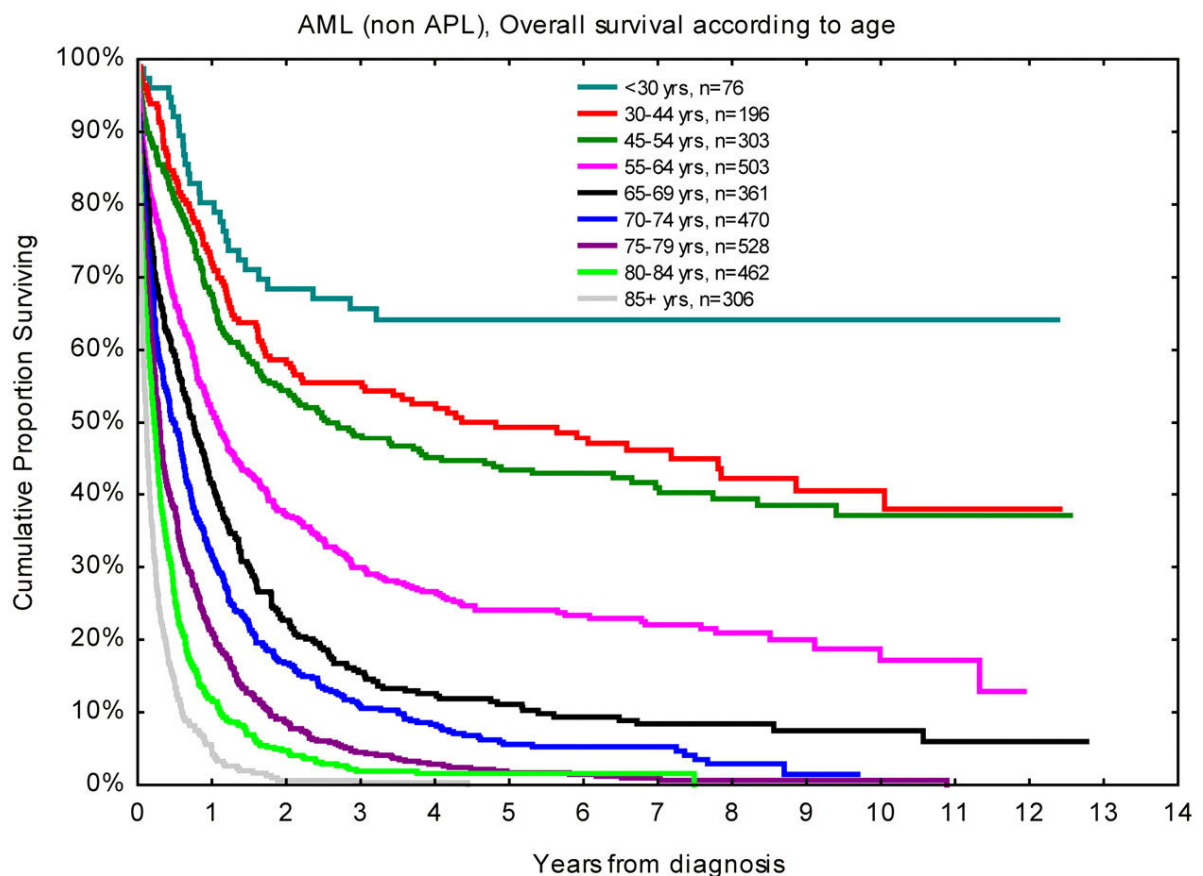


Gráfico 1. Sobrevida de pacientes com LMA de acordo com a idade (JULIUSSON et al, 2012)

As características desfavoráveis no idoso com LMA estão relacionadas alta prevalência de citogenética desfavorável nesses pacientes, a alta frequência de antecedente de doença hematológica ou tratamento prévio para um ou mais de um tipo de câncer e a uma alta prevalência de fenótipos que apresentam resistência a múltiplas drogas (POLLYEA et al, 2011).

Devidos a todos esses fatores é difícil de se estabelecer um tratamento padrão para pacientes idosos com LMA. Muitas vezes não há consenso sobre qual terapia empregar e nem a dose a ser utilizada. Pelos próprios fatores prognósticos presentes nesse grupo de pacientes, o mais plausível é a utilização de terapia de suporte (hemoterápica e farmacológica) que não agrida tanto o paciente e possa melhorar sua qualidade de vida, sem alterar o curso da doença (LUGER, 2010).

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são um grupo de doenças que permanecem enigmáticas, apesar da grande evolução científica ocorrida nos últimos anos. No início do século XX, as SMD eram identificadas como anemia crônica refrataria que, frequentemente, evoluída para um quadro de leucemia mielóide aguda, em cerca de 20 a 40% dos casos. Os pacientes eram predominantemente idosos, apresentavam a medula óssea hiperclular e megacarioblástica, porém refrataria a reposição de vitamina B12 e ácido fólico. Alguns pacientes apresentavam precursores eritróides cheios de grânulos de ferro, chamados de sideroblastos em anel. O curso clínico da SMD era arrastado, acompanhado de pancitopenia, grande necessidade transfusional e invariavelmente tornava-se fatal (MAIOLI; SOUZA, 2012).

A SMD ocorre predominantemente em indivíduos idosos, com idade média de 60 a 75 anos e a incidência aumenta para 15 a 50 casos/100.000 indivíduos em idades superiores a 70 anos. Apesar da predominância em idosos, a SMD também ocorre em pacientes jovens e até em crianças. Sua distribuição por gênero é balanceada, mas alguns estudos mostram uma discreta prevalência em homens. A exceção é a Leucemia Mielomonocítica que possui uma predominância maior no sexo masculino (HOFMANN, 2005).

Os sintomas incluem fadiga e dispneia que pode desenvolver-se por um longo período, entre 6 e 12 meses. Esses sintomas podem ser mascarados por doenças cardíacas ou pulmonares, sobretudo em pacientes de idade mais avançada. Aproximadamente metade dos indivíduos são assintomáticos e recebem seu diagnóstico em exames de sangue de rotina. A anemia é uma característica quase que universal e mais de 80% apresentam hemoglobina inferior a 10 g/dL, não responsáveis ao uso de eritropoietina (HOFMANN, 2005).

Vários fatores de riscos têm sido implicados com etiológicos para SMD como idade, sexo, uso de álcool, cigarro, radiação ionizante, terapia imunossupressora, infecções virais, exposições ao benzeno e outras exposições ocupacionais. Esses fatores de risco não têm sido muito frequentes e estimam-se que eles contribuem com 20 a 30% dos casos de doença, sendo frequentemente SMD secundárias. A maioria dos casos de SMD secundárias são relacionadas a terapia, que é mais predominante nos pacientes que foram tratados por quimioterapia ou radioterapia. Em geral, a SMD relacionada a terapia apresenta um alto índice de transformação para LMA e está associada a pobre prognóstico (CATENACCI; SCHILLER, 2005).

A SMD provavelmente se origina da stem cell hematopoiética primitiva. A mutação inicial e as vias moleculares ainda permanecem incertas. Devido a heterogeneidade histológica e citogenética, a doença nas suas várias formas constitui um grupo molecular distinto de entidades com vários graus de ineficácia hematopoiética e susceptibilidade a transformação leucêmica. Entretanto, mutações secundárias, haploinsuficiências, mudanças epigenéticas, resposta alteradas às citocinas, mudanças no sistema imune e no estroma medular, também contribuem para o fenótipo dessa doença (TEFFERI, 2009).

Estudos baseados na inativação do cromossomo X em mulheres e cariótipos anormais em pacientes com SMD, tem mostrado correlação clonal de populações celulares da linhagem mielóide. As stem cells associadas a SMD tem sido estudadas e possuem papel relevante no tratamento. Interferências farmacológicas na auto-renovação ou interrupção de vias que sustentam a clonalidade da stem cell ou que desregulam as interações entre elas pode resultar em fenótipos resistentes ao tratamento (TEFFERI, 2009).

As duas maiores classificações da SMD foram baseadas nos sistemas FAB e da Organização Mundial de Saúde (OMS). Porém, em 1997, clínicos propuseram uma classificação prognóstica alternativa chamado de *International Prognostic Scoring System* (IPSS) baseado na presença de citopenia, anormalidades citogenéticas e contagem blástica. Tanto a FAB como IPSS, distinguem SMD de LMA pelo número de blastos (30%), enquanto que na classificação da OMS esse limiar é de 20% (TEFFERI, 2009).

Na classificação FAB, as SMD são classificadas em: Anemia Refratária (AR), Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA), Anemia Refratária com Excesso de Blastos (AREB), Anemia Refratária com Excesso de Blastos em transformação (AREB-t) e Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC). A classificação FAB foi predominante até o aparecimento da classificação da OMS. Nessa classificação, os subtipos foram separados pelo número de linhagens displásicas identificadas na medula óssea, pelas citopenias periféricas, pela quantidade de blastos, pela presença de sideroblastos em anel e pela presença de anormalidades citogenéticas recorrentes, em especial a deleção do braço longo do cromossomo 5 (del 5q-), que constituiu um subtipo independente. A presença das anormalidades displásicas com 19% ou mais de blastos no sangue periférico ou na medula óssea dos pacientes, no diagnóstico ou durante a evolução do quadro, caracteriza a presença um tipo de leucemia mieloide aguda designada pela OMS como mielodisplasia relacionada à leucemia mieloide aguda (MDR-LMA). A leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) deixou de fazer parte das SMD, passando para o grupo das doenças mielodisplásica/mieloproliferativa (MAIOLI; SOUZA, 2012).

O diagnóstico da SMD é baseado na presença de características displásicas de uma, duas ou das três linhagens mielóides. Como procedimento inicial é feito a contagem de células no sangue e medula, corados pelos corantes hematológicos. A cariotipagem vem se tornando um procedimento padrão nos casos de SMD. Entre 30 e 60% dos pacientes apresentam cariótipo normal. Outra ferramenta no diagnóstico é a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) que pode ser útil quando a citogenética convencional não se torna esclarecedora. Sua vantagem está no fato de poder avaliar as células tanto em metáfase como em interfase, sendo por isso um método mais sensível (COSTA et al, 2009).

A medula óssea apresenta um elevado potencial de renovação, sendo necessário que ocorra morte celular para manutenção do equilíbrio. A morte celular pode ocorrer através de dois mecanismos: necrose ou apoptose. A necrose é chamada de morte celular passiva ou acidental e geralmente é um processo inflamatório severo (COTRAN et al, 2005). Já a apoptose é um mecanismo fisiológico de morte celular que desempenha importante papel na manutenção da homeostasia celular, na supressão tumoral e no correto funcionamento do tecido hematopoiético, possuindo mecanismos complexos envolvendo diversos mediadores (figura 2).

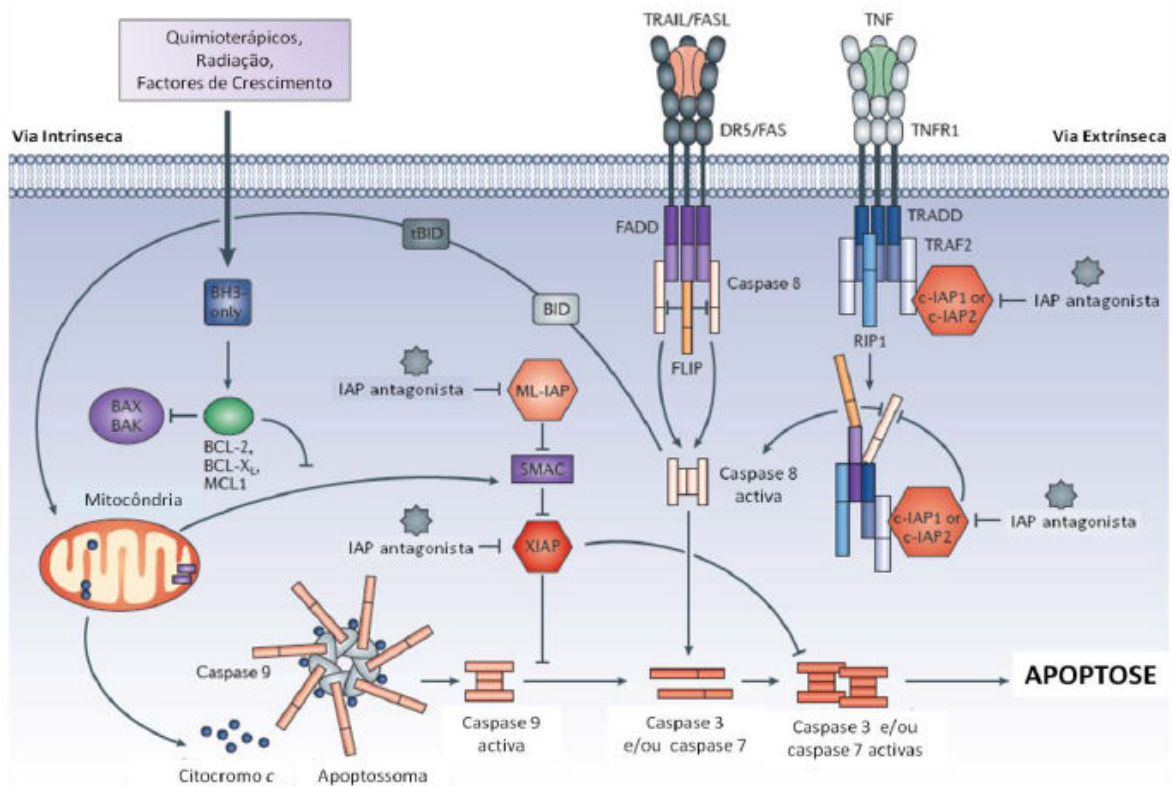


Figura 3. Vias de sinalização envolvidas na morte celular (Adaptado de Fulda, S. & Vivic, D., 2012).

A proteína p53 é uma fosfoproteína nuclear que exerce suas funções no controle do ciclo celular, atuando na interfase, nos pontos de checagem (checkpoints), na fase pós-mitótica (G1) e na fase pré-mitótica (G2). A ativação dessa proteína vai provocar cascatas de reações que vão favorecer ao reparo de algum dano no DNA que ocorra nesse processo. Quando o reparo no DNA não é possível, essa proteína ativa a via de apoptose (morte celular programada). O gene TP53, que se encontra no cromossomo 17, é o responsável pela codificação dessa proteína e ele é considerado da maior importância quanto a estabilidade genética e integridade do genoma (CHRISTIANSEN et al, 2001).

A p53 recebe o nome de “guardiã do genoma” por relevante função no monitoramento da integridade do genoma e impedindo a multiplicação de células com mutações em seu material genético. A lesão no DNA pode ocorrer por diversos estímulos como radiações ultravioletas, raios gama, produtos químicos, dentre outros, que ativam o gene TP53 e levam a transcrição da proteína. A capacidade regulatória da transcrição dos diversos genes que estão envolvidos na apoptose pode resultar na ativação do gene bax, cujo produto irá inibir a ação antiapoptótica do gene bcl-2 (TOSHIYUKI et al, 1995).

A família das proteínas Bcl-2 é subdividida em pro-apoptóticas (Bad, Bax e Bid) e anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-xL). O principal papel das proteínas dessa família é estabilizar a membrana mitocôndrial, prevenindo a liberação de citocromo c, sua subsequente ligação a mediadores quimio-específicos e por fim culminando na morte celular programada. O balanço entre as moléculas pró e anti-apoptóticas garante a sobrevivência das células de vida longa e renovação das células de vida curta, como as células da medula óssea. A elevada expressão de membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 confere, frequentemente, resistência à morte celular programada, evidenciada nas células neoplásicas (KEESHAN et al, 2002).

Grande parte das mutações observadas no gene TP53 é resultado de transcrição e acúmulo de proteína mutada e não-funcional que pode ser facilmente detectada nas células neoplásicas utilizando métodos imunológicos (VASCONCELOS, 2004). A citometria de fluxo também pode ser particularmente bem adaptada para detecção exata, semiquantitativa da expressão das oncoproteínas Bcl-2 e Bax e para estimar a heterogeneidade celular que é frequentemente encontrada na LMA e SMD (DEL POETA, 2003).

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma técnica multiparamétrica que permite analisar o tamanho, a complexidade celular e os marcadores celulares de diferenciação presente no clone neoplásico. O estudo das características imunofenotípicas das neoplasias clonais mielóides possui também interesse de investigação clínica, como:

- Determinar a sensibilidade diagnóstica do imunofenótipo e sua relação com os subtipos FAB;
- Examinar a relação entre expressão de antígenos, subtipos FAB, anormalidades cromossômicas e características clínicas;
- Avaliar o significado prognóstico dos diferentes achados imunofenotípicos e comparar com outros fatores prognósticos, especialmente a morfologia e a citogenética;
- Detectar a doença residual mínima.

Embora a análise citomorfológica continue sendo um ponto fundamental para o diagnóstico das neoplasias hematológicas clonais agudas, técnicas laboratoriais adicionais, incluindo imunofenotipagem, citogenética e estudos de genética molecular tornaram-se essenciais em alguns casos específicos. O uso desses métodos permite a identificação do tipo celular envolvido na leucemogênese (SILVA et al, 2006; CAREY et al, 2007).

A imunofenotipagem utiliza anticorpos monoclonais (AcMo) marcados com fluorocromos, que reconhecem epítomos específicos de antígenos celulares de superfície e intracitoplasmático. Os AcMo utilizados são habitualmente submetidos aos critérios do *International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens* para caracterização e classificação. Após validados, esses anticorpos recebem a designação CD (*cluster of differentiation*) (SILVA et al, 2006, CAREY et al, 2007). Cada CD pode ser representado por vários AcMo que reconhecem o mesmo antígeno, mas não necessariamente o mesmo epítomo, produzidos por diferentes clones. Este fato explica a ampla aplicabilidade dos anticorpos monoclonais (SILVA et al, 2006, CAREY et al, 2007).

Os principais AcMo empregados no diagnóstico da LMA são CD117, CD13, CD33, CD65, anti-MPO, CD11c, CD14, CD64, CD41, CD61 (Figura 2). Os antígenos mais frequentemente expressos durante a diferenciação mielóide são CD13 e CD33 (MARTINS; FALCÃO, 2000). As células mielóides mais precoces são identificadas pela expressão de CD117, CD34 e HLA-DR. Os marcadores CD11c, CD14 e CD64 são úteis na identificação de células da linhagem monocítica e o CD41 ou CD61 nas células megacariocíticas. As células eritróides, por sua vez, apresentam glicoforinas e CD71 na superfície (BAHIA et al, 2001).

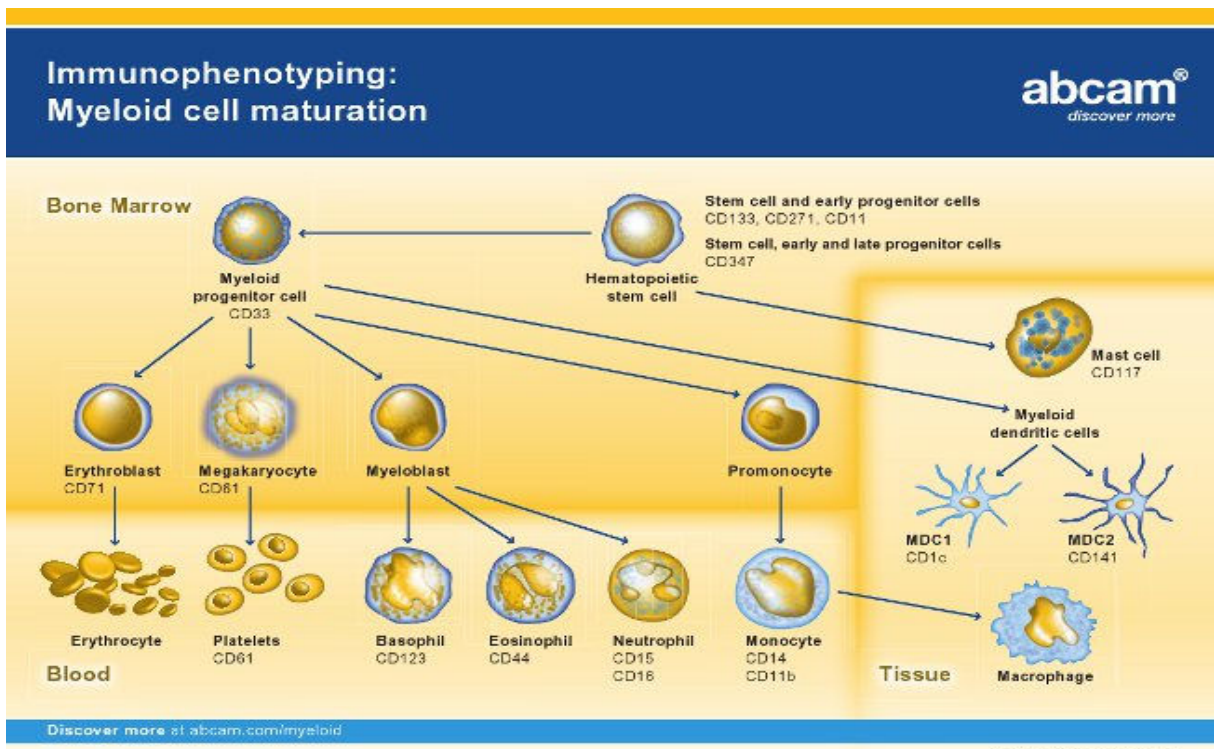


Figura 4. Imunofenotipagem e maturação mielóide (Fonte: <http://www.abcam.com>).

Em 2001, Stetler-Stevenson e col., demonstraram que a imunofenotipagem era sensível e específica para diagnóstico das anormalidades celulares características da SMD. A utilização dos anticorpos CD11b/CD16 e CD13/CD16, permite identificar assincronismo de maturação. Na análise SCC/CD45, pode-se verificar padrões de hipogranularidade presentes nos neutrófilos. Estudos do efeito das displasias que ocorrem na SMD pode ser verificado pela utilização de CD34, CD38, CD117 para identificar mieloblastos anormais; CD11b/HLA-DR e CD13/CD16, expressos anormalmente nos monócitos e blastos; perda da expressão do antígeno mielóide CD33; desvios assincrônicos e perda de CD34 ou CD56; presença de antígenos linfóides como CD7, CD5, CD19; perda da expressão de CD13, CD33, CD14, HLA-DR; Baixa expressão de CD71 e Glicoforina A (MAIOLI; SOUZA, 2012).

A imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF) promove uma avaliação objetiva das características displásicas na SMD. Estudos mostram que a CF pode ser utilizada como ferramenta de score podendo ser correlacionada com outros índices como IPSS e o WPSS para avaliar o resultado do transplante. Ela serve como parâmetro de avaliação dos imunofenótipos presentes na SMD, sendo assim útil no diagnóstico e prognóstico das neoplasias mielóides agudas (CHU et al, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Principal

Realizar um estudo investigativo das Leucemias Mielóides Agudas em um grupo de pacientes idosos no momento do diagnóstico, visando determinar suas características clínicas e biológicas.

3.2 Específicos

- Categorizar os casos de LMA recém-diagnosticadas dos pacientes idosos encaminhados ao Serviço de Citometria de Fluxo do HEMONORTE;
- Identificar marcadores celulares mais prevalentes nesse grupo de estudo e correlaciona-los com o status da doença e fatores prognósticos relatados na literatura.

4. JUSTIFICATIVA

A busca por um acompanhamento mais preciso e específico nesse grupo de indivíduos, no que se refere a monitoramento de doença e abordagem terapêutica e no intuito de melhorar a qualidade de vida e o suporte dado a esses pacientes, há uma necessidade na literatura de identificar e classificar os casos de leucemias mielóides agudas na população idosa, visando e estabelecer condutas terapêuticas e determinação de fatores prognósticos mais eficazes.

Esse estudo vai fornecer uma grande contribuição científica para o desenvolvimento da medicina no nosso Estado, principalmente no setor onco-hematológico e, também, para alunos e profissionais da área de saúde que estejam interessados em ampliar seus conhecimentos neste campo de pesquisa.

Neste contexto, imunofenotipagem por citometria de fluxo é importante para o diagnóstico, classificação, prognóstico, acompanhamento evolutivo, orientação e monitoração terapêutica.

Portanto, um estudo dos marcadores imunofenotípicos nos idosos portadores de LMA, através de painéis de anticorpos monoclonais, é de suma importância e justifica a realização deste projeto.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Caracterização do estudo

O presente trabalho foi submetido ao comitê de ética do Hospital Universitário Onofre Lopes e obteve aprovação (359/09) para sua realização. Ele consiste de um estudo retrospectivo de resultados clínicos e laboratoriais de pacientes idosos (faixa etária maior que 60 anos de idade) encaminhados para diagnóstico por imunofenotipagem por citometria de fluxo no Hemocentro Dalton Cunha (HEMONORTE) no período de 2006 a 2012.

5.2 Seleção das amostras de pacientes

Utilizou-se como critério de inclusão no estudo, indivíduos com idade acima de 60 anos, diagnosticados com LMA; e como critério de exclusão, indivíduos com LMA e idade abaixo de 60 anos. Pacientes com idade superior a 60 anos e classificados com FAB M3 também foram excluídos do estudo.

Foram analisadas 80 amostras de aspirados de medula óssea e/ ou sangue periférico desses pacientes. Os indivíduos foram divididos em dois grupos etários (I e II) com idades de 60 a 79 anos (grupo I) e a partir de 80 anos (grupo II).

O diagnóstico dessas leucemias baseou-se em critérios clínicos e laboratoriais. Estes últimos incluíram o hemograma, mielograma e imunofenotipagem celular por citometria de fluxo, com um painel de anticorpos monoclonais específicos para caracterização da ontogenia de leucemias agudas, sendo também marcadores celulares para estudo de resistência as drogas (Pgp e MRP) e associados a mecanismos de apoptose (p53 e BCL-2).

Informações a respeito dos pacientes foram obtidas no momento em que as amostras deram entrada no Laboratório de Hematologia do HEMONORTE. No momento da coleta das amostras foram anotados dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes ou por análises dos dados dos prontuários arquivados no arquivo médico do HEMONORTE.

Um modelo pré-definido para a coleta de dados incluiu etnia, sexo, idade, subtipo FAB para a classificação das leucemias agudas, mielograma, dosagem de hemoglobina, contagem de plaquetas, leucometria global e contagem diferencial de leucócitos, além da avaliação do envolvimento extra-medular da doença (SNC, baço, fígado e gânglios linfáticos, massa mediastinal e infiltração de pele e hipertrofia gengival e fenômenos hemorrágicos).

Considerou-se linfadenopatia generalizada quando os linfonodos mediam mais que 2 cm de diâmetro e pertenciam a mais de uma cadeia regional não contígua. Considerou-se visceromegalia quando o fígado e/ou baço mediam mais de 3 cm abaixo do rebordo costal direito e esquerdo, respectivamente. A presença de massa mediastinal foi determinada por exames radiológicos do tórax com aumento de 1/3 da imagem radiológica própria do mediastino.

Para o diagnóstico laboratorial das leucemias agudas seguiu-se o critério da observação da presença de mais de 20% de células blásticas no sangue periférico ou no aspirados de MO, cuja avaliação morfológica seguiu os critérios adotados pela classificação FAB (BENNETT et al, 1976; BENNETT et al, 1981).

5.3 Métodos

5.3.1 Hemograma e estudo citomorfológico

Estudos citomorfológicos de distensão de sangue periférico (SP) e medula óssea (MO) de pacientes foram realizados após coloração com corante Leishman. As lâminas depois de coradas foram examinadas no microscópio ótico, inicialmente com objetiva de 40x e posteriormente, com objetiva de 100x. A avaliação morfológica para as leucemias agudas seguiu os critérios do grupo FAB conforme os subtipos L1, L2 e L3 para a LLA e M0 até M7 para a LMA (BENNETT et al, 1976).

Amostras de SP dos pacientes foram coletadas em tubos do tipo “vacutainer” com EDTA potássico para hemograma realizar rotineiro. A leucometria foi realizada no analisador hematológico Micros 60 (ABX). Para análises subsequentes das amostras procedentes de sangue periférico, utilizou-se a mesma amostra colhida para o hemograma rotineiro.

Quando o material analisado foi MO, utilizou-se para tal, aspirado de medular em seringa previamente heparinizada (Liquemine-Roche).

As amostras de sangue periférico ou de medula óssea foram submetidas a imunofenotipagem por citometria de fluxo utilizando-se um painel de AcMo diretamente conjugado com fluorocromos como o isotiocianato de fluoresceína ou FITC (fluorescein isothiocyanate) e/ou Phicoeritrina (PE) e/ou proteína do chlorophyll de Peridinin (PerCP), correspondentes as fluorescências verde, laranja e vermelha respectivamente, possibilitando a dupla ou tripla marcação em uma única etapa.

5.3.2 Marcação de antígenos de superfície

A reação de imunofluorescência direta foi realizada em 50 microlitros (50 µL) de suspensão de células totais (MO e/ou SP) previamente homogeneizadas, as quais foram incubadas com 20 µL de AcMo específico por 30 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente (24°C). Após esta etapa, a suspensão foi novamente homogeneizada e acrescentada à mesma cerca de 2 mililitros (2mL) de solução de lise, havendo nova incubação por mais 10 minutos no escuro à temperatura ambiente (24°C). Após este período, a suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos a 2000 rotações por minutos (RPM), o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspense em PBS e novamente centrifugado a 1.500 RPM por 5 minutos, sendo esta última etapa realizada mais 2 vezes consecutivas. Ao final desta etapa, o sedimento foi então ressuspense em 1 mL de solução de PBS/formaldeído a 1% e estocado ao abrigo da luz, sob refrigeração, até o momento da análise. Em todos os casos analisados, utilizou-se um controle de autofluorescência inespecífica com um conjugado IgG marcado com fluorocromo (Gama 1FICT / gama 2PE - Becton Dickinson).

5.3.3 Marcação de antígenos intracitoplasmáticos e nucleares

Por se tratar de antígenos cujos epítopos se encontram localizados no citoplasma e núcleo das células, foi necessária a prévia permeabilização celular, possibilitando dessa forma, o direcionamento e reatividade do AcMo para os seguintes antígenos: TdT e p53 (núcleo) e sendo também necessário esta metodologia na investigação intracitoplasmática (c) para o mieloperoxidase (MPO), CD13 (cCD13), CD22 (cCD22), CD79a (cCD79a) e BCL-2.

Para este procedimento empregou-se solução de lise (Becton Dickinson's FACS lysing solution, San José CA, USA) para a permeabilização celular. Cerca de 50µL de amostra de suspensão celular de SP e ou MO por tubo foi incubada com solução de lise previamente diluída a 10% em água destilada por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de uma centrifugação a 1.500 rpm por 7 minutos, descarte do sobrenadante e homogeneização do sedimento. Logo após, ressuspendeu-se o sedimento em 2 mL de solução de Tween-20 diluído a 0,5% em PBS (Tween-20 / BHD, England), esta mistura foi centrifugada 2 vezes a 1.500 rpm.

Após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi homogeneizado e adicionado sobre o mesmo 10µL do AcMo, seguida de uma incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esta etapa, o sedimento foi homogeneizado em 2 mL de solução de PBS/Tween-20, seguida de centrifugação a 1.500 RPM por 5 minutos, desprezado o sobrenadante e o sedimento ressuspendido e submetido a mais uma lavagem com solução de PBS/Tween-20. Após o descarte do sobrenadante, ao sedimento final foi adicionado 1 mL de solução de formaldeído diluído a 1% em PBS e estocado na geladeira ao abrigo da luz até o momento da leitura no citômetro de fluxo.

Para cada amostra foi utilizado um tubo controle de marcação inespecífica, empregando-se para tal, imunoglobulina inespecífica conjugada ao FITC diluída conforme as especificações do fabricante (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Painel de Anticorpos utilizados no estudo de caracterização imunofenotípica.

	Marcadores de Célula B	Marcadores de Célula T	Marcadores de Células Mielóides	Marcadores Não-Específicos
Primeiro Passo	cytCD79a, CD19, sCD22	sCD3, cytCD3 CD7	*CD13, CD33, anti-MPO	CD45
Segundo Passo	cytIg, slg	CD1a, CD2, CD4, CD5, CD8	CD15, CD11b, CD14, CD41, CD61, CD117, CD235	CD34, CD123, HLA-Dr, TdT, CD10, PgP, P53, Bcl-2

Nota: slg: Imunoglobulina de superfície, cytIg: Imunoglobulina citoplasmática, sCD3: CD3 de superfície, cyCD3: CD3 citoplasmático, MPO: mieloperoxidase, CD235: Glicoforina alfa, TdT: Terminal deoxinucleotidil Transferase, *CD13 (em alguns casos, cytCD13 foi utilizado). Todos os anticorpos monoclonais são da Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA.

Tabela 2. Anticorpos monoclonais empregados neste estudo.

ANTÍGENOS RELACIONADOS A LINFÓCITOS T E B		
Anticorpos	Especificidade	Marca comercial
CD3/CD19/CD45	Linfócitos T e B	Beckton-Dikinson
CD4/CD8/CD3	Linfócitos T e subpopulações	Beckton-Dikinson
CD22	Linfócitos B e precursores	Beckton-Dikinson
CD79a	Linfócitos B e precursores	Beckton-Dikinson
CD10	Antígeno Comum da Leucemia Linfóide Aguda	Beckton-Dikinson
CD20	Linfócitos B e precursores	Beckton-Dikinson
CD2	Linfócitos T e precursores	Beckton-Dikinson
CD7	Linfócitos T e precursores	Beckton-Dikinson
CD5	Linfócitos T e precursores	Beckton-Dikinson
CD1a	Timocitos Corticais	Pharmigen
IgM	Cadeia pesada da imunoglobulina IgM	Pharmigen
ANTÍGENOS MIELÓIDES, MONOCITÁRIOS, PLAQUETÁRIOS E ERITRÓIDES		
Anticorpos	Especificidade	Marca comercial
CD13	Células mielóides	Pharmigen
CD33	Células mielóides	Pharmigen
CD15	Granulócitos maduros	Pharmigen
CD11b	Monócitos e precursores	Pharmigen
CD45/CD14	Leucócitos / Monócitos	Beckton-Dikinson
CD41	Glicoproteína plaquetárias	Beckton-Dikinson
CD61	Glicoproteína plaquetária	Beckton-Dikinson
Glicoforina alfa	Eritroblastos	Beckton-Dikinson
Anti- MPO	Mieloperoxidase	Beckton-Dikinson
OUTROS		
Anticorpos	Especificidade	Marca comercial
CD34	Células progenitoras	Pharmigen
CD117	Receptor para C-kit	Beckton-Dikinson
CD123	Receptor para IL3	Beckton-Dikinson
TdT	Terminal deosinucleotidil Transferase	Beckton-Dikinson
CD38	Ativação celular	Beckton-Dikinson
HLADR	Antígeno de histocompatibilidade de classe II	Pharmigen
P53	Antígeno nuclear	Beckton-Dikinson
BCL2	Antígeno nuclear	Beckton-Dikinson

5.3.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF)

Todas as amostras passaram por CF após a marcação com o AcMo especificado pelo painel proposto (Tabela 1). A imunofenotipagem foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCalibur® (Becton Dickinson) em plataforma machintosh (Apple, USA). A fluorescência verde (fluorescência de FITC) foi detectada no canal FL1 (nm 530/30), e fluorescência laranja (PE) foi detectada no canal FL2 (nm 585/42). As células foram analisadas em pelo menos 20.000 eventos no gate (região) de células mononucleares (com base na dispersão frontal e lateral FSC e SSC), o que incluiu os linfócitos e células blásticas. Os dados foram analisados com o software Cell Quest software (Beckton Dickinson).

As imunofenotipagens foram consideradas positivas por ambas as técnicas quando ocorreram mais que 20% de células blásticas positiva os AcMo. Os resultados foram fornecidos na forma de dot-plot em percentagens da população celular com reação positiva ou negativa e intensidade de fluorescência.

5.4 Análise estatística

Todos os dados e suas variáveis foram analisados utilizando software IBM SPSS Statistic v.20 para calcular perfil de frequências. Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para averiguar se as amostras podiam ser consideradas como provenientes da população do estudo. O resultado foi normal em todas as variáveis utilizadas nas análises, portanto foram escolhidos testes paramétricos para as análises estatísticas. As associações significativas entre as variáveis foram obtidas através de análises de correlação de Pearson e Spearman, do teste Qui-Quadrado e foi realizado o teste de Regressão Linear para verificar quais variáveis independentes influenciavam mais na variável dependente. Os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

6. RESULTADOS

A necessidade do uso de marcadores biológicos na avaliação do comportamento clínico das leucemias mielóides agudas é evidente se nós considerarmos que nessas doenças, em geral, ocorre eventos de paradas no ciclo celular devido a alterações genéticas e moleculares. Portanto a detecção dessas mudanças pode ser útil no momento do diagnóstico e no monitoramento e evolução da doença, sobretudo em pacientes idosos que apresentam pobre prognóstico. Há muitos estudos que mostram como o fenótipo e o genótipo afetam as células, particularmente na relação de proteínas com mecanismos de controle de apoptose e resistência ao tratamento (COSTELLO, 2000; FENAUX, 1997; PARKER, 2000).

A análise da tendência de dispersão dos pacientes de acordo com a idade mostrou que os indivíduos possuíam uma média de idade de $72,74 \pm 8,2$, onde o paciente menos idoso tinha 60 anos e o mais idoso tinha 95 anos (tabela 3).

Tabela 3. Medidas da tendência central e dispersão de acordo com a idade.

VARIAVEL	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
IDADE	72,74	71	8,276	60	95

Teste: Análise Descritiva. Fonte: Dados coletados pelos investigadores

Os pacientes tiveram suas análises descritivas de frequências calculadas de acordo com o sexo, dados clínicos (esplenomegalia, hepatomegalia, febre, hemorragia, linfadenopatia, massa tumoral e infiltração de pele) e classificação FAB. Os dados de perfis de frequência dessas variáveis constam nas tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4. Distribuição de frequências da amostra segundo o gênero.

Variável	Categorias	Frequência Absoluta	Frequencia Relativa %
SEXO	Masculino	48	60
	Feminino	32	40

Teste: Análise Descritiva. Fonte: Dados coletados pelos investigadores

Tabela 5. Distribuição de frequências da amostra segundo os dados clínicos.

Variável	Categorias	Frequência Absoluta	Frequencia Relativa %
DADOS CLÍNICOS	Esplenomegalia	73	91,3
	Hepatomegalia	61	76,3
	Febre	19	23,8
	Hemorragia	1	1,3
	Linfadenopatia	8	10
	Massa tumoral	6	7,5
	Infiltração de pele	6	7,5

Teste: Análise Descritiva. Fonte: Dados coletados pelos investigadores

Tabela 6. Distribuição de frequências da amostra segundo a classificação FAB.

Variável	Categorias	Frequência Absoluta	Frequencia Relativa %
CLASSIFICAÇÃO FAB	M0	3	3,8
	M1	29	36,3
	M2	14	17,5
	M4	19	23,8
	M5a	4	5
	M5b	7	8,8
	M6	2	2,5
	M7	2	2,5

Teste: Análise Descritiva. Fonte: Dados coletados pelos investigadores

Do total de pacientes analisados, 32 pacientes eram do sexo feminino (40%) e 48 pacientes do sexo masculino (60%). A análise dos dados clínicos dos pacientes mostrou que a maior parte apresentava esplenomegalia (91,3%), hepatomegalia (76,3%) e febre (23,8%). Dentre os 80 indivíduos analisados, 29 (36,3%) foram classificados pela FAB como LMA-M1, 14 (17,5%) pertenciam eram LMA-M2 e 19 (23,8%) foram classificados como LMA-M4.

A distribuição dos grupos etários de acordo com o gênero mostrou que dentre os homens houve um predomínio de indivíduos menos idosos (87,5%) e que dentre as mulheres, esse grupo de indivíduos compreendiam cerca de 56,2% (gráfico 2).

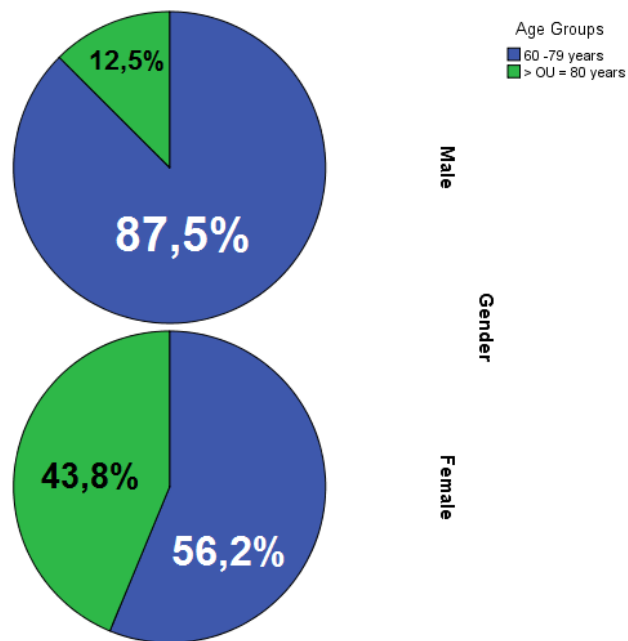


Gráfico 2. Análise da distribuição de gênero por grupos etários.

Dentre as 80 amostras analisadas, a maior parte dos pacientes (60 indivíduos) pertenciam do grupo I, correspondendo a 75%. Os achados clínicos foram mais prevalentes nos pacientes do grupo I, alcançando uma frequência de indivíduos com 74% de esplenomegalia, 75,4% com hepatomegalia e 84,2% com febre. As correlações estatísticas entre os dados das variáveis sexo, dados clínicos e classificação FAB de acordo com os grupos etários dos pacientes mostraram que o gênero possui significância estatística quando comparado com os grupos de idade I e II, com *odds ratio* (OR) de 5,4 vezes para o sexo masculino quando comparado com o feminino (tabela 7).

Tabela 7. Correlação das características fenotípicas de acordo com grupos etários.

VARIÁVEIS	Total	Grupos etários		OR	p valor
		GRUPO I 60 – 79	GRUPO II ≥ 80		
	80	60 (75)	20 (25)		
Sexo					
MASCULINO	48 (60)	42 (87,5)	6 (12,5)	5,4	0.02*
FEMININO	32 (40)	18 (56,2)	14 (43,8)		
Dados clínicos					
Esplenomegalia	73 (91,3)	54 (74)	19 (26)	2,1	0.493
Hepatomegalia	61 (76,3)	46 (75,4)	15 (24,6)	0,91	0.879
Febre	19 (23,8)	16 (84,2)	3 (15,8)	0,48	0.288
Hemorragia	1 (1,3)	1 (100)	0 (0)	-	0.561
Linfadenopatia	8 (10)	6 (75)	2 (25)	1,0	1.000
Massa tumoral	6 (7,5)	4 (66,7)	2 (33,3)	1,5	0.637
Infiltração de pele	6 (7,5)	4 (66,7)	2 (33,3)	1,5	0.624
Classificação FAB					
M0	3 (3,8)	2 (66,7)	1 (33,3)	-	0.882
M1	29 (36,3)	23 (79,3)	6 (20,7)		
M2	14 (17,5)	11 (78,6)	3 (21,4)		
M4	19 (23,8)	14 (73,7)	5 (26,3)		
M5a	4 (5)	3 (75)	1 (25)		
M5b	7 (8,8)	4 (57,1)	3 (42,9)		
M6	2 (2,5)	2 (100)	0 (0)		
M7	2 (2,5)	1 (50)	1 (50)		

Nota: Números nos parênteses são percentagens. *p < 0.05 estatisticamente significante.

Teste Qui-Quadrado.

Para avaliar a correlação entre as variáveis laboratoriais e o prognóstico da doença, categorizou-se os quatro status (diagnóstico, refratária/recaída e transformada) de acordo com o grau (baixo, médio e alto), respectivamente. Do total de 80 pacientes analisados, 56 indivíduos tiveram a imunofenotipagem como critério diagnóstico, 3 foram categorizados como refratários ao tratamento, 6 tiveram recaída da leucemia e 15 possuíam LMA transformada.

Leucocitoses com valores entre 10 e 50 x 10⁹/L, e acima de 50 x 10⁹/L foram as mais prevalentes, alcançando uma frequência de 33,7% e 57,6%, respectivamente. Esse perfil de aumento do número de leucócitos foi evidenciado nos quatro status de doença: diagnóstico, refratária, recaída e transformada com valores significativos.

A plaquetopenia se mostrou presente na maior parte dos pacientes, com contagem de plaquetas menores de 50 x 10⁹/L encontrada em 32,5% dos indivíduos e valores entre 50 e 100 x 10⁹/L presentes em 52,5%. Essa diminuição do número de plaquetas nos pacientes idosos também se mostrou estatisticamente significativa quando correlacionada com os status da leucemia mielóide aguda nesses pacientes.

A avaliação da dosagem de hemoglobina mostrou que 86,2% dos indivíduos apresentavam valores de hemoglobina abaixo de 10 g/dL. Essa anemia também se mostrou significativa ($p < 0,05$) quando correlacionada com o status da doença. Todos os dados acima estão na tabela 8 e gráficos 3, 4 e 5.

Tabela 8. Correlações entre as características laboratoriais e o status de doença.

VARIÁVEIS	Total	Status de doença				p valor
		Diagnóstico	Refratária	Recaída	Transformada	
	80	56 (70)	3 (3,7)	6 (7,5)	15 (18,7)	
Leucócitos x 10⁹/L						
≤ 2	4 (5)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	0.003*
> 2 - 5	2 (2,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	
> 5 - 10	1 (1,2)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	
> 10 - 50	27 (33,7)	17 (63)	2 (7,4)	1 (3,7)	7 (25,9)	
> 50	46 (57,6)	37 (80,4)	1 (2,2)	4 (8,7)	4 (8,7)	
Plaqueta x 10⁹/L						
≤ 50	26 (32,5)	19 (73,1)	2 (7,7)	1 (3,8)	4 (15,4)	0.039*
> 50 - 100	42 (52,5)	31 (73,8)	1 (2,4)	1 (2,4)	9 (21,4)	
≥ 100 - 150	7 (8,7)	3 (42,9)	0 (0)	3 (42,9)	1 (14,3)	
> 150	5 (6,3)	3 (60)	0 (0)	1 (20)	1 (20)	
Hemoglobina (g/dL)						
≤ 10.0	69 (86,2)	51 (73,9)	3 (4,3)	3 (4,3)	12 (17,4)	0.033*
> 10.0	11 (13,8)	5 (45,5)	0 (0)	3 (27,3)	3 (27,3)	

Nota: Percentagens entre parênteses. * $p < 0.05$ é considerado significativo. Teste Qui – Quadrado.

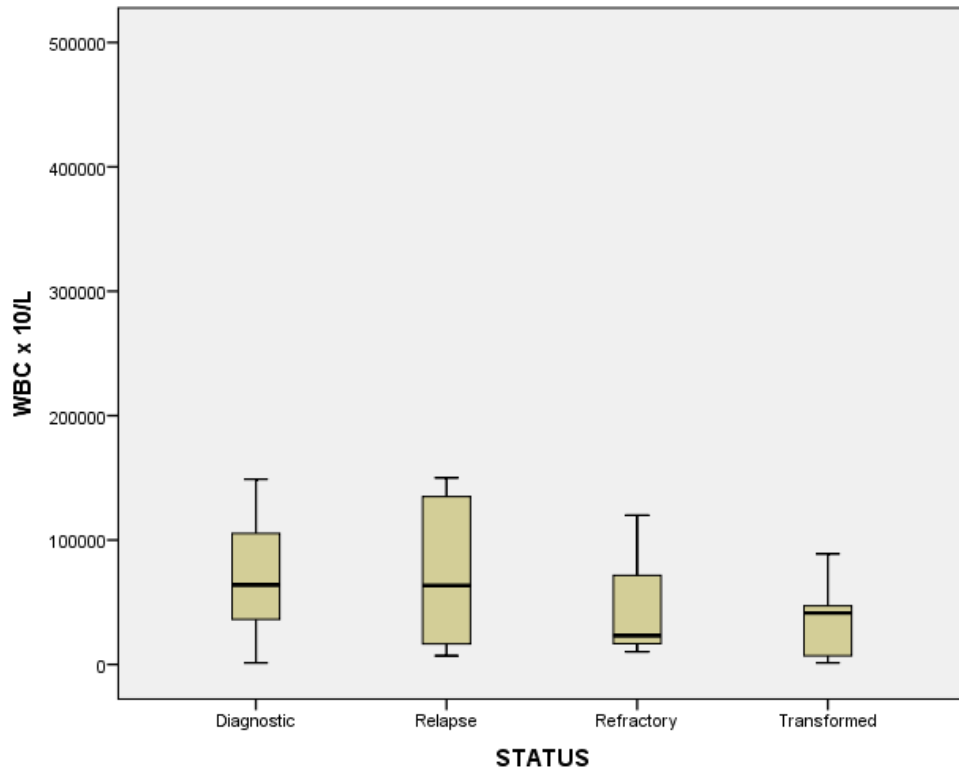


Gráfico 3. Análise da distribuição dos valores de leucócitos de acordo com o status.

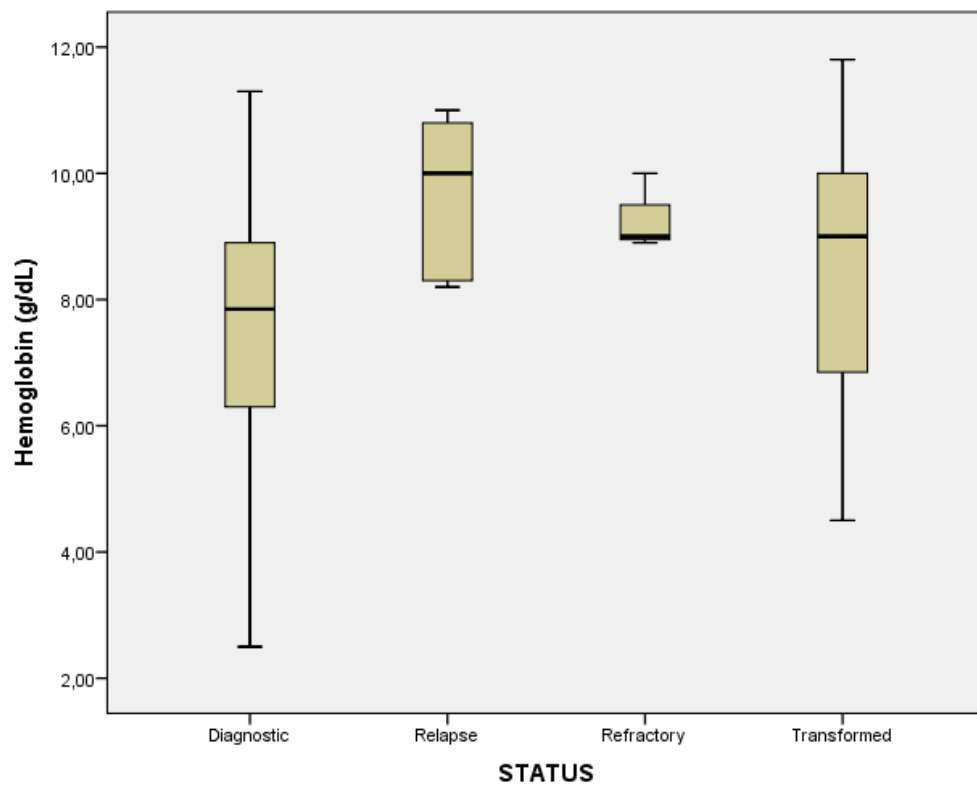


Gráfico 4. Análise da distribuição dos valores de hemoglobina de acordo com o status.

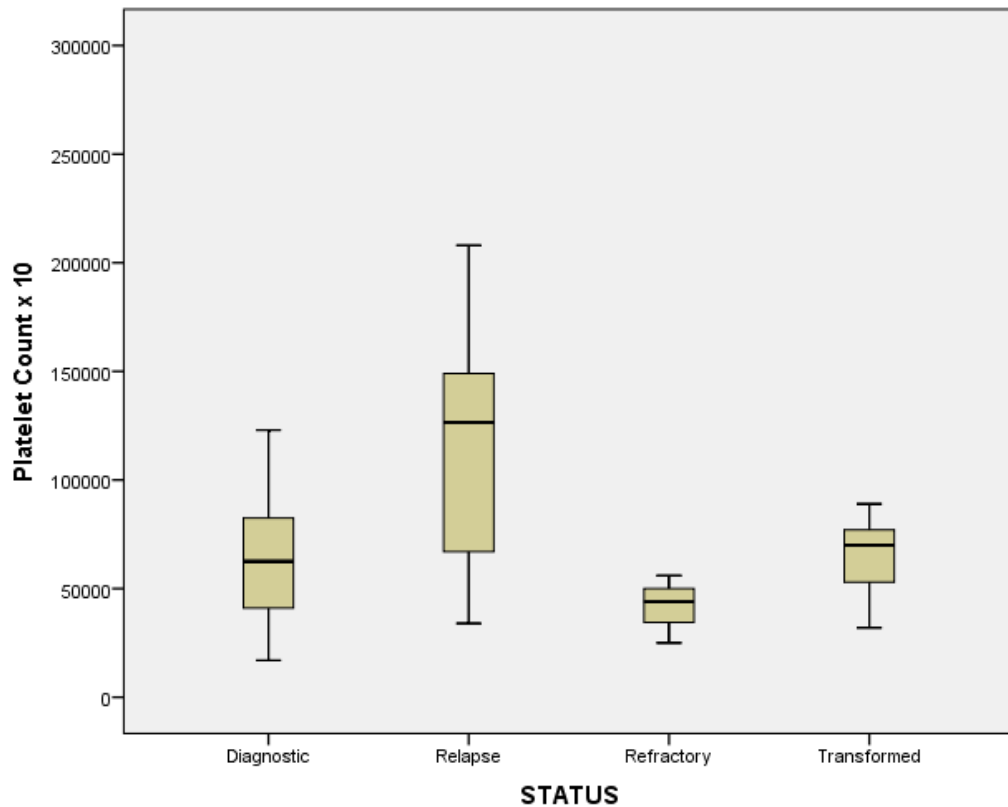


Gráfico 5. Análise da distribuição dos valores de plaquetas de acordo com o status.

A tabela 9 mostra a análise descritiva de dispersão da positividade dos marcadores imunofenotípicos nos pacientes do estudo.

Tabela 9. Medidas de frequência e tendência central e dispersão dos marcadores.

MARCADOR	Frequência (%)	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Pgp	45	24,38	0	29,691	0	89
CD34	67,5	26,97	22	27,898	0	100
CD7	25	14,89	0	26,472	0	88
HLADR	75	38,78	30	30,61	0	97
CD38	63,8	30,87	28	30,644	0	96
CD117	67,5	29,68	25	30,483	0	93
p53	30	23,35	0	36,039	0	90
Bcl-2	30	16,54	0	25,68	0	67

Teste: Análise Descritiva. Fonte: Dados coletados pelos investigadores

Após avaliação da frequência dos marcadores, de acordo com os status da doença, identificamos 8 marcadores com frequência aumentada (tabela 10). O teste de Qui-Quadrado e correlações de Person e Spearman mostraram que quatro marcadores possuíam relação estatisticamente significativa quando comparado com status da doença: CD7, Pgp, p53 e Bcl-2 (tabelas 11 e 12). A distribuição desses marcadores de acordo com o status são representadas nos gráficos 6, 7, 8 e 9.

Tabela 10. Correlações entre os marcadores mais frequentes e o status de doença.

VARIÁVEIS		Status da doença				p valor
		Diagnostico	Refratária	Recaída	Transformada	
		56	3	6	15	
Marcadores	Pacientes					
CD34	54	34 (63)	3 (5)	5 (8,3)	12 (22,2)	0.224
HLADR	60	40 (66,7)	3 (5)	5 (8,3)	12 (20)	0.614
CD38	51	36 (70,6)	1 (2)	4 (7,8)	10 (19,6)	0.733
CD117	54	36 (66,7)	3 (5,6)	3 (5,6)	12 (22,2)	0.210
CD7	20	8 (40)	2 (10)	4 (20)	6 (30)	0.004*
Pgp	36	18 (50)	3 (8,3)	5 (13,9)	10 (27,8)	0.003*
p53	24	0 (0)	3 (12,5)	6 (25)	15 (62,5)	0.001*
Bcl-2	24	0 (0)	3 (12,5)	6 (25)	15 (62,5)	0.001*

Nota: Percentagens entre parênteses. *p < 0,05 é considerado significativo. Teste Qui – Quadrado.

Tabela 11. Correlação entre o status da doença e os marcadores: análise variável contínua.

VÁRIAVEL	Pgp	CD34	CD7	HLADR	CD38	CD117	p53	Bcl-2
STATUS DA DOENÇA	r	0,418	0,121	0,201	0,114	0,018	0,800	0,913
	p	0,001*	0,286	0,074	0,316	0,876	0,484	0,001*
	N	80	80	80	80	80	78	80

Legenda: * = p < 0,05 estatisticamente significativa. Teste: Correlação de Pearson

Fonte: Dados coletados pelos investigadores

Tabela 12. Correlação entre o status da doença e os marcadores: análise categórica.

VÁRIAVEL	Pgp	CD34	CD7	HLADR	CD38	CD117	p53	Bcl-2
STATUS DA DOENÇA	r	0,370	0,211	0,344	0,117	-0,010	0,150	0,985
	p	0,001*	0,060	0,002*	0,301	0,927	0,190	0,001*
	N	80	80	80	80	80	78	80

Legenda: * = p < 0,005 estatisticamente significativa. Teste: Correlação de Spearman

Fonte: Dados coletados pelo Pesquisador

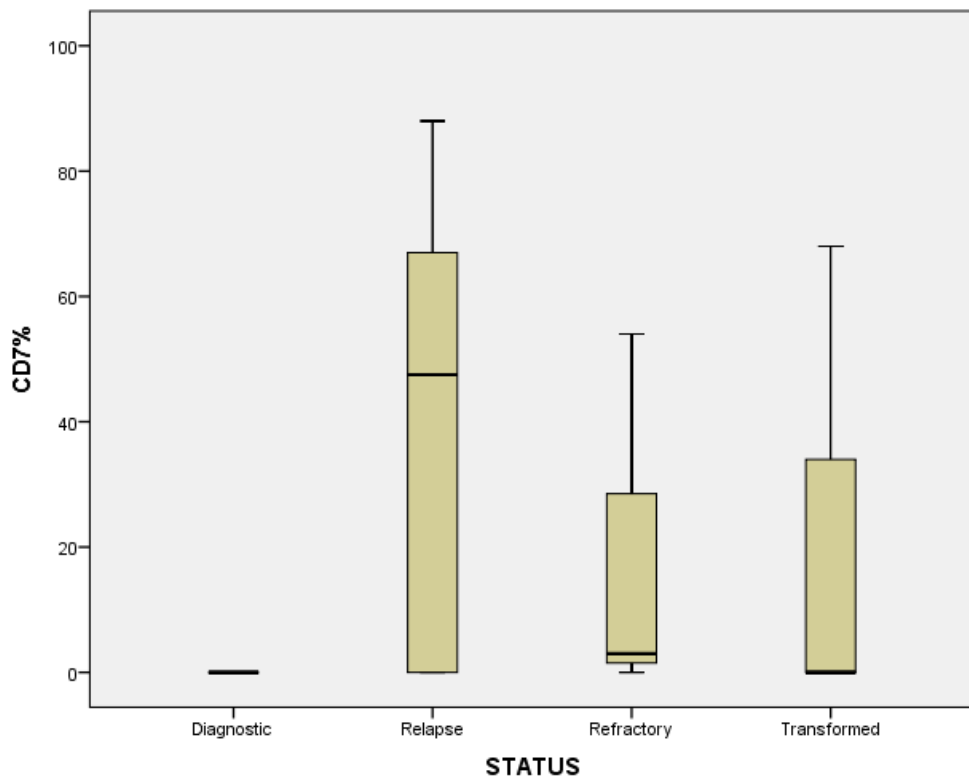


Gráfico 6. Distribuição da frequência de CD7 de acordo com o status.

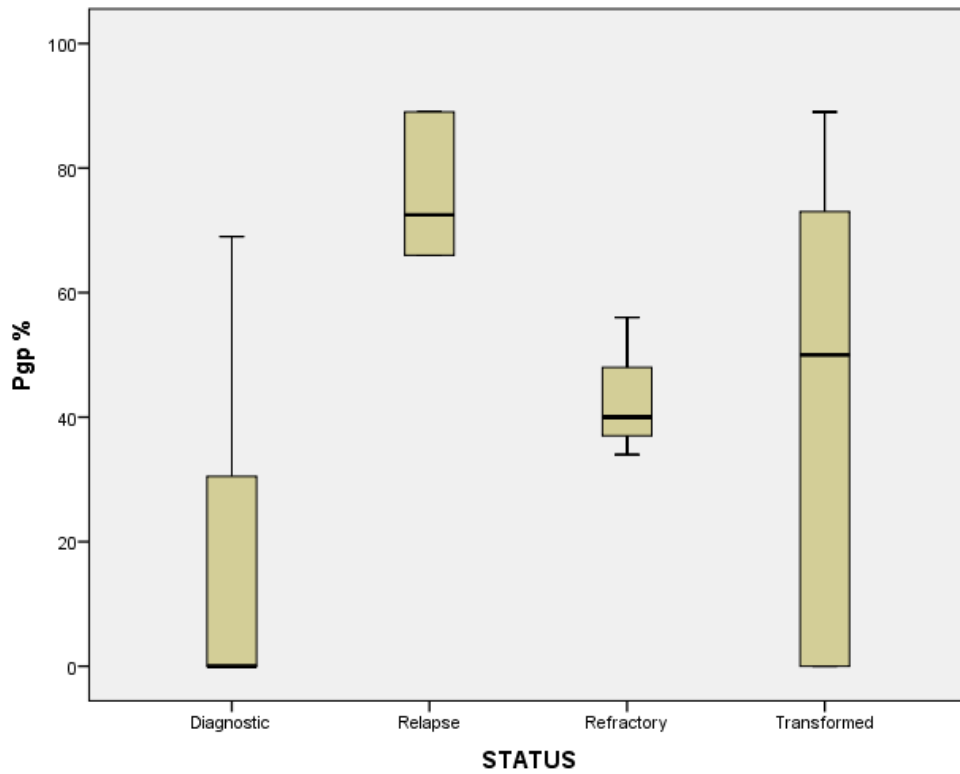


Gráfico 7. Distribuição da frequência de Pgp de acordo com o status.

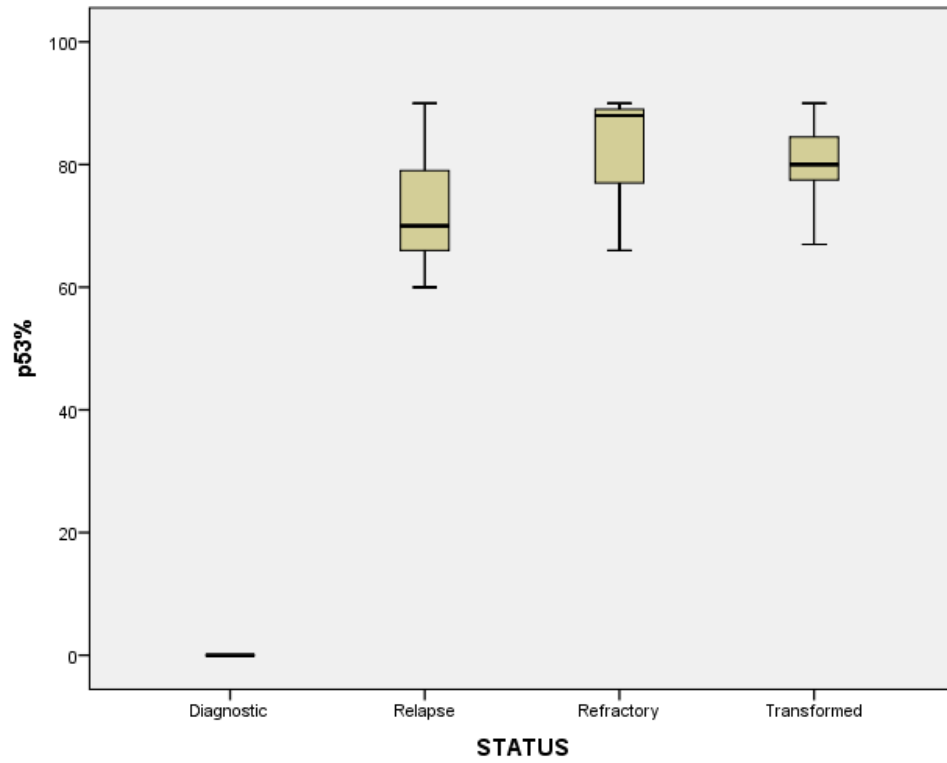


Gráfico 8. Distribuição da frequência de p53 de acordo com o status.

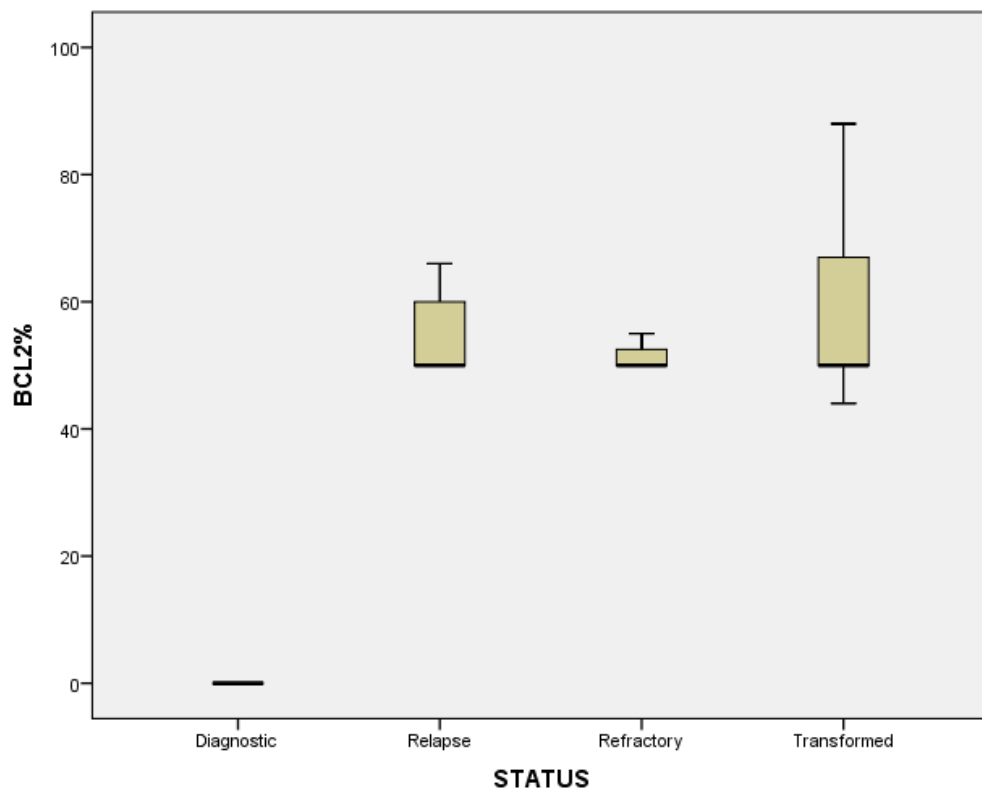


Gráfico 9. Distribuição da frequência de Bcl-2 de acordo com o status.

A análise de regressão linear dos marcadores que apresentaram significância estatística mostrou que quando eles foram correlacionados com os status da doença, verificou-se que dentre eles, o p53 e o CD7 foram os que apresentaram maior significância estatística (tabelas 13, 14 e 15). A análise de regressão mostrou que a medida que o status muda de diagnostico para transformada, aumenta a expressão de p53 e diminui a expressão de CD7 (gráficos 10, 11, 12 e 13).

Tabela 13. Regressão linear segundo o Status.

Modelo	R	R2	R 2 Ajustado	Std. Error of the Estimate
1	0,930	0,866	0,858	0,449

Teste: Regressão. R: Correlação de Pearson.

Predictors: (Constant), Pgp+/-, CD7%, p53%, BCL2+/-

Tabela 14. Variância das médias nas variáveis predictoras segundo o Status.

Modelo	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	Sig
Regressão	97,281	4	24,320	120,744	0,000
Residual	15,107	75	0,201		
Total	112,387	79			

Teste: Regressão Linear. Predictors: (Constant), Pgp+/-, CD7%, p53%, BCL2+/-.

Variável Dependente: STATUS

Tabela 15. Coeficientes dos níveis de aderências das variáveis independentes no Status.

MODELO	Coeficientes não-padronizados		Coeficientes Padronizados		Sig.	IC 95%	
	B	Std. Error	Beta	t		INF	SUP
(Constant)	1,050	,070		14,947	,000	,910	1,190
CD7%	-,005	,002	-,099	-2,162	,034	-,009	,000
p53%	,027	,010	,834	2,780	,007	,008	,047
BCL2+/-	,337	,778	,130	,432	,667	-1,214	1,887
Pgp+/-	-,043	,112	-,018	-,381	,704	-,266	,181

Teste: Regressão Linear. * Sig < 0,05 estatisticamente significativo

Variável Dependente: STATUS

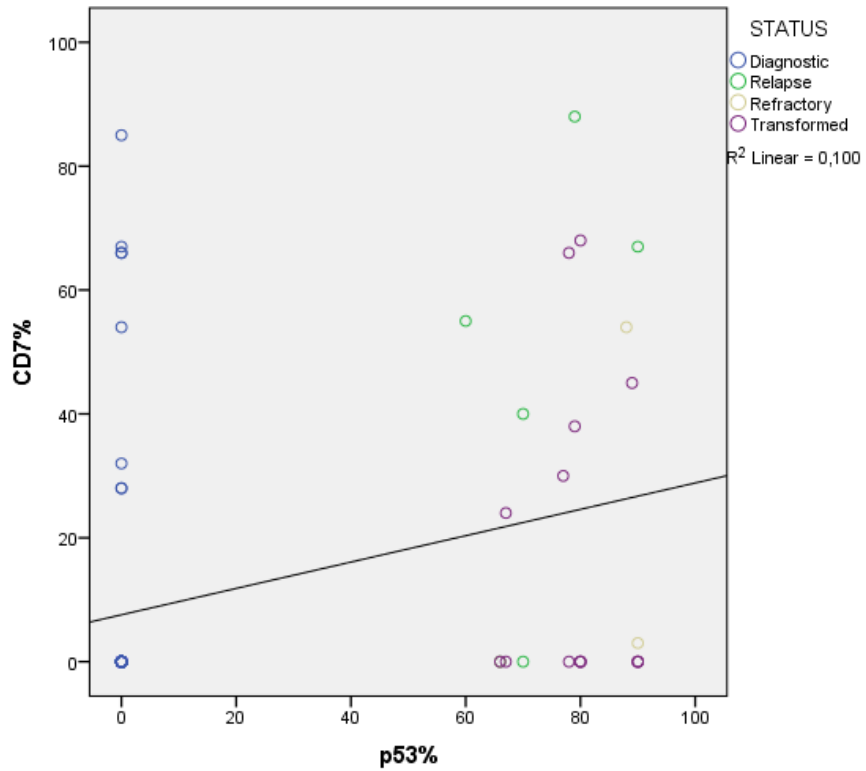


Gráfico 10. Análise da regressão linear de CD7 e p53 pelo status.

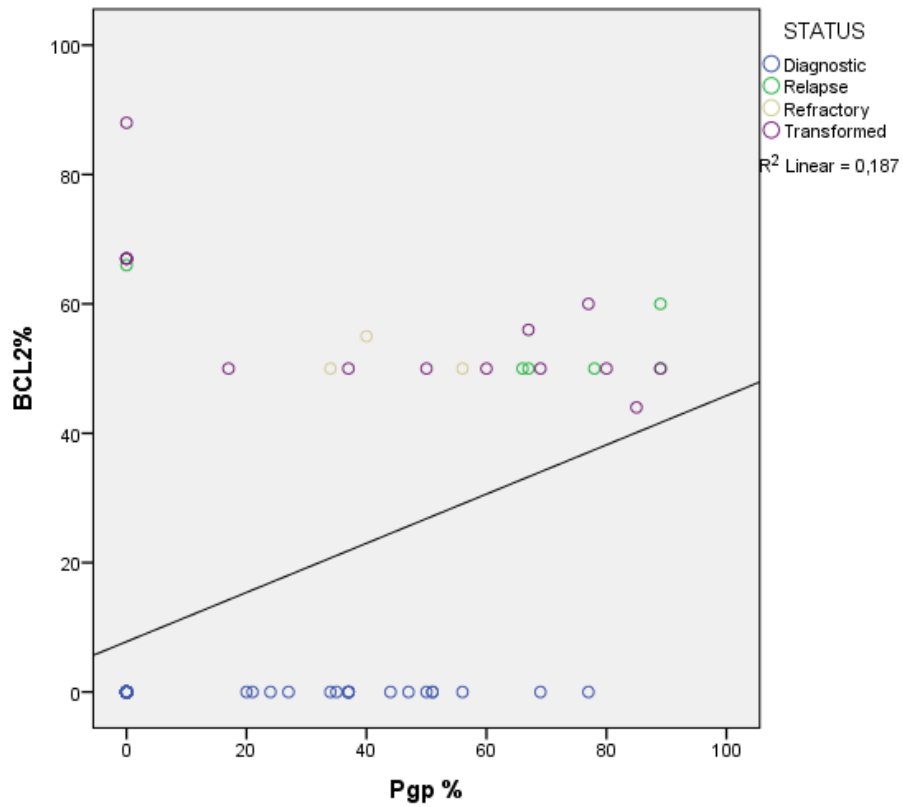


Gráfico 11. Análise da regressão linear de Bcl-2 e Pgp pelo status.

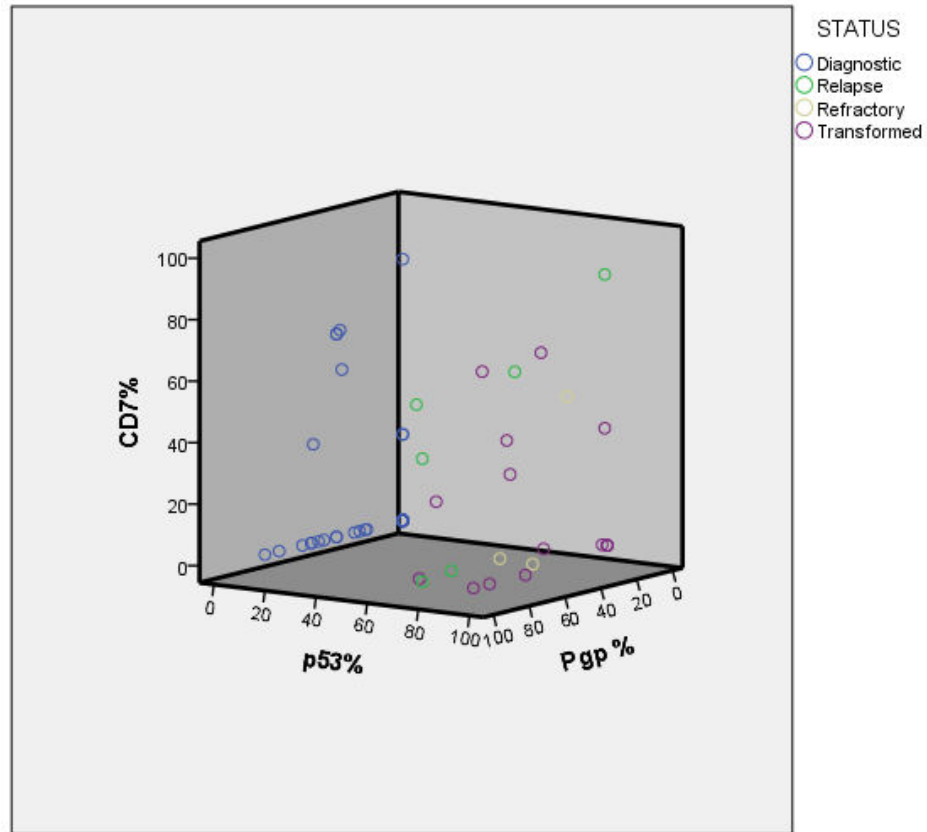


Gráfico 12. Análise da regressão linear de CD7, p53 e Pgp pelo status.

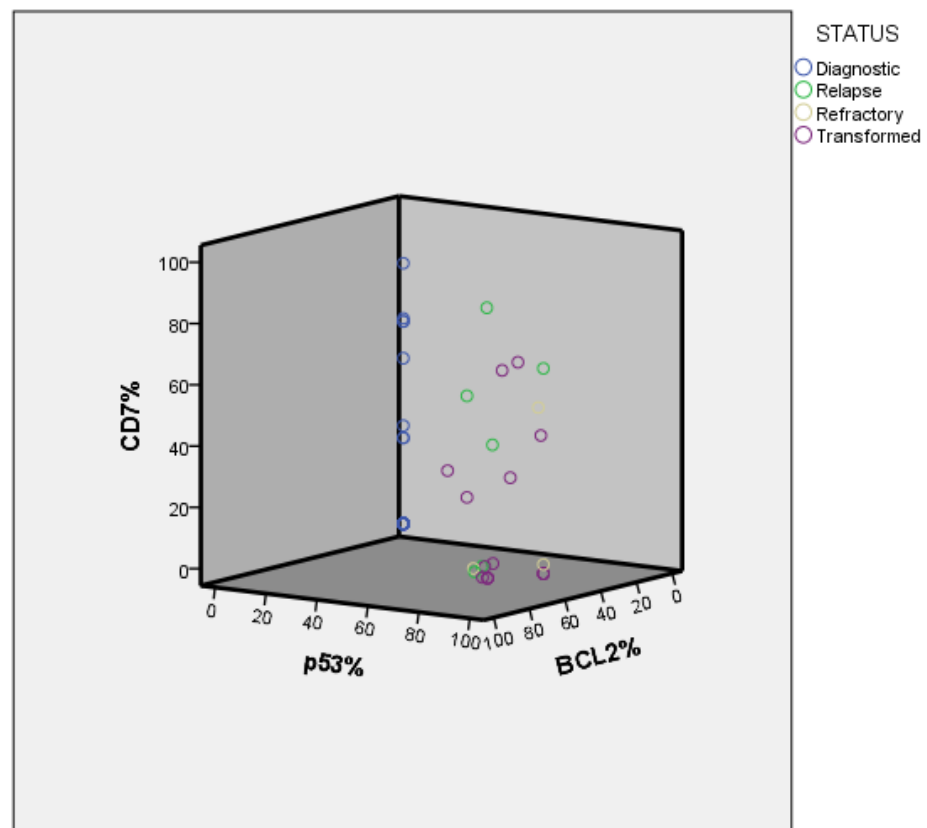


Gráfico 13. Análise da regressão linear de Bcl-2 e Pgp pelo status.

7. DISCUSSÃO

A LMA atinge crianças e adultos e possui uma alta incidência em indivíduos acima de 70 anos (SILVA et al, 2006). A SMD também ocorre em indivíduos predominantemente idosos, com idades entre 65 e 75 anos (HOFMANN, 2005). Ela é ligeiramente mais comum em indivíduos do sexo masculino, na proporção de 1,3 indivíduos masculinos para cada feminino (SILVA et al, 2006). Já na SMD, a incidência da distribuição de gênero é relativamente balanceada (HOFMANN, 2005). A análise descritiva dos dados do nosso trabalho mostrou uma frequência relativa de 60% de indivíduos masculinos para 40% de indivíduos femininos. Os pacientes do nosso estudo tinham uma idade média de 72,74 anos, com idades variando de 60 a 96 anos.

Pacientes idosos com LMA se torna um desafio para os hematologistas, visto que há certa heterogeneidade entre as características clínicas de cada paciente. Essa diversidade de apresentações também influencia no prognóstico e tratamento desses indivíduos. A idade muito avançada contribui para a susceptibilidade a reações tóxicas das drogas comumente utilizadas. O êxito no tratamento de pacientes mais velhos é menor ao comparar com adultos jovens de meia idade com LMA, mas isso não deve ser desestímulo na abordagem terapêuticas desses pacientes. Os doentes com LMA, independente da sua idade merecem as mesmas oportunidades de diagnóstico e terapêutica (OSSENKOPPELE, 2015).

Os sintomas decorrentes da LMA são, em sua maioria, inespecíficos e causados pela falha na hematopoese normal, visto que a medula óssea se encontra infiltrada por grande quantidade de células leucêmicas. Essas células podem infiltrar qualquer órgão do corpo. A esplenomegalia e/ou hepatomegalia pode estar presente em 1/3 dos pacientes. A febre pode ocorrer em cerca de 15-20%, pode vir acompanhada de perda de peso e anorexia. Os dados do nosso trabalho mostraram que a maior parte dos pacientes apresentavam esplenomegalia (91,3%), hepatomegalia (76,3%) e febre (23,8%). Esse perfil sintomatológico também foi evidenciado nos dois grupos etários, com frequência aumentada nos pacientes com idades de 60 a 79 anos. As características clínicas e biológicas são importantes fatores de prognóstico e podem agir como preditores de resposta à terapêutica. (STOCK et al, 2006).

A Leucemia Mielóide Aguda se caracteriza pela proliferação anormal de mieloblastos, ocasionando produção e maturação anormal das células sanguíneas. Assim, a infiltração medular vem frequentemente acompanhada de neutropenia, anemia e plaquetopenia. A leucocitose, quando ocorre, pode ser devido ao aumento do número de blastos no sangue periférico (SILVA, 2006). Os dados do nosso estudo mostraram que essa tendência de aumento do número global de leucócitos ocorreu em 33,7% dos indivíduos, com valores entre 10 e 50 x 10⁹/L; e em 57,6%, com valores acima de 50 x 10⁹/L. Na SMD a leucocitose raramente ocorre e o hemograma geralmente mostra uma tricitopenia, com diminuição de hemoglobina, hemácias e leucócitos (CATENACCI, 2005).

Essa falência hematológica progressiva conduz à anemia, trombocitopenia, leucopenia e, isoladamente ou em combinação, é a marca dominante da SMD. A anemia está presente quase que em 100% dos casos no momento do diagnóstico inicial; mais de 80% dos indivíduos apresentam-se com uma concentração de hemoglobina inferior a 10 g/dL. A contagem de reticulócitos normalmente é reduzida nesses pacientes (HOFMANN, 2005).

Nossos resultados também mostraram a incidência de plaquetopenia com valores abaixo de 50 x 10⁹/L em 32,5% dos pacientes, e valores entre 50 e 100 x 10⁹/L ocorrendo em 52,5%. A anemia, com valores de hemoglobina abaixo de 10 g/dL ocorreu em 86,2% dos pacientes. Todos esses dados corroboram com a literatura.

O CD7 é um antígeno primariamente expresso nas linhagens linfoides. A presença desses marcadores está relacionada com a expressão de linhagem indefinida ou imunofenótipo aberrante. Apesar da expressão de CD7 nos mieloblastos ser encontrada em menor proporção nos pacientes com leucemia mielóide aguda, a presença desse antígeno está relacionada a mal prognóstico (BASTURK, 2015). Recentemente tem sido demonstrado que mieloblastos CD7+ existem nas células mielóides progenitoras no tecido hepático fetal e sua expressão pode ser relacionado a um marcador de imaturidade. A anormalidade dos fenótipos aberrantes é reflexo de assincronias na maturação normal que pode estar relacionado com presença de doença residual mínima e alterações prognósticas (DREXLER et al, 2002; EMERECIANO et al, 2004). A expressão aumentada de CD7 foi encontrada em 20 pacientes e a correlação desses dados com a evolução dos status da doença apresentou significância estatística.

A Glicoproteína P (PgP) é uma proteína transmembrana que pertence à família de transportadores *ATP Binding Cassete* (ABC) que forma um grande grupo de proteínas que estão relacionadas com os mecanismos de efluxo de diferentes agentes quimioterápicos, favorecendo ao mecanismo de Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) (MARZOLINI, 2004). O gene MDR codifica a glicoproteína de membrana cuja principal função é proteger as células contra substâncias tóxicas e metabólitos celulares, exportando substâncias de dentro das células e das membranas para o meio externo (BODOR et al., 2005). A resistência a múltiplas drogas pode ser dividida em: resistência primária ou “de novo” – presente no diagnóstico e ligado ao processo neoplásico; e resistência secundária ou adquirida – observadas após a exposição a agentes citotóxicos (GOTTESMAN, 1993).

Do total de pacientes analisados, 36 apresentaram expressão aumentada de PgP, mostrando a correlação da expressão dessa proteína com a presença de fenótipos de resistência a múltiplas drogas.

As leucemias, na maioria dos casos, apresentam boa resposta a tratamento quimioterápico. Porém, alguns pacientes não obtêm resposta satisfatória devido a presença de células neoplásicas resistentes aos quimioterápicos, caracterizando assim a doença refratária. A presença de PgP na LMA pode variar desde a ausência de expressão até níveis mais elevados, podendo estar presente em 30 a 50% dos casos, principalmente em casos de recidivas, LMA secundária e LMA transformada (STAVROVSKAYA, 2002).

A idade avançada dos pacientes é outro fator determinante na presença de fenótipo MDR nos pacientes com LMA. Acredita-se que a exposição a uma variedade de substâncias tóxicas ao longo da vida pode estar relacionada com a expressão de níveis mais elevados de PgP em idosos e sua presença está associada a uma resposta desfavorável ao tratamento. Vários estudos foram publicados considerando a expressão aumentada de PgP como fator de mal prognóstico em LMA. A superexpressão de PgP leva a diminuição do acúmulo intracelular de drogas, causando diminuição do efeito terapêutico esperado, ocasionando uma baixa da sobrevida livre da doença ou aumento da taxa de óbitos precoces. A idade é um considerável preditor de resposta à terapia de indução. Pacientes acima de 60 anos não apresentam boa tolerância a ciclos intensos de quimioterapia, além de comumente exibirem alterações citogenéticas desfavoráveis e expressarem gene *MDR1* (PIKER et al, 2006).

As mutações no gene TP53 são consideradas as alterações genéticas mais frequente nas neoplasias hematológicas humanas, ocorrendo em cerca de 60% dos casos. Nas neoplasias hematológicas malignas, as mutações no p53 ocorre em menor frequência quando comparado com outras neoplasias, porem sempre há um predomínio de evolução clinica desfavorável. Nessas doenças, tem sido observado associações de mutação do gene TP53 com superexpressão da proteína no núcleo das células neoplásicas. Algumas alterações estruturais no cromossomo 17, como translocações, deleções e inversões, tem sido relatadas com expressão aumentada de proteínas de outros oncogenes como o Bcl-2. A frequência da mutação de p53 em pacientes com LMA fica em torno de 15%. Esse percentual aumenta nas recaídas e nos pacientes que apresentam resistência ao tratamento. Nas SMD, observa-se sua incidência em cerca de 5% dos casos, com predomínio nas formas mais graves da doença que evoluem para LMA (CAVALCANTI JR et al, 2004).

Em nosso estudo, identificamos 24 pacientes com expressão aumentada de p53. E verificou-se que havia aumento da frequência da expressão dessa proteína a medida que o status evoluía de diagnostico para transformado.

A morte celular programada pode ser desencadeada por uma variedade de estímulos extracelulares e sinais intracelulares. A maior parte dos reguladores das vias de apoptose são membros da família Bcl-2. Essas proteínas funcionam como dímeros e a regulação entre as moléculas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas irá determinar a morte celular mediada. Alterações na regulação das proteínas dessa classe tem sido demonstrada em vários tipos de câncer, incluindo as neoplasias hematológicas. Na LMA, a superexpressão de Bcl-2, associado com a positividade de CD34, tem sido relacionada a resistência ao tratamento. Estudos tem mostrado a redução da expressão de Bcl-2 em células CD34 de pacientes de SMD inicial comparado com casos mais avançados e casos normais. Esses estudos demonstram que é nas fases iniciais da SMD que ocorre alta proliferação desordenada, com algumas células em fase S do ciclo celular estando significativamente relaciona com o aumento da apoptose (PAKER et al, 2000).

O aumento da frequência de expressão de Bcl-2 também ocorreu em 24 pacientes, com tendência significativa durante a evolução do status da doença.

Algumas linhas de evidencia indicam que a morte celular programada tem papel importante a resposta a quimioterapia, sugerindo associação entre a apoptose induzida pela terapia e sua eficácia terapêutica na LMA. Estudos mostram que o aumento de Bcl-2 e diminuição de Bax pode contribuir para a leucemogênese e resistências às drogas. (CAMPOS et al, 1993; DEL POETA et al, 2003). A desregulação de Bcl-2 é comum nas neoplasias hematológicas. Na LMA é evidenciado níveis elevados de Bcl-2, Bcl-xL e Bad. A razão Bcl-2/Bax também encontra-se elevada, especialmente nos subtipos M4, M5 e M6, e nos blastos CD34 positivos. Geralmente o aumento de Bad e Bax, assim como da relação Bcl-2/Bax está relacionado com um pior prognóstico (TALLMAN, 2005; TZIFI et al, 2012).

Portanto alguns estudos estão focando no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que tenham ações sobre diversas vias de sinalização intracelular, sobretudo àquelas que estão envolvidas nos mecanismos de apoptose (GOJO, 2014).

8. CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados permitiram concluir que:

- Nosso estudo se mostrou bastante consistente com os dados da literatura. Nós observamos um notável aumento da frequência de achados relacionados a prognóstico desfavorável;

- A imunofenotipagem por citometria de fluxo tem se mostrado útil na caracterização do diagnóstico, prognóstico e classificação das Leucemias Mielóides Agudas na população idosa atendida no Hemonorte;

- O painel de anticorpos monoclonais inicialmente utilizado com grupos de diferenciação foi eficiente na identificação dos casos;

- A análise de 80 casos de pacientes idosos com Leucemia Mielóide Aguda permitiu identificar um perfil imunofenotípico composto pelos marcadores CD7, PgP, p53 e Bcl-2, os quais mostraram ter relação com o status da doença e conseqüentemente seu prognóstico;

- Estudos em uma amostragem superior de pacientes precisam ser realizados para confirmar as correlações evidenciadas nesse estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-HAMID, Gamal. Classification of Acute Leukemia. In: **Acute Leukemia - The Scientist's Perspective and Challenge**. Prof. Mariastefania Antica (Ed.), InTech, 2011.

ASTER, Jon C. Doenças de Leucócitos, Linfonodos, Baço e Timo. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Adaptação, Dano e Morte Celular. In: **Robins-Pathologic Basis of Disease**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora WB Saunders Company Edição. Cap. 14. p. 695-746, 2005.

BAHIA, D. M. M. et al. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and clinical significance. **Haematologica**, v.86, p.801-806, 2001.

BARION, L. A. et al. Associação entre HLA e leucemia em uma população brasileira de etnia mista. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 87020, p. 900, 2007.

BASTURK, A. et al. Prognostic significance of flow cytometry findings in Turkish adult acute leukemia patients. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 19, n. 18, p. 3360-3366, 2015.

BENE, M. C., et al. Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias. **Haematologica**. v.84, n.11, p.1024-1034, 1995.

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias: french-american-birtish cooperative study group. **British Journal of Hematology**, v.33, p.451-458, 1976.

_____. The French-American-British (FAB) co-operative group.

Correspondence: a variant form of hypergranular promyelocytic leukemia (M3). **British Journal of Hematology**. v.47, p.553-561, 1981.

_____. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French American British Cooperative Group. **Annals Internal Medicine**, v.103, p.620-625, 1985.

_____. The French - American - British (FAB) Cooperative Group. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukemia. **Journal of Clinical Pathology**, v.42, p.567-584, 1989.

_____. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. **Annals Internal Medicine**, v.103, p.620-629, 1990.

BODOR, M. et al., Characterization of the MDR1 gene. **AAPS Journal** v. 7, n. 1, p. E1-E5, 2005.

CAMPOS, L. et al. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. **Blood**, v. 81, n. 11, p. 3091-3096, 1993.

CAREY, J. L.; K., David F. **Flow cytometry in clinical diagnosis**. ASCP, 2007.

CATENACCI, D. V.; SCHILLER, G. J. Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review. **Blood Reviews**. v. 19, n. 6, p. 301-319, 2005.

CAVALCANTI JR, G., B.; KLUMB, C., E.; MAIA, R. p53 e as hemopatias malignas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 419-427, 2002.

CAVALCANTI JR, G. B **Relevância clínica e biológica das alterações do gene P53 nas leucemias**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

CHRISTIANSEN, D. H.; ANDERSEN, M. K.; PEDERSEN-BJERGAARD, J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 5, p. 1405-1413, 2001.

CHU, S. C.; WANG, T. F; LI, C.; C.; KAO, R. H.; LI, D. K. et al. Flow cytometric scoring system as a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes. **Leukemia Research** v. 35, n. 7, p. 868–873, 2011

COSTA, A. S. L.; ANJOS, M. E. F.; BELTRÃO, A. C.; BRITO JUNIOR, L. C.
Diagnóstico das Síndromes Mielodisplásicas. **Revista Paraense de Medicina**. v. 23,
p. 79-83, 2009.

COSTELLO, R. T. et al. Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. **Cancer research**, v. 60, n. 16, p. 4403-4411, 2000.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Adaptação, Dano e Morte Celular. In: **Robins-Pathologic Basis of Disease**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora WB Saunders Company Edição. Cap. 1. p. 3-48, 2005.

DAMLE, R.; WASIL, T.; ALLEN, S.; SCHULMAN, P.; RAI, K.R.; CHLORAZZI, N.;
Updated data on gene mutation status and CD38 expression in B-cell. **Blood**. v. 95.
p. 2456-2457. 2000.

DEL POETA, G. et al. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). **Blood**, v. 101, n. 6, p. 2125-2131, 2003.

DESCHLER, B.; LÜBBERT, M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. **Cancer**. v.107, n.9, p. 2099-2107, 2006.

DESCHLER, B.; LÜBBERT, M, M. Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology. In: (Ed.) **Acute Leukemias**, Springer. Cap 3. p. 47-56 2008.

DREXLER, H. G.; QUENTMEIER, H.; FLECKENSTEIN, D. S.; UPHOFF, C. C.
Detection of p53 gene mutation by single strand conformational polymorphism (SSCP) in human acute myeloid leukemia-derived cell lines. **Leuk Research**. v. 26,
p. 207-214, 2002.

EMERECIANO, M. et al. The frequency of aberrant immunophenotypes in acute leukemias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.50, n.3, p.183-189, 2004.

FENAUX, P. The clinical significance of the *p53* suppressor gene in haematological malignancies. **Br J Haematol**, v. 98, p. 502-511, 1997.

GE, F.; LI, B; GAO, X; et al. Immuno-phenotypes and prognosis of acute leukemia in elderly patients. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**. v. 7, n. 10, p. 3714-3718, 2014

GHODKE, Y. et al. HLA and disease. **European journal of epidemiology**, v. 20, n. 6, p. 475-488, 2005.

GIVAN, A. L. **Flow cytometry: first principles**. John Wiley & Sons, 2013.

GOJO, I.; KARP, J. E. New strategies in acute myelogenous leukemia: leukemogenesis and personalized medicine. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 24, p. 6233-6241, 2014.

GOLDMAN, L.; BEMMET, J. C.; CECIL, J. **Tratado de medicina interna**. 22. Ed. São Paulo. Guanabara Koogan. 2005.

GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, Ira. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. **Annual review of biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 385-427, 1993.

GREAVES, M. F. Stem cell origins of leukaemia and curability. **British Journal of Cancer**, n.67, p. 413-423, 1993.

GRIMWADE, D.; HILLS, R. K. Independent prognostic factors for AML outcome. **ASH Education Program Book**, v. 2009, n. 1, p. 385-395, 2009.

GUZMAN-ROJAS, L. et al. Cooperative effects of aminopeptidase N (CD13) expressed by nonmalignant and cancer cells within the tumor microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 5, p. 1637-1642, 2012.

HOFMANN, W.K. & KOEFFLER, H.P. Myelodysplastic syndrome. **Annual Review of Medicine**, v. 56, p. 1–16, 2005.

IMAMURA, J.; MIYOSHI, I.; KOEFFLER, P. p53 in hematologic malignancies. **Blood**, v. 84, n. 8, p. 2412-2421, 1994.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da incidência de câncer para 2016 no Brasil e nas cinco regiões. **Instituto nacional de câncer-INCA**. Disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso em: 12 abr. 2016.

JULIUSSON, G. et al. Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. **Blood**, v. 119, n. 17, p. 3890-3899, 2012.

KALEEM, Z; Crawford, E.; PATHAN, M. H.; JASPER, L; COVINSKY, M. A.; JOHNSON, L. R; WHITE, G; Flow Cytometric Analysis of Acute Leukemias. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Vol. 127, No. 1, pp. 42-48. 2003.

KANDA, Y. et al. The clinical significance of CD34 expression in response to therapy of patients with acute myeloid leukemia. **Cancer**, v. 88, n. 11, p. 2529-2533, 2000.

KEESHAN, K. et al. High Bcr-Abl expression prevents the translocation of Bax and Bad to the mitochondrion. **Leukemia**, v. 16, n. 9, p. 1725-1734, 2002.

KLCO, J. et al. Functional heterogeneity of genetically defined subclones in acute myeloid leukemia. **Cancer cell**, v. 25, n. 3, p. 379-392, 2014.

KRESO, A.; DICK, J. E. Evolution of the cancer stem cell model. **Cell stem cell**, v. 14, n. 3, p. 275-291, 2014.

LASZLO, G. S.; ESTEY, E. H.; WALTER, R. B. The past and future of CD33 as therapeutic target in acute myeloid leukemia. **Blood reviews**, v. 28, n. 4, p. 143-153, 2014.

- LORAND-METZE, I. Contribuição da citometria de fluxo para o diagnóstico e prognóstico das síndromes mielodisplásicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. Setembro, vol.28, no.3, p.178-181, 2006.
- LUGER, S. M. Treating the elderly patient with acute myelogenous leukemia. **Hematology American Society of Hematology Educational Program**; v. 2010, n. 1, p. 62-69, 2010.
- LUSIS, M. K. P. Classificação Fab das Leucemias Mieloides Agudas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.22 (suplemento 2). p.175-178, 2000.
- MAIOLI M. C. P., SOUZA M. H. F. Síndromes mielodisplásicas (SMD). **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**. v. 11, n. 1, p. 24-36, 2012.
- MARTINS, S. L. R.; FALCAO, A. R. P. A importância da imunofenotipagem na leucemia mielóide aguda. **Revista da Associação Médica Brasileira**. São Paulo, v. 46, p. 104-4230, 2000.
- MARZOLINI, C.; PAUS, E.; BUCLIN, T.; KIM, R.B. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. **Clin Pharmacol Ther**. v. 75, n. 1, p. 13-33, 2004.
- O'DONNELL, M. et al. Acute myeloid leukemia. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 10, n. 8, p. 984-1021, 2012.
- OSSENKOPPELE, G.; LÖWENBERG, B. How I treat the older patient with acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 125, n. 5, p. 767-774, 2015.
- PARKER, J. E. et al. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. **Blood**, v. 96, n. 12, p. 3932-3938, 2000.
- PIKER, R., WALLNER, J.; GEISSLER, K. MDR1 gene expression and treatment outcome in myeloid leukemia. **J Natl Cancer Inst**. v. 83, p. 708-12, 1991.

PIRRUCCELLO, S. J.; YOUNG, K. H; AOUN, P. Myeloblast phenotypic changes in myelodysplasia. **Am J Clin Pathol**. Junho, vol. 125, n. 6, p. 884-894, 2006.

POLLYEA, D. A.; KOHRT, H. E.; MEDEIROS, B. C. Acute myeloid leukaemia in the elderly: a review. **British Journal of Hematology**. v. 152, n. 5, p. 524-542, 2011.

ROTTER, V.; PROKOCIMER, M. p53 and human malignancies. **Adv Cancer Res**, v. 53, p. 257-272, 1991.

SILVA G. C. et al. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. **Jornal Brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, v.42, 2006.

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

STAVROVSKAYA, A. A. Cellular mechanism of multidrug resistance of tumor cell. **Biochemistry**. v. 65, n. 1, p. 95-106, 2002.

STOCK, W.; THIRMAN, M. J. Pathobiology of acute myelogenous leukemia. In: SILVA G. C. et al. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. **Jornal Brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, v.42, 2006.

TALLMAN, M. S. New strategies for the treatment of acute myeloid leukemia including antibodies and other novel agents. **ASH Education Program Book**, v. 2005, n. 1, p. 143-150, 2005.

TEFFERI, A.; VARDIMAN, J. W. Myelodysplastic syndromes. **New England Journal of Medicine**. v. 361, n. 19, p. 1872-1885, 2009.

TOSHIYUKI, M.; REED, J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 293-299, 1995.

TZIFI, F. et al. The role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. **Advances in hematology**, v. 2012, 2011.

VASCONCELOS, F. C. et al. Detecção da proteína p53 em células leucêmicas por citometria de fluxo e Western blot. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 50, n. 3, p. 191-202, 2004.

VASCONCELOS, R. C. **Avaliação dos marcadores celulares por citometria de fluxo nos portadores de leucemia mielóide aguda atendidos no Hemocentro do Rio Grande do Norte-Hemonorte**. 2010. 121 f. Dissertação (Mestrado em Bioanálises e Medicamentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

VECINA, A., LUCENA, R., PINHEIRO JUNIOR, W., CLIQUET, M. Síndromes mielodisplásicas: aspectos clínico-laboratoriais e classificação prognóstica. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**. v. 15, n. 2, p. 1-5, 2013.

WANG, X. W.; HARRIS, C. C. p53 tumor-suppressor gene: Clues to molecular carcinogenesis. **J Cell Physiol**, v. 173, p. 247-255, 1997.

WEIR, E. G. et al. Leukemia: Acute bilineal leukemia: a rare disease with poor outcome. **Official Journal of the Leukemia Society of America**, Reino Unido, v. 21, n. 11, p. 2264-70, 2007.

WOŹNIAK, J.; KOPEĆ-SZLEŹAK, J;. C-Kit receptor (CD117) expression on myeloblasts and white blood cell counts in acute myeloid leukemia. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 58, n. 1, p. 9-16, 2004.

YANADA M, NAOE T. Acute myeloid leukemia in older adults. **International Journal of Hematology**. 96:186-193, 2012.

ANEXO A



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ONOFRE LOPES
(CEP-HUOL)

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes (CEP-HUOL), devidamente reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/MS), analisou o projeto:

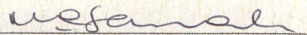
Título: Avaliação de marcadores celulares e moleculares nas leucemias agudas: uma abordagem da cintometria de fluxo.

Protocolo – 359/09

Pesquisador Responsável: Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior.

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, incluindo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com as diretrizes da Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Em reunião plenária realizada no cep/HUOL do dia 30 de outubro de 2009. Toda e qualquer alteração no projeto/protocolo de pesquisa, assim como eventos adversos que venham a ocorrer deverão ser comunicados oficialmente e imediatamente ao CEP-HUOL. O relatório final do projeto ou a cópia de sua publicação deverá ser encaminhado ao CEP/HUOL após o término do estudo, conforme cronograma, com a respectiva cópia da folha de rosto.

Natal, 06 de Novembro de 2009.


Maria Sanali M. de Oliveira Paiva
Coordenadora do Comitê de Ética
CEP-HUOL

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes (CEP-HUOL) - Av. Nilo Peçanha 620, Petrópolis, Natal-RN, 59.012-300. Fone: 84-32023719 Ramal 242. email: cephuol@reitoria.ufrn.br

ANEXO B

Artigo a ser publicado na revista Journal of Clinical Laboratory Analysis

IMUNOPHENOTYPIC AND HEMATOLOGICAL CHARACTERIZATION STUDY OF ELDERLY PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN RIO GRANDE DO NORTE – BRAZIL

Leonardo de Lima Fernandes,¹ Andrea Luciana Araújo da Cunha Fernandes,² Aldair de Souza Paiva,² James Farley Rafael Maciel,² Irian Guedes Farkatt,² Juliana Mendonça Freire,² Ciro Alexandre Merces Gonçalves,³ Geraldo Barroso Cavalcanti Junior*⁴

¹ Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brazil

² Laboratório de Hematologia, Hemocentro Dalton Cunha (HEMONORTE), Natal-RN, Brazil

³ Departamento de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brazil

⁴ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brazil

Acute myeloid leukemia (AML) comprises a heterogeneous group of clonal myeloid precursor cell disorders with distinct clinical, morphologic, immunophenotypic, cytogenetic, and molecular features. Age is one of the most important predictors of outcomes in adult AML, and 20-30% of patients are older than 60 years of age at the time of diagnosis. To evaluate the outcomes of acute myeloid leukemia patients who were older than 60 years of age at the time of diagnosis and determination of prognostic factors in these patients. We retrospectively compared the results of 80 elderly with acute myeloid leukemia patients (48 male and 32 female). Fifty-six patients had newly diagnosed AML, 6 with recurrent disease, myelodysplastic syndrome 15 (MDS) transformed and 3 AML refractory. Sixty patients had ages between 60 - 80 years old and 20 above 80 years old. Regarding clinical aspects, there was a predominance of splenomegaly, followed by hepatomegaly. Concerning the laboratory data, it was observed hyperleucocytosis, thrombocytopenia and anemia in most cases and FAB classification M1, M2 and M4 in most cases. Immunophenotyping revealed the presence of CD7, PgP, p53 and Bcl-2 in correlation with bad prognostic according the disease status. Our results demonstrate the importance of clinico-laboratorial investigation of these group of patients aiming more information about these cancers.

Key words: acute myeloid leukemia; elderly; immunophenotyping.

*Correspondence to: Geraldo Barroso Cavalcanti Junior, Laboratório de Imunologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, 1st floor, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Avenida Gustavo Cordeiro de Farias S/N, CEP: 59010-180, Natal-RN, Brazil. E-mail: gbcjunior@hotmail.com

INTRODUCTION

Acute myeloid leukemia (AML) comprises a heterogeneous group of clonal myeloid precursor cell disorders with distinct clinical, morphologic, immunophenotypic, cytogenetic, and molecular features. Age is one of the most important predictors of outcomes in adult AML, and 20-30% of patients are older than 60 years of age at the time of diagnosis (1).

A variety of clinical and biologic parameters has been examined for potential value in predicting treatment response and prognostic factor; among these is flow cytometry immunophenotype. Leukemic myeloblasts express a variety of leukocyte differentiation antigens, which reflect commitment to the myeloid lineage as well as level of maturation (2).

Unlike that observed in acute lymphoblastic leukemia (ALL), where immunophenotyping correlates with prognosis, the value of immunophenotyping in the AML as a prognostic value is still controversial. Initial reports suggested a relationship between patterns of myeloid lineage differentiation antigens and patient prognosis, but subsequent studies have produced conflicting and inconsistent results (3-5).

The only markers with significant prognostic associations in more than one study have been CD13 (6-8), CD14, (6, 9, 10, 11) and CD15 (7, 12) associated with the stem cell marker (CD34) also recently be associated with poor clinical outcome in AML. The expression of the CD34 antigen reveals a shorter survival than where these markers are absent (13). In addition, leukemic cells in AML can also express lymphoid-lineage antigens, a phenomenon variously described as lineage infidelity, some cases expressed lymphoid antigens, either T cell :CD2, CD3, CD7 (14) or B cell: CD10, CD19 and CD22 (15).

Recently, several authors have demonstrated the multidrug resistance protein (MDR1) with association of CD34 expression, explaining in part a worse response in positive AML patients for the CD34 and CD7 antigens (16-17). TP53 gene mutation and p53 protein inactivation are the most common alterations observed in human cancers. This protein plays an important role in apoptosis e DNA repair. In leukemia, these alterations are not very frequent, but they are present in more severe or refractory cases (18). Bcl-2 family members are the major regulators proteins of the apoptotic pathways. Deregulation in this class of proteins has been demonstrated in a variety of human cancers, including hematological malignancies (19).

Additionally, other factors prognostics can be related to AML patients the time of diagnosis. Among the favorable prognostic factors highlight white blood cell count less than 100.000/mm³, platelet count above than 100.000/mm³, hemoglobin levels more than 10.0g/dL, low scores of leukemic blasts cells in peripheral blood (PB), M3 and M4 FAB subtypes classification and inversion of chromosome 16, t (8; 21); t (15; 17) (20).

The aim of our study was to investigate the biological characteristics of AML in elderly, using samples from pre-treatment of elderly patients with AML to determine which biological characteristics may be useful in predicting established prognostic factors in literature.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Eighty elderly patients with newly diagnosed AML were included in this study and there bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) was collated from 2006 to 2012 in the Department of Hematology of Dalton Cunha Blood Center (HEMONORTE), Natal City located in Northeastern Brazil. Of the case, 48 (60%) were male and 32 (40%) female with median age of 77 years ranging from 60 to 95 years old.

Diagnosis of AML was initially based on clinical presentation, PB and BM smears routinely stained by May-Grunewald-Giemsa (MGG) and evaluated according to the revised French-American-British (FAB) criteria into M0 to M7 (21) and conventional immunophenotyping by flow cytometry (FC) according to the European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (EGIL), Euro Flow Group strategies (20). At the same time, they were also collected clinical and demographic data of patients.

Methods

Hematological analysis from peripheral blood and bone marrow cytomorphology

Hematological analysis was performed with 10 ml of peripheral venous blood collected in blood collection tubes containing EDTA. WBC count, hemoglobin dosage, and platelet count were scored in the hematological analyzer (Cell-Dyn 3.000, Unipath Corp., Mountain View, CA). Cytomorphological analysis of stained blood films in which 100 leukocytes were counted in optical microscope in 20, 40 and 100x increase lens (Zeiss Microscope, Götting, Germany) and the result scored in percentage and cytomorphological alterations were also recorded.

Bone marrow aspirate smears were stained with MGG for morphological analysis and FAB classification. Additional cytochemical staining with Sudan Black (SB) and myeloperoxidase (MPO) were performed with the purpose of excluding cases of ALL (22). Both, cytomorphological analysis and cytochemistry from BM smear were performed on optical microscope in 100x increase lens (Zeiss Microscope, Götting, Germany).

To hematological analysis of peripheral blood (PB), ten milliliters (10 mL) of PB was collected into vacutainer tubes containing EDTA and mixed immediately. The white blood cells count (WBC); platelet count and hemoglobin dosage was accomplished in the hematological analyzer (Cell-Dyn 3.000) and cytomorphologic analysis was in blood films stained by MGG. There were 100 leukocytes counted and the result scored in percentage. Cytomorphologic alterations were properly written down in the record of results.

Aspirate smears of BM were stained with MGG for morphological analysis and FAB classification. Additional cytochemical staining of Sudan Black (SB) was performed with the aim of excluding cases of ALL (22).

Flow cytometry analysis of immunological profile

Leukemic cell immunostaining

The immunophenotyping was performed on BM or PB samples collected in EDTA using panels of monoclonal antibodies (MoAb) based on the European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (EGIL) and Euro Flow Group recommendation (20, 23).

Immunophenotypic characterization consisted of two consecutive steps. According to the results obtained at the initial screening, the second level of investigation was assessed (table 1). The second panel was designed to identify stage of differentiation, prognosis features or aberrant phenotypes (17). The reactivity with fluorescent conjugated MoAbs directed against lymphoid and myeloid associated antigens was evaluated on the surface, cytoplasm and nucleus of leukemic cells.

For surface antigens, 50 μ l of total PB and/or BM cells previously homogenized were incubated with 10 μ l of MoAb for 30 min at room temperature in the dark. Furthermore, the cell suspension was increased to 1 mL of Becton Dickinson's FACS lysis solution (Becton Dickinson's FACS Lysing Solution, San Jose, CA, USA), previously prepared in distilled water (1:10; v:v), and then incubated for 10 min at room temperature in the dark. Then, the cell suspension was centrifuged for 5 min at 600 \times g, the supernatant fluid was discarded and the cell pellet was resuspended in cold PBS (pH 7.2) and centrifuged again. The last step was repeated. Finally, the cell pellet was resuspended in 1 mL of 0.5% formaldehyde in PBS, and cell suspension was kept in the dark at 4°C until flow cytometry analysis (18).

In the intracytoplasmic cell markers staining assay (TdT, CD3, CD13, CD22, CD79a, *m μ* chain, and MPO), cells samples were first incubated for 10 min at room temperature with Becton Dickinson's FACS Lysing Solution. Then, cell suspensions were centrifuged for 5 min at 600 \times g. The supernatant was discarded and the cell pellet was resuspended in cold PBS, and washed twice by centrifugation for 5 min at 600 \times g. The cell pellet was then resuspended in 1 mL of cold PBS containing 1% formaldehyde, and kept in the dark at 4°C until flow cytometry analysis. For each test, isotype-matched antibodies was used as negative control (IgG1_{FITC}\IgG1_{PE}\IgG1_{PerCP}) (18).

Flow Cytometry analysis

Minimum 20.000 events were acquired with Fluorescence Activated Cell Analyzer (FACScan, San Jose, CA, USA) with Cell Quest software (Cell Quest TM Software, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

The samples were analyzed around the gated in population of blastic cells, taking into account the parameters Forward Scatter (FSC) in linear scale that evaluates the cellular size, Side Scatter (SSC) also in linear scale, which evaluates the cellular complexity and cell marker expression analysis by fluorescence in FL1, FL2, and FL3 channels in logarithmical scale that detects green, orange, and red fluorescence respectively, which represents the antigen-antibody reaction conjugated to Isothiocyanate Fluorescein (FICT), Phycoerythrin (PE), and Peridin Chlorophyll Protein (PerCP) respectively. A positive reaction was considered if at least 20% of the leukemic cells revealed higher fluorescence intensity than cells stained with the isotype Ig control antibody (18). Histograms and dot plot analysis was generated to determine the percentage of positive cells.

RESULTS

Clinical, pathologic and demographic findings

The table 2 summarizes demographic and clinical data and disease status of all patients investigated, distributed in two groups according to age: 60 to 79 years old (75 patients) and above 79 years old (25 patients). The male-to-female odds ratio was 5,4.

In relation to clinical information at the time of examination, splenomegaly and hepatomegaly were the most frequently observed, occurring respectively in 73 and 61 cases. Others clinical findings were also observed at lower frequency such as hemorrhage, tumor infiltration, lymphadenopathy, skin infiltration and fever.

FAB classification through cytomorphological analysis of PB and BM stained films confirmed by FC immunophenotyping showed 3 cases of AML-M0, 29 AML-M1, 14 AML-M2, 19 AML-M4, 04 AML-M5a, 07 AML-M5b, 03 AML-M6 and one AML-M7, not being observed no cases of AML-M3.

Hematological data and status disease

To evaluate the prognosis, the patients were classified by status disease in diagnostic, refractory, relapse and transformed. The majority of patients have their status disease as newly diagnosed or *de novo* AML (n= 56), followed by AML secondary to myelodysplastic syndrome (MDS/AML) (n= 15), relapsed AML (n= 06) disease refractory AML (n= 03).

Date of blood findings such us WBC, platelet count (PC) and hemoglobin levels are shown in Table 3. WBC ranged from less than $2 \times 10^9/L$ to more than $50 \times 10^9/L$. Values $\leq 02 \times 10^9/L$ were observed in 4 cases, from $>02 \times 10^9/L$ to $05 \times 10^9/L$ in 02 cases, $>05 \times 10^9/L$ to $10 \times 10^9/L$ in one case, $> 10 \times 10^9/L$ to $50 \times 10^9/L$ in 27 cases and $>50 \times 10^9/L$ in 46 patients. PC below the normal range was found in most cases and normal count ($\geq 150 \times 10^9/L$) was found in only 05 cases. Levels of HB <10.0 g/dL and ≥ 10.0 g/dL were detected in 69 and 11 cases, respectively.

Immunological markers and status disease

Cell markers related prognostic factors also are listed in table 4, such us CD34 (n=54), HLADR (n=60), CD38 (n=51), CD117 (n= 54), CD7 (n=20), Pgp (n=36), p53 (n=24) and Bcl-2 (n=24). The last four markers showed statistical significance (table 4). Regression liner analysis between the most significant markers showed p53 and CD7 correlated with status disease (tables 5 and 6).

DISCUSSION

The need for the use of biological markers in the evaluation of the clinical behavior of the LMA is evident if we consider that the changes in those diseases, in general, are nothing more than the result of numerous cellular events that flock in the genetic and molecular level. Therefore, the detection of these changes can be considered useful at the time of diagnosis and monitoring and evolution of the disease. In recent years, we were conducted an increasing number of studies related to the genotype and phenotype of affected cells, particularly of proteins related to the mechanisms control of apoptosis, cell cycle and resistance to treatment (24-27).

In this context, the identification of biologic and clinical features associated with a poor prognosis is an essential first step for developing a rational approach to overcome the poor therapeutic outcome of AML in elderly patients. In this study, we analyzed the clinical, hematological and immunophenotyping characteristics of older patients with AML.

Our studies indicate results consistent with the literature. We observed the notably high frequency of findings related with increasing status and worsening prognostic: **i)** hematologic features traditionally associated with an unfavorable outcome such as high WBC count in peripheral blood (57.6%), platelet count \leq 100.000 / mm³ in peripheral blood (85%) and hemoglobin levels below 10.0g/dL (86.2 %) (table 3) and **ii)** immunophenotyping features traditionally associated with an unfavorable prognostic such as blastic cells CD7 (n=20), p53 (n=24), bcl-2 (n=24) and Pgp (n=36) (table 4).

The clinical relevance of lineage infidelity, or lymphoid antigen expression, in AML has been highly controversial. CD7 expressed on myeloblasts is found in a minor proportion of the AML patients. It has recently been demonstrated that a putative normal counterpart of the CD7+ myeloblast phenotype exists among early hemopoietic cells in fetal liver tissue, and thus CD7 expression may be a marker of immaturity. A number of studies have examined the prognostic importance of patients with CD7+ AML (28). In present study, the expression of CD7 was present in 20 cases.

The presence MDR phenotype currently is the main limiting factor to success in the treatment of cancer and is particularly observed in hematological malignancies. (29, 30, 31, 32, 3, 16, 33, 34, 35, 36). Among the various MDR mechanisms known, it stands out those mediated by drug transport proteins such as Pgp, used in this study. In acute leukemia, particularly AML, several studies have shown that the expression of Pgp is inversely correlated with response to treatment and overall survival are therefore a marker associated with a poor prognosis (31, 32, 36).

The expression of genes responsible for drug resistance occurs with greater frequency in this age group. Literature data point to the presence of P-glycoprotein molecule in 71% of blasts from AML patients aged over 60 years and is associated with multidrug resistance. Explaining into smaller complete remission rates (CR) and higher rates of chemotherapy-resistant disease such as refractory disease and disease recurrence.

Mutations in TP53 gene are considered the most common genetic alterations in human hematological malignancies, occurring in about 60% of cases. In these cancers, mutations in p53 occurs less frequently when compared to other tumors, but always there is a predominance of unfavorable clinical evolution. In these diseases, it has been observed mutation associations TP53 with protein overexpression in the nucleus of cancer cells. Some structural alterations on chromosome 17, such as translocations, deletions and inversions, has been reported with increased protein expression of other oncogenes such as Bcl-2. The frequency of p53 mutations in AML patients is around 15%. This percentage increases in relapse and in patients who are resistant to treatment. In MDS, there is its incidence in about 5% of cases, with a predominance in the most severe forms of the disease progressing to AML (37).

Some lines of evidence indicate that cell death plays an important role in response to chemotherapy, suggesting an association between apoptosis induced by a therapy and therapeutic efficacy in AML. Studies shows that the increase of Bcl-2 and Bax decreased can contribute to leukemogenesis and resistance to drugs. [38, 39]. The Bcl-2 dysregulation is common in hematological malignancies. In AML is finded elevated levels of Bcl-2, Bcl-xL and bad. Bcl-2 / Bax ratio is also high, especially in M4 subtypes, M5 and M6, and CD34 positive blasts. Generally, the increase of Bax and Bad, and the Bcl-2 / Bax ratio associated with a worse prognosis (40-41). Some studies are focusing on developing new therapeutic strategies that have actions in several intracellular signaling pathways, especially those that are involved in apoptosis mechanisms (42).

In conclusion, we identify the clinical and biological characteristics of elderly patients diagnosed with AML. The recognition of these characteristics of this disease takes the truck to determine prognostic factors tracing path to development of new therapeutic modalities aiming at avoiding these risk factors.

REFERENCES

1. Silveira NA, Arraes SMAA. A imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: uma revisão. *Arquivos do Mudi* 2008; 12(1):5-14.
2. Martins SLR, Falcao ARP. A importância da imunofenotipagem na leucemia mielóide aguda. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2000; 46:104-4230.
3. Zöchbauer S, Gsur A, Brunner R, Kyrle P, Lech K. P-glycoprotein expression as unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1994; 8:975-977.
4. Kuss BJ, Deeley RG, Cole SPC. et al. Deletion of gene for multidrug resistance in acute myeloid leukemia with inversion in chromosome 16. Prognostic implications. *Lancet* 1996; 343:1531-1534.
5. Van Den Helvel-Eibrink MM, Sonneveld P, Pieters R. The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) protein in leukemia. *Int J ClinPharmacolTher* 2000; 38(3):94-110.
6. Griffin JD, Davis R, Nelson DA, Davey FR, Mayer RJ, Schiffer C. Use of surface marker analysis to predict outcome of adult acute myeloblastic leukemia. *Blood* 1986; 68:1232-41.
7. Schwarzingler I, Valent P, Koller U, Marosi C, Schneider B, Haas O. Prognostic significance of surface marker expression on blasts of patients with de novo acute myeloblastic leukemia. *J ClinOncol* 1990; 8:423-30.
8. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999; 38:139-52.
9. San Miguel JF, Ojeda E, Gonzalez M, Orfao A, Canizo MC, Sanchez J. Prognostic value of immunological markers in acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 1989; 3:108-11.

10. Tucker J, Dorey E, Gregory WM, Simpson AP, Amess JA, Lister TA. Immunophenotype of blast cells in acute myeloid leukemia may be a useful predictive factor for outcome. *HematolOncol* 1990; 8:47–58.
11. Solary E, Casasnovas RO, Campos L, Bene MC, Faure G, Maingon P. Surface markers in adult acute myeloblastic leukemia: Correlation of CD19+, CD34+ and CD14+/DR– phenotypes with shorter survival. *Group ed'Etude Immunologique des Leucemies (GEIL). Leukemia* 1992; 6:393–9.
12. Campos L, Guyotat D, Archimbaud E, Devaux Y, Treille D, Larese A. Surface marker expression in adult acute myeloid leukaemia: correlations with initial characteristics, morphology and response to therapy. *Br J Haematol* 1989; 72:161–6.
13. Yamamoto M. Imunofenotipagem em leucemias mielóides agudas. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2000; 22(2):169-174.
14. Cross AH, Goorha RM, Nuss R, Behm FG, Murphy SB, Kalwinsky DK. Acute myeloid leukemia with T-lymphoid features: a distinct biologic and clinical entity. *Blood* 1988; 72:579–87.
15. Emerenciano M. et al. The frequency of aberrant immunophenotypes in acute leukemias. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2004; 50(3):183-189.
16. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J. et al. Acute Myeloid Leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics .distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy: A Southwest Oncology Group Study. *Blood* 1997; 89:3323 – 3329.
17. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997; 90(8):2863-2892.

18. Cavalcanti JR, GBC, Klumb CE, Maia R. p53 e as hemopatias malignas. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2002; 48(3):419-427.
19. Parker JE. et al. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood* 2000; 96(12):3932-3938.
20. Bene MC et al. Impact of imunophenotyping on management of acute leukemias. *Haematologica* 1995; 84(11):1024-1034.
21. Bennett JM et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French American British Cooperative Group. *Annals Internal Medicine* 1985; 103:620-625.
22. Shaw MT. The cytochemistry of acute leukemia: a diagnostic and prognostic evaluation. *Seminars in oncology* 1976; 3:3.
23. Kalina T. et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012; 26(9):1986-2010.
24. Rotter V, Prokocimer M. p53 and human malignancies. *Adv Cancer Res* 1991; 53:257-272.
25. Wang XW, Harris CC. p53 tumor-suppressor gene: Clues to molecular carcinogenesis. *J Cell Physiol* 1997; 173:247-255.
26. Imamura J, Miyoshi I, Koeffler P. p53 in hematologic malignancies. *Blood* 1994; 84(8):2412-2421.
27. Fenaux P. The clinical significance of the *p53* suppressor gene in haematological malignancies. *Br J Haematol* 1997; 98:502-511.

28. Drexler HG, Quentmeier H, Fleckenstein DS, Uphoff CC. Detection of p53 gene mutation by single strand conformational polymorphism (SSCP) in human acute myeloid leukemia-derived cell lines. *Leuk Research* 2002; 26:207-214.
29. Rothenberg M, Mickley L, Cole D. Expression of mdr1/pgp gene in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1989; 74:1399-1395.
30. Pirker R, Wallner J, Geissler K. MDR1 gene expression and treatment outcome in myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83:708-12.
31. Miyachi H, Takemura Y, Yonekura S. MDR1 (multidrug resistance) gene expression in adult acute leukemia: correlation with blast phenotype. *Int J Hematol* 1993; 57:31-37.
32. Miwa H, Kita K, Nishi K. Expression of MDR1 gene in acute leukemia cells: association with CD7+ acute myeloblastic leukemia / acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 82:3445-3451.
33. Tafuri A, Gregory C, Petrucci MT. MDR-1 protein expression is an independent predictor of complete remission in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 100:974-981.
34. Motomura S. et al. Inhibition of P-glycoprotein and recovery of drug sensitivity of human acute leukemic blast cells by multidrug resistance gene (mdr1) antisense oligonucleotides. *Blood* 1998; 91(9):3163-3171.
35. Wuchter C, Karawaljew L, Ruppert V. Clinical significance of P-glycoprotein expression and function for response to induction chemotherapy, relapse rate and overall survival in acute leukemia. *Haematologica* 2000; 85:711-721.
36. Stavrovskaya AA. Cellular mechanism of multidrug resistance of tumor cell. *Biochemistry* 2002; 65(1):95-106.

37. Cavalcanti JR GBC. Relevância clínica e biológica das alterações do gene P53 nas leucemias. (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz/RJ 2004.
38. Campos L. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 1993; 81(11):3091-3096.
39. Del Poeta G. et al. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2003; 101:6 2125-2131.
40. Tallman MS. New strategies for the treatment of acute myeloid leukemia including antibodies and other novel agents. *ASH Education Program Book* 2005; 1:143-150.
41. Tzifi F. The role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. *Advances in hematology* 2011.
42. Gojo I, Karp JE. New strategies in acute myelogenous leukemia: leukemogenesis and personalized medicine. *Clinical Cancer Research* 2014; 20(24):6233-6241.

TABLES

Table 1. Panel of monoclonal antibodies used in this study for acute leukemia characterization.

	B-cell markers	T-cell markers	Myeloid cell markers	No-specific markers
First Step	cytCD79a, CD19, sCD22	sCD3, cytCD3 CD7	†CD13, CD33, anti-MPO	CD45
Second step	cytIg, slg	CD1a, CD2, CD4, CD5, CD8	CD15, CD11b, CD14, CD41, CD61, CD117, CD235	CD34, CD123, HLA-Dr, TdT, CD10, P53, BCL-2

Note: slg: surface immunoglobulin, cylg: cytoplasmic immunoglobulin, sCD3: surface CD3, cytCD3: cytoplasmic CD3, MPO: myeloperoxidase, CD235: Glycophorin alfa, TdT: Terminal deoxynucleotidyl Transferase, †CD13 (in some cases, cytCD13 are employed). All MoAbs are from Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA.

Table 2. Correlations between phenotypic characteristics and age groups.

VARIABLES	Total	Age groups		OR	<i>p</i> valor
		Group I 60 – 79	Group II ≥ 80		
	80	60 (75)	20 (25)		
Gender					
Male	48 (60)	42 (87,5)	6 (12,5)	5,4	0.02*
Female	32 (40)	18 (56,2)	14 (43,8)		
Clinic data					
Splenomegaly	73 (91,3)	54 (74)	19 (26)	2,1	0.493
Hepatomegaly	61 (76,3)	46 (75,4)	15 (24,6)	0,91	0.879
Fever	19 (23,8)	16 (84,2)	3 (15,8)	0,48	0.288
Hemorrhage	1 (1,3)	1 (100)	0 (0)	-	0.561
Lymphadenopathy	8 (10)	6 (75)	2 (25)	1,0	1.000
Tumor Mass	6 (7,5)	4 (66,7)	2 (33,3)	1,5	0.637
Skin infiltration	6 (7,5)	4 (66,7)	2 (33,3)	1,5	0.624
FAB Classification					
M0	3 (3,8)	2 (66,7)	1 (33,3)	-	0.882
M1	29 (36,3)	23 (79,3)	6 (20,7)		
M2	14 (17,5)	11 (78,6)	3 (21,4)		
M4	19 (23,8)	14 (73,7)	5 (26,3)		
M5a	4 (5)	3 (75)	1 (25)		
M5b	7 (8,8)	4 (57,1)	3 (42,9)		
M6	2 (2,5)	2 (100)	0 (0)		
M7	2 (2,5)	1 (50)	1 (50)		

Note: Numbers in parenthesis are percentages. * $p < 0.05$ statistically significant. Test: Qui-Square.

Table 3. Correlations between laboratory characteristic and disease status.

VARIABLES	Total	Disease status				<i>p</i> valor
		Diagnostic	Refractory	Relapse	Transformed	
	80	56 (70)	3 (3,7)	6 (7,5)	15 (18,7)	
WBC x 10⁹/L						0.003*
≤ 2	4 (5)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	
> 2 - 5	2 (2,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	
> 5 - 10	1 (1,2)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	
> 10 - 50	27 (33,7)	17 (63)	2 (7,4)	1 (3,7)	7 (25,9)	
> 50	46 (57,6)	37 (80,4)	1 (2,2)	4 (8,7)	4 (8,7)	
Platelet count x 10⁹/L						0.039*
≤ 50	26 (32,5)	19 (73,1)	2 (7,7)	1 (3,8)	4 (15,4)	
> 50 - 100	42 (52,5)	31 (73,8)	1 (2,4)	1 (2,4)	9 (21,4)	
≥ 100 - 150	7 (8,7)	3 (42,9)	0 (0)	3 (42,9)	1 (14,3)	
> 150	5 (6,3)	3 (60)	0 (0)	1 (20)	1 (20)	
Hemoglobin (g/dL)						0.033*
≤ 10.0	69 (86,2)	51 (73,9)	3 (4,3)	3 (4,3)	12 (17,4)	
> 10.0	11 (13,8)	5 (45,5)	0 (0)	3 (27,3)	3 (27,3)	

Note: Numbers in parenthesis are percentages. **p* < 0.05 statistically significant. Test: Qui-Square.

Table 4. Correlations between cell markers and status disease.

VARIÁVEIS		Status disease				p valor
		Diagnostic	Refractory	Relapse	Transformed	
		56	3	6	15	
Markers	Patients					
CD34	54	34 (63)	3 (5)	5 (8,3)	12 (22,2)	0.224
HLADR	60	40 (66,7)	3 (5)	5 (8,3)	12 (20)	0.614
CD38	51	36 (70,6)	1 (2)	4 (7,8)	10 (19,6)	0.733
CD117	54	36 (66,7)	3 (5,6)	3 (5,6)	12 (22,2)	0.210
CD7	20	8 (40)	2 (10)	4 (20)	6 (30)	0.004*
Pgp	36	18 (50)	3 (8,3)	5 (13,9)	10 (27,8)	0.003*
p53	24	0 (0)	3 (12,5)	6 (25)	15 (62,5)	0.001*
BCL-2	24	0 (0)	3 (12,5)	6 (25)	15 (62,5)	0.001*

Note: Numbers in parenthesis are percentages. *p < 0.05 statistically significant. Test: Qui-Square.

Table 5. Linear regression by status.

Model	R	R2	R 2 Adjusted	Std. Error of the Estimate
1	0,930	0,866	0,858	0,449

Test: Regression. R: Pearson correlation.

Predictors: (Constant), Pgp+/-, CD7%, p53%, BCL2+/-

Table 6. Coefficients Regression.

MODEL	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients		Sig.	95,0% Confidence Interval for B	
	B	Std. Error	Beta	t		INF	SUP
(Constant)	1,050	,070		14,947	,000	,910	1,190
CD7%	-,005	,002	-,099	-2,162	,034	-,009	,000
p53%	,027	,010	,834	2,780	,007	,008	,047
BCL2+/-	,337	,778	,130	,432	,667	-1,214	1,887
Pgp+/-	-,043	,112	-,018	-,381	,704	-,266	,181

Dependent variable: STATUS