

Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno
Infantil- Mestrado Acadêmico

**LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA E AVALIAÇÃO DA
EXPRESSÃO ANÔMALA MIELÓIDE NO PROGNÓSTICO DE
CRIANÇAS E ADOLESCENTES DO MARANHÃO**

Thaiana da Costa Lopes

São Luís

2012

THAIANA DA COSTA LOPES

**LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA E AVALIAÇÃO DA
EXPRESSÃO ANÔMALA MIELÓIDE NO PROGNÓSTICO DE
CRIANÇAS E ADOLESCENTES DO MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil da Universidade Federal do Maranhão como requisito para qualificação, para obtenção do título de Mestre em Saúde Materno-Infantil.

Área de concentração: Saúde da Criança

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira

Coordenadora: Profa. Dra. Maria Bethânia da Costa Chein

São Luís

2012

THAIANA DA COSTA LOPES

**LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA E AVALIAÇÃO DA
EXPRESSÃO ANÔMALA MIELÓIDE NO PROGNÓSTICO DE
CRIANÇAS E ADOLESCENTES DO MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno-Infantil da Universidade Federal do Maranhão como requisito para qualificação, para obtenção do título de Mestre em Saúde Materno-Infantil

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou a candidata aprovada em: ___/___/____.

Prof. Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. Elba Gomide Mochel (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. Dorlene Maria Cardoso de Aquino (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Lídio Gonçalves Lima Neto (Examinador)
Universidade CEUMA

Aos pequenos maranhenses
participantes deste estudo, que
desde muito cedo aprenderam a
enfrentar o câncer hematológico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu primeiro e maior agradecimento, por seu amor paternal que mais uma vez não me faltou e certamente nunca me faltará.

Ao professor Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa das leucemias agudas no Maranhão e pela orientação deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da UFMA (CEPEC-HUUFMA), em especial a Karla Andrade, Heliana Marinho, Elda Noronha e Nivânia Camelo, pela ajuda, incentivo e compartilhamento de saberes e conhecimentos.

Ao Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB) nas pessoas do diretor administrativo José Generoso da Silva, da médica Geni Lourdes Veras e dos profissionais do serviço de Arquivo, pela autorização e disponibilidade de amostras e dados imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos professores e amigos Ms. Vandilson Rodrigues e Ms. Lusimar Ferreira, pelo desprendimento e atenção oferecidos na análise estatística e normalização.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno Infantil, pela oportunidade da pós-graduação e por todo conhecimento adquirido, através das aulas e convivência com os profissionais que fazem este Programa.

À minha família, meu porto seguro, meus maiores incentivadores do caminho do conhecimento e crescimento profissional: meus pais Osvaldo Lopes e Francisca Lopes, meu irmão Thales Lopes e minha cunhada Nadja Lopes.

À Marcio Rabelo, namorado, amigo, companheiro: pela compreensão, escuta, e pelas palavras certas na hora certa.

Aos colegas e amigos que rezaram, torceram, incentivaram e compartilharam dores e alegrias durante este período: amigos do Grupo de Oração Santo Antônio- RCC, colegas de turma do mestrado, amigos e colegas do Hospital da Mulher e da UPA Socorrinho I.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse essa gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA) representa a neoplasia hematológica mais frequente em crianças e adolescentes menores de quinze anos, com pico de incidência entre dois e cinco anos de idade. Diversos parâmetros têm sido avaliados quanto à sua importância na avaliação prognóstica da população pediátrica com LLA, dentre estes, a avaliação da expressão anômala mielóide no prognóstico destas patologias. O objetivo deste trabalho foi analisar a influência da expressão anômala mielóide no prognóstico de crianças e adolescentes com LLA do estado do Maranhão. Foram avaliados 65 pacientes menores de 18 anos com diagnóstico de LLA assistidos no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB), em São Luís, Maranhão. Os dados laboratoriais foram obtidos ao diagnóstico, realizado com base nos critérios morfológicos/citoquímicos e imunofenotípicos. Os demais dados foram obtidos a partir de prontuários. A amostra foi dividida em grupos com e sem expressão anômala mielóide dos antígenos CD13 e CD33 para análise com as variáveis prognósticas. Os resultados obtidos indicaram que a média de idade na amostra foi de 6,5 anos, sendo que a maioria (69,2%) se tratava de crianças do sexo masculino. A LLA-B foi o tipo mais frequente (83,1%). A porcentagem média de blastos em nossa casuística foi de 75,8% na medula óssea e de 46,6% em sangue periférico. Mais de noventa por cento (90,8%) dos pacientes apresentava morfologia do tipo L1. O perfil do hemograma indicou os valores médios de 32.373 leucócitos/mm³; 8,26 g/dl de hemoglobina e 52.498 plaquetas/mm³. A expressão anômala mielóide ocorreu em 49,2% da casuística. A classificação GBTLI-99 indicou 56,9% de sujeitos com baixo risco de recidiva. No final do período de indução do tratamento, 72,3% das crianças responderam positivamente com remissão da doença. A contagem de plaquetas foi estatisticamente inferior no grupo sem expressão anômala mielóide (33.627 plaquetas/mm³, p = 0,01) em relação ao grupo que expressou este marcador. Cerca de oitenta e nove por cento (88,9%) das crianças com LLA-B e sem expressão anômala mielóide apresentavam menos de 50.000 plaquetas/mm³ (p = 0,01). Crianças com expressão do CD33 foram significativamente mais velhas do que aquelas que não expressavam este marcador (9,4 anos, p = 0,01). Conclui-se que a contagem de plaquetas pode ser um importante parâmetro a ser analisado no prognóstico de crianças sem expressão anômala mielóide. O CD33 pode ser importante na caracterização da população com LLA e expressão anômala, já que o CD13 esteve presente em quase todos os casos.

Palavras-chave: Leucemia linfóide aguda. Crianças e adolescentes. Expressão anômala mielóide.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common hematologic malignancy in children and adolescents younger than fifteen years, with incidence peak between two and five years old. Several parameters have been evaluated for their importance in the prognostic evaluation of pediatric patients with ALL, of these, the evaluation of the anomalous myeloid expression prognosis of these pathologies. The aim of this work was to analyze the influence of myeloid anomalous expression in prognosis of children and adolescents with ALL of the state of Maranhão. It was evaluated 65 patients under 18 years diagnosed with ALL at the Instituto de Oncologia Maranhense Aldenora Belo (IMOAB) in São Luís, Maranhão. Laboratory data were obtained at diagnosis, made on the basis of morphological/ cytochemical and immunophenotype criteria. Other data were obtained from medical records. The sample was divided into groups with and without aberrant expression of myeloid antigens CD13 and CD33 for analysis with prognostic variables. The results indicated that the average age in the sample was 6,5 years, with the majority (69,2%) it was male children. The B-ALL was the most frequent type (83,1%). The mean percentage of blasts in our series was 75,8% in bone marrow and 46,6% in peripheral blood. Over ninety percent (90,8%) patients had L1 type morphology. The profile of blood test indicated the mean values of 32.373 leukocytes/mm³; 8,26 g / dl hemoglobin and 52.498 platelets/mm³. The anomalous myeloid expression occurred in 49,2% of the sample. The GBTLI-99 classification showed 56,9% of subjects with low risk of recurrence. At the end of the induction treatment period, 72,3% of children have responded positively in remission. The platelet count was significantly lower in without myeloid anomalous expression group (33.627 platelets/mm³, p = 0.01) compared to group that expressed this marker. About eighty-nine percent (88.9%) children with ALL-B and without myeloid aberrant expression had less than 50.000 platelets/mm³ (p = 0.01). Children with expression of CD33 were significantly older than those who did not express this marker (9,4 years, p = 0.01). It is concluded that the platelet count may be an important parameter to be analyzed in the prognosis of children with myeloid aberrant expression. The CD33 may be important in population with ALL and aberrant expression, since the CD13 was present in almost all cases.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia. Children and adolescents. Anomalous myeloid expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Características morfológicas dos subtipos de LLA, segundo Bennet et al (1976)	20
Quadro 2 -	Classificação das LLAs B de acordo com a Organização Mundial de Saúde (2001) e classificação EGIL (1995)	23
Quadro 3 -	Classificação das LLAs T segundo EGIL (1995)	23
Tabela 1 -	Gênero, tipo de LLA, morfologia dos blastos, grupo de risco, D29 e expressão anômala (LLA/My+) de crianças com LLA atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011.....	31
Tabela 2 -	Idade, blastos em medula óssea e sangue periférico, leucócitos, hemoglobinas e plaquetas de crianças com LLA atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011.....	31
Tabela 3 -	Idade, blastos em medula óssea e sangue periférico, leucócitos, hemoglobinas e plaquetas de crianças com LLA atendidas pelo IMOAB (São Luís-MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011	32
Tabela 4 -	Grupo de risco e D29 entre crianças com LLA B e LLA-T atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p	33
Tabela 5 -	Gênero, tipo de LLA, morfologia dos blastos, grupo de risco e D29 em crianças com LLA/My+ e LLA/My- atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p.....	34
Tabela 6 -	Idade, blastos em medula óssea e sangue periférico, leucócitos, hemoglobinas e plaquetas em crianças com LLA/My+ e LLA/My- atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p.....	34
Tabela 7 -	LLA-B e LLA-T com e sem expressão anômala mielóide em relação aos valores estratificados de leucócitos, hemoglobina	

	e plaquetas de crianças atendidas pelo IMOAB (São Luís-MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p.....	36
Tabela 8 -	Leucócitos, hemoglobina e plaquetas em crianças com LLA-B com e sem expressão anômala mielóide atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p.....	37
Tabela 9 -	Expressão independente do CD13 e CD33 no total de casos com expressão anômala positiva e nos casos de LLA-T e LLA-B em crianças atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p.....	37
Tabela 10 –	Gênero, tipo de LLA, morfologia dos blastos, grupo de risco e D29 de crianças com e sem expressão do marcador CD33 atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p.....	38
Tabela 11 -	Idade, blastos em medula óssea e sangue periférico, leucócitos, hemoglobina e plaquetas em crianças com e sem expressão do marcador CD33 atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	- Cluster Differentiation (marcador de diferenciação)
CDC	- Center for Disease Control and Prevention
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
CEPEC	- Centro de Pesquisa Clínica
Cit	- Citoplasmático
citCD	- Marcador de diferenciação citoplasmático
citIgM	- Imunoglobulina M citoplasmática
citMPO	- Mieloperoxidase citoplasmática
DRM	- Doença residual mínima
EGIL	- Grupo Europeu para Classificação Imunológica das Leucemias
FAB	- Grupo Franco-Americano- Britânico para classificação morfológica das leucemias agudas
GBTLI	- Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias Infantis
HLA-DR	- Antígeno leucocitário humano, família gênica DR
HU	- Hospital Universitário
IgM	- Imunoglobulina M
IMOAB	- Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo
LA	- Leucemia aguda
LLA	- Leucemia linfóide aguda
LLA/My+	- Leucemia linfóide com expressão anômala de antígeno mielóide
LLA/My-	- Leucemia linfóide sem expressão anômala de antígeno

mielóide

- LMA - Leucemia mielóide aguda
- LPC - Laboratório de Pesquisa Clínica
- MO - Medula óssea
- MPO - Mieloperoxidase
- PAS - Ácido periódico de Schiff
- SP - Sangue periférico
- UFMA - Universidade Federal do Maranhão
- WHO - World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Leucemia Linfóide Aguda	16
2.2 Diagnóstico laboratorial da LLA	19
2.3 Expressão anômala mielóide na LLA	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 Geral	25
3.2 Específicos	25
4 METODOLOGIA	26
4.1 Pacientes e tipo de estudo	26
4.2 Critérios de inclusão e não inclusão	26
4.3 Coleta de dados dos prontuários	26
4.4 Classificação em grupos de risco	27
4.5 Diagnóstico diferencial e classificação da LLA	27
4.6 Identificação da expressão anômala mielóide e avaliação da influência prognóstica	27
4.7 Análise estatística	28
4.8 Aspectos éticos	29
5 RESULTADOS	30
5.1 Caracterização da amostra	30
5.2 Associação entre a expressão anômala positiva e negativa e as variáveis em estudo	33
5.3 Associação entre os tipos de leucemia com a expressão anômala e as variáveis leucócitos, hemoglobina e plaquetas	35
5.4 Associação entre a expressão do CD33 e as variáveis em estudo	37
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE	44
ANEXO	46
ARTIGO CIENTÍFICO 1	48
ARTIGO CIENTÍFICO 2	71

1 INTRODUÇÃO

As leucemias são um grupo de doenças neoplásicas caracterizadas por proliferação clonal de células hematopoiéticas mielóides ou linfóides, as quais sofreram alterações genéticas. Representam um grupo de doenças bastante heterogêneas quanto ao mecanismo leucemogênico, etiologia, prognóstico e resposta ao tratamento (OLIVEIRA E POLI-NETO, 2004).

As leucemias agudas correspondem a um extenso grupo de neoplasias hematológicas, originadas com base na transformação maligna de uma célula tronco hematopoiética, diferenciada para determinada linhagem (mielóide ou linfóide) e que a partir de então desenvolve duas características básicas: perda total ou parcial da capacidade maturativa e proliferação intensa. Dependendo do tipo de célula progenitora afetada, dividem-se em leucemias agudas linfóides ou mielóides, além de raros casos de leucemia indiferenciada aguda e leucemia bifenotípica aguda (OLIVEIRA, 2007).

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer, de todos os cânceres infantis, a leucemia é o tipo mais freqüente na maioria das populações, correspondendo entre 25% e 35% de todos os tipos (BRASIL, 2009). Dentre todas as leucemias, a Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é a mais freqüente em crianças de 0 a 14 anos, representando cerca de 80% dos casos de leucemia aguda na infância (NIEMEYER E SALLAN, 1998; PARKER et al., 1997), com pico de incidência entre 2 e 5 anos de idade (SANDLER E ROSS, 1997; BERG et al., 2005).

Para o progresso do tratamento da criança portadora de câncer, há a necessidade de dados fiéis sobre o diagnóstico desses pacientes, com informações a respeito das características clínicas e epidemiológicas, terapêuticas adotadas e sobrevida, com a finalidade de novas descobertas que permitam o avanço do tratamento, diminuição da toxicidade e até a cura definitiva do câncer (SREDNI, 2000).

Embora a causa da LLA seja desconhecida é improvável que a transformação leucêmica seja resultante de evento único, mas sim do acúmulo de múltiplos

processos envolvendo interações complexas (KEBRIAIEI et al., 2003). A chance de cura na LLA tem aumentado e aproxima-se de 80%, sendo este avanço decorrente da melhora no diagnóstico, identificação de fatores prognósticos e utilização de tratamentos adaptados ao grupo de risco de cada paciente (VILA et al., 2005).

Na pesquisa por fatores prognósticos que possam estar relacionados aos mecanismos da LLA em crianças, diversas variáveis tem sido analisadas, tais como sexo, idade, cor, distribuição geográfica, grupo de risco ao diagnóstico, taxas de remissão, recidiva e sobrevida, além de parâmetros laboratoriais (LAKS et al., 2003; LEITE et al., 2007) Dentre os parâmetros laboratoriais utilizados como indicadores prognósticos, a análise da expressão de imunofenótipos aberrantes tem se destacado como um fator de influência na avaliação prognóstica de crianças com LLA (BHUSHAN et al., 2010). Estudos apontam que a expressão imunofenotípica aberrante pode diminuir o tempo de remissão e sobrevida de crianças com LLA, além de indicar sua frequência relacionada à presença de doença residual mínima (KUREC et al., 1991) e sua relação com outras variáveis laboratoriais, como subtipo de LLA e tipo morfológico do blasto (SHEN et al., 2003).

No Maranhão, pesquisas científicas no âmbito da oncohematologia iniciaram no ano de 2008 com o diagnóstico imunofenotípico de pacientes adultos e pediátricos encaminhados pelo Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB), centro oncológico de referência neste estado. Anteriormente, o diagnóstico da LLA se baseava apenas em critérios morfológicos, o que não assegurava a sub- linhagem linfóide nem tampouco características imunológicas que pudessem esclarecer o prognóstico das crianças leucêmicas. A avaliação da expressão anômala na LLA, juntamente com as demais variáveis envolvidas no mecanismo da doença, podem servir como subsídio para orientação de condutas terapêuticas mais eficientes no tratamento destes indivíduos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Leucemia linfóide aguda (LLA)

A leucemia aguda (LA) é o resultado de uma alteração genética em alguma célula precursora hematopoiética, podendo ser tanto uma célula pluripotente como uma célula progenitora mais madura (KEBRIAEI et al., 2003). Ao invés de proliferar e diferenciar normalmente, a célula afetada dá origem a uma prole que não se diferencia, e que continua a proliferar de maneira descontrolada. Como resultado, há um rápido acúmulo de células imaturas, denominados blastos que, progressivamente, substituem a medula óssea normal (VILLELA E WISINTEINER, 2001).

O acúmulo de blastos na medula óssea (infiltração medular) inibe o crescimento, a maturação normal e a boa funcionabilidade dos precursores normais eritróides, granulocíticos e megacariocíticos, originando respectivamente anemia, neutropenia e plaquetopenia. As leucemias agudas são definidas segundo a classificação World Health Organization (WHO) como entidades que possuem 20% ou mais de blastos na medula óssea (OLIVEIRA E POLI-NETO, 2004).

Na leucemia linfóide aguda (LLA), tais blastos, denominados linfoblastos, originam-se a partir da *stem cell* linfóide (célula tronco linfóide), ainda não diferenciada para linhagem B ou T, ou ainda a partir de precursoras linfóides mais diferenciados da medula óssea ou do timo, caracterizando os estágios iniciais de diferenciação das linhagens B (LLA-B) e T (LLA-T), respectivamente. Tal proliferação leva à substituição da hematopoiese normal por linfoblastos na medula óssea (MO), deprimindo sua atividade fisiológica, podendo ainda infiltrar linfonodos, baço, fígado e outros órgãos, frequentemente seguida de neutropenia, anemia e plaquetopenia em sangue periférico (SP). Cerca de 85% das LLA possuem blastos que expressam marcadores de células B, 15% dos casos são células T (PELLOSO et al., 2003)

As manifestações clínicas da LLA estão diretamente relacionadas à proliferação de linfoblastos na medula óssea, refletindo a diminuição da produção de células progenitoras de outras séries e à infiltração de outros órgãos (JONSSON et al., 1990).

Os primeiros sinais que se manifestam na ocasião da doença incluem anemia, trombocitopenia e granulocitopenia, as quais estão associadas aos sintomas de fadiga, sangramento e febre. A presença de doença extra medular é habitual, incluindo hepatoesplenomegalia e adenomegalia como os achados mais freqüentes ao exame físico. É comum ainda a doença produzir dor óssea e articular consequente a infiltração dos ossos (JONSSON et al., 1990).

Sinais e sintomas como cefaléia, náuseas e vômitos, letargia ou irritabilidade, rigidez na nuca e estados de coma devem levantar forte suspeita de infiltração do sistema nervoso central. Além destes, aumento indolor do volume testicular e nefropatia por urato, decorrente da lise de células leucêmicas, são também achados que sugerem infiltração leucêmica. A presença de massa mediastinal é um achado freqüente na LLA-T (BERG et al., 2005).

Embora a LLA possa ocorrer em qualquer idade, sua incidência é maior entre crianças de 2 a 5 anos, numa porcentagem de cerca de 70%, diminuindo entre adolescentes e adultos jovens, entre os quais a incidência das leucemias agudas é de 20%, voltando a crescer após 60 anos de idade (FALCÃO, 2002). Ao contrário do que ocorre no adulto, a LLA é a mais comum dentre as leucemias na faixa etária pediátrica, com percentuais que variam de 67% a 85% das leucemias (COEBERGH et al., 2000).

É a doença maligna mais comum em menores de quinze anos, com pico de incidência entre dois e cinco anos, correspondendo a 25% de todos os cânceres em crianças nessa faixa etária (MAUER, 1995). Ela é mais comum em caucasianos quando comparada a afro-americanos com uma relação de 1,5/100.000 na população branca e 0,8/100.000 na população negra. Existe uma maior freqüência em países industrializados e em áreas urbanas, sendo uma doença mais comum no sexo masculino na proporção de 1,3: 1 (FARHI E ROSENTHAL, 2000).

Praticamente todas as leucemias possuem fatores prognósticos determinados por fatores citogenéticos, mais propriamente mutações adquiridas que, uma vez detectadas, possibilitam a abordagem adequada do paciente (HAMERSCHLAK, 2008). KEBRIAEL et al. (2003) afirmam ainda que estas mutações adquiridas podem

ser provocadas por danos cromossômicos secundários à exposição por agentes químicos ou físicos e à possível incorporação de informações genéticas virais transmitidas às células progenitoras susceptíveis, além de fatores associados à susceptibilidade do hospedeiro, apontando assim o acúmulo de múltiplos processos envolvendo interações complexas na transformação leucêmica na LLA. Evidências epidemiológicas demonstram que a LLA na infância está associada às exposições ambientais, como substâncias químicas, radiação ionizante, infecções e imunodeficiências, bem como com as anormalidades genéticas constitucionais, como a Síndrome de Down (POMBO- DE- OLIVEIRA, 2008).

Outros estudos apontam que a avaliação da incidência dos subtipos de leucemias no mundo tem mostrado variações importantes em relação à distribuição geográfica, sexo, idade e grupos étnicos ou raciais, sugerindo que possam existir diferentes fatores etiológicos (GROVES et al., 1995). No Brasil, estudos epidemiológicos mostraram a relação entre subtipos imunológicos de LLA com sazonalidade e condições socioeconômicas, além de evidenciar variações da incidência dessa doença em diferentes estados brasileiros (OLIVEIRA et al., 2005; PAES et al., 2003).

Diversas variáveis clínicas e laboratoriais têm valor prognóstico e servem para estratificar os pacientes em grupos de risco, o que tem se tornado elemento essencial para o desenho e avaliação dos tratamentos atuais (MELLO, 2007). A intensidade do regime terapêutico utilizado é ajustada de acordo com fatores prognósticos associados ao risco de falha de tratamento (STANULLA E SCHRAUDER, 2009).

No Brasil, o protocolo de tratamento atual para a LLA, preconizado pelo Grupo Brasileiro para Tratamento da Leucemia na Infância (GBTLI), adota alguns parâmetros identificados ao diagnóstico para alocar os pacientes em grupos de risco, predizendo desta forma os fatores prognósticos pré-tratamento que identificam pacientes com maior ou menor chance de cura para conduzir o tratamento mais adequado para cada grupo. Pacientes de baixo risco são aqueles com idade acima de 1 ano e menor ou igual a 9 anos de idade, e/ou com número de leucócitos inicial

inferior a $50.000/\text{mm}^3$. Já indivíduos que apresentarem ao diagnóstico idade inferior a 1 ano ou superior a 9 anos, e /ou contagem leucocitária maior ou igual a $50.000/\text{mm}^3$ são classificados como pacientes de alto risco (SOCIEDADE BRASILEIRA..., 2000). O protocolo considera adicionalmente a avaliação da resposta precoce ao tratamento (fase de indução), estratificando o paciente com baixo risco de recaída aquele que apresenta menos de 5% de blastos nesta fase.

Segundo VILA et al. (2005), a chance de cura na LLA tem aumentado e aproxima-se de 80%, sendo este avanço decorrente da melhora no diagnóstico, identificação de fatores prognósticos e utilização de tratamentos adaptados ao grupo de risco de cada paciente.

2.2 Diagnóstico laboratorial da LLA

2.2.1 Hemograma

Algumas características clínicas na LLA são identificadas primariamente no hemograma, e refletem o comportamento da evolução leucêmica. Na maioria dos casos, o hemograma indica leucocitose (acima de 12.000 leucócitos/ mm^3) e neutropenia, sendo 20% dos pacientes apresentando mais de 100.000 leucócitos/ mm^3 ; presença de blastos circulantes em variados percentuais, principalmente em pacientes com leucometria elevada; anemia normocítica/normocrômica com freqüentes eritroblastos; plaquetopenia (menos de $50.000/\text{mm}^3$) em 90% dos casos. O número de blastos em sangue periférico independe da contagem de leucócitos e pode variar consideravelmente na análise ao microscópio da extensão sanguínea (OLIVEIRA E POLI-NETO, 2004).

2.2.2 Morfologia e Citoquímica

A classificação morfológica e citoquímica utilizada como consenso para diagnóstico das leucemias agudas foi a proposta pelo Grupo FAB (Franco Americano Britânico), baseada na morfologia das células do sangue periférico e em aspirado de medula óssea, associada ao uso de colorações citoquímicas.

Morfologicamente, as LLA são divididas em L1, L2 e L3 (BENNET et al., 1976) (Quadro 1), que considera características como tamanho, disposição da cromatina, cor citoplasmática e presença de vacúolos. O tipo L1 é o mais comum, representando cerca de 80% a 85% das LLA's em crianças, enquanto o tipo L2 corresponde a pouco menos de 20% e L3 pode variar de 1-3% (OLIVEIRA, 2007).

Quadro 1 – Características morfológicas dos subtipos de LLA, segundo Bennet et al. (1976)

CLASSIFICAÇÃO FAB	LLA L1	LLA L2	LLA L3
Tamanho da célula	Pequeno	Grande, heterogênea	Grande, homogênea
Cromatina	Homogênea	Heterogênea	Pontilhada, homogênea
Forma do núcleo	Regular	Irregular, podendo haver fendas e endentações	Regular, oval ou redonda
Nucléolo	Inconspicuo	Visível, podendo ser grande	Proeminente
Citoplasma	Escasso	Variável, podendo ser abundante	Moderado
Basofilia citoplasmática	Leve a moderada	Variável	Intensa
Vacuolização citoplasmática	Variável	Variável	Proeminente

Fonte: Extraído de Pombo-de-Oliveira (2008).

A coloração citoquímica, técnica associada aos critérios de classificação FAB, consiste no estudo dos constituintes químicos presentes nas células por meio de produtos corados, que podem ser observados à luz da microscopia. São de especial importância para o estudo diferencial das células neoplásicas das leucemias agudas, como os linfoblastos, principalmente por meio das colorações da peroxidase

(mieloperoxidase-MPO), *Sudan Black*, esterases inespecíficas e PAS (Ácido periódico de Schiff) (OLIVEIRA E POLI-NETO, 2004).

2.2.3 Imunofenotipagem

A citometria de fluxo é um moderno método de estudo de células, através do qual, múltiplas propriedades físicas e biológicas de uma célula podem ser determinadas. Permite um rastreamento rápido de um grande número de células, com elevada sensibilidade para detecção de uma pequena população de células neoplásicas entre um grande número de células normais (BACAL E FAULABER, 2003).

A imunofenotipagem consiste na análise de antígenos celulares que são detectados através dos anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo, durante a passagem de milhares de células no citômetro de fluxo. Isto possibilita a medida do número e porcentagem de células positivas para anticorpos marcados. A população de células e subpopulações em uma amostra podem ser determinadas pelo número e tipo do antígeno de superfície, intracitoplasmático ou mesmo intranuclear, o que propicia sua quantificação e classificação imunológica ontogênica, inclusive de um processo neoplásico. Os anticorpos monoclonais são agrupados de acordo com a origem e diferenciação celular e sob a denominação de CD. É uma ferramenta indispensável para o diagnóstico, classificação, estadiamento, e monitoração de neoplasias hematológicas (CRAIG E FOON, 2008).

Baseado na imunofenotipagem, o Grupo Europeu de Classificação Imunológica das Leucemias (EGIL) propõe a classificação imunológica das leucemias agudas. Essa classificação toma por base apenas critérios imunofenotípicos, a partir de sofisticados painéis de marcadores monoclonais. Além de trazer melhores parâmetros de classificação das leucemias agudas em mielóides, linfóide B e linfóide T, pormenorizam estas últimas em seus vários estágios de diferenciação (BENE et al., 1995).

A partir da diferenciação linfóide em células B ou T, e tomando por base os estágios de diferenciação dos antígenos utilizados pela classificação EGIL (BENE et

al., 1995) e Organização Mundial da Saúde (OMS) (BRUNNING et al., 2001), as LLA-B são classificadas em quatro grandes fases: fase pró-B (B-I ou B-imatura), fase pré-pré-B (B-II), fase pré-B (B-III) e fase B madura (B-IV), como ilustra o Quadro 2.

Quadro 2 - Classificação das LLAs B de acordo com a Organização Mundial de Saúde (2001) e classificação EGIL (1995)

Classificação OMS/ EGIL	TdT	CD 34	cCD 79	cCD 22	CD 19	CD 10	HLA- DR	clg	Ig_s
Pró-B/ (BI)	+	+	+	+	+	-	+	-	-
B comum / (BII)	+	-/+	+	+	+	+	+	-	-
Pré-B / (BIII)	+	-/+	+	+	+	+	+	+	-
B madura / (BIV)	+	-	+	+	+	-/+	+	-/+	+

Fonte: Extraído de BRUNNING et al., 2001

Já as LLA-T são classificadas em: pró-T (T-I ou fase pró- timócito), pré-T (T-II ou fase de timócito precoce), cortical T (T-III ou fase de timócito comum) e fase madura- T (T-IV), conforme Quadro 3.

Quadro 3 - Classificação das LLAs T segundo a classificação EGIL

Classificação EGIL	CD7	CD3_{cit}	CD2, CD5, CD8	CD1a	CD3_s+/CD1a-
T-I	+	+	-	-	-
T-II	+	+	+	-	-
T-III	+	+	+	+	-
T-IV	+	+	+	-	+

Fonte: Extraído de BENE et al., 1995.

A classificação EGIL para a leucemia linfóide aguda descreve ainda outro tipo imunológico: a LLA com expressão de um ou dois marcadores mielóides, caracterizando a leucemia linfóide aguda com expressão anômala mielóide (LLA/My+), que será descrita a seguir.

2.3 Expressão anômala mielóide na LLA

Segundo HRUSAK E MACDONALD (2002), muitas leucemias agudas podem apresentar características de mais de uma linhagem celular. Estas observações permitiram que fossem então descritas categorias de leucemias agudas que demonstram infidelidade de linhagem, conhecidas por leucemias agudas com expressão anômala, e incluídas na classificação EGIL para LLA.

Os blastos leucêmicos na LLA expressam antígenos de diferenciação linfóide com um padrão bem definido e com critérios já bem estabelecidos pela técnica de imunofenotipagem, através da utilização de anticorpos monoclonais específicos para esta linhagem, conhecidos como marcadores de diferenciação ou CD. Portanto, a expressão anômala de fenótipos na LLA consiste na co-expressão de marcadores associados à linhagem mielóide nos linfoblastos (LLA/My+) (HRUSAK E MACDONALD, 2002). Entre esses marcadores, estão incluídos o CD13 e CD33, mais frequentemente associados à expressão anômala mielóide na LLA.

O marcador CD13 está presente em todos os estágios de maturação, desde os mieloblastos até os granulócitos maduros, considerado, portanto, um marcador pan-mielóide. Já o CD33, chamado de marcador pan-LMA, está expresso nas unidades formadoras de colônias granulocítica, monocítica e eritrocítica, mieloblastos, promielócitos e mielócitos, com diminuição da expressão conforme a maturação mielóide. Ambos estão expressos em frequências que variam de 75% a 95% das leucemias mielóides agudas FAB M1 a M5 e em 90% das crises blásticas mielóides da leucemia mielóide crônica e na mielofibrose aguda. Ambos estão ausentes nos linfomas não-Hodgkin e linfomas linfoblásticos maduros de células B ou T. O CD33 pode estar expresso em cerca de 10% das LLAs de células B

precursoras. No adulto com LLA, a presença de CD13 aponta para um pior prognóstico (BACAL E FAULHABER, 2003).

Os mecanismos pelos quais ocorre a expressão anômala no desenvolvimento das leucemias agudas ainda permanecem incertos. No entanto, já é possível estabelecer associações entre estas expressões incomuns e outras características biológicas da doença, como as associações com translocações cromossômicas e fatores prognósticos. Além disso, os imunofenótipos aberrantes são sabidamente instrumentos de grande importância na detecção de doença residual mínima (DRM) (EMERENCIANO et al., 2004).

No estudo da expressão anômala na LLA, pesquisas apontam frequências de LLA/My+ que variam de 23% (BHUSHAN et al., 2010) até 49% (KUREC et al., 1991). No que diz respeito à faixa etária, KHALIDIL et al. (1999) aponta uma frequência maior de expressão anômala na LLA em crianças do que em adultos. Tal fato torna-se relevante a partir de considerações já descritas sobre a influência da expressão anômala na avaliação da LLA pediátrica sob os aspectos da DRM (COUSTAN-SMITH et al., 2000) e do valor prognóstico, quando crianças com LLA/My+ apresentaram redução do tempo de remissão e da sobrevida após o tratamento (KUREC et al., 1991).

Outros parâmetros avaliados no estudo da expressão anômala na LLA infantil incluem a associação com os subtipos de blastos linfóides, tanto sob aspectos morfológicos (L1, L2 e L3) e imunológicos (LLA-B e LLA-T) (WIERSMA et al., 1991). Dados do hemograma ao diagnóstico, como contagem global de leucócitos, dosagem de hemoglobina e contagem de plaquetas também já foram previamente analisados no estudo da LLA-My+, porém sem representação significativa (KUREC et al., 1991; COSTA et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a expressão anômala mielóide na leucemia linfóide aguda no prognóstico de crianças e adolescentes no estado do Maranhão.

3.2 Específicos

- a) caracterizar a leucemia linfóide aguda em crianças e adolescentes a partir de dados demográficos, laboratoriais e clínicos;
- b) avaliar a relação entre as variáveis demográficas, laboratoriais e clínicas com os grupos com e sem expressão anômala mielóide;
- c) correlacionar a expressão anômala dos marcadores CD13 e CD33 com as variáveis citadas;
- d) descrever características clínico-laboratoriais das leucemias agudas em crianças e adolescentes.

4 METODOLOGIA

4.1 Pacientes e tipo de estudo

Trata-se de um estudo prospectivo em sessenta e cinco crianças e adolescentes (<18 anos) de ambos os gêneros, encaminhadas pelo Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB) ao Laboratório de Pesquisa Clínica do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (LPC-CEPEC-HU-UFMA) para diagnóstico morfológico, citoquímico e imunofenotípico de leucemias agudas, no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011.

4.2 Critérios de inclusão e não inclusão

Foram incluídos no estudo crianças e adolescentes com até 17 anos e 11 meses, diagnosticados com leucemia linfóide aguda no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, que realizaram exames de mielograma e imunofenotipagem no LPC- CEPEC-HUUFMA e acompanhadas pelo centro de referência em oncologia do Maranhão IMOAB, com dados completos referentes à idade, gênero, parâmetros do hemograma ao diagnóstico (dosagem de hemoglobina e contagem de leucócitos e plaquetas) e evolução clínica até o D29 (último dia da indução do tratamento) contidos nos prontuários médicos. Os sujeitos que não se enquadraram nestes critérios não foram incluídos.

4.3 Coleta de dados dos prontuários

Os dados referentes à idade ao diagnóstico leucometria, plaquetometria, dosagem de hemoglobina e evolução da doença até o final da fase de indução (remissão – evolução boa, não remissão ou óbito – evolução ruim) foram obtidos dos prontuários dos pacientes, localizados no arquivo do IMOAB. Considera-se remissão completa os pacientes que tiveram porcentagem de blastos na medula óssea menor que 5% no D29 de tratamento. A não remissão foi considerada naqueles pacientes que apresentavam mais de 5% de blastos na medula óssea no final da fase de indução (D29). Óbito durante a fase de indução foi considerado

quando os pacientes morreram antes do final da fase de indução, ou seja, antes do D29.

4.4 Classificação em grupos de risco

Baseado no protocolo GBTLI-99 (SOCIEDADE BRASILEIRA..., 2000), os pacientes da pesquisa foram alocados em grupo de baixo risco quando apresentavam ao diagnóstico idade entre 1 e 9 anos e/ou quando apresentavam número de leucócitos inferior a $50.000/\text{mm}^3$. Para classificar pacientes no grupo de alto risco, os critérios foram idade ao diagnóstico inferior a 1 ano ou superior a 9 anos e /ou contagem leucocitária maior ou igual a $50.000/\text{mm}^3$.

4.5 Diagnóstico diferencial e classificação das LLA

Foram feitos com base no mielograma, provas citoquímicas e imunofenotipagem por citometria de fluxo das amostras de medula óssea encaminhadas pelo IMOAB ao LPC-CEPEC. Os critérios utilizados foram baseados nos conceitos morfológicos da classificação FAB (BENNETT et al., 1976, 1985, 1991) e imunofenotípicos da classificação EGIL (BENE et al., 1995). A técnica de imunofenotipagem e análise por citometria de fluxo baseou-se na metodologia de ZHENG et al., 2008. Os mesmos procedimentos foram realizados quando do envio da amostra no D29 (final da fase de indução do tratamento).

4.6 Identificação da expressão anômala mielóide e avaliação do prognóstico

A expressão anômala foi caracterizada quando a definição de células por citometria de fluxo apontou, além dos marcadores que caracterizam a LLA, a expressão dos marcadores CD13 e/ou CD33, ambos marcadores de linhagem mielóide. Baseado na expressão de pelo menos um destes, os pacientes foram divididos em dois grupos: aqueles que expressaram e os que não expressaram os marcadores mielóides. A ocorrência ou não deste evento foi relacionado com as variáveis idade, gênero, morfologia e percentual dos blastos em sangue e medula, leucometria, plaquetometria, dosagem de hemoglobina, grupo de risco e evolução até o D29 (grupo que apresentou remissão, caracterizando evolução boa, e grupo

que não apresentou remissão ou foi a óbito, representando evolução ruim), para desta forma avaliar a influência deste parâmetro sobre as variáveis.

Posteriormente, os pacientes foram divididos segundo a expressão independente dos marcadores CD13 e CD33 e também relacionados com as variáveis citadas.

O prognóstico ruim foi definido quando, na análise estatística entre os grupos com e sem expressão anômala mielóide, houve diferença significativa entre os resultados dos dados laboratoriais (dosagem de hemoglobina, contagem de leucócitos e plaquetas) e clínicos (grupo de risco e evolução até o D29). Os demais dados (idade, sexo, tipo imunológico e morfológico de LLA), quando significativos, foram identificados como características epidemiológicas da LLA no estado maranhense.

4.7 Análise estatística

Os dados coletados foram digitados na planilha eletrônica Microsoft Excel e posteriormente, conferidos e transferidos para o software estatístico Epi-Info, versão 3.4.3 (CDC- Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga, USA). Inicialmente foi realizada a estatística descritiva dos dados por meio de frequência absoluta e relativa, médias e desvio padrão. Para testar a normalidade da distribuição, utilizou-se o Teste de Variância de Barlett. As variáveis estudadas apresentaram distribuição assimétrica, assim, utilizaram-se testes não-paramétricos.

As variáveis foram comparativamente analisadas entre os grupos com expressão anômala mielóide do CD13 e/ou CD33 e sem expressão anômala. Em seguida foi realizada a expressão independente dos marcadores CD13 e CD33. Na análise entre os grupos com fenótipos B e T com e sem expressão anômala mielóide foram utilizados os parâmetros leucócitos, hemoglobina e plaquetas.

Para as variáveis categóricas foram utilizados o teste exato de Fischer e para as variáveis numéricas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4.8 Aspectos éticos

O presente trabalho é integrante do projeto de pesquisa intitulado “Estudo Imunofenotípico das Leucemias Agudas na Infância no Estado do Maranhão”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HU - UFMA, sob parecer substanciado nº 115/2008 CEP-HUUFMA (Anexo 1). Os pais ou responsáveis dos participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra

A maioria das crianças correspondia ao gênero masculino (69,2%), enquanto 30,8% ao feminino. Quanto ao tipo de LLA, 83,1% se tratava de LLA-B e 16,9% de LLA-T. Dos subtipos imunológicos de LLA-B, 7,4% correspondia a LLA BI; 57,4% de BII; 33,3% de BIII e 1,9% correspondiam ao subtipo BIV. Já na análise do total de crianças com LLA-T, 63,3% eram do subtipo TII e 36,4% do subtipo TIII. Nenhuma criança apresentou os subtipos imunológicos TI ou TIV. O tipo morfológico de blastos predominante foi o L1 (90,8%), enquanto 7,7% eram do tipo L2 e 1,5% do tipo L3. Os dados estão descritos na tabela 1.

A classificação GBTLI-99 para o grupo de risco indicou 56,9% de crianças de baixo risco ao diagnóstico e 43,1% pertencentes ao grupo de alto risco. No final do período de indução do tratamento (D29), 72,3% das crianças responderam positivamente com remissão da doença, caracterizando uma boa evolução, enquanto que 27,7% apresentaram evolução ruim, dos quais apenas 1,5% não remitiu ao final da fase de indução, enquanto os demais (26,2%) foram a óbito antes do D29. Quanto à expressão anômala mielóide (LLA/My+), 49,2% das crianças apresentaram este perfil imunofenotípico, e 50,8% não apresentaram expressão anômala mielóide (Tabela 1).

A média de idade na amostra foi de 6,5 anos. A porcentagem média de blastos na medula óssea foi 75,8%, A média de blastos em sangue periférico foi de 46,6%. O perfil do hemograma para amostra indicou ou seguintes valores médios: 32.373 leucócitos/mm³; 8,26 g/dl de hemoglobina; 52.498 plaquetas/mm³ (Tabela 2).

Tabela 1 – Gênero, tipo de LLA, morfologia dos blastos, grupo de risco, D29 e expressão anômala (LLA/My+) de crianças com LLA atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011.

VARIÁVEIS	n	%
Gênero		
Masculino	45	69,2
Feminino	20	30,8
Tipo de LLA		
LLA-B	54	83,1
LLA-T	11	16,9
Morfologia dos blastos		
L1	59	90,8
L2	5	7,7
L3	1	1,5
Grupo de risco		
Alto	28	43,1
Baixo	37	56,1
D29		
Remissão	47	72,3
Não remissão ou óbito	18	27,7
LLA/My+		
Sim	32	49,2
Não	33	50,8

NOTA: os resultados foram descritos em frequência absoluta e relativa.
n (número absoluto); LLA/My+ (expressão anômala mielóide positiva)

Tabela 2 – Idade, blastos em medula óssea e sangue periférico, leucócitos, hemoglobinas e plaquetas de crianças com LLA atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011.

VARIÁVEIS	MÉDIA	± DP
Idade (anos)	6,5	4,5
Blastos MO (%)	75,8	22,2
Blastos SP (%)	46,6	33,5
Leucócitos (/mm³)	32.373	41.431
Hemoglobina (g/dl)	8,26	2,24
Plaquetas (/mm³)	52.498	55.189

NOTA: os resultados foram descritos em média e desvio padrão.
MO (medula óssea); SP (sangue periférico); DP (desvio padrão)

Na tabela 3, a partir do valor médio das variáveis leucócitos, hemoglobina, plaquetas, blastos em sangue periférico e na medula óssea entre os indivíduos com LLA-B e LLA-T, observou-se que a leucometria na LLA-T foi significativamente superior (67.876 leucócitos/mm³) frente à LLA-B (25.140 leucócitos/mm³) (p=0,0006). Resultado significativo também foi identificado na análise de blastos no sangue periférico (p=0,02), onde a média foi superior também na LLA-T (66,63%) frente à LLA-B (42,51%).

Tabela 3 – Leucócitos, hemoglobina, plaquetas e blastos em medula óssea e sangue periférico entre crianças com LLA- B e LLA-T atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p.

VARIÁVEIS	LLA-T (n=11) Média ±DP	LLA-B (n=54) Média ±DP	Valor de p
Leucócitos (mm³)	67.876 ±49.723	25.140 ±35.937	0,0006*
Hemoglobina (g/dl)	8,50 ±2,97	8,21 ±2,09	0,70
Plaquetas (mm³)	64.763±48178	50.000±60110	0,10
Blasto MO (%)	73,54 ±20,45	76,31 ±22,69	0,51
Blasto SP (%)	66,63 ±29,22	42,51 ±33,14	0,02*

NOTA: os resultados foram descritos em média e desvio padrão.

*Diferenças estatisticamente significantes (p<0,05).

Na análise do grupo de risco entre LLA-T e LLA-B, obteve-se um valor de p=0,0005, indicando diferença estatística entre os grupos com fenótipo T e B, onde a maioria das crianças com LLA-T (81,8%) pertenciam ao grupo de alto risco, enquanto somente 35,2% de crianças com LLA-B pertenciam a este grupo. A avaliação no final da fase de indução de tratamento (D29) não apresentou resultado significativo (p>0,05). Estes resultados estão representados na tabela 4.

Tabela 4 – Grupo de risco e D29 entre crianças com LLA B e LLA-T atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p.

VARIÁVEIS	LLA-T (n=11)		LLA-B (n=54)		Valor de p
	n	%	n	%	
Grupo de risco					0,005*
Alto	9	81,8	19	35,2	
Baixo	2	18,2	35	64,8	
D29					0,64
Remissão	3	27,3	15	27,8	
Não Remissão ou óbito	8	72,7	39	72,2	

NOTA: os resultados foram descritos em frequência absoluta e relativa.

*Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

5.2 Associação entre a expressão anômala positiva e negativa e as variáveis em estudo

Quando comparadas as variáveis dos grupos de indivíduos com e sem expressão anômala mielóide (LLA/My+ e LLA/My-, respectivamente), identificou-se uma correlação estatisticamente significativa para plaquetas ($p=0,01$) (Tabela 6), indicando um valor médio inferior no grupo sem expressão anômala ($33.627/\text{mm}^3$) frente ao grupo com essa expressão ($71.959/\text{mm}^3$). A relação entre os dois grupos apresentou também valor de p no limite da significância ($p=0,05$) na avaliação de blastos na medula óssea. A relação entre as demais variáveis não apresentaram resultados estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

Tabela 5 – Gênero, tipo de LLA, morfologia dos blastos, grupo de risco e D29 em crianças com LLA/My+ e LLA/My- atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p.

VARIÁVEIS	LLA/My+ (n=32)		LLA/My- (n=33)		Valor de p
	n	%	n	%	
Gênero					0,42
Masculino	23	71,9	22	66,7	
Feminino	9	28,1	11	33,3	
Tipo de LLA					0,52
LLA-B	27	84,4	27	81,8	
LLA-T	5	15,6	6	18,2	
Morfologia do blasto					0,39
L1	30	93,8	29	87,9	
L2	2	6,3	3	9,1	
L3	0	0,0	1	3,0	
Grupo de risco					0,33
Alto	15	46,9	13	39,4	
Baixo	17	53,1	20	60,3	
D29					0,22
Remissão	25	78,1	22	66,7	
Não remissão ou óbito	7	21,9	11	33,3	

NOTA: os resultados foram descritos em frequência absoluta e relativa.

LLA/My+ (leucemia linfóide aguda com expressão anômala mielóide positiva).

LLA/My- (leucemia linfóide aguda sem expressão anômala mielóide).

Tabela 6 – Idade, blastos em medula óssea e sangue periférico, leucócitos, hemoglobinas e plaquetas em crianças com LLA/My+ e LLA/My- atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p.

VARIÁVEIS	LLA/My+ (n=32)	LLA/My (n=33)	Valor de p
	X±DP	X±DP	
Idade (anos)	6,8±4,1	6,2±4,7	0,22
Blasto MO (%)	81,6±19,8	70,8±23,4	0,05
Blasto SP (%)	50,3±35,0	43,0±32,2	0,37
Leucócitos (/mm³)	35.109±40.999	29.719±42.773	0,31
Hemoglobina (g/dl)	8,4±2,1	8,1±2,4	0,53
Plaquetas (/mm³)	71.959±71.552	33.627±30.442	0,01*

NOTA: * Diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

5.3 Associação entre os tipos de LLA com a expressão anômala e as variáveis leucócitos, hemoglobina e plaquetas

Na avaliação da contagem de leucócitos, a maioria das crianças com imunofenótipo B apresentava menos de 10.000/mm³ (48,1% para LLA-B/My+ e 66,7% para LLA-B/My-). Já na LLA-T, nenhum paciente apresentou menos de 10.000 leucócitos/mm³, porém 60% dos pacientes LLA-T/My+ e 50% dos LLA-B/My- apresentaram hiperleucocitose com mais de 50.000 leucócitos/mm³. Não houve resultado significativo nesta análise ($p > 0,05$) (Tabela 7).

A maioria dos indivíduos com LLA-B apresentava anemia moderada, indicada pelo valor de hemoglobina entre 7-10 g/dL, tanto no grupo com expressão anômala (63,0%) quanto no grupo sem esta expressão imunofenotípica (55,9%). Já na LLA-T, 40,0% das crianças com a expressão My+ e 50% daquelas com expressão My- estavam neste estrato de dosagem de hemoglobina. Também nesta análise, os valores de p não foram significativos ($p > 0,05$) (Tabela 7).

Apenas um paciente (3,7%) com LLA-B/My- apresentava mais de 100.000 plaquetas/mm³, enquanto sete (25,9%) para o grupo LLA-B/My+ estavam nesse estrato. Quando avaliada a contagem de plaquetas, encontrou-se $p=0,01$, indicando significância entre os pacientes com LLA-B/My- e os pacientes LLA-B/My+. O mesmo não foi observado nos pacientes com LLA-T (Tabela 7), muito embora nossa casuística tenha sido pequena para esse tipo imunológico de leucemia.

Tabela 7 – LLA-B e LLA-T com e sem expressão anômala mielóide em relação aos valores estratificados de leucócitos, hemoglobina e plaquetas de crianças atendidas pelo IMOAB (São Luís-MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p.

VARIÁVEIS	LLA-B (n=54)		Valor de p	LLA-T (n=11)		Valor de p
	My+(n=27) n; %	My-(n=27) n; %		My+(n=5) n; %	My-(n=6) n; %	
Leucócitos			0,38			0,60
<10.000/mm ³	13; 48,1	18; 66,7		0; 0	0;0	
10.000- 50.000/mm ³	8; 29,6	5; 18,5		2; 40,0	3; 50,0	
>50.000/mm ³	6; 22,2	4; 14,8		3; 60,0	3; 50,0	
Hemoglobina			0,64			0,67
<7 g/dl	6; 22,2	9; 33,3		2; 40,0	1; 16,7	
7-10g/dl	17; 63,0	14; 55,9		2; 40,0	3; 50,0	
>10g/dl	4; 18,8	4; 14,8		1; 20,0	2; 33,3	
Plaquetas			0,01*			0,88
<50.000/mm ³	15; 55,6	24; 88,9		3; 60,0	3; 50,0	
50.000-100.000/mm ³	5; 18,5	2; 7,4		1; 20,0	2; 33,3	
>100.000/mm ³	7; 25,9	1; 3,7		1; 20,0	1; 16,7	

NOTA: os resultados foram descritos em frequência absoluta e relativa.

My+ (expressão anômala mielóide positiva); My- (expressão anômala mielóide negativa).

*Diferença estatística significativa (p<0,05).

A partir dos valores médios de leucócitos, hemoglobina e plaquetas, pode-se observar que o valor de p na avaliação de plaquetas entre LLA-B/My+ e LLA-B/My- foi igual a 0,02, apresentando o grupo LLA-B/My+ um valor médio de 72.274 plaquetas/mm³ estatisticamente superior à média de plaquetas na LLA-B/My-, que foi de 27.726 plaquetas/mm³ (Tabela 8).

Tabela 8 – Leucócitos, hemoglobina e plaquetas em crianças com LLA-B com e sem expressão anômala mielóide atendidas pelo IMOAB 9São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p.

VARIÁVEIS	LLA-B/My+ (n= 27)	LLA-B/My- (n=27)	Valor de p
	X±DP	X±DP	
Leucócitos (/mm ³)	30.796±41862	19.485±28525	0,19
Hemoglobina (g/dl)	8,44±1,78	7,98±2,37	0,29
Plaquetas (/mm ³)	72.274±76576	27.726±21705	0,02*

NOTA: os resultados foram descritos em média e desvio padrão.

LLA-B/My+ (LLA-B com expressão anômala mielóide); LLA-B/My- (LLA-B sem expressão anômala mielóide).

*Diferença estatística significativa (p<0,05).

5.4 Associação entre a expressão independente CD13/CD33 e as variáveis em estudo

Apenas um paciente (3,1%) (LLA-BII) não apresentou a expressão do marcador CD13, entretanto este paciente foi positivo para expressão anômala do marcador CD33. Seis pacientes (18,8%) apresentaram expressão anômala de ambos os marcadores. A frequência independente de cada marcador foi 96,9% para CD13 e 21,9% para o CD33, não havendo diferença significativa entre os indivíduos LLA-T e LLA-B (p>0,05) (Tabela 9).

Tabela 9 – Expressão independente do CD13 e CD33 no total de casos com expressão anômala positiva e nos casos de LLA-T e LLA-B em crianças atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p.

MARCADOR	Total (n=32)		LLA-T (n=5)		LLA-B (n=27)		Valor de p
	n	%	n	%	n	%	
CD 13	31	96,9	5	100	26	96,3	0,84
CD 33	7	21,9	2	40	5	28,5	0,29

NOTA: os resultados foram descritos em frequência absoluta e relativa

Considerando que apenas um indivíduo com LLA/My+ não apresentou a expressão do marcador CD13, a análise deste com as variáveis em estudo não foi realizada por não ter representatividade estatística.

Nas tabelas 10 e 11 estão descritos os resultados da correlação entre a expressão ou não do marcador CD33 com as variáveis em estudo. Foi observado resultado estatisticamente significativo para a idade ($p=0,01$), indicando crianças com média de idade superior no grupo com a expressão do marcador CD33 (9,4 anos) quando comparadas com aquelas sem expressão desse marcador (6 anos) (Tabela 11). As demais variáveis não apresentaram valor de p significativo.

Tabela 10 – Gênero, tipo de LLA, morfologia dos blastos, grupo de risco e D29 de crianças com e sem expressão do marcador CD33 atendidas pelo IMOAB (São Luís- MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p .

VARIÁVEIS	LLA CD33+ (n=7)		LLA CD33- (n=25)		Valor de p
	n	%	n	%	
Sexo					0,65
Masculino	5	71,4	18	72,0	
Feminino	2	28,6	7	28,0	
Tipo de LLA					0,29
LLA-B	5	71,4	22	88,0	
LLA-T	2	28,6	3	12,0	
Morfologia do blasto					0,39
L1	6	85,7	24	96,0	
L2	1	14,3	1	4,0	
L3	0	0,0	0	0,0	
Grupo de Risco					0,14
Alto	5	71,4	10	40,0	
Baixo	2	28,6	15	60,0	
D29					0,51
Remissão	6	85,7	19	76,0	
Não remissão ou óbito	1	14,3	6	24,0	

NOTA: os resultados foram descritos em frequência absoluta e relativa.

LLA CD33+ (leucemia linfóide aguda com expressão do marcador mielóide CD33);

LLA CD33- (leucemia linfóide aguda sem expressão do marcador mielóide CD33).

Tabela 11 – Idade, bastos em medula óssea e sangue periférico, leucócitos, hemoglobina e plaquetas em crianças com e sem expressão do marcador CD33 atendidas pelo IMOAB (São Luís-MA), no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011, com respectivo valor de p.

VARIÁVEIS	LLA CD33+ (n=7) (X±DP)	LLA CD33- (n=25) (X±DP)	Valor de p
Idade (anos)	9,4±3,2	6,0±4,1	0,01*
Blasto MO (%)	86,0±12,3	79,7±21,5	0,41
Blasto SP (%)	44,3±41,5	52,0±33,8	0,66
Leucócitos (/mm³)	37.731±36.421	34.375±42.241	0,80
Hemoglobina (g/dl)	8,7±2,9	8,3±1,8	0,83
Plaquetas (/mm³)	68.771±55.253	72.852±77.666	0,14

NOTA: os resultados foram descritos em média e desvio padrão.

*Diferença estatística significativa (p<0,05)

REFERÊNCIAS

- BACAL, N. S.; FAULHABER, M. H. **Aplicação prática em citometria de fluxo**. São Paulo: Atheneu, 2003.
- BENE, M. C. et al. Proposal for the immunological classification of acute leukemias: European Group for the Immunological characterization of leukemia (EGIL). **Leukemia**, v. 9, p. 1783-1786, Oct. 1995.
- BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukemias. **Br J Haematol.**, v. 33, p. 451-458, Aug. 1976.
- _____. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Group. **Ann of Intern Med.**, v.103, p. 620-625, Oct. 1985.
- _____. Proposals for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0). **Br J Haematol**, v. 78, p. 325-329, July 1991.
- BERG, S.L.; STEUBER, C.P.; POPLACK, D.G. Clinical manifestations of acute lymphoblastic leukemia. In: HOFFMAN, R. et al. **Hematology**: basic principles and practice. 4. ed. Philadelphia: Elsevier, 2005. p.1155-1162.
- BHUSHAN, B. et al. Aberrant phenotypes in childhood and adult acute leukemia and its association with adverse prognostic factors and clinical outcome. **Clin Exp Med**, v. 10, n .1, p. 33-40, Mar. 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2010**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2009.
- BRUNNING, R. D. et al. Precursor B-cell and T-cell neoplasms. In: JAFFE E. S. et al. **Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**: World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press, 2001. p. 111-117.
- COEBERGH, J. W. W. et al. **Netherlands Cancer Registry**: Childhood cancer in the Netherlands. Utrecht: Association of Comprehensive Cancer Centres, 2000.
- COSTA, F. R. et al. Identificação de antígenos aberrantes na leucemia linfóide aguda: frequência e perfil do hemograma. **NewsLab**, v. 104, p. 82-84, 2011.
- COUSTAN-SMITH, E. et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 96, n. 8, p. 2691-2696, Oct. 2000.
- CRAIG, F.E.; FOON, K. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 3941-3967, Jan. 2008.
- EMERENCIANO, M. et al. Frequência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas. **Rev bras cancerol**, v. 50, n. 3, p. 183-189, jun. 2004.

- FALCÃO, R. P. Leucemia linfóide aguda em adultos e crianças: características morfológicas e imunofenóticas. **Ser Monogr Esc Bras Hemat**, v. 9, p. 25-35, 2002.
- FARHI, D. C.; ROSENTHAL, N. S. Acute lymphoblastic leukemia. **Clin Lab Med**, v. 20, n. 1, p. 17-28, Mar. 2000.
- HAMERSCHLAK, N. Leucemia:fatores prognósticos e genética. **J Pediatr**, v. 84, n. 4,, p. 52-57, ago. 2008.
- HRUSAK, O.; MacDONALD, A.P. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. **Leukemia**, v. 16, p. 1233-1258, July 2002.
- JONSSON, O. G. et al. Bone pains as an initial symptom of childhood acute lymphoblastic leukemia: association with nearly normal hematologic indexes. **J Pediatr**, v.117, p.233-237, Aug. 1990.
- KEBRIAIEI, P.; ANASTASI, J.; LARSON, R.A. Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and classification. **Best Pract Res Clin Haematol.**, v. 15, p. 597- 621, Dec. 2003.
- KHALIDI, H. S. et al. Acute lymphoblastic leukemia. Survey of immunophenotype, FAB classification, frequency of myeloid antigen expression, and karyotypic abnormalities in 210 pediatric and adult cases. **Am J Clin Pathol.**, v. 111, p. 467-476, Apr. 1999.
- KUREC, A.S. et al. Significance of Aberrant Immunophenotypes in Childhood Acute Lymphoid Leukemia. **Cancer**, v. 67, n. 12, p. 3081- 3086, June 1991.
- LAKS, D. et al. Avaliação da sobrevida de crianças com leucemia linfocítica aguda tratadas com o protocolo Berlim Frankfurt-Munique. **J Pediatr.**, v. 79, n. 2, p. 149-158, 2003.
- LEITE, E.P. et AL. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda. **Rev Bras Saúde Matern Infant**, v. 7, n. 4, p.413-421, out. / dez. 2007.
- MAUER, A. M. Acute lymphocytic leukemia. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLER, M. B. **Williams Hematology**. New York: McGraw-Hill, 1995. p.1004-1016.
- MELLO, M. R. B. **Avaliação imunofenotípica, estudo do índice de DNA e de alterações moleculares em células blásticas de pacientes portadores de leucemia linfóide aguda diagnosticados na Fundação Hemope**. 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- NIEMEYER, C. M.; SALLAN, S. E. Acute lymphoblastic leukemia. In: NATHAN, D. G.; OSKI, S. H. **Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood**. 5. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998, p. 1245-1285.
- OLIVEIRA, M. S. et al. Biological diversity variations of pediatric acute leukemia in Brazil: contribution of immunophenotypic profiles to epidemiological studies. **Rev Bras Hematol Hemoter.**, v. 27, p. 21-26, Jan./Mar. 2005.

OLIVEIRA, R. A. G. **Hemograma**: como fazer e interpretar. São Paulo: Livraria Médica Paulista, 2007.

OLIVEIRA, R. A. G.; POLI-NETO, A. **Anemias e leucemias**: conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais. São Paulo: Roca, 2004.

PAES, C. A. et al. Direct association of socio-economic *status* with T-cell acute lymphoblastic leukaemia in children. **Leuk Res.** , v. 27, p. 789-794, Sept. 2003.

PARKER, S. L. et al. Cancer statistics, 1997. **Cancer J Clin.**, v. 47, p. 5-27, Jan./Feb. 1997.

PELLOSO, L. A. et al. Karyotype in acute myeloid leukemia: importance and type of aberrations in 30 patients at diagnosis. **Rev Assoc Med Bras**, v. 49, p. 150-455, Apr./June 2003.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. **Leucemias infantis**: abordagem imuno-molecular no diagnóstico e nas pesquisas. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer. 2008.

SANDLER, D. P.; ROSS, J. A. Epidemiology of acute leukemia in children and adults. **Semin Oncol**, v. 24, p. 3-16, Feb. 1997.

SHEN, H.Q. et al. Immunophenotyping of 222 children with acute leukemia by multi-color flow cytometry. **Zhonghua Er Ke Za Zhi.**, v. 41, n. 5, p. 334-337, May 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA PEDIÁTRICA. GBTLI LLA-99: protocolo de tratamento da leucemia linfóide aguda em crianças. [Campinas], 2000.

SREDNI, S. T. Patologia dos tumores infantis. In: CAMARGO, B. de; LOPES, L. F. **Pediatria oncológica**: noções fundamentais para o pediatra. São Paulo: Lemar, 2000. p. 47-67.

STANULLA, M.; SCHRAUDER, A. Bridging the gap between the north and south of the world: the case of treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 94, n. 6, p. 748-752, June 2009.

VILA, P. B. et al. Leucemia mínima residual: nuevo concepto de remisión completa. **An Pediatr.**, v. 63, p. 390-395, Nov. 2005.

VILLELA, L. P.; WISINTEINER, S. C. Protocolo de leucemias agudas do adulto. **Mom Perspec Saúde**, v. 14, n. 1, p. 19-22, jan./dez. 2001.

WIERSMA, S. R. et al. Clinical importance of myeloid-antigen expression in acute lymphoblastic leukemia of childhood. **N Engl J Med**, v. 324, n. 12, p. 800-808, Mar. 1991.

ZHENG, J. et al. A correlation study of immunophenotypic, cytogenetic, and clinical features of 180 AML patients in China. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 74, n. 1, p.25-29, Jan. 2008.

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE MATERNO-INFANTIL

**PROJETO: ESTUDO IMUNOFENOTÍPICO DAS LEUCEMIAS AGUDAS NA
INFÂNCIA NO ESTADO DO MARANHÃO.**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(aos pais ou responsáveis)

Prezado(a) Senhor(a),

Você está sendo convidado(a) a autorizar a participação do seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade no presente estudo, que pretende identificar, através de exames laboratoriais, qual o subtipo de Leucemia de que o mesmo é portador.

Para a realização dos exames laboratoriais serão necessárias amostras de sangue e de medula óssea do seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade. Essas amostras serão coletadas por técnicos treinados e especializados, do Hospital Aldenora Belo, proporcionando segurança e o mínimo de desconforto possível.

Com essas amostras de sangue e medula óssea, iremos realizar os seguintes exames laboratoriais: Hemograma, Mielograma, Imunofenotipagem e Estudo da Proliferação Celular. Através desse conjunto de exames poderemos identificar, de forma bastante criteriosa, qual o tipo de Leucemia de que a criança é portadora.

Após a realização dos exames, as amostras de sangue e medula óssea serão desprezadas de forma adequada.

Com a autorização da participação do seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade, nesse projeto, poderemos ter conhecimento do tipo de Leucemia de que o mesmo é portador, e assim, o médico indicará o tratamento mais adequado, melhorando desta forma a qualidade de vida e aumentando as chances de cura.

Você poderá entrar em contato com a nossa equipe a qualquer momento para tirar dúvidas.

Após as informações acima fornecidas, no caso de aceitar a participação do seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade, no estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Você terá a garantia de sigilo, direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo da continuidade na forma de tratamento, assistência, cuidado, ou acompanhamento, proporcionados a seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade.

Responsável: _____ Data do aceite: ___/___/___

ANEXO A – Parecer consubstanciado

	Universidade Federal do Maranhão Hospital Universitário Diretoria Adjunta de Ensino, Pesquisa e Extensão Comitê de Ética em Pesquisa
---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL Anti-projeto de pesquisa do Mestrado Materno infantil	Nº. do Parecer: 115/2008 Nº do Protocolo: 33104-2040/2007 Data de Entrada no CEP: 13/12/2007 Data da Assembléia: 14/03/2008 Parecer: APROVADO
--	--

I - Identificação:

Título do projeto: Estudo imunofenotípico das leucemias agudas na infância no Estado do Maranhão.		
Identificação do Pesquisador Responsável: Raimundo Antonio Gomes Oliveira		
Identificação da Equipe executora: Raimundo Antonio Gomes Oliveira, Elda Pereira Noronha, Ênio Fernandes Aragão Soares, Nivânia Lisboa Camelo, Sônia Maria Pereira Cruz e Lígia Maria Mendes Gonçalves		
Instituição onde será realizado: Hospital Universitário - UFMA- Laboratório de Análises Clínicas, CEPEC- Laboratório de Pesquisa Clínica e Departamento de Farmácia – Laboratório de Hematologia Clínica		
Área temática: III	Multicêntrico: NÃO	Cooperação estrangeira: NÃO

II – Objetivos:

Determinar o perfil imunofenotípico e cinético das leucemias agudas em crianças no Estado do Maranhão.

III- Sumário do projeto:

Trata-se de um anteprojecto de pesquisa apresentado ao Programa de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil, como pré-requisito do processo seletivo do Mestrado Acadêmico da UFMA, cuja estrutura é a seguinte: folha de rosto, curriculum vitae dos pesquisadores, protocolo de pesquisa propriamente dito, contendo: sumário, introdução e justificativa, objetivos, casuística e métodos, orçamento previsto, financiamento e execução, cronograma, resultados e impactos esperados, equipe executora, referências bibliográficas e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Tipo de pesquisa: Estudo prospectivo randomizado em pacientes encaminhados ao Hospital Aldenora Belo e diagnosticados como portadores de leucemias agudas, no período de maio de 2008 a outubro de 2009.

A metodologia esta devidamente detalhada, como está transcrito a seguir: Os pacientes serão divididos de acordo com a faixa etária em: crianças com menos de 15 anos, adultos de 15 a 60 anos e idosos acima de 60 anos. Para cada faixa etária serão avaliados os marcadores de proliferação celular.

O diagnóstico das leucemias agudas será feito com base no hemograma, mielograma, provas citoquímicas e imunofenotipagem por citometria de fluxo, do sangue periférico e medula óssea de pacientes encaminhados ao Hospital Aldenora Bello do município de São Luís- Maranhão, para diagnóstico diferencial de leucemias agudas. Os critérios utilizados serão: de acordo com os conceitos morfo-citoquímicos FAB(BENNET et al. 1976; BENNET, DANIEL et al, 1991) e imunofenotípicos da classificação EGIL(BENE et al, 1995).

Marcadores de proliferação celular: serão estudados os marcadores de proliferação celular Ki-67 & CD71, bem como a DNA ploidy por citometria fluxo.

Análise estatística: serão usados a análise de variância, método de Kaplan-Meier, teste delog-rank e o teste de fisher, quando indicados.

IV- Comentários frente à resolução 196/96 CNS e complementares:

A justificativa apresenta de forma resumida o projeto e deixa bem clara a relevância do mesmo: É através do diagnóstico correto que se pode prognosticar ou tomar decisões terapêuticas específicas para uma determinada doença. As leucemias agudas são neoplasias cuja evolução clínica difere sobremaneira entre seus portadores. A determinação dos diferentes subtipos é a forma mais específica de poder prognosticar e tratar de modo particular cada paciente. Como não há nenhum dado científico sobre os diferentes subtipos imunológicos de leucemias em nossa população, este trabalho que ora se apresenta poderá dar subsídios mais sólidos para conduta terapêutica que vão, além do diagnóstico, pode aumentar a qualidade de vida e diminuir a morbimortalidade de uma doença tão grave e incidente na infância.

Infelizmente, no Estado do Maranhão ainda não se faz diagnósticos das leucemias agudas através dos marcadores imunológicos, muitos menos estudos clínicos com marcadores de prognóstico, exceto em raros casos pontuais de pacientes com familiares em condições financeiras de encaminharem suas amostras para centros mais avançados. Desde modo, boa parte dos pacientes são tratados e prognosticados apenas através da morfologia e clínica, o que por vezes pode ofuscar a escolha mais correta de tratamento e frustrar resultados alentadores de cura. Também, como consequência, inviabiliza-se um estudo clínico de tal assunto em nossa comunidade.

Assim, nos parece indispensável e de forte impacto utilizar-mos de métodos seguros e que possam classificar e subclassificar os diversos tipos de leucemias agudas em requeiram maçadores imunológicos (antígenos de membrana), com a utilização da citometria de fluxo, e a partir de então, fazer-se um estudo cinético correlacionando-os com o prognósticos destas doenças.

A metodologia está devidamente detalhada e de acordo com os objetivos propostos. Entretanto o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) deve atender as normas da Res. 196/96 so CNS/MS.

Inicialmente o processo apresentava apenas uma folha de rosto, na qual eram citados três unidades/órgãos nos quais as pesquisa será desenvolvida. Mas esta pendência já foi resolvida.

Ainda não há garantia de financiamento para alguns do itens de material de consumo.

V –Parecer Consubstanciado do CEP:

Diante do exposto, o protocolo 33104-2040/07, referente o título Estudo imunofenotipico das leucemias agudas na infância no Estado do Maranhão, pleiteado por Raimundo Antonio Gomes Oliveira é considerado: **APROVADO**.

Relatórios parciais (um por ano) devem ser apresentados ao CEP-HUUFMA, sendo o primeiro para 23/05/2008, ou se houver algum evento adverso, emenda ou alteração no protocolo. O relatório final deve ser entregue, acompanhado de cópia do trabalho final gravado em CD ROM.

Obs: Este parecer se refere só à forma como o projeto dessa pesquisa desenhado e foi protocolado junto ao CEP, não dando nenhum respaldo à pesquisa para fins de publicação ou apresentação em congresso, bancas ou outros eventos científicos. Para isto, o pesquisador deve solicitar o Parecer Consubstanciado Aprovando Relatório de Pesquisa ou o Parecer Consubstanciado Aprovando a finalização da Pesquisa.

São Luís, MA, 23 de maio de 2008.


Roberto Batista Gurgel

Filósofo
Coordenador do CEP-HUUFMA
Ethica homini habitat est

PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO

Nome do Periódico: **Jornal de Pediatria**

ISSN 0021-7557 (versão impressa); ISSN 1678-4782 (versão online)

Qualificação WEBQUALIS da CAPES na área de avaliação MEDICINA II: B2

Orientações Gerais

O original – incluindo tabelas, ilustrações e referências bibliográficas – deve estar em conformidade com os "Requisitos Uniformes para Originais Submetidos a Revistas Biomédicas", publicado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (<http://www.icmje.org>).

Cada seção deve ser iniciada em nova página, na seguinte ordem: página de rosto, resumo em português, resumo em inglês, texto, agradecimentos, referências bibliográficas, tabelas (cada tabela completa, com título e notas de rodapé, em página separada), figuras (cada figura completa, com título e notas de rodapé, em página separada) e legendas das figuras.

Página de Rosto

A página de rosto deve conter todas as seguintes informações:

- a) título do artigo, conciso e informativo, evitando termos supérfluos e abreviaturas; evitar também a indicação do local e da cidade onde o estudo foi realizado, exceto quando isso for essencial para a compreensão das conclusões; (retirar)
- b) título abreviado (para constar na capa e topo das páginas), com máximo de 50 caracteres, contando os espaços;
- c) nome de cada um dos autores (o primeiro nome e o último sobrenome devem obrigatoriamente ser informados por extenso; todos os demais nomes aparecem como iniciais);
- d) titulação mais importante de cada autor;
- e) endereço eletrônico de cada autor;
- f) informar se cada um dos autores possui currículo cadastrado na plataforma Lattes do CNPq;
- g) a contribuição específica de cada autor para o estudo;
- h) declaração de conflito de interesse (escrever "nada a declarar" ou a revelação clara de quaisquer interesses econômicos ou de outra natureza que poderiam causar constrangimento se conhecidos depois da publicação do artigo);
- i) definição de instituição ou serviço oficial ao qual o trabalho está vinculado para fins de registro no banco de dados do Index Medicus/MEDLINE;
- j) nome, endereço, telefone, fax e endereço eletrônico do autor responsável pela correspondência;

- k) nome, endereço, telefone, fax e endereço eletrônico do autor responsável pelos contatos pré-publicação;
- l) fonte financiadora ou fornecedora de equipamento e materiais, quando for o caso;
- m) contagem total das palavras do texto, excluindo o resumo, agradecimentos, referências bibliográficas, tabelas e legendas das figuras;
- n) contagem total das palavras do resumo;
- o) número de tabelas e figuras.

Resumo

O resumo deve ter no máximo 250 palavras ou 1.400 caracteres, evitando o uso de abreviaturas. O resumo das comunicações breves deve ter no máximo 150 palavras. Não colocar no resumo palavras que identifiquem a instituição ou cidade onde foi feito o artigo, para facilitar a revisão cega. Todas as informações que aparecem no resumo devem aparecer também no artigo. O resumo deve ser estruturado, conforme descrito a seguir:

Resumo de Artigo Original

Objetivo: informar por que o estudo foi iniciado e quais foram as hipóteses iniciais, se houve alguma. Definir precisamente qual foi o objetivo principal e informar somente os objetivos secundários mais relevantes.

Objetivo: informar por que o estudo foi iniciado e quais foram as hipóteses iniciais, se houve alguma. Definir precisamente qual foi o objetivo principal e informar somente os objetivos secundários mais relevantes.

Métodos: informar sobre o delineamento do estudo (definir, se pertinente, se o estudo é randomizado, cego, prospectivo, etc.), o contexto ou local (definir, se pertinente, o nível de atendimento, se primário, secundário ou terciário, clínica privada, institucional, etc.), os pacientes ou participantes (definir critérios de seleção, número de casos no início e fim do estudo, etc.), as intervenções (descrever as características essenciais, incluindo métodos e duração) e os critérios de mensuração do desfecho.

Resultados: informar os principais dados, intervalos de confiança e significância estatística.

Conclusões: apresentar apenas aquelas apoiadas pelos dados do estudo e que contemplem os objetivos, bem como sua aplicação prática, dando ênfase igual a achados positivos e negativos que tenham méritos científicos similares.

Texto

O texto dos artigos originais deve conter as seguintes seções, cada uma com seu respectivo subtítulo:

- a) **Introdução:** sucinta, citando apenas referências estritamente pertinentes para mostrar a importância do tema e justificar o trabalho. Ao final da introdução, os

objetivos do estudo devem ser claramente descritos.

b) Métodos: descrever a população estudada, a amostra e os critérios de seleção; definir claramente as variáveis e detalhar a análise estatística; incluir referências padronizadas sobre os métodos estatísticos e informação de eventuais programas de computação. Procedimentos, produtos e equipamentos utilizados devem ser descritos com detalhes suficientes para permitir a reprodução do estudo. É obrigatória a inclusão de declaração de que todos os procedimentos tenham sido aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da instituição a que se vinculam os autores ou, na falta deste, por um outro comitê de ética em pesquisa indicado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde .

c) Resultados: devem ser apresentados de maneira clara, objetiva e em sequência lógica. As informações contidas em tabelas ou figuras não devem ser repetidas no texto. Usar gráficos em vez de tabelas com um número muito grande de dados.

d) Discussão: deve interpretar os resultados e compará-los com os dados já descritos na literatura, enfatizando os aspectos novos e importantes do estudo. Discutir as implicações dos achados e suas limitações, bem como a necessidade de pesquisas adicionais. As conclusões devem ser apresentadas no final da discussão, levando em consideração os objetivos do trabalho. Relacionar as conclusões aos objetivos iniciais do estudo, evitando assertivas não apoiadas pelos achados e dando ênfase igual a achados positivos e negativos que tenham méritos científicos similares. Incluir recomendações, quando pertinentes.

O texto de artigos de revisão não obedece a um esquema rígido de seções. Sugere-se uma introdução breve, em que os autores explicam qual a importância da revisão para a prática pediátrica, à luz da literatura médica. Não é necessário descrever os métodos de seleção e extração dos dados, passando logo para a sua síntese, que, entretanto, deve apresentar todas as informações pertinentes em detalhe. A seção de conclusões deve correlacionar as ideias principais da revisão com as possíveis aplicações clínicas, limitando generalizações aos domínios da revisão.

O texto de relatos de caso deve conter as seguintes seções, cada uma com seu respectivo subtítulo:

a) Introdução: apresenta de modo sucinto o que se sabe a respeito da doença em questão e quais são as práticas de abordagem diagnóstica e terapêutica, por meio de uma breve, porém atual, revisão da literatura.

b) Descrição do(s) caso(s): o caso é apresentado com detalhes suficientes para o leitor compreender toda a evolução e seus fatores condicionantes. Quando o artigo tratar do relato de mais de um caso, sugere-se agrupar as informações em uma tabela, por uma questão de clareza e aproveitamento do espaço. Evitar incluir mais de duas figuras.

c) Discussão: apresenta correlações do(s) caso(s) com outros descritos e a importância do relato para a comunidade pediátrica, bem como as perspectivas de

aplicação prática das abordagens inovadoras.

Agradecimentos

Devem ser breves e objetivos, somente a pessoas ou instituições que contribuíram significativamente para o estudo, mas que não tenham preenchido os critérios de autoria. Integrantes da lista de agradecimento devem dar sua autorização por escrito para a divulgação de seus nomes, uma vez que os leitores podem supor seu endosso às conclusões do estudo.

Referencias Bibliográficas

As referências bibliográficas devem ser numeradas e ordenadas segundo a ordem de aparecimento no texto, no qual devem ser identificadas pelos algarismos arábicos respectivos sobrescritos. Para listar as referências, não utilize o recurso de notas de fim ou notas de rodapé do Word.

As referências devem ser formatadas no estilo Vancouver, também conhecido como o estilo Uniform Requirements, que é baseado em um dos estilos do American National Standards Institute, adaptado pela U.S. National Library of Medicine (NLM) para suas bases de dados. Os autores devem consultar Citing Medicine, The NLM Style Guide for Authors, Editors, and Publishers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=citmed>) para informações sobre os formatos recomendados para uma variedade de tipos de referências. Podem também consultar o site "sample references" (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html), que contém uma lista de exemplos extraídos ou baseados em Citing Medicine, para uso geral facilitado; essas amostras de referências são mantidas pela NLM.

Artigos aceitos para publicação, mas ainda não publicados, podem ser citados desde que indicando a revista e que estão "no prelo".

Observações não publicadas e comunicações pessoais não podem ser citadas como referências; se for imprescindível a inclusão de informações dessa natureza no artigo, elas devem ser seguidas pela observação "observação não publicada" ou "comunicação pessoal" entre parênteses no corpo do artigo.

Os títulos dos periódicos devem ser abreviados conforme recomenda o Index Medicus; uma lista com suas respectivas abreviaturas pode ser obtida através da publicação da NLM "List of Serials Indexed for Online Users", disponível no endereço <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html>. Para informações mais detalhadas, consulte os "Requisitos Uniformes para Originais Submetidos a Revistas Biomédicas". Este documento está disponível em <http://www.icmje.org/>.

Tabelas

Cada tabela deve ser apresentada em folha separada, numerada na ordem de aparecimento no texto, e conter um título sucinto, porém explicativo. Todas as explicações devem ser apresentadas em notas de rodapé e não no título, identificadas pelos seguintes símbolos, nesta sequência: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡. Não sublinhar ou desenhar linhas dentro das tabelas, não usar espaços para separar

colunas. Não usar espaço em qualquer lado do símbolo \pm .

Figuras (fotografias, desenhos, gráficos) Todas as figuras devem ser numeradas na ordem de aparecimento no texto. Todas as explicações devem ser apresentadas nas legendas, inclusive acerca das abreviaturas utilizadas na tabela. Figuras reproduzidas de outras fontes já publicadas devem indicar esta condição na legenda, assim como devem ser acompanhadas por uma carta de permissão do detentor dos direitos. Fotos não devem permitir a identificação do paciente; tarjas cobrindo os olhos podem não constituir proteção adequada. Caso exista a possibilidade de identificação, é obrigatória a inclusão de documento escrito fornecendo consentimento livre e esclarecido para a publicação. Microfotografias devem apresentar escalas internas e setas que contrastem com o fundo.

As ilustrações são aceitas em cores para publicação no site. Contudo, todas as figuras serão vertidas para o preto-e-branco na versão impressa. Caso os autores julguem essencial que uma determinada imagem seja colorida mesmo na versão impressa, solicita-se um contato especial com os editores. Imagens geradas em computador, como gráficos, devem ser anexadas sob a forma de arquivos nos formatos .jpg, .gif ou .tif, com resolução mínima de 300 dpi, para possibilitar uma impressão nítida; na versão eletrônica, a resolução será ajustada para 72 dpi. Gráficos devem ser apresentados somente em duas dimensões, em qualquer circunstância. Desenhos, fotografias ou quaisquer ilustrações que tenham sido digitalizadas por escaneamento podem não apresentar grau de resolução adequado para a versão impressa da revista; assim, é preferível que sejam enviadas em versão impressa original (qualidade profissional, a nanquim ou impressora com resolução gráfica superior a 300 dpi). Nesses casos, no verso de cada figura dev e ser colada uma etiqueta com o seu número, o nome do primeiro autor e uma seta indicando o lado para cima.

Legendas das Figuras

Devem ser apresentadas em página própria, devidamente identificadas com os respectivos números.

Lista de Verificação

Como parte do processo de submissão, os autores são solicitados a indicar sua concordância com todos os itens abaixo; a submissão pode ser devolvida aos autores que não aderirem a estas diretrizes.

1. Todos os autores concordam plenamente com a Nota de Copyright.
2. O arquivo de submissão foi salvo como um documento do Microsoft Word.
3. A página de rosto contém todas as informações requeridas, conforme especificado nas diretrizes aos autores.
4. O resumo e as palavras-chave estão na língua de submissão (inglês ou português), seguindo a página de rosto.
5. O texto é todo apresentado em espaço duplo, utiliza fonte tamanho 12 e itálico em vez de sublinhado para indicar ênfase (exceto em endereços da internet).

Todas as tabelas, figuras e legendas estão numeradas na ordem em que aparecem no texto e foram colocadas cada uma em página separada, seguindo as referências, no fim do arquivo.

6. O texto segue as exigências de estilo e bibliografia descritas nas normas de publicação.

7. As referências estão apresentadas no chamado estilo de Vancouver e numeradas consecutivamente na ordem em que aparecem no texto.

8. Informações acerca da aprovação do estudo por um conselho de ética em pesquisa são claramente apresentadas no texto, na seção de métodos.

9. Todos os endereços da internet apresentados no texto (p.ex., <http://www.sbp.com.br>) estão ativos e prontos para serem clicados.

10. Na submissão de um original que vá ser submetido a revisão por pares, os nomes e afiliações dos autores devem ser removidos do arquivo principal. Nas referências, os nomes dos autores, títulos de artigos e outras informações devem ser substituídos simplesmente por "Autor," de modo a assegurar um processo de revisão cega.

ARTIGO ORIGINAL

- a) Título do artigo: Influência da expressão anômala mielóide na leucemia linfóide aguda em crianças e adolescentes
- b) Título abreviado: Expressão mielóide na leucemia linfóide aguda
- c) Autores: Thaiana da C. Lopes¹, Nivânia L. Camelo¹, Karla N. de S. Andrade¹, Vandilson P. Rodrigues², Raimundo A. G. Oliveira³
- d) 1: Mestranda, Saúde Materno-Infantil, Programa de Pós- Graduação em Saúde Materno Infantil, Universidade Federal do Maranhão;
2: Doutorando, Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal do Maranhão;
3: Doutor, Análises Clínicas, Universidade de São Paulo; Professor Adjunto do Departamento de Farmácia da UFMA; Coordenador do Laboratório do Centro de Pesquisa Clínica do HU UFMA
- e) thianacl@hotmail.com, nivaniacamelo@yahoo.com.br, karlanadinne@hotmail.com, vandilson@hotmail.com, ragomesoliveira@gmail.com
- f) Todos os autores possuem currículo cadastrado na plataforma Lattes- CNPq;
- g) Thaiana da C. Lopes: análises laboratoriais, coleta de dados, redação do artigo;
Karla N. de S. Andrade: análises laboratoriais e coleta de dados; Nivânia L. Camelo: análises laboratoriais e revisão do artigo; Vandilson P. Rodrigues: análise estatística; Raimundo A. G. Oliveira: orientação, análises laboratoriais, redação e revisão do artigo
- h) Nada a declarar
- i) Centro de Pesquisa Clínica- Hospital Universitário da UFMA
- j) Thaiana da Costa Lopes.
Rua K, qd. 04, nº 18- Maranhão Novo. São Luís- MA. CEP: 65061-440.
(98)32361847, (98)88754330. thianacl@hotmail.com
- k) Os mesmos acima
- l) Fundo de Amparo à Pesquisa do Maranhão- FAPEMA
- m) 1.853 palavras
- n) 149 palavras
- o) 4 tabelas

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da expressão anômala mielóide na leucemia linfóide aguda em crianças e adolescentes acompanhadas em um hospital de referência em oncologia do estado do Maranhão, a partir de dados demográficos, laboratoriais e clínicos. Foram avaliados 65 pacientes menores de 18 anos com diagnóstico morfológico e imunofenotípico de LLA. Variáveis demográficas, laboratoriais (valores do hemograma, porcentagem de blastos no sangue e medula e expressão imunofenotípica dos blastos), obtidos no Laboratório de Pesquisa Clínica do Centro de Pesquisa Clínica do HU-UFMA, e clínicas obtidas a partir dos prontuários médicos do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB). A amostra foi dividida em grupos com e sem expressão anômala mielóide dos antígenos CD13 e/ou CD33 para análise com as variáveis prognósticas. A expressão mielóide ocorreu em 49,2% da amostra. A contagem de plaquetas foi estatisticamente inferior no grupo de crianças sem expressão anômala mielóide (33.627 plaquetas/mm³, p=0,01). Cerca de 90,0% das crianças com LLA-B sem expressão anômala mielóide apresentava menos de 50.000 plaquetas/mm³ (p=0,01). Conclui-se que a expressão anômala de marcadores mielóides é relativamente comum (49,2%) em menores de 18 anos com LLA, onde as crianças e adolescentes que apresentam expressão anômala do CD33 são mais velhas (9,4 anos) e que há associação entre os pacientes com expressão anômala de marcadores mielóides CD13 e/ou CD33 e um menor grau de plaquetopenia, representando menor risco de sangramentos durante o tratamento neste grupo.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the anomalous myeloid expression influence in acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents attending an oncology referral hospital in the state of Maranhão, from demographic, laboratory and clinical data. It was evaluated 65 patients under 18 years with morphological and immunophenotypical diagnosis of ALL. Demographic data, laboratory tests (blood count values, blasts percentage in blood and bone marrow and blast's immunophenotypic expression), obtained at the Clinical Research Laboratory of Clinical Research Center from HU-UFMA and clinical data were obtained from medical records at the Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB). The sample was divided into groups with and without aberrant expression of myeloid antigens CD13 and / or CD33 for analysis with prognostic variables. The myeloid expression occurred in 49.2% of the sample. The platelet count was significantly lower in children's group without myeloid aberrant expression (33,627 platelets/mm³, $p = 0.01$). About 90% of children with ALL-B without myeloid aberrant expression was less than 50.000 platelets/mm³ ($p = 0.01$). We conclude that aberrant expression of myeloid markers is relatively common (49,2%) in people less than 18 years with ALL, where children and adolescents who have aberrant expression of CD33 are older (9.4 years) and there is association between patients with aberrant expression of myeloid markers CD13 and / or CD33 and a lower degree of thrombocytopenia, representing a lower risk of bleeding during treatment in this group.

INTRODUÇÃO

A classificação imunológica das leucemias linfóides agudas (LLA) estabelece três grupos: LLA-B, LLA-T e LLA + My, caracterizando a LLA com expressão de antígenos mielóides, sem critério de escore para leucemia bifenotípica¹. Os blastos leucêmicos na LLA expressam antígenos de diferenciação linfóide com um padrão bem definido e com critérios já bem estabelecidos pela técnica de imunofenotipagem, através da utilização de anticorpos monoclonais específicos para esta linhagem². Entre esses marcadores, estão incluídos o CD13 e CD33, mais frequentemente associados à expressão anômala mielóide na LLA.

O CD13 está presente em todos os estágios de maturação dos mieloblastos aos granulócitos maduros, considerado, portanto, um marcador pan-mielóide. Já o CD33, chamado de marcador pan-LMA, está expresso nas unidades formadoras de colônias granulocítica, monocítica e eritrocítica, mieloblastos, promielócitos e mielócitos³.

Dentre os parâmetros laboratoriais utilizados como indicadores prognósticos, a análise da expressão de imunofenótipos aberrantes tem se destacado como um fator de influência na avaliação prognóstica de crianças com LLA⁴. Associações entre estas expressões incomuns e outras características biológicas da doença, como translocações cromossômicas e detecção de doença residual mínima já são bem estabelecidos⁵. Estudos apontam que a expressão imunofenotípica aberrante pode diminuir o tempo de remissão e sobrevida de crianças com LLA⁶.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da expressão mielóide na leucemia linfóide aguda em crianças e adolescentes acompanhadas por um hospital de referência em oncologia do estado do Maranhão, a partir de dados demográficos, laboratoriais e clínicos.

MÉTODOS

Estudo prospectivo com sessenta e cinco menores de 18 anos, de ambos os sexos, acompanhados pelo Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB) no período de janeiro de 2008 a setembro de 2011. Amostras de sangue periférico e medula óssea foram enviadas ao Laboratório do Centro de Pesquisa Clínica- Hospital Universitário - Universidade Federal do Maranhão (CEPEC-HU-UFMA) para diagnóstico morfológico/citoquímico e imunofenotípico baseado nos critérios FAB⁷ e EGIL¹, respectivamente. A técnica de imunofenotipagem e análise por citometria de fluxo baseou-se em metodologia já preconizada⁸. Os mesmos procedimentos foram realizados quando do envio da amostra no D29 (final da fase de indução do tratamento).

Foram avaliados dados na data do diagnóstico referentes à idade, leucometria, dosagem de hemoglobina, plaquetometria, percentual de blastos no sangue e em medula óssea. Ao D29, os pacientes foram avaliados e separados em dois grupos: remissão e não remissão ou óbito. Foi considerada remissão quando os pacientes apresentaram menos de 5% de blastos na medula óssea avaliada sob critérios morfológicos e imunofenotípicos e não remissão quando os blastos representaram mais de 5%. Estes dados foram determinados no Laboratório do CEPEC-HUUFMA durante o período de estudo. A classificação em grupos de risco ao diagnóstico baseou-se no protocolo GBTLI-99⁹.

A expressão anômala mielóide foi caracterizada quando a população de blastos por citometria de fluxo apontou, além dos marcadores que caracterizam a LLA, a expressão do CD13 e/ou CD33, e excluído critérios para bifenotípicas. Os pacientes foram divididos nos grupos com (LLA/My+) e sem expressão anômala mielóide (LLA/My-) e relacionados com as variáveis demográficas, laboratoriais e clínicas citadas.

Para análise estatística, realizada pelo software estatístico Epi-Info, utilizaram-se os testes Exato de Fischer e o teste de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). O presente foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HU - UFMA sob parecer consubstanciado nº 115/2008. Os pais ou responsáveis dos participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

RESULTADOS

Dos sessenta e cinco pacientes, 32 (49,2%) expressaram pelo menos um antígeno mielóide (CD13 ou CD33), enquanto 33 (50,8%) não apresentaram nenhum dos dois marcadores. A relação entre LLA/My+ e LLA/My- e as variáveis em estudo apontou resultado estatisticamente significante para plaquetas ($p=0,01$), indicando um valor médio inferior no grupo de crianças sem expressão anômala mielóide ($33.627/\text{mm}^3$) frente ao grupo que apresentou este marcador ($71.959/\text{mm}^3$). As demais variáveis não apresentaram resultado significativo (Tabela 1).

A partir da estratificação dos dados laboratoriais leucócitos, hemoglobina e plaquetas, a maioria das crianças com imunofenótipo B apresentava menos de 10.000 leucócitos/ mm^3 (48,1% para LLA-B/My+ e 66,7% para LLA-B/My-). Já na LLA-T, nenhum paciente apresentou menos de 10.000 leucócitos/ mm^3 , porém 60% dos pacientes LLA-T/My+ e 50% dos LLA-B/My- apresentaram hiperleucocitose com mais de 50.000 leucócitos/ mm^3 . Não houve resultado significativo nesta análise ($p>0,05$) (Tabela 2). A maioria dos indivíduos com LLA-B apresentava anemia moderada, indicada pelo valor de hemoglobina entre 7-10 g/dL, tanto no grupo com expressão anômala (63,0%) quanto no grupo sem esta expressão imunofenotípica (55,9%). Já na LLA-T, 40,0% das crianças com a expressão My+ e 50% daquelas com expressão My- estavam neste estrato de dosagem de hemoglobina. Também nesta análise, os valores de p não foram significativos ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Apenas um paciente (3,7%) com LLA-B/My- apresentava mais de 100.000 plaquetas/ mm^3 , enquanto sete (25,9%) para o grupo LLA-B/My+ estavam nesse estrato. Quando avaliada a contagem de plaquetas, encontrou-se $p=0,01$, indicando significância entre os pacientes com LLA-B/My- e os pacientes LLA-B/My+. O mesmo não foi observado nos pacientes com LLA-T (Tabela 2), muito embora nossa casuística tenha sido pequena para esse tipo imunológico de leucemia. Esse resultado foi ressaltado na tabela 3, onde, a partir dos valores médios de leucócitos, hemoglobina e plaquetas, pode-se observar que o valor de p na avaliação de

plaquetas entre LLA-B/My+ e LLA/BMy- foi igual a 0,02, apresentando o grupo LLA-B/My+ um valor médio de 72.274 plaquetas/mm³ superior à média de plaquetas na LLA-B/My-, que foi de 27.726 plaquetas/mm³ (Tabela 3).

Ao analisar a expressão independentemente do CD13 e o CD33, dos 32 pacientes LLA/My+, apenas um não expressou o marcador CD13, o qual foi positivo em 96,9%, portanto apenas o CD33 teve representatividade estatística, com frequência de 21,9% entre os pacientes LLA/My+. Na análise deste marcador com as variáveis, identificou-se valor de significativo na avaliação da idade, onde crianças com expressão do CD33 eram estatisticamente mais velhas (9,4 anos) frente àquelas sem expressão deste marcador (6 anos), com valor de $p = 0,01$ (Tabela 4).

DISCUSSÃO

A frequência de expressão anômala na LLA identificada no presente estudo (49,2%) aproxima-se daquela identificada no Brasil⁵, com 46,67%, e em demais localidades^{6,10,11}, com 49%, 52,4% e 53,2%, respectivamente. Outros autores brasileiros apontam uma frequência em torno de 31%¹². Encontram-se ainda frequências menores que variam de 22% a 27%^{4,13,14}. Tais resultados discordantes podem ser devidos à já conhecida influência genética no imunofenótipo das leucemias⁵, considerando crianças avaliadas em diferentes localidades.

Estudos sobre a influência prognóstica da expressão mielóide anômala na LLA são controversos. Por um lado, alguns descartam o significado prognóstico independente da LLA/My+¹⁵. Outros apontam a existência desta relação, principalmente associado com a redução do tempo da primeira remissão, indicando um péssimo prognóstico^{6,16}.

Excluindo o estudo do tipo imunológico de LLA (B ou T), poucos trabalhos avaliam a relação da expressão anômala mielóide com as variáveis ao diagnóstico da LLA. Idade, sexo, morfologia FAB dos blastos e percentual de blastos em sangue periférico, contagem de leucócitos e dosagem de hemoglobina, assim como resultados encontrados na literatura⁶, não foram significativos no presente estudo. Em ambos os estudos os resultados foram semelhantes nos dois grupos (anômalos e não anômalos), exceto no valor médio de leucócitos que neste estudo foi menor (35.109 leucócitos/mm³ para grupo com expressão anômala e 29.719 leucócitos/mm³ para o grupo sem expressão anômala).

Assim como no presente estudo, outros autores¹¹ também não encontraram diferença estatística entre os grupos e a morfologia dos blastos. Porém, outros estudos relatam a associação entre a expressão anômala e a morfologia blástica L2¹³. O grupo de risco, D29, o percentual de blastos no sangue periférico e na medula óssea também não foram significativos no presente estudo, porém a

contagem deste último na análise dos dois grupos aproximou-se muito da significância ($p=0,05$), com maior contagem de blastos na medula óssea para o grupo com expressão anômala (81,6%). Avaliando-se estas variáveis, encontra-se apenas estudo com adultos, onde se identificou uma contagem de blastos em sangue periférico superior no grupo não anômalo¹⁷.

Na análise do perfil imunológico da LLA, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o fenótipo B ou T, igualmente referido por outros autores^{10,18}. Já foram relatados a ausência da expressão anômala na LLA-T⁴ e o significado clínico positivo do fenótipo aberrante na LLA-B na avaliação da doença residual mínima (DRM)¹⁹, importante parâmetro utilizado para avaliar os riscos de recidiva após a primeira fase de indução no tratamento da LLA. A maior ocorrência da expressão mielóide na LLA-B deve-se a translocações cromossômicas e fusões gênicas aberrantes, frequentemente observadas em células progenitoras da linhagem B em crianças, o que não se observa em adultos²⁰.

Ressalta-se no presente estudo o valor significativo na análise das plaquetas. (33.627 plaquetas/mm³ no grupo sem expressão anômala mielóide e 71.959 plaquetas/mm³ no grupo com este marcador, $p=0,01$). Alguns autores¹² não encontraram diferença estatística nesta análise no estado do Paraná, resultado observado também em outros estudos^{4,6,13}. Resultado semelhante ao encontrado neste estudo foi identificado em pesquisa com adultos, também com valor médio de plaquetas superior no grupo positivo para a expressão mielóide¹⁷.

A partir da estratificação dos valores de plaquetas, observou-se um valor de $p=0,01$ para crianças com LLA-B, com maior número de indivíduos com LLA-B/My- (88,9%) com menos de 50.000 plaquetas/mm³ e apenas 3,7% apresentavam mais de 100.000/mm³. Das crianças com LLA-B/My+, 55,6% apresentavam menos de 50.000 plaquetas/mm³ e 25,9% mais de 100.000/mm³. Tal diferença não foi observada em crianças com LLA-T, provavelmente pelo pouco número de amostra ($n=11$). A diferença significativa foi confirmada na LLA-B a partir da avaliação do valor médio de plaquetas, que na LLA-B/My+ foi estatisticamente superior (72.274 plaquetas/mm³) quando comparado à LLA-B/My- (27.726 plaquetas/mm³) ($p=0,02$).

A contagem de plaquetas na condução de tratamento de crianças com LLA é importante. Considerando o tempo de vida das plaquetas na circulação (8 a 10 dias), quanto menor a contagem de plaquetas ao diagnóstico no sangue de pacientes com leucemia aguda, maior poder proliferativo do clone leucêmico²¹. Além disso, número inferior a 50.000 plaquetas/mm³ em pacientes com infecção presente, em virtude da alteração na fragilidade capilar secundária ao processo inflamatório, poderão ocasionar hemorragias, caracterizadas por epistaxe, sangramento gengival e gastrointestinal, e algumas vezes no sistema nervoso central, o que leva a necessidade de terapia transfusional como suporte no tratamento à criança com LLA⁹.

O CD33 pode estar expresso em cerca de 10% das LLAs de células B precursoras, e no adulto com LLA, a presença de CD13 refere a um pior prognóstico³. No presente estudo, a expressão anômala mielóide ocorreu principalmente pela expressão do CD13. Já o CD33 variou entre as crianças LLA/My+, o qual apresentou diferença significativa na análise da idade, traduzindo, portanto, o perfil epidemiológico da expressão anômala em crianças maranhenses com LLA, indicando os marcadores mais frequentes para cada faixa etária.

Nossos resultados apontam que as crianças e adolescentes com LLA e expressão anômala do CD33 são mais velhas (9,4 anos) frente àquelas sem expressão deste marcador (6 anos). Também demonstram que a expressão anômala mielóide dos marcadores CD13 e/ou CD33 na LLA em nosso estado está associada à plaquetopenias de menor intensidade, o que por si só representa menor risco de sangramento durante o tratamento. Considerando que as plaquetas tem significado prognóstico na LLA, as crianças sem expressão anômala dos marcadores CD13 e CD33 podem ter pior prognóstico frente às crianças que apresentam estes antígenos. A expressão do CD13 é mais freqüente na LLA/My+, tendo o CD33 importância significativa na estratificação dos pacientes por idade.

Os dados obtidos podem contribuir para melhorias nas condutas médicas de tratamento da LLA infantil no Maranhão, avaliando, ainda no diagnóstico, os riscos proporcionados pela plaquetopenia em crianças sem expressão anômala mielóide. Além disso, permite o conhecimento epidemiológico sobre a expressão destes

marcadores anômalos, indicando o CD13 como marcador de maior frequência, caracterizando a LLA/My+ neste estado.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo.

REFERÊNCIAS

- ¹ Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposal for the immunological classification of acute leukemias: European Group for the Immunological characterization of leukemia (EGIL). *Leukemia*. 1995 Oct;9:1783-86.
- ² Hrusak O, MacDonald AP. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia*. 2002 July;16:1233-58.
- ³ Bacal NS, Faulhaber MH. *Aplicação prática em citometria de fluxo*. São Paulo: Atheneu, 2003.
- ⁴ Bhushan B, Chauhan PS, Saluja S, Verma S, Mishra AK, Siddiqui S, Kapur S. Aberrant phenotypes in childhood and adult acute leukemia and its association with adverse prognostic factors and clinical outcome. *Clin Exp Med*. 2010 Mar;10 (1):33-40.
- ⁵ Emerenciano M, Bossa Y, Zanrosso CW, Alencar DM, Campos MM, Dobbin J, Carriço K, Oliveira MSP. Frequência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas. *Rev bras cancerol*. 2004 Jun;50 (3):183-89.
- ⁶ Kurec AS, Belair P, Stefanu C, Barrett DM, Dubowy RL, Davey FR. Significance of Aberrant Immunophenotypes in Childhood Acute Lymphoid Leukemia. *Cancer*. 1991 Jun;67 (12):3081-86.
- ⁷ Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol*. 1976 Aug;33:451-58.
- ⁸ Zheng J, Wang X, Hu Y, Yang J, Liu J, He Y, Gong Q, Yao J, Li X, Du W, Huang S. A correlation study of immunophenotypic, cytogenetic, and clinical features of 180 AML patients in China. *Cytometry Part B*. 2008 Jan;74 (1):25–29.
- ⁹ Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica. GBTLI LLA-99: protocolo de tratamento da leucemia linfóide aguda em crianças. [Campinas], 2000.
- ¹⁰ Bachir F, Bennani S, Lahjouji A, Cherkaoui S, Harif M, Khattab M, Nassereddine I, Zafad S, El Aouad R. Characterization of Acute Lymphoblastic Leukemia Subtypes in Moroccan Children. *Int J Pediatr*. 2009 May;2009:1-7.
- ¹¹ Tanyeli A, Erbey F, Bayram I, Kömür M. Myeloid Antigen Positivity in Turkish Children With Acute Lymphoblastic Leukemia Lacks Influence on Prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010 Jun;11:1823-26.
- ¹² Silva IZ, Bom APKP, Parise GA, Malvezzi M, Watanabe FM, Carboni EK, Olandoski M. Expressão dos marcadores mielóides e prognóstico das leucemias linfóides agudas. *Pediatria*. 2004 Jul;26 (2):97-103.
- ¹³ Wiersma SR, Ortega J, Sobel E, Weinberg KI. Clinical importance of myeloid-antigen expression in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *N Engl J Med*. 1991 Mar;324 (12):800-08.

- ¹⁴ Shen HQ, Tang YM, Yang SL, Qian BQ, Song H, Shi SW, Xu WQ. Immunophenotyping of 222 children with acute leukemia by multi-color flow cytometry. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2003 May;41 (5):334-37.
- ¹⁵ Putti MC, Rondelli R, Cocito MG, Aricó M, Sainati L, Conter V, Guglielmi C, Cantú-Rajoldi A, Consolini R, Pession A, Zanesco L, Masera G, Biondi A, Basso G. Expression of myeloid markers lacks prognostic impact in children treated for acute lymphoblastic leukemia: Italian experience in AIEOP-ALL 88-91 studies. *Blood*. 1998;92:795-801.
- ¹⁶ Pui CH, Behm FG, Singh B, Rivera GK, Schell MJ, Roberts WM, Crist WM, Mirro JJr. Myeloid-Associated Antigen Expression Lacks Prognostic Value in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With Intensive Multiagent Chemotherapy. *Blood*. 1990;75 (1):198-202.
- ¹⁷ Vitale A, Guarini A, Ariola C, Meloni G, Perbellini O, Pizzuti M, De Gregoris C, Mettievier V, Pastorini A, Pizzolo G, Vignetti M, Mandelli F, Foà R. Absence of prognostic impact of CD13 and/or CD33 antigen expression in adult acute lymphoblastic leukemia. Results of the GIMEMA ALL 0496 trial. *Haematologica*. 2007 Mar;92 (3):342-48.
- ¹⁸ Rêgo MFN. Características das leucemias agudas em Teresina.[dissertação]. Campinas (SP):Universidade Estadual de Campinas; 2002. 100 p.
- ¹⁹ Seegmiller AC, Kroft SH, Karandikar NJ, McKenna RW. Characterization of Immunophenotypic Aberrancies in 200 Cases of B Acute Lymphoblastic Leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2009 Dec;132:940-49.
- ²⁰ Baruchel A, Cayula JM, Ballerini P, Landman-Parker J, Cezard V, Firat H, Haddad E, Aucler MF, Valensi F, Cayre YE, Macintyre EA, Sigaux F. The majority of myeloid-antigen-positive (My+) childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemias express TEL-AML1 fusion transcripts. *Br J Haematol*. 1997 Oct; 99 (1):101-06.
- ²¹ Oliveira RAG. Hemograma: como fazer e interpretar. São Paulo: Livraria Médica Paulista, 2007.

TABELA

Tabela 1 – Distribuição de pacientes com LLA/My+ e LLA/My- de acordo com as variáveis.

VARIÁVEIS	LLA/My+ (n=32)	LLA/My- (n=33)	Valor de p
Idade (X±DP)	6,8±4,1	6,2±4,7	0,22
Sexo (n; %)			0,42
Masculino	23; 71,9	22; 66,7	
Feminino	9; 28,1	11; 33,3	
Tipo de LLA (n; %)			0,52
LLA-B	27; 84,4	27; 81,8	
LLA-T	5; 15,6	6; 18,2	
Morfologia do blasto (n; %)			0,39
L1	30; 93,8	29; 87,9	
L2	2; 6,3	3; 9,1	
L3	0; 0	1; 3,0	
Grupo de risco (n; %)			0,33
Alto	15; 46,9	13; 39,4	
Baixo	17; 53,1	20; 60,3	
D29 (n; %)			0,22
Remissão	25; 78,1	22; 66,7	
Não remissão ou óbito	7; 21,9	11; 33,3	
Blasto MO (X±DP)	81,6±19,8	70,8±23,4	0,05
Blasto SP (X±DP)	50,3±35,0	43,0±32,2	0,37
Leucócitos/mm³ (X±DP)	35.109±40.999	29.719±42.773	0,31
Hemoglobina g/dl (X±DP)	8,4±2,1	8,1±2,4	0,53
Plaquetas/mm³ (X±DP)	71.959±72.552	33.627±30.442	0,01*

NOTA: LLA/My+ = leucemia linfóide aguda com expressão mielóide. LLA/My- = LLA sem expressão anômala mielóide; LLA-B = LLA subtipo imunológico B; LLA-T = LLA subtipo imunológico T; MO = medula óssea; SP = sangue periférico; D29 = último dia de indução do tratamento da LLA.

*Diferença estatística significativa (p<0,05)

Tabela 2 – Distribuição de pacientes com LLA-B e LLA-T com e sem expressão mielóide de acordo com dados hematológicos.

VARIÁVEIS	LLA-B (n=54)		Valor de p	LLA-T (n=11)		Valor de p
	My+ (n=27)	My- (n=27)		My+ (n=5)	My- (n=6)	
Leucócitos: (n;%)			0,38			0,60
<10.000/mm ³	13; 48,1	18; 66,7		0; 0	0;0	
10.000- 50.000/mm ³	8; 29,6	5; 18,5		2; 40,0	3; 50,0	
>50.000/mm ³	6; 22,2	4; 14,8		3; 60,0	3; 50,0	
Hemoglobina: (n;%)			0,64			0,67
<7 g/dl	6; 22,2	9; 33,3		2; 40,0	1; 16,7	
7-10g/dl	17; 63,0	14; 55,9		2; 40,0	3; 50,0	
>10g/dl	4; 18,8	4; 14,8		1; 20,0	2; 33,3	
Plaquetas: (n;%)			0,01*			0,88
<50.000/mm ³	15; 55,6	24; 88,9		3; 60,0	3; 50,0	
50.000-100.000/mm ³	5; 18,5	2; 7,4		1; 20,0	2; 33,3	
>100.000/mm ³	7; 25,9	1; 3,7		1; 20,0	1; 16,7	

NOTA: My+ = expressão anômala mielóide positiva; My- = expressão anômala mielóide negativa.
*Diferença estatística significativa (p<0,05)

Tabela 3 – Distribuição de pacientes com LLA-B com e sem expressão mielóide de acordo com dados hematológicos.

VARIÁVEIS	LLA-B/My+ (n= 27)	LLA-B/My- (n=27)	Valor de p
	(X±DP)	(X±DP)	
Leucócitos (/mm³)	30.796±41862	19.485±28525	0,19
Hemoglobina (g/dl)	8,44±1,78	7,98±2,37	0,29
Plaquetas (/mm³)	72.274±76576	27.726±21705	0,02*

NOTA: LLA-B/My+ = LLA-B com expressão anômala mielóide; LLA-B/My- = LLA-B sem expressão anômala mielóide.

*Diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Frequência, média e desvio-padrão das variáveis de acordo com a expressão anômala mielóide do marcador CD33 e respectivo valor de p.

VARIÁVEIS	LLA CD33+ (n=7)	LLA CD33- (n=25)	Valor de p
Idade (X±DP)	9,4±3,2	6,0±4,1	0,01*
Sexo (n; %)			0,65
Masculino	5; 71,4	18; 72,0	
Feminino	2; 28,6	7; 28,0	
Tipo de LLA (n; %)			0,29
LLA-B	5; 71,4	22; 88,0	
LLA-T	2; 28,6	3; 12,0	
Morfologia do blasto (n; %)			0,39
L1	6; 85,7	24; 96,0	
L2	1; 14,3	1; 4,0	
L3	0; 0	0; 0	
Blasto MO (X±DP)	86,0±12,3	79,7±21,5	0,41
Blasto SP (X±DP)	44,3±41,5	52,0±33,8	0,66
Leucócitos/mm³ (X±DP)	37.731±36.421	34.375±42.241	0,80
Hemoglobina g/dl (X±DP)	8,7±2,9	8,3±1,8	0,83
Plaquetas/mm³ (X±DP)	68.771±55.253	72.852±77.666	0,14
Grupo de Risco (n;%)			0,14
Alto	5; 71,4	10; 40,0	
Baixo	2; 28,6	15; 60,0	
D29 (n; %)			0,51
Remissão	6; 85,7	19; 76,0	
Não remissão ou óbito	1; 14,3	6; 24,0	

NOTA: LLA CD33+ (leucemia linfóide aguda com expressão do marcador mielóide CD33); LLA CD33- (leucemia linfóide aguda sem expressão do marcador mielóide CD33).

*Diferença estatística significativa ($P < 0,05$)

SEGUNDO ARTIGO CIENTÍFICO

Nome do Periódico: **Revista do Instituto Adolfo Lutz** (ISSN 1983-3814)

Qualificação WEBQUALIS da CAPES na área de avaliação MEDICINA II: B4

Lopes TC, Sarmiento LDM, Fróz RC, Marinho HT, Noronha EP, Oliveira RAG.
Avaliação do Programa Nacional de Triagem Neonatal para Hemoglobinopatias. Rev
Inst Adolfo Lutz. 2011;70 (3):417-21.

NOTA CIENTÍFICA/SCIENTIFIC NOTE

Avaliação do Programa Nacional de Triagem Neonatal para Hemoglobinopatias

Assessment of National Neonatal Screening Program for Hemoglobinopathies

RIALA6/1395

Thaiana da Costa LOPES¹, Leiliane Delgado Mahmud SARMENTO¹, Rosilene Cutrim FRÓZ², Heliana Trindade MARINHO¹, Elda Pereira NORONHA¹, Raimundo Antônio Gomes OLIVEIRA^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹ Laboratório de Pesquisa Clínica, Centro de Pesquisa Clínica, Hospital Universitário, Universidade Federal do Maranhão, Rua Almirante Tamandaré, 1, Centro, CEP: 65020-600, São Luís, MA, Brasil, e-mail: rago@usp.br

² Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais do Maranhão (APAE-MA)
Recebido: 07.02.2011 - Aceito para publicação: 13.09.2011

RESUMO

As hemoglobinopatias representam grave problema de saúde pública em virtude de alta frequência e pelas consequências fisiopatogênicas. No presente estudo foi avaliado o *Programa Nacional de Triagem Neonatal* para hemoglobinopatias no Maranhão no ano de 2008. Utilizando-se relatórios obtidos do serviço de referência e Secretaria de Saúde do Estado, foram analisados os dados da implantação do programa em todos os municípios maranhenses, bem como a consonância com o Ministério da Saúde quanto aos recursos humanos e divulgação do serviço. Na coleta das amostras, 60,4% das crianças tinham entre oito dias a um mês de idade. O tempo médio entre a coleta e o recebimento da amostra foi de 37 dias. Foram realizados 99.498 testes para hemoglobinopatias, dos quais 4,8% apresentaram perfis alterados. A alteração mais frequente foi o traço falciforme (1/25,4). A cobertura do programa foi de 81,57%. Conclui-se que há necessidade de melhorias no serviço de triagem quanto aos indicadores de gerenciamento, bem como maior atenção no diagnóstico e intervenção precoce das doenças hemoglobínicas que apresentam alta frequência no Maranhão.

Palavras-chave. recém-nascido, triagem neonatal, hemoglobinopatias.

ABSTRACT

Hemoglobinopathies represent a severe public health problem due to its high frequency and pathogenic consequences. This investigation aimed at evaluating the Neonatal Screening National Program for Hemoglobinopathies in Maranhão State, in 2008, by analyzing reports at disposal at public services and State Secretary of Health. The features analyzed were the program implementation in all of the cities of Maranhão and the consonance with the Federal Health Ministry for the human resources and the service disclosure. At the sample collection, 60.4% of children aged from eight days to one month. The mean period of time between the sample collection and its receipt was 37 days. A total of 99.498 hemoglobinopathies tests were carried out, and 4.8% of them showed abnormal profiles. The most frequent alteration was falciform trace (1/25.4). In 2008, the program coverage was of 81.57%. This study indicated the need in improving both the screening service and the management indicators, also to ameliorate the hemoglobin diseases diagnosis and the preventive intervention, considering the high frequency of these diseases in Maranhão State.

Keywords. newborn, neonatal screening, hemoglobinopathies.

As doenças falciformes representam o grupo de doenças hereditárias mais comuns no Brasil. Constituem-se num grupo de alterações genéticas caracterizadas pela presença de hemoglobina S (Hb S). As doenças falciformes mais freqüentes são a anemia falciforme (HbSS), as doenças SC, SD, SE (duplos heterozigotos) e outras mais raras, as quais fazem parte das hemoglobinopatias. Apesar das particularidades que distinguem as doenças falciformes e de graus variados de gravidade, todas essas doenças têm o perfil epidemiológico e de manifestações clínicas e hematológicas semelhantes¹.

De acordo com dados do *Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN)*, nascem atualmente no Brasil cerca de 3 mil crianças/ano com doença falciforme e 180 mil portadoras do traço falciforme. Está distribuída de forma heterogênea na população, sendo mais prevalente nos Estados que possuem maior concentração de afrodescendentes, com recorte social entre os mais pobres¹.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no Brasil, sem assistência específica, 25% dos portadores de anemia falciforme morrem antes dos 5 anos e 70% antes de completar os 25 anos de idade. Dessa forma, a melhor estratégia para o problema tão grave das hemoglobinopatias é o diagnóstico precoce por meio dos programas de triagem neonatal, que possibilitam a identificação dos portadores em tempo oportuno e a sua inclusão em programas de assistência especializada, o que reduz expressivamente a morbimortalidade da doença².

Os principais objetivos do *PNTN* consistem na busca da cobertura de 100% dos nascidos vivos e a definição de uma abordagem mais ampla da questão, determinando que o processo de triagem neonatal envolva várias etapas, tais como: a realização do exame laboratorial, a busca ativa dos casos suspeitos, a confirmação diagnóstica, o tratamento e o acompanhamento multidisciplinar especializado dos pacientes. Procura-se, dessa forma, criar mecanismos para que seja alcançada a meta principal, que é a prevenção e redução da morbimortalidade provocada pelas patologias triadas².

A partir dos aspectos demonstrados e da constatação da inexistência de trabalhos prévios sobre o perfil do *Programa de Triagem Neonatal para Hemoglobinopatias no Maranhão*, faz-se necessária a realização de estudos descrevendo e analisando as características desse programa, bem como os resultados por ele obtidos. Assim, a presente pesquisa visa demonstrar o perfil de funcionamento desse programa

no Maranhão no ano de 2008, bem como elucidar as freqüências de hemoglobinas variantes nesse Estado.

Este trabalho trata-se de um estudo descritivo do tipo transversal baseado no banco de dados do Serviço de Referência de Triagem Neonatal do Maranhão, localizado na Associação dos Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE), em São Luís, Maranhão, Brasil, tendo como amostra todos os recém-nascidos que realizaram o teste de triagem neonatal na rede de coleta conveniada no período de janeiro a dezembro de 2008.

Os dados foram obtidos a partir de relatórios fornecidos pelo banco de dados do serviço de referência. Foram analisados dados referentes ao serviço de triagem neonatal preconizados pelo *Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal (2002)*, como: número de postos de coleta do estado, o fluxo de exames por mês, número estimado de crianças nascidas vivas no Estado, número de crianças testadas pelo serviço, idade das crianças na primeira coleta e indicadores de gerenciamento (intervalo médio de tempo entre a coleta e o envio de amostras ao laboratório e intervalo médio de tempo entre a coleta e entrega/ retirada dos resultados às famílias). Para o cálculo da cobertura foi utilizada a seguinte fórmula: n° de crianças testadas / n° de crianças nascidas vivas x 100.

O método utilizado para a pesquisa de hemoglobinas é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE\HPLC), por meio do aparelho denominado VARIANT Sickle TM Cell Short Program (BioRad Laboratories), que utilizando o programa Sickle Cell identifica as hemoglobinas F, A, S, D, C e E. O perfil de hemoglobinas é determinado como normal (FA\AA) ou alterado (heterozigose simples: FAS\AS, FAC\AC, FAD\AD; homozigose: FCC\CC, FSS\SS; dupla heterozigose: FSC\SC e hemoglobinas variantes raras: HBV). A hemoglobina fetal (F) apresenta-se praticamente em todas as amostras, pois segundo Oliveira e Poli-Neto³, trata-se de um importante subtipo de hemoglobina da vida fetal, que após o nascimento deve ser totalmente substituída pela hemoglobina A aos seis meses de vida.

Para a avaliação da cobertura do programa, foram utilizados dados referentes ao número de nascidos vivos do ano de 2008, indicados pelo Sistema Nacional de Nascidos Vivos (SINASC), cujos dados foram obtidos pela Secretaria Estadual de Vigilância Epidemiológica do Maranhão. Dados do serviço de referência correspondente aos anos anteriores não foram utilizados devido o mesmo não dispor de informações

de todas as variáveis analisadas nesta nota científica. Até o término deste estudo, o SINASC dispunha de consolidado completo somente até o ano de 2008, fatos que justificam o recorte temporal do trabalho.

A pesquisa, desenvolvida dentro dos padrões éticos segundo a Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196/96 e suas complementares, foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão sob o nº 6192/09 em 10 de junho de 2010.

Os resultados encontrados apontam o Maranhão na "Fase II" do *Programa Nacional de Triagem Neonatal*, encarregando-se da triagem para fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito e hemoglobinopatias. A APAE de São Luís é responsável por toda a cobertura do "testes do pezinho" do Estado do Maranhão e conta com o serviço complementar do Hemocentro do Maranhão (HEMOMAR).

O SRTN segue o fluxograma de triagem até o primeiro tratamento do usuário identificado com perfil alterado, de acordo com a Figura 1. As estratégias utilizadas para a capacitação de recursos humanos que trabalham na coleta de amostras envolvem treinamento com enfermeiros e técnicos uma vez ao ano na APAE São Luís, além de seminários de capacitação nas macrorregiões estaduais quando solicitados pelo Ministério da Saúde.

Para o atendimento de pacientes com anemia falciforme, a equipe é constituída de assistente social, enfermeiro, médico hematologista, pediatra e médico geneticista.

Todos os 217 municípios que compõem o Estado do Maranhão estão conveniados ao *PNTN*, dispondo de um total de 377 postos de coleta, indicando uma média de 1,72 postos por município.

Durante a coleta da amostra para triagem neonatal, a maior parte dos recém-nascidos (60,4%) estava na faixa etária entre oito dias e um mês. O restante correspondia aos recém-nascidos com idade até sete dias após o nascimento (31,5%) e com mais de 30 dias de vida (8,1%). O tempo médio entre a coleta e a chegada da amostra no serviço para a realização dos testes foi de 22 dias e entre a coleta e o recebimento do resultado pela família foi de 37 dias, incluindo a emissão do laudo.

O número total de análises para pesquisa de hemoglobinas realizadas pela APAE foi de 99.498, correspondendo a uma média de 8.291,5 testes por mês. Como resultado, 94.136 amostras apresentaram perfil normal de hemoglobinas (FAA\AA), correspondendo à 94,6% da população analisada, enquanto 4.798 amostras (4,8%) apresentaram perfil alterado. As demais 564 amostras (0,60%) correspondem às amostras inconclusivas, não eluentes e os casos em que houve necessidade de reconvocação para nova coleta.

Entre as amostras alteradas, 4.618 (96,2%) indicam heterozigose simples, 26 (0,5%) dupla heterozigose, 65 amostras (1,4%) em homozigose e 89 hemoglobinas variantes raras (1,9%).

Na Tabela 1 estão representadas as frequências de cada perfil hemoglobinico alterado encontrados na população analisada.

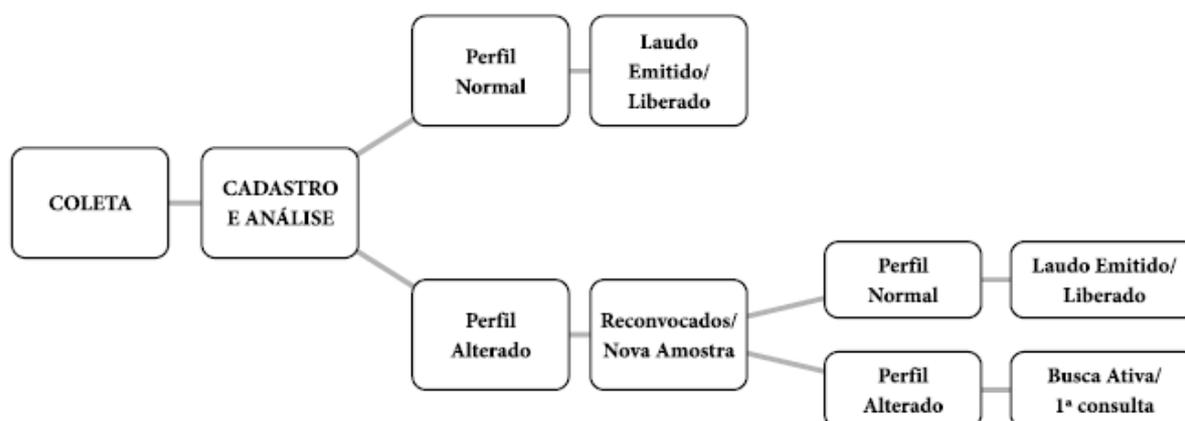


Figura 1. Fluxograma de atendimento do PNTN no Maranhão.

Lopes TC, Sarmiento LDM, Fróz RC, Marinho HT, Noronha EP, Oliveira RAG. A Avaliação do Programa Nacional de Triagem Neonatal para Hemoglobinopatias. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2011;70(3):417-21.

Tabela 1. Número, porcentagem e frequência dos diferentes perfis de hemoglobinas diagnosticadas pelo PNTN no Maranhão no ano de 2008

Perfis de HB	Nº	%	Frequência
Heterozigose simples			
FAS/AS	3.917	4,96	1/25,4
FAC/AC	656	0,66	1/151,7
FAD/AD	45	0,05	1/ 2. 211
Homozigose			
FSS/SS	62	0,06	1/ 1.604
FCC/CC	3	0,003	1/ 33.168
Dupla Heterozigose			
FSC/SC	26	0,03	1/ 3.826
HBV raras	89	0,09	1/ 1.117

O número de crianças nascidas vivas no Maranhão em 2008 foi de 121.981, segundo dados do Sistema Nacional de Nascidos Vivos (SINASC). Considerando o número de crianças triadas para a pesquisa de hemoglobinas (99.498), a cobertura do PNTN no Maranhão no ano de 2008 foi de 81,57%.

Observa-se que as atividades realizadas pela APAE-MA relacionadas ao fluxograma, à composição e capacitação da equipe, além da divulgação das informações referentes à triagem neonatal condizem com as normas técnicas e rotinas operacionais do PNTN, bem como a constituição da equipe multiprofissional, o número de postos por município estão em conformidade com a Portaria nº 822/014. A idade das crianças na coleta e o tempo médio para análise e liberação do resultado constituem parâmetros a serem priorizados pelo programa de triagem no Maranhão, uma vez a maioria dos recém-nascidos estava com idade na faixa tolerável pelo PNTN, além de terem recebido seus resultados de exames após um mês da data da coleta. Deve-se considerar que os portadores de anemia falciforme são assintomáticos nos primeiros seis meses de vida, devido à presença de hemoglobina fetal (HbF), cuja capacidade protetora impede a manifestação dos sinais e sintomas da doença⁵. Um diagnóstico precoce e eficaz, portanto pode favorecer ao paciente uma intervenção adequada e em tempo hábil.

A frequência de heterozigotos do gene da hemoglobina S encontrada neste trabalho é observada na estimativa de muitos autores, concluindo que essa doença hereditária constitui um problema de saúde pública em nosso país. Os indivíduos com perfil FAS/AS, mesmo sendo considerados não patológicos requerem acompanhamento clínico e em algumas situações, intervenção terapêutica⁶.

Já os indivíduos portadores do fenótipo SS e SC, que juntos apresentaram uma frequência de 1/1.130,7, possuem inúmeras alterações fisiopatológicas, por isso a necessidade de tratamento adequado e intervenção precoce⁷. Como mostra a Tabela 1, existe ainda uma elevada frequência de hemoglobinas variantes raras, apresentando-se maior do que a frequência para o perfil FSS/SS. Segundo a literatura, atualmente existem mais de 900 variantes estruturais de hemoglobinas descritas⁸ que, devido à limitação dos tipos de hemoglobinas variantes diagnosticados nos serviços de triagem, não podem ser caracterizadas.

Diversas medidas podem ser adotadas visando à dispersão de perfis hemoglobínicos alterados. O aconselhamento genético apresenta-se como uma medida preventiva em um contexto de educação, pois pode contribuir para reduzir a incidência a partir da geração de filhos de pais heterozigotos⁶, além de impedir futuramente indivíduos portadores de anemias hemolíticas crônicas e incuráveis, embora tratáveis⁷.

Embora o regimento da portaria preconize um compromisso formal de 100% de cobertura dos nascidos vivos em cada estado, o PNTN no Maranhão, cuja cobertura foi de 81,57%, mostra-se apto para mudança para a "Fase III", em que se exige uma cobertura mínima de 70%.

Este trabalho reforça o significado dos programas de triagem, além de retratar o perfil hemoglobínico do Estado do Maranhão em 2008. Por meio da avaliação do programa maranhense, podemos evidenciar que, embora o serviço não tenha obtido 100% de cobertura, garante o diagnóstico de 81,57% dos nascidos vivos, possuindo além do nível mínimo exigido pela Portaria nº 822/01. Outros aspectos concordantes com a portaria são a equipe de atendimento e os procedimentos diagnósticos.

Lopes TC, Sarmiento LDM, Fróz RC, Marinho HT, Noronha EP, Oliveira RAG. A Avaliação do Programa Nacional de Triagem Neonatal para Hemoglobinopatias. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2011;70(3):417-21.

No entanto, parâmetros de qualidade como idade da criança na coleta, tempo entre a coleta da amostra e a entrega dos resultados são ainda problemas críticos nesse Serviço. Estudos prospectivos são necessários a fim de acompanhar os parâmetros avaliados neste estudo e dessa forma avaliar a qualidade no Estado.

Conclui-se que o Maranhão apresenta uma elevada frequência de hemoglobinas variantes, sendo mais preocupante o número de indivíduos tanto heterozigotos quanto homozigotos para hemoglobina S, o que torna necessária maior atenção nas estratégias epidemiológicas como incentivo às famílias sobre a importância da triagem neonatal, melhorias no serviço do *PNTN* desde o diagnóstico precoce e eficaz até o tratamento, além de aconselhamento genético e capacitação das equipes de serviços de unidades de saúde para atendimento de indivíduos em crise. Atenção também deve ser dedicada às pesquisas e às metodologias eficazes que identifiquem as hemoglobinas variantes raras, considerando a alta frequência encontrada neste estudo.

AGRADECIMENTOS

À Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais do Maranhão (APAE-MA) e à Secretaria de Saúde do Estado do Maranhão (SES-MA).

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Autocuidado na Doença Falciforme. (Manual de Educação em Saúde, v. 1). Brasília: Ministério da Saúde; 2008.
2. Ministério da Saúde. Manual de normas técnicas e rotinas operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.
3. Oliveira RAG, Poli Neto A. Anemias e leucemias: conceitos básicos por diagnóstico e técnicas laboratoriais. 1ª ed. São Paulo: Roca; 2004.
4. Ministério da Saúde. Portaria nº GM 822. Institui o Programa Nacional de Triagem Neonatal, no âmbito do Sistema Único de Saúde, para fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, fibrose cística e hemoglobinopatias. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF; 6 jun. 2001.
5. Daudt LE, Zechmaister D, Portal L, Camargo Neto E, Silla LMR, Giugliani R. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2002;18(3):833-41.
6. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. Brasília, DF: Anvisa; 2002.
7. Fisher GB, Rathke CAF, Friedrish JR, Job FM. Características clínicas dos portadores de hemoglobinopatias. *J Bras Med São Paulo*. 1999;77:39-42.
8. Hardison RC, Chui DH, Giardine B, Riemer C, Patrinos GP, Anagnou N et al. HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum Mutat*. 2002;19(3):225-33.