

Vanessa Mengatto

**IMPLANTAÇÃO DA ANÁLISE DO CONTEÚDO DE DNA POR
CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO DO
PROGNÓSTICO DE HEMOPATIAS MALIGNAS NOS
PACIENTES ATENDIDOS PELO SERVIÇO DE
HEMATOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

Dissertação submetida ao Programa de
Mestrado Profissional Multidisciplinar
em Saúde da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre Profissional
Multidisciplinar em Saúde.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria Cláudia
Santos da Silva

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mengatto, Vanessa

IMPLANTAÇÃO DA ANÁLISE DO CONTEÚDO DE DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO DO PROGNÓSTICO DE HEMOPATIAS MALIGNAS NOS PACIENTES ATENDIDOS PELO SERVIÇO DE HEMATOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA / Vanessa Mengatto ; orientador, Maria Cláudia Santos-Silva - Florianópolis, SC, 2014.

77 p.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Saúde.

Inclui referências

1. Saúde. 2. Análise do conteúdo de DNA. 3. Aneuploidia. 4. Hemopatias malignas. 5. Iodeto de propídeo. I. Santos-Silva, Maria Cláudia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Saúde. III. Título.

Vanessa Mengatto

**IMPLANTAÇÃO DA ANÁLISE DO CONTEÚDO DE DNA POR
CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO DO
PROGNÓSTICO DE HEMOPATIAS MALIGNAS NOS
PACIENTES ATENDIDOS PELO SERVIÇO DE
HEMATOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre Profissional em Saúde, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado Profissional Multidisciplinar em Saúde.

Florianópolis, 27 de março de 2014.

Prof.^a Katia Cilene Godinho Bertoncello, Dr.^a
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Maria Cláudia Santos da Silva, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Maria Luiza Bazzo, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Ana Carolina Rabello de Moraes, Dr.^a.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Sharbel Weidner Maluf, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

À minha família, que, com muito carinho e apoio, não medem esforços para que eu concretize meus sonhos;

Ao Bruno, pelo amor, carinho, companheirismo, paciência e por sua capacidade de me acalmar nos momentos de ansiedade;

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Cláudia Santos da Silva, pela oportunidade, disponibilidade e pelos seus ensinamentos que foram indispensáveis para o meu crescimento acadêmico e profissional;

Às minhas amigas de Graduação, Daniela, Camila, Ciana, Katiúscia e Fernanda pela amizade, mesmo distante;

Aos amigos do LOEH e LBMM, pela amizade, pela conversa descontraída e pela ajuda científica, em especial, para Renata, Pâmela, Chandra, Íris, Manoela, Kauê, Lorena, Daiane e Prof.^a Dr.^a Ana Carolina;

Aos amigos do Laboratório de Patologia do CEPON, pela amizade, pela ajuda profissional e pela compreensão;

Às minhas amigas de residência/ mestrado, pela amizade e pela ajuda e incentivo mútuos;

À Prof.^a Dr.^a Joanita Ângela Gonzaga Del Moral, pela disposição e contribuição em relação aos dados clínicos;

Aos amigos do Hospital Universitário, pelos ensinamentos durante à residência/ mestrado;

Ao Hospital Universitário e a UFSC, pela infraestrutura e oportunidade para a realização deste estudo;

Ao Programa de Mestrado Profissional Multidisciplinar em Saúde da UFSC, pela oportunidade de desenvolvimento do mestrado profissional;

A todas as pessoas que me ajudaram durante essa fase, obrigada!

RESUMO

Os cânceres são doenças que apresentam expansão clonal descontrolada de células somáticas, promovendo a ruptura da organização tecidual. O genoma humano possui inúmeros mecanismos de proteção de sua integridade. Quando não ocorre a reparação dos danos no DNA, podem ocorrer desequilíbrios genéticos; entre esses, as aneuploidias, as quais são boas indicadoras da presença de neoplasia, assim como, podem sugerir o prognóstico em vários tumores. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a classificação dos tumores dos tecidos hematopoético e linfóide deve ser baseada em uma abordagem diagnóstica com ênfase nos seguintes parâmetros: morfológico, fenotípico, genotípico e características clínicas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi implantar a análise do conteúdo de DNA, por citometria de fluxo, para avaliação do prognóstico de hemopatias malignas nos pacientes atendidos pelo Serviço de Hematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. Para atingir o objetivo, inicialmente a metodologia foi padronizada com células de sangue periférico de oito indivíduos sem neoplasias hematológicas. Após essa etapa, foram iniciados os testes com amostras de medula óssea, sangue periférico, e aspirados e biópsias de linfonodo de pacientes que apresentaram células patológicas no exame imunofenotípico, entre os meses de maio e dezembro de 2013. Na padronização da metodologia, foi estabelecida a utilização de anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados ao fluorocromo FITC para não ocorrer interferência com a faixa de emissão da fluorescência do iodeto de propídeo (PI). Os AcMo padronizados para cada doença foram: CD20 e CD22, para Leucemia Linfoblástica Aguda do tipo B (LLA-B) e linfomas; CD 7 para Leucemia Linfoblástica Aguda do tipo T (LLA-T); e CD38, para Mieloma Múltiplo (MM) – todos conjugados ao fluorocromo FITC. No total, foram analisadas 25 amostras de pacientes que apresentaram células patológicas no exame imunofenotípico. A maior quantidade de amostras foi proveniente de pacientes com linfoma – principalmente Linfoma de Burkitt e Linfoma de Células do Manto –, os quais apresentaram 73,3% de presença de aneuploidias. Além disso, também foram analisadas amostras com células de LLA e MM. As LLAs exibiram 100% de presença de aneuploidias; enquanto o MM, 25%. A partir deste estudo, foi possível padronizar a metodologia para análise do conteúdo de DNA de linfomas, LLA e MM. Os resultados encontrados indicam que a citometria de fluxo é um bom método para

auxiliar na estimativa do prognóstico dos pacientes diagnosticados com neoplasias hematológicas.

Palavras-chave: Análise do conteúdo de DNA; Aneuploidia; Hemopatias malignas; Iodeto de propídeo.

ABSTRACT

Cancers are diseases with uncontrolled clonal expansion of somatic cells that promotes breakdown of tissue organization. The human genome has numerous mechanisms to protect its integrity. When the DNA damage repair does not occur, genetic imbalances can happen; among them, the aneuploidies, which are good indicators of malignancy, and may suggest a prognosis in several tumors. According to the World Health Organization (WHO), the classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues should be based on a diagnostic approach with emphasis on the following parameters: morphological, phenotypic, genotypic and clinical characteristics. Therefore, the aim of this study was to implement the analysis of DNA content by flow cytometry in order to assess the prognosis of hematological malignancies in patients treated by the Hematology Service at University Hospital of Universidade Federal de Santa Catarina. Initially, the methodology was standardized with peripheral blood cells of individuals without hematologic malignancies. After, it was performed the tests with samples of bone marrow aspirates, peripheral blood, and lymph node aspirates and biopsies from patients with pathological cells in immunophenotyping, between May and December 2013. During the development of standardized methodology, it was established the use of monoclonal antibodies (MoAb) conjugated to FITC fluorochrome to prevent the interference with the emission range of propidium iodide (PI) fluorescence. The MoAb standardized for each disease were: CD20 and CD22 for B- Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) and lymphomas; CD7 for T- Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL), and CD38 for Multiple Myeloma (MM) - all conjugated to FITC fluorochrome. A total of 25 samples obtained from patients with pathological cells in immunophenotyping were analyzed. The largest number of samples came from patients with lymphomas, especially Burkitt Lymphoma and Mantle Cell Lymphoma, which showed 73.3% of aneuploidy. Moreover, samples with ALL cells and MM cells were also analyzed. ALL showed the presence of 100% aneuploidy, while the MM, 25%. By the present study, it was possible to standardize the methodology for analysis of DNA content of lymphoma, ALL and MM. The results indicate that flow cytometry is a good method to assist the estimation of prognosis of patients diagnosed with hematological malignancies.

Keywords: Analysis of DNA content; Aneuploidy; Hematological malignancies; Propidium iodide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fases do ciclo celular.	25
Figura 2 – Gráfico representativo da padronização da localização das células de sangue periférico nos eixos x e y dos <i>dot plots</i>	40
Figura 3 – Gráfico representativo da padronização da marcação celular com anticorpos monoclonais e iodeto de propídeo em células de sangue periférico.	42
Figura 4 – Figura ilustrativa de um caso de LLA-T que demonstra a estratégia de análise do conteúdo de DNA em amostra de medula óssea.	45
Figura 5 – Figura ilustrativa de um caso de Linfoma de Burkitt que demonstra a estratégia de análise do conteúdo de DNA em amostra de medula óssea.	47
Figura 6 – Figura ilustrativa de um caso de mieloma múltiplo que demonstra a estratégia de análise do conteúdo de DNA em amostra de medula óssea.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMo – Anticorpo Monoclonal
APC – Aloficocianina
BSA – Albumina de Sora Bovino
CD – Grupo de Diferenciação (do inglês, *Cluster of Differentiation*)
CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
DACL – Divisão de Análises Clínicas
DI – Índice de DNA
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DRM – Doença Residual Mínima
DP – Desvio-padrão
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EROS – Espécies Reativas de Oxigênio
Fase G0 – Período de quiescência do ciclo celular
Fase G1 – Período de intérfase celular - fase pré-síntese de DNA
Fase G2 – Período de preparação para a mitose – fase pós-síntese de DNA
Fase M – Período de mitose do ciclo celular
Fase S – Período de síntese de DNA
FITC – Isotiocianato de Fluoresceína (do inglês, *Fluorescein Isothiocyanate*)
FL1 – Detector de fluorescência 1
FL2 – Detector de fluorescência 2
FSC – Dispersão de luz frontal (do inglês, *Foward Scatter*)
G0/G1 – Período compreendido entre o repouso e a intérfase celular
G1/S – Período compreendido entre a intérfase e a síntese de DNA
G2/M – Período compreendido entre a preparação para a mitose e a mitose
HU – Hospital Universitário
IFM – Intensidade de Fluorescência Média
IgH – Cadeia pesada da imunoglobulina
IgM – Imunoglobulina M
LB – Linfoma de Burkitt
LDGCB – Linfoma Difuso de Grandes Células B
LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-B – Leucemia Linfoblástica Aguda do tipo B
LLA-T – Leucemia Linfoblástica Aguda do tipo T
LLC – Leucemia Linfocítica Crônica
LMA – Leucemia Mieloide Aguda
LNH – Linfoma Não-Hodgkin

MGUS – Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (do inglês, *Monoclonal Gammopathy of Unknown Significance*)
MM – Mieloma Múltiplo
MO – Medula Óssea
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Tampão Fosfato-Salino (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*)
PE – Ficoeritrina (do inglês, *Phycoerythrin*)
PE-A – Ficoeritrina – Área (do inglês, *Phycoerythrin - Area*)
PE-H – Ficoeritrina – Altura (do inglês, *Phycoerythrin - High*)
PE-W – Ficoeritrina – Largura (do inglês, *Phycoerythrin - Width*)
PerCP – Complexo Proteína Peridínina-Clorofila (do inglês, *Peridinin Chlorophyll Protein Complex*)
PI – Iodeto de Propídeo (do inglês, *Propidium Iodide*)
PMT – Tubos Fotomultiplicadores (do inglês, *Photomultiplier Tubes*)
SP – Sangue Periférico
SSC-A – Dispersão de luz lateral – Área (do inglês, *Side Scatter - Area*)
SSC-H – Dispersão de luz lateral – Altura (do inglês, *Side Scatter - High*)
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
V500 – Fluorocromo V500
2n – Conteúdo de DNA diploide

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 HEMOPATIAS MALIGNAS	21
3.1.1 Leucemias Agudas	21
<i>3.1.1.1 Leucemia Mieloblástica Aguda – LMA</i>	<i>21</i>
<i>3.1.1.2 Leucemia Linfoblástica Aguda – LLA</i>	<i>22</i>
3.1.2 Neoplasias de células linfoides maduras	23
<i>3.1.2.1 Linfomas</i>	<i>23</i>
<i>3.1.2.2 Neoplasias de células plasmocíticas</i>	<i>23</i>
3.2 CICLO CELULAR	24
3.3 CONTEÚDO DE DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO	26
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	31
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	31
4.2 AMOSTRAS	31
4.3 REAGENTES	31
4.4 PADRONIZAÇÃO DA MARCAÇÃO CELULAR COM IODETO DE PROPÍDEO	32
4.5 PADRONIZAÇÃO DA MARCAÇÃO CELULAR COM ANTICORPOS MONOCLONAIS E IODETO DE PROPÍDEO	33
4.6 PADRONIZAÇÃO DA MARCAÇÃO DE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO E DE MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	34
4.7 PADRONIZAÇÃO DA MARCAÇÃO DE CÉLULAS DE ASPIRADOS E BIÓPSIAS DE LINFONODOS DE PACIENTES COM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	35
4.7.1 Isolamento de mononucleares de sangue periférico para controle interno	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 PADRONIZAÇÃO DA MARCAÇÃO CELULAR COM IODETO DE PROPÍDEO	39
5.2 PADRONIZAÇÃO DA MARCAÇÃO CELULAR COM ANTICORPOS MONOCLONAIS E IODETO DE PROPÍDEO	41
5.3 PADRONIZAÇÃO DA MARCAÇÃO DE CÉLULAS DE PACIENTES COM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	43

5.3.1 Inserção da metodologia na rotina	49
5.3.1.1 Linfomas	49
5.3.1.2 Leucemia Linfoblástica Aguda	51
5.3.1.3 Mieloma Múltiplo	52
6 CONCLUSÕES	55
7 PERSPECTIVAS	57
REFERÊNCIAS	59
ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS – CEPSH/UFSC.....	69
ANEXO B – APROVAÇÃO DO ADENDO DO CONTEÚDO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS – CEPSH/UFSC.....	71
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	73
APÊNDICE B – QUADRO DOS ÍNDICES DE DNA RESULTANTES DAS ANÁLISES DAS CÉLULAS DE PACIENTES DO ESTUDO	77

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças que apresentam expansão clonal descontrolada de células somáticas, promovendo a ruptura da organização tecidual. Existe uma grande diversidade entre os tipos de tumores, os quais, apesar de heterogêneos, compartilham a capacidade de proliferação celular além dos limites do crescimento tecidual normal (EVAN; VOUSDEN, 2001). Além disso, a literatura descreve que a maioria dos tumores surge a partir do clone de uma única célula que foi submetido à transformação maligna; o que acarreta na geração de múltiplas populações celulares anômalas, que se organizam na forma de uma massa heterogênea de células (BJERKVIG et al., 2009).

O genoma humano, assim como o de outras espécies, possui inúmeros mecanismos de proteção de sua integridade. Dessa forma, enzimas de reparo do DNA monitoram continuamente os cromossomos com o objetivo de corrigir resíduos de nucleotídeos danificados pela exposição ambiental a agentes cancerígenos e compostos citotóxicos (WOOD et al., 2001), como, por exemplo, a fumaça de cigarro e as radiações ultravioleta e ionizante (HOEIJMAKERS, 2001; WOOD et al., 2001; WANG et al., 2008). Além disso, agentes mutagênicos endógenos, que incluem as espécies reativas de oxigênio (EROS) e alguns metabólitos que atuam como agentes alquilantes também são descritos entre as causas de alterações no DNA (WOOD et al., 2001).

Desse modo, quando não ocorre a reparação dos danos no DNA, acontecem mutações genéticas, alterações cromossômicas e instabilidade genômica, as quais afetam as principais vias que controlam a diferenciação, a proliferação e a morte celular (SEN, 2000; EVAN; VOUSDEN, 2001; HOEIJMAKERS, 2001; WANG et al., 2008; D'URSO, 2009; LIU et al., 2014). Os eventos clínicos e biológicos presentes na progressão do câncer representam os resultados de desequilíbrios genéticos, tais como: mutações sutis nos nucleotídeos dos genes; translocações cromossômicas, que induzem rearranjos estruturais nos genes; e mudanças numéricas em ambos os segmentos parciais de cromossomos ou nos cromossomos inteiros (aneuploidias). Essas últimas, em particular, são boas indicadoras de neoplasia, assim como podem sugerir o prognóstico em vários tumores (WANG et al., 2004).

Em vista disso, a análise da ploidia do DNA por citometria de fluxo – também denominada análise do conteúdo do DNA – é utilizada na identificação das variações no conteúdo genético das células e fornece informações sobre as anormalidades cromossômicas e heterogeneidade nos tumores humanos (EL-NAGGAR et al., 1999).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a classificação dos tumores dos tecidos hematopoético e linfóide deve ser baseada em uma abordagem diagnóstica com ênfase nos seguintes parâmetros: morfológico, fenotípico, genotípico e características clínicas (SWERDLOW et al., 2008).

Diante disso, propôs-se a implantação da análise do conteúdo de DNA no Setor de Onco-hematologia da Divisão de Análises Clínicas (DACL) do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC) – referência no Estado de Santa Catarina para neoplasias hematológicas (Portarias GM/MS nº2.439 de 08/12/05 e SAS nº741 de 19/12/05). Dessa forma, além de ampliar a cobertura de exames disponibilizados aos pacientes atendidos no hospital, serão viabilizadas as análises recomendadas pela OMS para essas doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Implantar a análise do conteúdo de DNA, por citometria de fluxo, para avaliação do prognóstico de hemopatias malignas nos pacientes atendidos pelo Serviço de Hematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica de quantificação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo;
- Comparar a análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo com o estudo citogenético;
- Inserir a análise de conteúdo de DNA na rotina do Setor de Onco-hematologia a fim de se obterem informações complementares ao exame imunofenotípico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HEMOPATIAS MALIGNAS

As hemopatias malignas compreendem um grupo de várias doenças que afetam a hematopoiese normal. Entre essas neoplasias são descritas as leucemias agudas e as neoplasias de células linfóides maduras (SWERDLOW et al., 2008).

3.1.1 Leucemias Agudas

As leucemias agudas são tumores nos quais acontece a proliferação desordenada e o acúmulo de progenitores mielóides ou linfóides (blastos) não funcionais na medula óssea (MO), com consequente migração para o sangue periférico (SP) e infiltração em outros tecidos. Devido ao acúmulo desses blastos na MO, ocorre a diminuição ou o bloqueio da produção de elementos hematopoiéticos normais; o que gera sintomas relacionados à pancitopenia na maioria dos pacientes (SWERDLOW et al., 2008; ASTER; FLEMING, 2011).

3.1.1.1 Leucemia Mieloblástica Aguda – LMA

As LMAs compreendem um grupo heterogêneo de doenças clonais do tecido hematopoiético, caracterizado pela proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mieloide (SWERDLOW et al. 2008). Essa proliferação anormal ocorre devido a um bloqueio na diferenciação de células-tronco hematopoiéticas, o que resulta no acúmulo de precursores imaturos na MO e supressão da diferenciação e da maturação das células envolvidas na hematopoiese normal (KUPSA, HORACEKA; JEBAVYA, 2012; ABDEL-WAHAB; LEVINE, 2013; HASSERJIAN, 2013).

Tradicionalmente, as LMAs têm sido consideradas como resultado de alterações que geram defeitos irreversíveis em funções genéticas críticas, tais como: proliferação, diferenciação, apoptose e transcrição gênica (GUTIERREZ; ROMERO-OLIVA, 2013). Em vista disso, a identificação das alterações cromossômicas está entre os fatores prognósticos independentes mais importantes (VEIGAARD; NØRGAARD; KJELDSSEN, 2011).

3.1.1.2 Leucemia Linfoblástica Aguda – LLA

A LLA é uma neoplasia maligna originada de um único precursor hematopoiético comprometido com as linhagens de células B ou de células T, que, devido à aquisição de uma série de anormalidades genéticas, acontece a desregulação do processo normal de maturação, ocasionando parada na diferenciação e na proliferação das células. Como consequência, em decorrência do acúmulo de clones imaturos de células B ou de células T na MO, ocorre a supressão da hematopoiese normal, tanto medular, como em vários sítios extramedulares (SWERDLOW et al., 2008; GRAUX, 2011; HARRISON, 2011).

Do total de LLAs, 80–85% são de origem B (LLA de células precursoras B – LLA-B) e 15–20% são originadas a partir da linhagem T (LLA-T) (GRAUX, 2011; ZHAO; HUANG; WEI, 2013).

Além disso, as LLAs são predominantemente encontradas em crianças e ocorrem raramente em adultos (HARRISON, 2011; ZHOU et al., 2012), exibindo atualmente taxa de cura em torno de 85% nas crianças e de 40–50% nos adultos em uso de regimes terapêuticos multidrogas (HARRISON, 2011; GOMES et al., 2014; ZHAO; HUANG; WEI, 2013).

O tratamento das LLAs geralmente é bem sucedido; no entanto, o prognóstico piora com o avançar da idade (LUKENBILL; ADVANI, 2013; ZHAO; HUANG; WEI, 2013). Além disso, muitas anormalidades cromossômicas têm sido relatadas nas LLA-B e LLA-T (MOORMAN et al., 2007; HARRISON, 2011, MOORMAN, 2012). A ocorrência de alterações específicas pode ser indicativa de lesões moleculares subjacentes, o que pode contribuir ou até mesmo estabelecer o diagnóstico e determinar a terapia ideal. Nos casos de LLAs em adolescentes e adultos jovens, a existência das anormalidades associadas a melhor prognóstico – hiperdiploidia, trissomias cromossomais favoráveis e t(12;21)(p13;q22) – é infrequente quando comparada à LLA infantil, além de exibir relevância prognóstica incerta (MOORMAN et al., 2007). Por outro lado, a ocorrência de alterações como amplificação intracromossômica do cromossomo 21, de translocações MLL (ou 11q23) e do cromossomo Philadelphia (LLA Ph+), são mais comuns em adolescentes mais velhos e adultos jovens, o que contribui para um prognóstico menos favorável desse último grupo (NAKANO; HUNGER, 2012).

3.1.2 Neoplasias de células linfoides maduras

Entre as neoplasias de células linfoides maduras, encontram-se os linfomas de células B e de células T; e neoplasias de células plasmocíticas (SWERDLOW et al., 2008).

3.1.2.1 *Linfomas*

Os linfomas e as neoplasias de células linfoides maduras compreendem um grande e diverso grupo de tumores derivados de linfócitos maduros e de seus progenitores. Essas neoplasias, as quais são as mais comuns entre as malignidades hematológicas, são divididas em dois grandes grupos: Linfoma de Hodgkin e Linfomas Não-Hodgkin (SWERDLOW et al., 2008; ASTER; FLEMING, 2011).

O Linfoma de Hodgkin é um grupo de neoplasias de células B relacionado à presença característica de células tumorais muito raras, denominadas de células Reed-Sternberg. Por outro lado, todos os outros linfomas são chamados de Linfomas Não-Hodgkin (LNH), os quais podem ser derivados de linfócitos em qualquer estágio de desenvolvimento. Isso explica, em parte, sua notável diversidade e, também, as enormes diferenças no comportamento clínico, as quais variam entre tumores muito agressivos e de crescimento rápido e neoplasias que permanecem indolentes durante anos, referidas como pseudolinfomas (SWERDLOW et al., 2008; ASTER; FLEMING, 2011).

3.1.2.2 *Neoplasias de células plasmocíticas*

As neoplasias de células plasmocíticas são tumores compostos, em parte, por células B diferenciadas (células plasmocíticas). Essas doenças são relativamente comuns, ocorrendo principalmente em idosos, os quais apresentam com frequência sintomas relacionados à produção de imunoglobulinas completas ou parciais pelas células tumorais (ASTER; FLEMING, 2011).

Entre as neoplasias de células plasmocíticas, encontra-se o Mieloma Múltiplo (MM), o qual é responsável por aproximadamente 10% de todas as neoplasias hematológicas (KYLE; RAJKUMAR, 2008), e caracteriza-se pela produção de imunoglobulina monoclonal, que pode ser detectada no soro e/ou na urina (SWERDLOW et al., 2008; BASAK; CARRIER, 2010). Geralmente, o desenvolvimento do MM envolve um estágio assintomático de proliferação de células plasmocíticas clonais, denominado Gamopatia Monoclonal de

Significado Indeterminado (MGUS – do inglês, Monoclonal Gammopathy of Unknown Significance) (KYLE; RAJKUMAR, 2008; BASAK; CARRIER, 2010). A MGUS está presente em mais de 3% da população acima de 50 anos, com taxa de progressão para MM em torno de 1% ao ano (FARIA; PAULA e SILVA, 2007; KYLE; RAJKUMAR, 2008). Essa progressão abrange eventos complexos tanto nas células progenitoras quanto no microambiente medular (BASAK; CARRIER, 2010).

As manifestações clínicas incluem anemia, lesões ósseas líticas, osteoporose difusa, hipercalcemia, insuficiência renal e aumento do risco de infecções (SWERDLOW et al., 2008; BASAK; CARRIER, 2010; KUMAR et al., 2010). Além disso, o MM e a MGUS são duas vezes mais comuns em negros quando comparados aos brancos e, também, ligeiramente mais comuns em homens do que mulheres (KYLE; RAJKUMAR, 2008). Devido à heterogeneidade do MM, o prognóstico é variável, com sobrevida global que varia de poucos meses até décadas, em alguns casos. É importante destacar que, atualmente, a identificação de anormalidades cromossômicas é uma das mais importantes ferramentas para prever o prognóstico da doença (NAHI et al., 2011).

Como visto, as neoplasias hematológicas caracterizam-se pela proliferação descontrolada ou parada de diferenciação das células hematopoiéticas; e resultam de alterações no ciclo celular. Isso ocorre, pois, a cada divisão celular, há uma probabilidade infinita de acontecerem mutações somáticas secundárias e erros na replicação do DNA. Esse fato é importante principalmente no caso de células-tronco hematopoiéticas nas quais, devido à capacidade de auto-renovação, mutações adquiridas durante a divisão celular poderão se propagar para as células-filha (LINK, 2012). Por isso, a diminuição da eficiência de reparação do DNA é considerada um evento importante na carcinogênese, pois acelera a instabilidade e a taxa de variações genéticas (HOEIJMAKERS, 2001; WOOD et al., 2001; LIU et al., 2014).

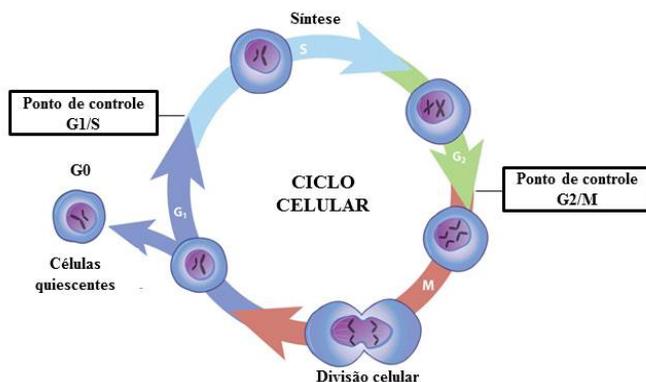
3.2 CICLO CELULAR

O ciclo celular é constituído por uma série de fases, através das quais células normais e neoplásicas procedem durante a replicação celular. Este ciclo é dividido nas fases G1 (fase pré-síntese de DNA), S (fase onde ocorre a síntese de DNA), G2 (fase pós-síntese de DNA) e M (fase onde ocorre a mitose, ou seja, divisão e segregação cromossomal)

(Figura 1). Algumas células permanecem indefinidamente quiescentes (fase G0) até que sejam induzidas por desencadeadores específicos – por exemplo, fatores de crescimento hematopoiético – a entrarem no ciclo celular (fase G1) (ROSS et al., 2003; GERSON et al., 2005; ROBBINS; COTRAN; MITCHELL, 2006).

Além disso, o ciclo celular apresenta dois controles internos, chamados de pontos de verificação: um na transição G1/S e outro em G2/M (Figura 1). Como a fase S é o ponto limite no ciclo celular, o ponto de verificação em G1/S avalia a presença de lesão no DNA antes de iniciar a proliferação celular. Caso haja danos, o ciclo celular é interrompido para se fazer os reparos necessários; se isso não for possível, as vias apoptóticas são ativadas para destruir a célula. Dessa forma, o ponto de verificação G1/S impede a replicação de células com DNA defeituoso, que se perpetuariam como mutações ou rupturas de cromossomos na progênie da célula. O ponto de controle G2/M monitora o término da replicação do DNA e verifica a possibilidade de iniciar a mitose e separar as cromátides irmãs. Este ponto de verificação é importante nas células lesionadas pela radiação ionizante, as quais ativam esse ponto de verificação e param em G2; caso contrário, originam-se anormalidades cromossomais (ROBBINS; COTRAN; MITCHELL, 2006).

Figura 1 – Fases do ciclo celular.



Fase G0 (fase de quiescência); Fase G1 (fase pré-síntese de DNA); Fase G2 (fase pós-síntese de DNA); Fase S (fase onde ocorre a replicação de DNA) e Fase M (fase onde ocorre a mitose). Fonte: Disponível em: <http://www.teliga.net/2013/03/mitose-as-celulas-como-tecelas.html>. Acesso em: 03 mar. 2014. (adaptado).

Os tecidos do corpo podem ser compostos principalmente de células quiescentes em G0; entretanto, tecidos mais maduros apresentam combinação de células de divisão contínua, células terminais diferenciadas, células-tronco e células quiescentes. Baseados em suas atividades proliferativas, os tecidos são divididos em três grupos:

1) Tecidos lábeis (tecidos de divisão contínua): apresentam proliferação celular por toda a vida, para substituição das células destruídas. Como exemplo, citam-se as células da MO, tecidos hematopoiéticos e epitélios;

2) Tecidos não-divisores (permanentes): englobam células que não podem ser submetidas à divisão mitótica na vida pós-natal; como, por exemplo, o músculo cardíaco e os neurônios;

3) Tecidos quiescentes (ou estáveis): apresentam, normalmente, baixo nível de replicação. As células desses tecidos estão na fase G0 do ciclo celular, mas, em resposta a determinados estímulos, podem entrar na fase G1 para iniciar uma rápida divisão para reconstrução do tecido de origem. Nessa categoria encontram-se as células parenquimatosas – fibroblastos e músculo liso; as células do endotélio vascular; e os linfócitos restantes e outros leucócitos (ROBBINS; COTRAN; MITCHELL, 2006). Estes últimos juntamente com as células da MO serão objeto deste estudo.

3.3 CONTEÚDO DE DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma metodologia amplamente utilizada para análises de células em suspensão (MITTAG; TARNOK, 2009) devido a sua capacidade de proporcionar análises multiparamétricas (tamanho, complexidade citoplasmática e composição bioquímica e/ou antigênica) e quantitativas de populações celulares heterogêneas de forma objetiva, sensível, rápida e precisa (DE ROSA; BRENCHLEY; ROEDERER, 2003; BACAL; FAULHABER, 2003; ORFAO et al., 2004; D'ARCHANGELO, 2007; McCOY, 2007; QUIXABEIRA; SADDI, 2008; MITTAG; TARNOK, 2009; PREFFER; DOMBKOWSKI, 2009).

Sendo assim, essa tecnologia apresenta grande importância tanto em laboratórios clínicos quanto de pesquisa, para caracterização diagnóstica e monitoramento do tratamento de várias malignidades hematológicas (DUNPHY, 2004; SWERTS et al., 2007; PAIVA et al., 2010); por meio da detecção e quantificação de antígenos de superfície ou intracelulares, da análise de resistência celular a múltiplos fármacos e

do monitoramento da doença residual mínima (DRM) (BACAL; FAULHABER, 2003; QUIXABEIRA; SADDI, 2008).

A análise do ciclo celular também pode ser realizada por citometria de fluxo com o objetivo de estudar a expressão de proteínas reguladoras e a cinética celular, o que fornece, por meio da quantificação do DNA celular, informações fundamentais a respeito da proliferação das células neoplásicas (BOROVECKI et al., 2003; FARIAS; CASTRO, 2004; SWERTS et al., 2007; KRUEGER; WILSON, 2011). Dessa forma, essa análise ajuda a detectar perturbações em determinadas fases do ciclo, ou seja, alterações no conteúdo do DNA das células neoplásicas em divisão, que geram mutações e alterações na metilação de genes reguladores do ciclo celular; situações, essas, comumente encontradas devido à instabilidade genética presente no processo de transformação maligna e de progressão tumoral (PALMEIRA et al., 2007),

Essas aplicações justificam a ampla utilização da citometria de fluxo para avaliação do conteúdo de DNA celular (PALMEIRA et al., 2007; SWERTS et al., 2007), pois, essa metodologia permite uma análise mais rápida de um amplo número de células (BROWN; WITTWER, 2000; ROSS et al., 2003), sem a necessidade do estabelecimento de culturas celulares, necessárias na citogenética convencional (NYGAARD et al., 2006).

Para a análise do conteúdo de DNA, são utilizados compostos fluorescentes específicos, como o iodeto de propídeo, que se intercalam à estrutura helicoidal do DNA (BROWN; WITTWER, 2000; ROSS et al., 2003; SWERTS et al., 2007). A intensidade da fluorescência resultante da ligação do fluorocromo ao DNA é diretamente proporcional à quantidade de material genético presente no núcleo celular. Essa análise, além de mostrar a distribuição das populações celulares da amostra nas diferentes fases do ciclo celular (PALMEIRA et al., 2007), possibilita: a identificação de alterações clonais (aneuploidias) no conteúdo de DNA celular (BROWN; WITTWER, 2000; PALMEIRA et al., 2007); a correlação entre o conteúdo de DNA e a expressão antigênica das células; sensibilidade na detecção de populações aneuploides quase diploides, as quais podem ser mascaradas pela presença de numerosas células não-tumorais. Além disso, a citometria de fluxo permite também estudos retrospectivos em amostras de tecidos embebidos de parafina, apesar de os melhores histogramas serem obtidos a partir de tecidos frescos ou congelados (ROSS et al., 2003).

É necessário discriminar o termo aneuploidia utilizado na citogenética convencional daquele utilizado em citometria de fluxo. Enquanto, naquela metodologia, o termo refere-se à adição ou deleção de cromossomos inteiros – aneussomias ou aneuploidias de cromossomos–, em citometria de fluxo é utilizado para descrever alterações na quantidade de DNA cromossomal (aneuploidia de DNA) (ROSS et al., 2003; ROSS et al., 2005; DIERSSEN; HERAULT; ESTIVILL, 2009; KRUEGER; WILSON, 2011), a qual pode ser alterada por meio de mecanismos de replicação, poliploidização, ganho ou deleção, apoptose, necrose, infecção viral, terapia de radiação, entre outros (BOROVECKI et al., 2003).

Nesse sentido, o termo "índice de DNA" (DI) é uma descrição mais fidedigna das informações obtidas a partir de análise do DNA por citometria de fluxo, pois é a razão entre o pico G0/G1 de uma população-teste e o pico G0/G1 de uma população diploide conhecida (KRUEGER; WILSON, 2011).

A distribuição da população de células dentro do ciclo celular gera um padrão conhecido como histograma e representa a ploidia do DNA. Dessa forma, ao avaliar um histograma, este pode ser definido como DNA diploide quando a distribuição do conteúdo total de DNA no pico predominante – ou G0/G1 – da população de células tumorais é igual ao conteúdo total do pico G0/G1 de uma população diploide de referência; e as fases S e G2/M da população de células tumorais apresentam-se relativamente reduzidas. Por outro lado, aneuploidia é definida quando o conteúdo de DNA celular médio das células compreendidas na fase G0/G1 é substancialmente diferente do conteúdo diploide normal (2n ou 7,14 pg de DNA) (Tabela 1) (ROSS et al., 2003).

A ocorrência de aneuploidias, apesar de serem associadas ao aumento da sobrevida em determinadas malignidades hematológicas, estão relacionadas com pior prognóstico em outras neoplasias (BROWN; WITTEWER, 2000).

Por isso, o DI é utilizado como fator prognóstico preditivo da doença, imprescindível para estratificação do tratamento. Um dos exemplos que merecem destaque são as células da LLA infantil, nas quais a presença de hipodiploidia está associada a mau prognóstico; enquanto que células hiperdiploides, que apresentam DI maior ou igual a 1,16, demonstram relação com melhor prognóstico (BROWN; WITTEWER, 2000; SWERTS et al., 2007; RACHIERU-SOURISSEAU et al., 2010).

Tabela 1 – Definições da ploidia de DNA.

Índice de DNA do pico G0/ G1	Definição da ploidia de DNA
= 1,00 (1,00 ± 0,15)	Diploide
<0,85 ou >1,15 (exceto tetraploide)	Aneuploide
<0,85	Hipodiploide
1,15 – 1,9	Hiperdiploide, Aneuploidia hipotetraploide
1,9 – 2,1	População tetraploide G2/M; População aneuploide tetraploide G0/G1
>2,1	Aneuploidia hipertetraploide
Múltiplos picos (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; etc)	Multiploide ou poliploide

Fonte: ROSS et al., 2003.

O MM é outra neoplasia maligna que merece ênfase, visto que pacientes acometidos por essa malignidade apresentam cariótipos complexos, com presença de hipodiploidia ou pseudodiploidia que, apesar de raras e de pior prognóstico, mostram perda de cromossomos e mudanças estruturais frequentes, entre as quais, rearranjos da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH) (WUILLEME et al., 2005; BROUSSEAU et al, 2007). Por outro lado, a presença de hiperdiploide indica melhor prognóstico. Como exemplo, cabe salientar que as trissomias dos cromossomos 3, 5, 7, 9, 11, 15 e 19, são amplamente relatadas em pacientes com MM hiperdiploide (≥ 47 cromossomos) e podem ser observadas em 50-60% dos casos. Assim, a identificação de anormalidades cromossômicas, provavelmente, será ainda mais importante para avaliação da sobrevida e para seleção da melhor conduta terapêutica individualizada; principalmente com o desenvolvimento de novas modalidades no tratamento do MM, como novos medicamentos em combinação com as modalidades de transplante alternativas ou em novas combinações sem necessidade de transplante (NAHI et al., 2011).

Cabe ressaltar que, além da LLA e do MM, há um consenso de que a complexidade cariotípica em malignidades mieloides está associada a pior prognóstico (VEIGAARD; NØRGAARD; KJELDSEN, 2011). A hipodiploidia, por exemplo, está relacionada a pior prognóstico na síndrome mielodisplásica (BROWN; WITTEWER, 2000); enquanto a hiperdiploidia na LMA pode indicar prognóstico reservado em pacientes idosos que apresentam triploidia ou tetraploidia (SHARMA et al., 2012).

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (CEPSH/UFSC), sob o número nº913/2010 (Anexo A) com aprovação do adendo do conteúdo emitido em 29/07/2013 (Anexo B).

4.2 AMOSTRAS

Para implantação da análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo, inicialmente foram analisadas 12 amostras de sangue periférico (SP) de indivíduos sem neoplasias hematológicas.

Após isso, foram analisadas 24 amostras de pacientes atendidos pelo Serviço de Hematologia (HU/UFSC) que foram encaminhadas ao Setor de Onco-hematologia da DACL para realização de imunofenotipagem, entre os meses de maio e dezembro de 2013.

Como critério de inclusão no estudo foi definido a presença de células de LLA ou de neoplasias de células linfoides maduras no exame imunofenotípico de amostras de SP, aspirados de MO, aspirados e biópsias de linfonodos dos pacientes supracitados.

Juntamente às amostras de pacientes, foram utilizadas amostras-controle de indivíduos sem neoplasias hematológicas.

Todos os participantes dessa pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

4.3 REAGENTES

Os anticorpos monoclonais (AcMo) utilizados neste estudo estavam conjugados aos fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e complexo proteína peridínina-clorofila (PerCP); e foram previamente titulados para a obtenção o volume ideal para uso (concentração de saturação). A procedência, o clone e o volume de todos os AcMo utilizados no estudo estão descritos nos Quadro 1.

Quadro 1 – Relação de anticorpos monoclonais, clone, volume estabelecido na titulação e fabricante.

Anticorpo Monoclonal	Clone	Volume	Fabricante
BD Tritest™ anti-CD4 FITC/ anti-CD8 PE/ anti-CD3 PerCP	SK3 SK1 SK7	10 µL	Becton, Dickinson and Company - BD Biosciences
Anti-CD7 FITC	4H9	10 µL	Becton, Dickinson and Company - BD Biosciences
Anti-CD20 FITC	L27	7 µL	Becton, Dickinson and Company - BD Biosciences
Anti-CD22 FITC	IS7	7 µL	Exbio
Anti-CD38 FITC	T16	7 µL	Beckman Coulter

CD: *Cluster of Differentiation*; FITC: Isotiocianato de Fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PerCP: Proteína Peridínina-Clorofila.

4.4 PADRONIZAÇÃO DA MARCAÇÃO CELULAR COM IODETO DE PROPÍDEO

Na primeira etapa do projeto de implantação da análise do conteúdo de DNA, foi padronizada a intensidade de marcação celular – ou seja, a intensidade de fluorescência média (IFM) do fluorocromo iodeto de propídeo (PI) em leucócitos de amostras de SP (em anticoagulante EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético) sem neoplasias hematológicas.

Para isso, seguiu-se o protocolo de marcação contido na bula do kit PI/RNase (Immunostep, Spain). Foram pipetados 100 µL de SP em um tubo de poliestireno, ao qual foram adicionados gota a gota 200 µL de etanol 70% gelado. Essa mistura foi incubada aproximadamente a zero grau durante 30 minutos. Após esse período, foram adicionados a esse tubo 2 mL de tampão fosfato-salino (PBS) com 2% de albumina de soro bovino (BSA) e centrifugados a 400 g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento foi ressuspensionado em 500 µL da solução do kit PI/RNase (Immunostep, Spain).

Em seguida, a mistura foi incubada por 15 minutos na ausência de luz e adquirida (no mínimo 5000 eventos) no citômetro de fluxo BD

FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA). Para a aquisição da amostra, foi utilizado o software BD FACSDiva (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) para plotar um histograma – gráfico de distribuição de frequências – com os dados do número de eventos (eixo y - ordenadas) versus IFM do PI (eixo x - abscissas).

4.5 PADRONIZAÇÃO DA MARCAÇÃO CELULAR COM ANTICORPOS MONOCLONAIS E IODETO DE PROPÍDEO

Na segunda parte da padronização da análise do DNA, foi realizado o teste para marcação dos leucócitos de SP (em EDTA) de indivíduos sem neoplasias hematológicas com os AcMo.

Para isso, procedeu-se da seguinte forma: em um tubo de poliestireno de 5 mL (12 mm x 75 mm) (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA), foram pipetados 100 μ L de SP e adicionados 10 μ L de uma mistura de AcMo contra marcadores de linfócitos T (CD4/CD8/CD3), conjugados aos fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e complexo proteína peridínina-clorofila (PerCP), respectivamente (BD Tritest™ anti-CD4/ anti-CD8/ anti-CD3, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Após homogeneização em vórtex, o tubo foi incubado por 10 minutos na ausência de luz e em temperatura ambiente.

Após esse tempo, foi adicionado 1 mL de solução lisante (BD FACS Lysing Solution, San Jose, CA, USA), homogeneizado em vórtex e incubado por 10 minutos na ausência de luz e em temperatura ambiente. Depois disso, o tubo foi centrifugado a 400 g por 5 minutos, com posterior descarte do sobrenadante e ressuspensão do sedimento em 100 μ L de PBS. Para iniciar a marcação com PI, foram adicionados gota a gota 200 μ L de etanol 70% gelado. Essa mistura foi incubada aproximadamente a zero grau durante 30 minutos, com posterior adição de 2 mL de PBS com 2% de albumina de soro bovino (BSA) e centrifugado a 400 g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento foi ressuspensionado em 500 μ L da solução do kit PI/RNase (Immunostep, Spain). Posteriormente, a mistura foi incubada por 15 minutos na ausência de luz. A aquisição (no mínimo 5000 eventos) da amostra foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA). Durante esse processo, foi utilizado o software BD FACSDiva versão 6.1.2 (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) para plotar um histograma com os dados do número de células (eixo y) versus IFM do PI (eixo x). A

análise dos dados foi realizada com o software Infinicyt versão 1.6.0 (Cytognos SL, Salamanca, España).

4.6 PADRONIZAÇÃO DA MARCAÇÃO DE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO E DE MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Para dar continuidade à padronização da metodologia, foram iniciados os testes com células de amostras de MO e SP de pacientes que apresentaram células patológicas no exame imunofenotípico.

Para a análise de aspirados de MO, era necessária uma etapa adicional antes da marcação com os AcMo, a qual consistia na lavagem da amostra com PBS para retirada da gordura do material. Para isso, em um tubo de poliestireno de 5 mL (12 mm x 75 mm) foram adicionados 1 mL de amostra de aspirado de MO e 1 mL de PBS, com posterior homogeneização em vórtex, centrifugação a 400 g por 5 minutos, retirada do sobrenadante e ressuspensão do sedimento em 500 μ L de PBS. A partir desse ponto, essa amostra estava pronta para marcação com AcMo.

Além disso, a padronização da marcação de células de pacientes com neoplasias hematológicas exigia a utilização de um controle interno do teste, o qual consistiu de uma amostra de SP normal (sem neoplasia hematológica) proveniente de um “paciente controle” do mesmo sexo do “paciente teste” (RACHIERU-SOURISSEAU et al., 2010). Essas amostras foram originadas do Setor de Hematologia da DACL, sem qualquer divulgação da identidade do “paciente controle”.

Dessa forma, para cada amostra processada, foram testados três tubos:

- Tubo 1: era constituído pela mistura da amostra de SP ou MO do “paciente teste” com um AcMo contra o marcador característico da neoplasia hematológica em questão. O volume médio de amostra utilizada foi de 100 μ L, pois variava com a celularidade (aquisição de no máximo 2000 eventos/segundo no modo High). Por isso, quando havia excesso de células, a amostra era diluída até se obter a celularidade desejada. Por outro lado, se a quantidade de células era insuficiente, era utilizado maior volume de amostra;
- Tubo 2: era composto por uma mistura meio a meio da amostra de SP ou MO do “paciente teste” e da amostra de SP do “paciente controle”, mais um AcMo contra o marcador característico da neoplasia hematológica. Essa mistura,

geralmente, foi feita com 50 μ l de amostra do “paciente teste” e 50 μ L de amostra do “paciente controle”; pois, assim como no tubo 1, também dependia da celularidade;

- Tubo 3: era formado pela amostra de SP do “paciente controle” mais um AcMo contra o marcador característico da neoplasia hematológica. O volume utilizado deveria ser igual ao do tubo 1.

Cabe ressaltar que, devido serem específicos para cada doença, os AcMo utilizados na marcação celular foram definidos após a determinação do perfil imunofenotípico (imunofenotipagem) das células neoplásicas do “paciente teste”.

Além disso, o volume de AcMo que deveria ser adicionado aos tubos já havia sido estabelecido em titulações realizadas pelo Setor de Onco-hematologia, conforme orientações do fabricante, para todos os marcadores utilizados.

Após a identificação dos tubos e adição de seus respectivos conteúdos, foi realizada a permeabilização celular e marcação do DNA com PI, conforme descrito no item 4.3 – Padronização da Marcação Celular com Iodeto de Propídeo.

Os resultados obtidos a partir da citometria de fluxo foram comparados com os resultados do estudo citogenético, quando estes estavam disponíveis no prontuário dos indivíduos dos quais foram obtidas as amostras.

4.7 PADRONIZAÇÃO DA MARCAÇÃO DE CÉLULAS DE ASPIRADOS E BIÓPSIAS DE LINFONODOS DE PACIENTES COM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Após a padronização da metodologia em SP e aspirado de MO, foi iniciada a padronização em amostras de aspirados e biópsias de linfonodos. Por ser de difícil obtenção, esse tipo de material foi padronizado somente à medida que foi recebido no Setor de Onco-hematologia.

É importante destacar que as células precisam estar em suspensão para serem analisadas por citometria de fluxo. Dessa forma, para utilização de biópsias de linfonodos foi necessário macerá-las com um bastão de vidro, adicionar aproximadamente 500 μ L de PBS e filtrá-las em filtro de 150 μ m para retirar o excesso de tecido. Após, a suspensão filtrada foi utilizada da mesma forma que os aspirados de linfonodos.

De modo geral, a padronização para o uso de aspirados e biópsias de linfonodos não diferiu daquela realizada para SP e MO. A diferença

fundamental estava no uso do SP do “paciente controle”, pois os eritrócitos dessa amostra dificultavam o teste. Por isso, foi necessário isolar os mononucleares do SP do “paciente controle” para que essas células pudessem ser misturadas às células do “paciente teste” (vide item 4.6.1 – Isolamento de mononucleares de sangue periférico para controle interno).

Da mesma forma que nos testes com SP ou MO, para cada amostra processada, foram utilizados três tubos:

- Tubo 1: era constituído pela mistura da amostra de aspirado ou suspensão da biópsia de linfonodo do “paciente teste” mais um AcMo contra o marcador característico da neoplasia hematológica em questão. O volume médio de amostra utilizada era 100 μL , pois dependia da celularidade;
- Tubo 2: era composto por uma mistura meio a meio da amostra de aspirado ou suspensão da biópsia de linfonodo do “paciente teste” e da amostra de mononucleares de SP do “paciente controle”, mais um AcMo contra o marcador característico da neoplasia hematológica. Essa mistura, geralmente, era feita com 50 μL de amostra do “paciente teste” e 50 μL de amostra do “paciente controle” para resultar no mesmo volume do tubo 1;
- Tubo 3: era formado pela alíquota de mononucleares de SP do “paciente controle” mais um AcMo contra o marcador característico da neoplasia hematológica. O volume utilizado era igual ao do tubo 1.

Cabe ressaltar, que os marcadores, ou seja, os AcMo utilizados na marcação celular eram definidos após a determinação do perfil imunofenotípico das células neoplásicas do “paciente teste” por meio da imunofenotipagem, realizada previamente. Além disso, o volume de AcMo adicionado aos tubos já havia sido estabelecido em titulações realizadas pelo Setor de Onco-hematologia, conforme orientações do fabricante, para todos os marcadores utilizados.

Após a identificação dos tubos e adição das amostras e reagentes, foi realizada a permeabilização celular e marcação do DNA com PI, conforme descrito no item 4.3 – Padronização da Marcação Celular com Iodeto de Propídeo.

4.7.1 Isolamento de mononucleares de sangue periférico para controle interno

Para o isolamento dos mononucleares dos outros constituintes do SP, foi utilizado o método de separação de células por gradiente de densidade – Ficoll-Hypaque (densidade: 1,077 g/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Para isso, foram adicionados 1 mL de SP (em EDTA) de indivíduo sem neoplasia hematológica e 1 mL de PBS em um tubo de poliestireno de 5 mL (12 mm x 75 mm) e, logo após, misturados por inversão. Essa mistura foi lentamente colocada sobre 2 mL de Ficoll-Hypaque contidos em outro tubo de poliestireno; o qual foi centrifugado a 400 g por 30 minutos.

Após centrifugação, formaram-se as seguintes fases: fase superior composta pelo plasma e seus constituintes solúveis; interface constituída pelas células mononucleares; fase inferior composta pelo Ficoll-Hypaque; e sedimento, formado pelos eritrócitos e granulócitos.

A primeira fase foi cuidadosamente aspirada e descartada para que a interface que continha os mononucleares pudesse ser retirada. Logo após essa etapa, a interface foi colocada em outro tubo de poliestireno, ao qual foi adicionado PBS para que o excesso de Ficoll-Hypaque fosse retirado. Procedeu-se, em seguida, uma nova centrifugação em condições iguais às anteriores. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 500 µL de PBS para serem utilizadas como controle interno do teste.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PADRONIZAÇÃO DA MARCAÇÃO CELULAR COM IODETO DE PROPÍDEO

Para padronização do histograma, à medida que era feita a aquisição, foram seleccionadas as células de interesse do SP (linfócitos) no gráfico de dispersão de luz Foward Scatter - Area (FSC-A) linear versus Side Scatter - Area (SSC-A) linear (Figura 2, Painel A – células em vermelho). O detector FSC avalia o tamanho, enquanto, o SSC, detecta a granulidade celular. Além desse gráfico, também foi plotado um dot plot (gráfico de pontos, onde cada ponto é chamado de evento) e um histograma para visualizar a IFM do corante PI, o qual é detectado pelo detector FL2 (fluorescência 2). Este último emite luz no comprimento de onda de aproximadamente 570 nm, mesmo canal que detecta o fluorocromo PE.

Dessa forma, foi estabelecido um dot plot com os dados de PI (PE – Área) linear versus SSC – Área (área) linear (Figura 2, Painel B); e um histograma com a IFM do PI (PE - Área) versus número de eventos (density) (Figura 2, Painel C).

Durante a passagem da amostra pelos lasers, foi necessário ajustar a posição das células dentro do dot plot; pois, a fixação/permeabilização realizada com o álcool 70% altera o tamanho celular e, conseqüentemente, a disposição das células no dot plot. A fixação/permeabilização das células permite que o PI penetre no citoplasma, ação impossibilitada anteriormente à adição do álcool devido à presença da membrana plasmática íntegra. Além disso, o PI, que é pouco fluorescente em solução aquosa, exhibe forte fluorescência quando ligado ao DNA, devido à natureza hidrofóbica da interação (ORMEROD, 2008).

Os parâmetros de SSC e FSC foram ajustados até que se obtivesse a IFM do PI com variação entre 50.000 e 150.000. Por outro lado, para o detector SSC, ficou estabelecido a IFM máxima em torno de 150.000; e a IFM mínima, próxima ao eixo x, pois esta é a localização das células mononucleares, que não exibem grânulos (KRUEGER; WILSON, 2011) (Figura 2, Painel A).

Figura 2 – Gráfico representativo da padronização da localização das células de sangue periférico nos eixos x e y dos *dot plots*.

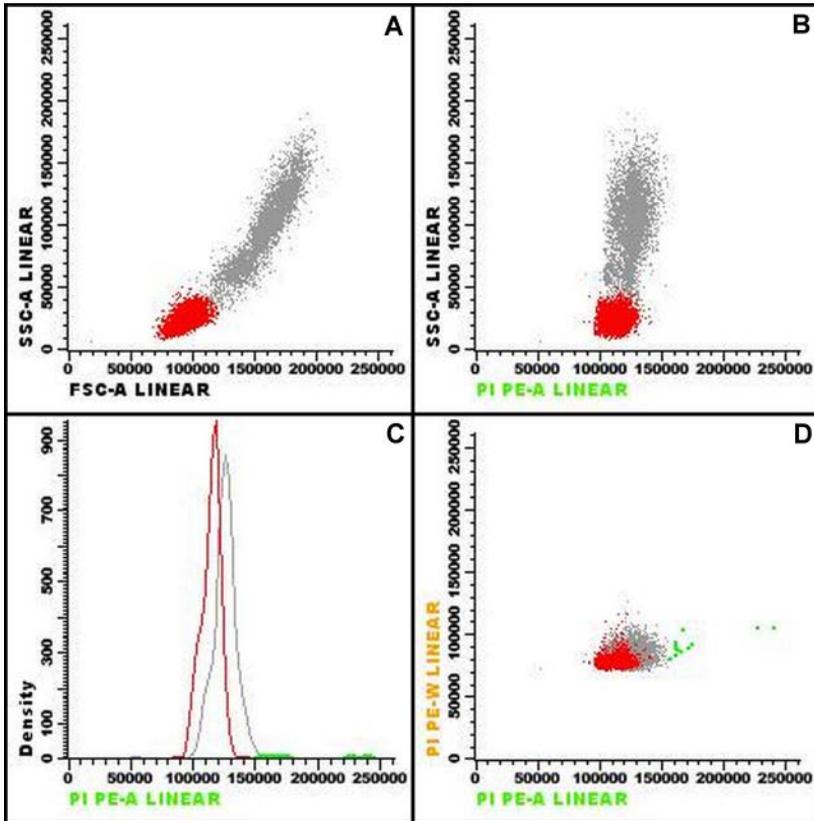


Figura 2, Paineil A: Seleção dos linfócitos (em vermelho) do SP para ajuste das voltagens dos detectores FSC e SSC. As células em cinza correspondem às demais células da amostra; Paineil B: *Dot plot* representando a intensidade de marcação (IFM) dos linfócitos pelo PI; Paineil C: Histograma representando a IFM do PI em relação à quantidade de células; Paineil D: *Dot plot* PI PE-Area versus PI PE-Width para retirar debris (restos celulares) e dubletes (eventos em verde). FSC: Dispersão de luz frontal; SSC: Dispersão de luz lateral; PI: iodeto de propídeo; IFM: Intensidade de Fluorescência Média. Fonte: A autora.

Adicionalmente, foi avaliado outro dot plot [PI PE-A versus PI PE-W (Width)] (Figura 2, Paineil D), o qual teve como objetivo retirar os debris (restos celulares) e os dubletes de células – agregados celulares que prejudicam o resultado do exame por ter maior FSC (eventos em

verde) (DARZYNKIEWICZ; JUAN; BEDNER, 2001; NUNEZ, 2001; KRUEGER; WILSON, 2011). Para separar o sinal emitido pelos dubletes de células que se encontram na fase G1 daquele que é emitido pelas células que se estão verdadeiramente na fase G2/M – e que possuem maior quantidade de DNA e, conseqüentemente, maior IFM –, foi utilizada a diferença na altura do sinal emitido pelo laser FL2, pois os dubletes (células grudadas) aumentam o sinal emitido FL2 Width, devido ao maior diâmetro; enquanto o sinal de FL2 Area é igual tanto para células únicas na fase G2/M quanto para dubletes na fase G1 (NUNEZ, 2001; KRUEGER; WILSON, 2011). Além disso, as amostras devem ser adquiridas no citômetro em baixa velocidade – menos de 1000 células por segundo – para se obter boa discriminação entre singletes (células individuais) e dubletes (NUNEZ, 2001).

Outro fato que foi considerado na padronização da metodologia, foi a utilização de um kit de PI com RNase, para prevenir a ligação desse fluorocromo com algum RNA de cadeia dupla e evitar falsas interpretações no conteúdo de DNA (NUNEZ, 2001; ORMEROD, 2008).

5.2 PADRONIZAÇÃO DA MARCAÇÃO CELULAR COM ANTICORPOS MONOCLONAIS E IODETO DE PROPÍDEO

Na segunda parte da padronização da análise do DNA, foi testada a marcação dos leucócitos de SP de indivíduos sem neoplasias hematológicas com uma mistura de AcMo contra marcadores de linfócitos T (CD4/CD8/CD3), conjugados aos fluorocromos FITC/PE/PerCP, respectivamente (BD Tritest™ anti-CD4/ anti-CD8/ anti-CD3, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Esses marcadores foram escolhidos por estarem presentes em maior proporção nas células linfóides do SP.

Para essa análise, foram plotados, além dos dot plots presentes no item 5.1 –Padronização da Marcação Celular com Iodeto de Propídeo (detalhados novamente na Figura 3, Painéis A, C, E e F), mais três dot plots com a plotagem dos AcMo versus a granulocidade das células (CD4 FITC-A log versus SSC-A linear; CD8 PE-A log versus SSC-A linear e CD3 PerCP-A log versus SSC-A linear) (Figuras 3, Painéis B, C e D, respectivamente) e três gráficos para cada um dos AcMo versus IFM do PI (CD4 FITC-A log versus PI PE-A linear; CD8 PE-A log versus PI PE-A linear e CD3 PerCP-A log versus PI PE-A linear) (MULLEN, 2004; KRUEGER; WILSON, 2011).

Figura 3 – Gráfico representativo da padronização da marcação celular com anticorpos monoclonais e iodeto de propídeo em células de sangue periférico.

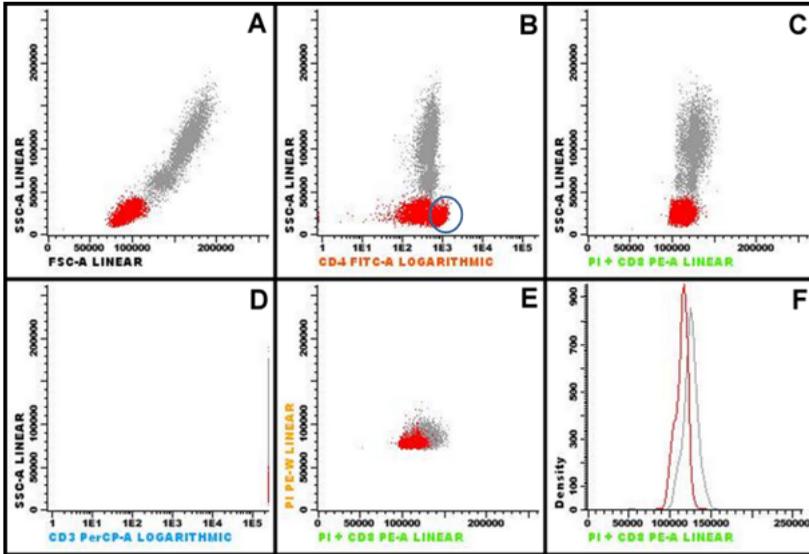


Figura 3, Painel A: Seleção dos linfócitos da amostra (células em vermelho). As células em cinza correspondem às demais células da amostra; Painel B: Linfócitos positivos para o AcMo CD4 (círculo azul) (CD4+: linfócitos T helper); Painel C: Marcação celular do PI e do AcMo CD8. Nota-se que não houve separação de um grupo de células (como ocorrido com o AcMo CD4) devido a interferência do PI sobre o espectro de emissão de fluorescência do AcMo CD8; Painel D: Interferência do PI sobre o espectro de emissão do fluorocromo PerCP; Painel E: *Dot plot* PI PE-Area versus PI PE-Width para retirar debris (restos celulares) e dubletes (não mostrado); Painel F: Histograma representando a IFM do PI em relação à quantidade de células. FSC: Dispersão de luz frontal; SSC: Dispersão de luz lateral; PI: iodeto de propídeo; IFM: Intensidade de Fluorescência Média; CD3: Anticorpo anti-CD3; CD4: Anticorpo anti-CD4; CD8: Anticorpo anti-CD8; FITC: Isotiocianato de Fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PerCP: Complexo Proteína Peridina-Clorofila. Fonte: A autora.

Na Figura 3, os três últimos dot plots (CD4 FITC-A log versus PI PE-A linear; CD8 PE-A log versus PI PE-A linear e CD3 PerCP-A log versus PI PE-A linear) têm a função de mostrar uma população celular específica com relação à quantidade de DNA nuclear. Se a amostra contiver células aneuploides entre as células diploides, aparecerão dois grupos de células com diferente IFM do PI (demonstrado

posteriormente) (WANG et al., 2004; RACHIERU-SOURISSEAU et al., 2010; KRUEGER; WILSON, 2011).

Além disso, à medida que as células foram adquiridas pelo citômetro de fluxo, a voltagem dos tubos fotomultiplicadores (PMT), que têm a função de detectar fluorescência, foi ajustada até que os eventos ficassem dentro dos limites do gráfico, visto que inicialmente o PI exibiu alta IFM. O *threshold* – ponto a partir do qual o sinal é considerado um evento positivo – foi estabelecido como sendo todas as células posicionadas acima de 101 no gráfico (Figura 3, Painel A).

Esse teste inicial com os AcMo contra os marcadores de linfócitos T não foi bem sucedido devido à sobreposição dos espectros de emissão dos fluorocromos PE e PerCP sobre a leitura da IFM do PI, visto que a leitura de todos esses é realizada no mesmo detector FL2 (ORMEROD, 2008).

Em vista disso, foi padronizado o uso de AcMo conjugados ao fluorocromo FITC, pois seu espectro de emissão é lido no detector FL1 e, por isso, não ocorre interferência com a faixa de emissão da fluorescência do PI (ORMEROD, 2008; KRUEGER; WILSON, 2011).

5.3 PADRONIZAÇÃO DA MARCAÇÃO DE CÉLULAS DE PACIENTES COM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Para dar continuidade à padronização da metodologia, foram iniciados os testes com células de amostras de SP, aspirados de linfonodos e de MO e biópsias de linfonodo de pacientes que apresentaram células patológicas no exame imunofenotípico.

Uma vez que o DI é uma mensuração relativa, para todos os exames foi necessária a utilização de uma amostra controle, a qual foi obtida de indivíduo do mesmo sexo do paciente, devido a diferença nas quantidades de DNA entre os cromossomos X e Y (RACHIERU-SOURISSEAU et al., 2010).

A utilização da amostra de um “paciente controle” misturada ao “paciente teste” (volume/ volume) – denominado tubo 2 – foi necessária para comparar a localização das células não doentes com as células patológicas. Esse procedimento foi utilizado para verificar se as células patológicas exibem conteúdo de DNA euploide (2n) ou aneuploide (diferente de 2n), principalmente em amostras de “pacientes teste” que não exibem nenhuma população de células com conteúdo de DNA dentro da normalidade (WANG et al., 2004; RACHIERU-SOURISSEAU et al., 2010).

Além disso, o tubo 3 que continha apenas as células do “paciente controle” e o AcMo dirigido contra os marcadores presentes nas células patológicas tinha a função de conhecer o perfil de marcação do AcMo em células não doentes.

Os AcMo utilizados na marcação celular foram definidos sempre após a determinação do tipo de malignidade hematológica a partir do perfil imunofenotípico (imunofenotipagem) das células neoplásicas. Os AcMo utilizados para calcular o DI são direcionados contra marcadores característicos de cada doença – conjugados ao fluorocromo FITC, para não causar sobreposição com o espectro de emissão de fluorescência do PI (KRUEGER; WILSON, 2011).

Basicamente, foram utilizados sempre os mesmos AcMo para determinada doença. Para LLA-T, foi estabelecido o uso de CD7, característico de linfócitos T (Figura 4). Para LLA-B e para linfomas, foram utilizados AcMo direcionados contra marcadores de células B, tais como: CD20, CD22 (Figura 5). E finalmente, para MM, foi utilizado o CD38 (Figura 6).

Para calcular o DI, ou seja, a quantidade de material genético que as células patológicas continham em comparação com as células do “paciente controle”, foi feita a razão entre o pico G0/G1 de uma população teste e o pico G0/G1 de uma população diploide padrão (WANG et al., 2004; OCIO et al., 2005; ARICÒ et al., 2008; KRUEGER; WILSON, 2011). A partir disso, $DI = 1,0$ corresponde ao conteúdo de DNA diploide ($2n$) ou 46 cromossomos – característico de células na fase G0 e G1; enquanto que células com $DI = 2,0$ possuem conteúdo de DNA tetraploide ($4n$), com 92 cromossomos (NUNEZ, 2001; ROSS et al., 2003). É importante destacar que, o DI de uma população aneuploide raramente é menor que 1,0 (hipodiploide) e comumente é maior que 1,0 (hiperdiploide) (ROSS et al., 2003).

Figura 4 – Figura ilustrativa de um caso de LLA-T que demonstra a estratégia de análise do conteúdo de DNA em amostra de medula óssea.

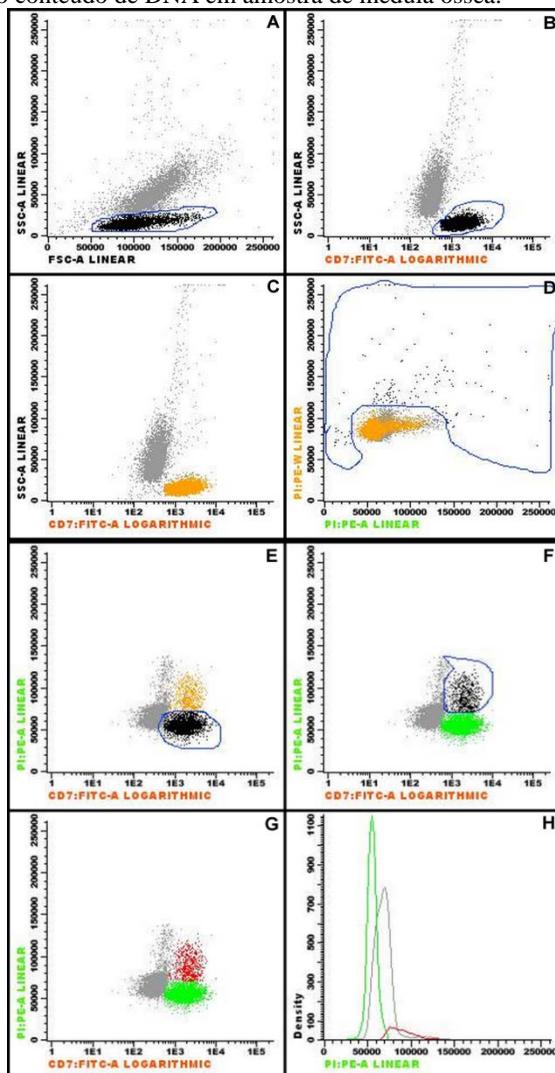


Figura 4, Painel A: Seleção das células de interesse no tubo 1 (linfoblastos + linfócitos normais). As células em cinza correspondem às demais células da amostra; Painéis B e C: Seleção dos linfócitos positivos para CD7; Painel D: *Dot plot* PI PE-Area versus PI PE-Width para retirar debris (restos celulares) e dubletes; Painel E: Seleção dos linfócitos CD7 positivos com baixa IFM para a marcação com PI (células diploides); Painel F: Seleção dos linfócitos CD7

positivos com alta IFM para a marcação com PI (células hiperdiploides); Painei G: Linfócitos diploides (em verde) e linfócitos hiperdiploides (em vermelho) e a diferença da IFM para marcação com PI; Painei H: Histograma representando a diferença da IFM entre as células patológicas hiperdiploides (em vermelho) e as células normais diploides (em verde). FSC: Dispersão de luz frontal; SSC: Dispersão de luz lateral; PI: iodeto de propídeo; IFM: Intensidade de Fluorescência Média; CD7: Anticorpo anti-CD7; FITC: Isotiocianato de Fluoresceína. Fonte: A autora.

Figura 5 – Figura ilustrativa de um caso de Linfoma de Burkitt que demonstra a estratégia de análise do conteúdo de DNA em amostra de medula óssea.

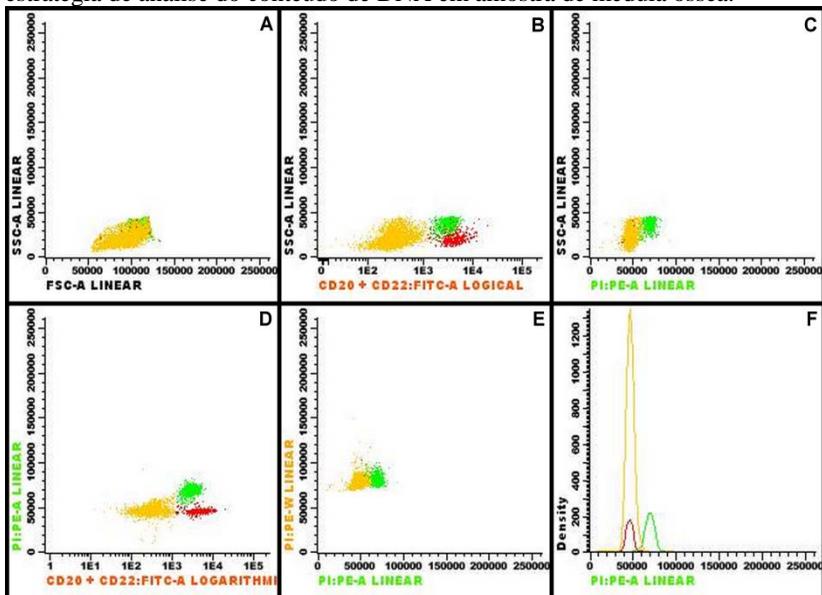


Figura 5, Paineis A: Células de interesse (linfócitos patológicos + linfócitos normais) no tubo 1 – *gated*; Paineis B: Células positivas para a marcação com AcMo contra CD20 e CD22; Paineis C: Diferença entre a IFM do PI das células patológicas (em verde) e dos linfócitos T CD3+ (em amarelo); Paineis D: Linfócitos diploides (em vermelho) e linfócitos hiperdiploides (patológicos) (em verde) e a diferença da IFM da marcação com PI; Paineis E: *Dot plot* PI PE-*Area versus* PI PE-*Width* para retirar debris (restos celulares) e dubletes; Paineis F: Histograma representando a diferença da IFM entre as células patológicas hiperdiploides (em verde) e as células normais diploides (em vermelho). FSC: Dispersão de luz frontal; SSC: Dispersão de luz lateral; PI: iodeto de propídeo; IFM: Intensidade de Fluorescência Média; CD20: Anticorpo anti-CD20; CD22: Anticorpo anti-CD22; FITC: Isotiocianato de Fluoresceína. Fonte: A autora.

Figura 6 – Figura ilustrativa de um caso de mieloma múltiplo que demonstra a estratégia de análise do conteúdo de DNA em amostra de medula óssea.

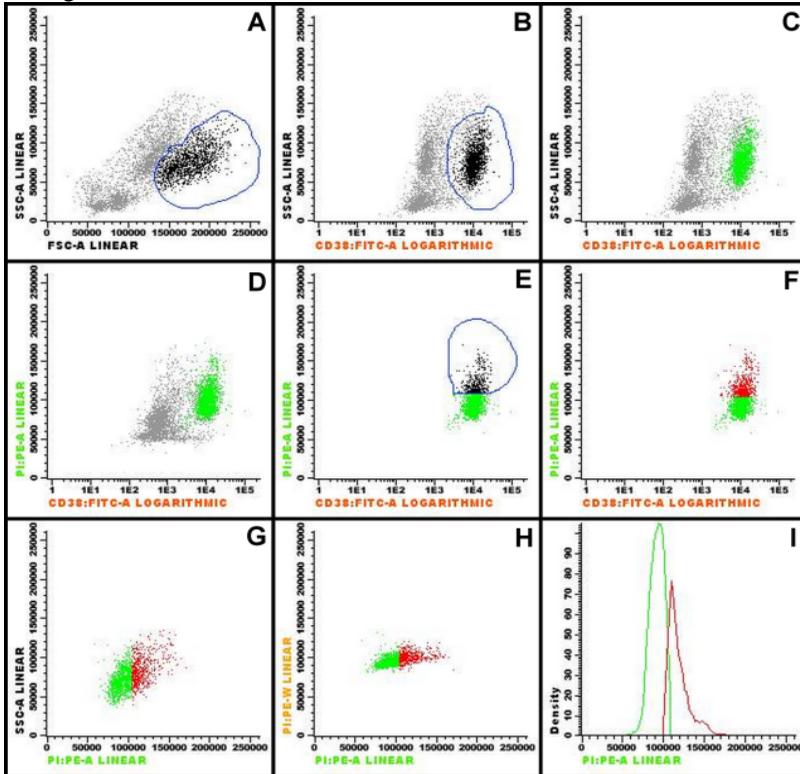


Figura 6, Painel A: Seleção das células de interesse (plasmócitos patológicos + plasmócitos normais) no tubo 1. As células em cinza correspondem às demais células da amostra; Painéis B e C: Seleção dos plasmócitos positivos para CD38; Painel D: Plasmócitos positivos para CD38 e a diferença na IFM da marcação com PI; Painéis E e F: Seleção dos plasmócitos CD38 positivos com alta IFM para a marcação com PI (células hiperdiploides) (em vermelho). Os plasmócitos normais exibem menor IFM para a marcação com PI (células diploides); Painel G: Plasmócitos diploides (em verde) e plasmócitos hiperdiploides (em vermelho) e a diferença da IFM para marcação com PI; Painel H: *Dot plot* PI PE-Area versus PI PE-Width para retirar debris (restos celulares) e dubletes (não representado); Painel I: Histograma representando a diferença da IFM entre as células patológicas hiperdiploides (em vermelho) e as células normais diploides (em verde). FSC: Dispersão de luz frontal; SSC: Dispersão de luz lateral; PI: iodeto de propídeo; IFM: Intensidade de Fluorescência Média; CD38: Anticorpo anti-CD38; FITC: Isotiocianato de Fluoresceína. Fonte: A autora.

5.3.1 Inserção da metodologia na rotina

Foram avaliadas, no total, 24 amostras de SP (n = 6), aspirados de MO (n = 10), aspirados de linfonodos (n = 4) e biópsias de linfonodos (n = 4) de pacientes com as seguintes neoplasias malignas: linfomas (n = 15), LLA (n = 5) e MM (n = 4).

Para melhor descrição dos resultados, essas doenças foram divididas em tópicos individuais.

5.3.1.1 Linfomas

Os linfomas apresentaram maior variedade de amostras (n = 15), visto que foram recebidas duas amostras (n = 2) de aspirado de MO, cinco amostras (n = 5) de SP, quatro amostras (n = 4) de aspirado de linfonodos e quatro amostras (n = 4) de biópsia de linfonodos.

A maior parte dos casos foi de Linfoma de Burkitt – LB (n = 4) e de Linfoma de Células do Manto (n = 4), seguidos pelo Linfoma Difuso de Grandes Células B – LDGCB (n = 3). As outras quatro amostras corresponderam aos casos de: LNH de Células B (n = 2), Linfoma da Zona Marginal (n = 1) e Síndrome de Sézary (n = 1).

A mediana da idade (\pm desvio-padrão – DP) dessa população foi de 55 (\pm 19) anos, com predomínio do sexo masculino (4:1).

No total, 11 amostras (73,3%) apresentaram conteúdo de DNA aneuploide. Para melhor compreensão, os tipos de linfomas com os respectivos resultados para presença/ ausência de aneuploidia estão detalhados na Tabela 2. Os DIs de todas as amostras de pacientes testados estão representados no Apêndice B.

Do total de pacientes, apenas em dois casos (13,4%) foram solicitados os exames citogenéticos (cariótipo). Desses, somente um paciente teve presença de aneuploidia de cromossomos (células com 57 cromossomos), o que confirmou o resultado do obtido por citometria de fluxo (aneuploidia de DNA com DI = 1,50 e presença de 9% de células B patológicas).

No outro paciente com aneuploidia, a citometria de fluxo evidenciou 57% de células patológicas e a análise do conteúdo de DNA mostrou um DI = 1,65; porém, a citogenética não indicou ganhos de cromossomos.

Tabela 2 – Subtipos de linfomas com relação à presença ou ausência de aneuploidias no conteúdo de DNA celular.

Linfoma	Amostras (n) (%)	Presença de aneuploidia (n) (%)	Ausência de aneuploidia (n) (%)
Linfoma de Burkitt	4 (26,6%)	4 (100%)	---
Linfoma de Células do Manto	4 (26,65%)	2 (50%)	2 (50%)
LDGCB	3 (20,0%)	3 (100%)	---
LNH de Células B	2 (13,4%)	1 (50%)	1 (50%)
Linfoma da Zona Marginal	1 (6,7%)	1 (100%)	---
Síndrome de Sézary	1 (6,7%)	---	1 (100%)
Total	15	11	4

Durante este estudo, houve 40% de taxa de óbito ($n = 6$), dos quais 50,0% ($n = 3$) corresponderam a pacientes portadores de LB; e os outros 50,0% corresponderam a pacientes portadores de LDGCB ($n = 1$), Linfoma de Células do Manto ($n = 1$) e LNH de Células B ($n = 1$).

Com relação ao LB, o principal rearranjo cromossômico ocorre na região 8q24. Assim, a translocação mais comum nesse linfoma é $t(8;14)(q24;q32)$, a qual ocorre em aproximadamente 70 – 80% dos casos. Outras translocações, como a $t(2;8)(p12;q24)$ e $t(8;22)(q24;q11)$ são observadas em 10 – 15% dos casos. Além disso, 60 – 90% dos LB mostram anormalidades cromossômicas secundárias, dos quais 30 – 50% dos tumores exibem cariótipos complexos (NELSON et al., 2010).

Estudos sobre LNH sugerem maior incidência de aneuploidias de DNA (50-60%) em linfomas mais agressivos quando comparados aos linfomas de baixo-grau (10-20%) (BELESSI et al., 2003; WANG et al., 2004); ainda que a função dessas aneuploidias como fator prognóstico da maioria dos LNH de pequenas e grandes células permaneça controverso (WANG et al., 2004).

5.3.1.2 Leucemia Linfoblástica Aguda

Do total de pacientes com LLA (n = 5), três (n = 3) foram diagnosticados com LLA-B e dois (n = 2) com LLA-T. Foram recebidas quatro amostras (n = 4) de aspirado de MO e uma (n = 1) de SP.

Com relação aos pacientes com LLA-B, a mediana da idade (\pm DP) foi 25 (\pm 15) anos, com predomínio do sexo feminino (2:1). Por outro lado, a mediana da idade (\pm DP) dos pacientes com LLA-T foi de 36 (\pm 0) anos, com presença exclusiva do sexo masculino.

Todas as amostras de LLA (100%), tanto de células B quanto de células T, apresentaram conteúdo de DNA aneuploide, com DI entre 1,22 e 1,71 (Apêndice B). A presença de $DI \geq 1,50$, mas $< 1,75$ é classificada como quase-triploidia, na qual a quantidade de cromossomos varia entre 68 e 80 (RAIMONDI et al., 2006).

A presença de $DI \geq 1.16$ (hiperdiploidia) está relacionada à sobrevida mais longa em crianças com LLA (RACHIERU-SOURISSEAU et al., 2010, GRAUX, 2011). Por outro lado, apesar de preditiva em crianças, a relação entre a presença de alterações cromossômicas e o prognóstico em adultos, não está bem estabelecida (MANCINI et al., 2005; MOORMAN et al., 2007; MRÓZEK1; HARPER; APLAN, 2009; MOORMAN et al., 2010). Um estudo publicado por Moorman e colaboradores (2007) relatou que alterações citogenéticas comumente presentes em adultos mais velhos, como cromossomo Ph+, t(4;11), cariótipo complexo (com cinco ou mais anormalidades cromossômicas) e baixa hipodiploidia/ quase-triploidia, estão relacionadas a uma sobrevida inferior, independentemente da idade, sexo e contagem inicial de leucócitos. Além disso, pacientes com LLA Ph+ são mais velhos, apresentam maior contagem de leucócitos e de blastos ao diagnóstico, mostram com frequência positividade para marcadores de diferenciação mieloide, e costumam ter prognóstico reservado, com pouca chance de cura (FADERL; ALBITAR, 2000).

Durante este estudo, a taxa de óbito foi de 40% (n =2); sendo um paciente portador de LLA-B e um portador de LLA-T, os quais exibiram DI igual a 1,61 e 1,63, respectivamente. Devido a amostra ser reduzida, não se pode extrapolar os resultados para a população em geral, o que mostra a necessidade da continuação dessa investigação, inclusive com a pesquisa de outras alterações que podem ser detectadas por biologia molecular.

A comparação com o cariótipo só pôde ser feita em três amostras (60%), sendo um paciente portador de LLA-B e dois portadores de LLA-T. Os três cariótipos não apresentaram conteúdo aumentado ou

diminuído de cromossomos, porém em todos os casos a análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo evidenciou $DI > 1,0$, mostrando $DI = 1,61$ no caso de LLA-B; e $DI = 1,22$ e $1,63$ nos casos de LLA-T, respectivamente. Assim como nos linfomas, a presença de células de LLA com diferença na quantidade de DNA, sem alterações numéricas nos cromossomos, resulta na alteração do valor do DI. Por isso, a mensuração do DI por citometria de fluxo deve ter sensibilidade elevada a fim de detectar clones raros e distinguir dois clones com pouca diferença do conteúdo de DNA entre si (RACHIERU-SOURISSEAU et al., 2010).

5.3.1.3 Mieloma Múltiplo

Todas as amostras de MM ($n = 4$) recebidas para realização da análise do conteúdo de DNA foram de aspirado de MO. A escolha desse tipo de material biológico provavelmente é porque as células patológicas do MM apresentam tropismo pela MO (BASAK; CARRIER, 2010).

A mediana da idade ($\pm DP$) dos pacientes foi $63 (\pm 8)$ anos, com predomínio do sexo feminino (3:1).

Do total de amostras analisadas, três (75%) apresentaram conteúdo de DNA diploide e apenas uma (25%) exibiu conteúdo de DNA aumentado ($DI = 1,29$) (Apêndice B), ou seja, considerada hiperdiploide (MATEO et al., 2005; CHNG et al., 2006); porém, a comparação com a citogenética não pôde ser realizada.

As aneuploidias no DNA de células plasmocíticas estão presentes em aproximadamente 60-80% dos casos de MM (TABERNERO et al., 1996; ALMEIDA et al., 1999; OCIO et al., 2005), e evidenciam importantes implicações no prognóstico do MM. A presença de hiperdiploidia, evidenciada na amostra supracitada, pode indicar sobrevida prolongada quando comparada aos MM diploides (LIMA et al., 2000; WUILLEME et al., 2005; RAAB et al., 2009).

Em vista disso, vários estudos têm demonstrado a importância da pesquisa da ploidia do DNA no prognóstico do MM, tanto por citogenética convencional (SMADJA et al., 2001; FONSECA et al., 2003; PANTOU et al., 2005; SMADJA et al., 2003), quanto por citometria de fluxo (MATEO et al., 2005; CHNG et al., 2006). No entanto, é necessário destacar que a citogenética clássica, além de ser trabalhosa e demorada, nem sempre pode ser realizada no momento do diagnóstico (KOREN-MICHOWITZ et al., 2007), devido à infiltração heterogênea da MO, à baixa taxa proliferativa das células patológicas

(WUILLEME et al., 2005) e, conseqüentemente, ao desenvolvimento escasso em culturas celulares, o que torna difícil a obtenção de metáfases (TABERNERO et al., 1996; NAHI et al, 2011).

Apesar das vantagens evidenciadas pela citometria de fluxo, essa metodologia tem baixa sensibilidade para detecção de hipodiploidias (WUILLEME et al., 2005). Dessa forma, em aproximadamente metade dos pacientes com MM que apresentam histograma de DNA diploide nessa metodologia, existem alterações cromossômicas numéricas não detectadas devido a ganhos e perdas balanceados de cromossomos ou também a aberrações individuais que, em ambos os casos, permanecem indetectáveis (TABERNERO et al., 1996).

6 CONCLUSÕES

A partir deste estudo, foram evidenciadas as seguintes conclusões:

- Com relação à padronização da metodologia, foi estabelecida a utilização de AcMos conjugados ao fluorocromo FITC para não ocorrer interferência com a faixa de emissão da fluorescência do PI;
- Com relação aos resultados obtidos nas análises de amostras de pacientes por citometria de fluxo, foram encontradas aneuploidias em 73,3% dos pacientes portadores de linfomas; em 100% dos pacientes portadores de LLA; e em 25% dos pacientes portadores de MM;
- A comparação dos resultados da citometria de fluxo com a citogenética apenas foi possível em 13,4% das amostras de células de linfomas e em 60% das de LLA. As amostras de MM não foram submetidas ao exame citogenético;
- De todos os resultados do conteúdo de DNA por citometria de fluxo que puderam ser comparados com o exame citogenético (n = 5), quatro amostras apresentaram aneuploidias somente pelo primeiro método, o que indica a necessidade de se fazer todos os exames disponíveis, a fim de que os resultados obtidos sejam os mais próximos possíveis da realidade;

Os resultados encontrados indicam que a citometria de fluxo é um bom método para auxiliar na estimativa do prognóstico dos pacientes portadores de neoplasias hematológicas. Contudo, é importante destacar que, a avaliação do prognóstico é complexa, e envolve desde questões intrínsecas de cada paciente até os resultados de exames laboratoriais – como a citogenética e a biologia molecular.

7 PERSPECTIVAS

Considerando-se o fato de que a avaliação do prognóstico das neoplasias hematológicas é multifatorial, para melhor estimativa do prognóstico dos pacientes incluídos neste estudo, sugere-se:

- Ampliar o número de pacientes com neoplasias hematológicas estudados neste trabalho;
- Determinar o coeficiente de variação para definitivamente implantar o exame no Setor de Onco-hematologia;
- Acompanhar durante pelo menos cinco anos a evolução clínica e laboratorial dos pacientes incluídos neste estudo;
- Comparar os resultados obtidos por citometria de fluxo e por citogenética, a partir da parceria criada entre o Setor de Onco-hematologia e o Serviço de Citogenética da DACL;
- Implantar a pesquisa de novas translocações envolvidas na patogênese doenças onco-hematológicas, em especial os linfomas, a LLA e o MM.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.; ORFAO, A.; MATEO, G.; OCQUETEAU, M.; GARCÍA-SANZ, R.; MORO, M.J.; HERNANDEZ, J.; ORTEGA, F.; BORREGO, D.; BAREZ, A.; MEJIDO, M.; SAN MIGUEL, J.F. Immunophenotypic and DNA content characteristics of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. **Pathol. Biol. (Paris)**, v. 47, n. 2, p. 119-27, Feb. 1999.

ARICÒ, M.; VALSECCHI, M.G.; RIZZARI, C.; BARISONE, E.; BIONDI, A.; CASALE, F.; LOCATELLI, F.; LO NIGRO, L.; LUCIANI, M.; MESSINA, C.; MICALIZZI, C.; PARASOLE, R.; PESSION, A.; SANTORO, N.; TESTI, A.M.; SILVESTRI, D.; BASSO, G.; MASERA, G.; CONTER, V. Long-term results of the AIEOP-ALL-95 Trial for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: insight on the prognostic value of DNA index in the framework of Berlin-Frankfurt-Muenster based chemotherapy. **J. Clin. Oncol.**, v. 26, n. 2, p. 283-9, Jan. 2008.

ASTER, J.C.; FLEMING, M. **Chapter 19: Introduction to Hematologic Malignancies**. In: BUNN, H.; ASTER, J.C. eds. Pathophysiology of Blood Disorders. New York: McGraw-Hill, 2011.

BACAL, N.S.; FAULHABER, M.H.W. **Aplicação prática em citometria de fluxo**. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 1-4.

BASAK, G.W.; CARRIER, E. The search for multiple myeloma stem cells: the long and winding road. **Biol. Blood Marrow Transplant.**, v. 16, n. 5, p. 587-94, May 2010.

BELESSI, C.J.; PARASI, A.S.; MANIOUDAKI, H.S.; LAOUTARIS, N.P.; LEGAKIS, N.C.; PEROS, G.T.; ANDROULAKIS, G.A. Prognostic impact of DNA ploidy pattern, S-phase fraction (SPF), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in patients with primary gastric lymphoma. **J. Surg. Oncol.**, v. 82, n. 4, p. 247-55, Apr. 2003.

BOROVECKI, A.; KARDUM-SKELIN, I.; SUSTERCIC, D.; HITREC, V.; LASAN, R.; JAKSIC, B. Chromosomal abnormalities and DNA image cytometry of haematological neoplasms in fine needle aspirates of lymph nodes. **Cytopathology**, v. 14, n. 6, p. 320-6, Dec. 2003.

BJERKVIG, R.; JOHANSSON, M.; MILETIC, H.; NICLOU, S.P. Cancer stem cells and angiogenesis. **Semin. Cancer Biol.**, v. 19, n. 5, p. 279-84, Oct. 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Gabinete do Ministro. Portaria Nº 2.439, de 08 de dezembro de 2005. Institui a Política Nacional de Atenção Oncológica: Promoção, Prevenção, Diagnóstico, Tratamento, Reabilitação e Cuidados Paliativos, a ser implantada em todas as unidades federadas, respeitadas as competências das três esferas de gestão. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília: DF, n. 76, 09 dez.2005. Seção 1, páginas 80-81.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria Nº 741, de 19 de dezembro de 2005. Define os critérios para habilitação das Unidades de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON), os Centros de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (CACON) e os Centros de Referência de Alta Complexidade em Oncologia e suas aptidões e qualidades. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília: DF, n. 246, 23 dez.2005. Seção 1, páginas 113-124.

BROUSSEAU, M.; LELEU, X.; GERARD, J.; GASTINNE, T.; GODON, A.; GENEVIEVE, F.; DIB, M.; LAI, J.L.; FACON, T.; ZANDECKI, M.; Intergroupe Francophone du Myélome. Hyperdiploidy is a common finding in monoclonal gammopathy of undetermined significance and monosomy 13 is restricted to these hyperdiploid patients. **Clin. Cancer Res.**, v. 13, n. 20, p. 6026-31, Oct. 2007.

BROWN, M.; WITTEWER, C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. **Clin. Chem.**, v. 46, n. 8(B), p. 1221–1229, 2000.

CHNG, W.J.; WINKLER, J.M.; GREIPP, P.R.; JALAL, S.M.; BERGSAGEL, P.L.; CHESI, M.; TRENDLE, M.C.; AHMANN, G.J.; HENDERSON, K.; BLOOD, E.; OKEN, M.M.; HULBERT, A.; VAN WIER, S.A.; SANTANA-DÁVILA, R.; KYLE, R.A.; GERTZ, M.A.; LACY, M.Q.; DISPENZIERI, A.; FONSECA, R. Ploidy status rarely changes in myeloma patients at disease progression. **Leuk. Res.**, v. 30, n. 3, p. 266–71, Mar. 2006.

DARZYNKIEWICZ, Z.; JUAN, G.; BEDNER, E. Determining cell cycle stages by flow cytometry. **Curr. Protoc. Cell Biol.**, chapter 8, unit 8.4, May 2001.

D'ARCHANGELO, M. Flow cytometry: new guidelines to support its clinical application. **Cytometry B Clin. Cytom.**, v. 72, n. 3, p. 209-10, May 2007.

DE ROSA, S.C.; BRECHLEY, J.M.; ROEDERER, M. Beyond six colors: a new era in flow cytometry. **Nat. med.**, v. 9, n. 1, p. 112-7, Jan. 2003.

DIERSSEN, M.; HERAULT, Y.; ESTIVILL, X. Aneuploidy: from a physiological mechanism of variance to Down syndrome. **Physiol. Rev.**, v. 89, n. 3, p. 887-920, Jul. 2009.

DUNPHY, C.H. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 128, n. 9, p. 1004-22, Sep. 2004.

EL-NAGGAR, A.K.; DINH, M.; TUCKER, S.L.; SWANSON, D.; STECK, K.; VIELH, P. Numerical chromosomal changes in DNA hypodiploid solid tumors: restricted loss and gain of certain chromosomes. **Cytometry**, v. 37, n. 2, p. 107-12, 1 Oct. 1999.

EVAN, G.I.; VOUSDEN, K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 342-8, 17 May 2001.

FADERL, S.; ALBITAR, M. Insights into the biologic and molecular abnormalities in adult acute lymphocytic leukemia. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 14, n. 6, p. 1267-88, Dec. 2000.

FARIAS, M.G.; CASTRO, S.M. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 40, n. 2, Rio de Janeiro, Apr. 2004.

FONSECA, R.; DEBES-MARUN, C.S.; PICKEN, E.B.; DEWALD, G.W.; BRYANT, S.C.; WINKLER, J.M.; BLOOD, E.; OKEN, M.M.; SANTANA-DÁVILA, R.; GONZÁLEZ-PAZ, N.; KYLE, R.A.; GERTZ, M.A.; DISPENZIERI, A.; LACY, M.Q.; GREIPP, P.R. The

recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. **Blood.**, v. 102, n. 7, p. 2562–7, 1 Oct. 2003.

GERSON, S.L.; BHALLA, K.N.; GRANT, S.; CREGER, R.J.; BAHLLIS, N.J. **Chapter 55: Pharmacology and molecular mechanisms of antineoplastic agents for hematology malignancies.** In:HOFFMAN, R.;BENZ Jr, E.J.; SHATTIL, S.J.; FURIE, B.; COHEN, H.J.; SILBERSTEIN, L.E.; McGLAVE, P. Hematology: Basic principles and practice. 4.ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

GOMES, A.M.; SOARES, M.V.; RIBEIRO, P.; CALDAS, J.; PÓVOA, V.; MARTINS, L.R.; MELÃO, A.; SERRA-CAETANO, A.; DE SOUSA, A.B.; LACERDA, J.F.; BARATA, J.T. Adult B-cell acute lymphoblastic leukemia cells display decreased PTEN activity and constitutive hyperactivation of PI3K/Akt pathway despite high PTEN protein levels. **Haematologica**, [Epub ahead of print] 21 Feb. 2014.

GRAUX, C. Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic relevance. **Transfus. Apher. Sci.**, v. 44, n. 2, p. 183-9, Apr. 2011.

HARRISON, C.J. Acute lymphoblastic leukemia. **Clin. Lab. Med.**, v. 31, n. 4, p. 631-47, Dec. 2011.

HOEIJMAKERS, J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 366-74, 17 May 2001.

KOREN-MICHOWITZ, M.; HARDAN, I.; BERGHOFF, J.; YSHOEV, G.; AMARIGLIO, N.; RECHAVI, G.; NAGLER, A.; TRAKHTENBROT, L. Chromosome 13q deletion and IgH abnormalities may be both masked by near-tetraploidy in a high proportion of multiple myeloma patients: a combined morphology and I-FISH analysis. **Cancer Lett.**, v. 255, n. 2, p. 307–14, 8 Oct. 2007.

KRUEGER, S.A.; WILSON, G.D. Flow cytometric DNA analysis of human cancers and cell lines. **Methods Mol. Biol.**, v. 731, p. 359–70, 2011.

KUMAR, S. Multiple myeloma - current issues and controversies. **Cancer Treat. Rev.**, v. 36, suppl. 2, p. S3–11, May 2010.

KYLE, R.A.; RAJKUMAR, S.V. Multiple myeloma. **Blood**, v.111, n. 6, p. 2962–72, 15 Mar. 2008.

LINK, D.C. Molecular genetics of AML. **Best Pract. Res. Clin. Haematol.**, v. 25, n. 4, p. 409-14, Dec. 2012.

LIU, D.; WU, D.; LI, H.; DONG, M. The effect of XPD/ERCC2 Lys751Gln polymorphism on acute leukemia risk: A systematic review and meta-analysis. **Gene.**, v. 538, n. 2, p. 209-216, 1 Apr. 2014.

LORENZI, T. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

LUKENBILL, J.; ADVANI, A.S. The treatment of adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia. **Curr. Hematol. Malig. Rep.**, v. 8, n. 2, p. 91-7, Jun. 2013.

MANCINI, M.; SCAPPATICCI, D.; CIMINO, G.; NANNI, M.; DERME, V.; ELIA, L.; TAFURI, A.; VIGNETTI, M.; VITALE, A.; CUNEO, A.; CASTOLDI, G.; SAGLIO, G.; PANE, F.; MECUCCI, C.; CAMERA, A.; SPECCHIA, G.; TEDESCHI, A.; DI RAIMONDO, F.; FIORITONI, G.; FABBIANO, F.; MARMONT, F.; FERRARA, F.; CASCAVILLA, N.; TODESCHINI, G.; NOBILE, F.; KROPP, M.G.; LEONI, P.; TABILIO, A.; LUPPI, M.; ANNINO, L.; MANDELLI, F.; FOÀ, R. A comprehensive genetic classification of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of the GIMEMA 0496 protocol. **Blood.**, v. 105, n. 9, p. 3434-41, 1 May 2005.

MATEO, G.; CASTELLANOS, M.; RASILLO, A.; GUTIÉRREZ, N.C.; MONTALBÁN, M.A.; MARTÍN, M.L.; HERNÁNDEZ, J.M.; LÓPEZ-BERGES, M.C.; MONTEJANO, L.; BLADÉ, J.; MATEOS, M.V.; SUREDA, A.; DE LA RUBIA, J.; DÍAZ-MEDIAVILLA, J.; PANDIELLA, A.; LAHUERTA, J.J.; ORFAO, A.; SAN MIGUEL, J.F. Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, n. 10, p. 3661–7, 15 May 2005.

McCOY Jr, J.P. **Basic principles in clinical flow cytometry**. In: CAREY, J.L.; McCOY Jr, J.P.; KEREN, D.F. eds. *Flow cytometry in clinical diagnosis*. 4. ed. Chicago: American Society for Clinical Pathology, 2007, p. 15–34.

MÉHES, G. Chromosome abnormalities with prognostic impact in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Pathol. Oncol. Res.**, v.11, n. 4, p. 205-10, 2005.

MITTAG, A.; TARNOK, A. Basics of standardization and calibration in cytometry: a review. **J. Biophoton.**, v. 2, n. 8–9, p. 470–481, Sep. 2009.

MOASSER, M.M. **Chapter 5: Neoplasia.** In: McPHEE, S.J.; HAMMER, G.D. eds. *Pathophysiology of Disease*, 6 ed. New York: McGraw-Hill, 2010.

MOORMAN, A.V.; HARRISON, C.J.; BUCK, G.A.; RICHARDS, S.M.; SECKER-WALKER, L.M.; MARTINEAU, M.; VANCE, G.H.; CHERRY, A.M.; HIGGINS, R.R.; FIELDING, A.K.; FORONI, L.; PAIETTA, E.; TALLMAN, M.S.; LITZOW, M.R.; WIERNIK, P.H.; ROWE, J.M.; GOLDSTONE, A.H.; DEWALD, G.W.; Adult Leukaemia Working Party, Medical Research Council/National Cancer Research Institute. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. **Blood**, v. 109, n. 8, p. 3189-97, 15 Apr. 2007.

MOORMAN, A.V.; ENSOR, H.M.; RICHARDS, S.M.; CHILTON, L.; SCHWAB, C.; KINSEY, S.E.; VORA, A.; MITCHELL, C.D.; HARRISON, C.J. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. **Lancet Oncol.**, v. 11, n. 5, p. 429–38, May 2010.

MOORMAN, A.V. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **Blood Rev.**, v. 26, n. 3, p. 123-35, May 2012.

MROZEK, K.; HARPER, D.P.; APLAN, P.D. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 23, n. 5, p. 991-1010, Oct. 2009.

MULLEN, P. Flow cytometric DNA analysis of human cancer cell lines. **Methods Mol. Med.** v. 88, p. 247–55, 2004.

NAHI, H.; SUTLU, T.; JANSSON, M.; ALICIL, E.; GAHRTON, G. Clinical impact of chromosomal aberrations in multiple myeloma. **J. Intern. Med.**, v. 269, n. 2, p. 137–147, 2011.

NAKANO, T.A.; HUNGER, S.P. Blood consult: therapeutic strategy and complications in the adolescent and young adult with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 119, n. 19, p. 4372-4, 10 May 2012.

NUNEZ, R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 3, n. 3, p. 67–70, Jul. 2001.

NYGAARD, U.; LARSEN, J.; KRISTENSEN, T.D.; WESENBERG, F.; JONSSON, O.G.; CARLSEN, N.T.; FORESTIER, E.; KIRCHHOFF, M.; LARSEN, J.K.; SCHMIEGELOW, K.; CHRISTENSEN, I.J. Flow Cytometric DNA index, G-band karyotyping, and comparative genomic hybridization in detection of high hyperdiploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 28, n. 3, p. 134 – 140, Mar. 2006.

OCIO, E.M.; MATEO, G.; VIDRIALES, B.; LOPEZ-BERGES, M.C.; GARCIA-SANZ, R.; HERNANDEZ, J.M.; ORFAO, A.; SAN MIGUEL, J.F. Cell cycle analysis of Waldenstrom's macroglobulinemia. **Clin. Lymphoma**, v. 5, n. 4, p. 250-2, Mar. 2005.

ORMEROD, M.G. **Chapter 6: DNA Analysis.** Flow Cytometry: a basic introduction. Los Angeles: De Novo Software Inc., 2008.

ORFAO, A.; ORTUÑO, F.; DE SANTIAGO, M.; LOPEZ, A.; SAN MIGUEL, J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. **Cytometry Part A**, v. 58A, n. 1, p. 62–71, Mar. 2004.

PAIVA, B.; ALMEIDA, J.; PÉREZ-ANDRÉS, M.; MATEO, G.; LÓPEZ, A.; RASILLO, A.; VÍDRIALES, M.B.; LÓPEZ-BERGES, M.C.; MIGUEL, J.F.; ORFAO, A. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. **Cytometry B Clin Cytom.**, v. 78, n. 4, p. 239–52, Jul. 2010.

PALMEIRA, C.; RIBEIRO, N.; RIBEIRO, E.; GODINHO, I.; SOUSA, M.E.; CAETANO, C.; LIMA, E.; MARTINS, G. Avaliação do conteúdo

de DNA celular por citometria de fluxo em linfoma não-Hodgkin de células B: situação actual e perspectivas futuras. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, n.4, p. 88–93, 2007.

PANTOU, D.; RIZOU, H.; TSAROUHA, H.; POULI, A.; PAPANASTASIOU, K.; STAMATELLOU, M.; TRANGAS, T.; PANDIS, N.; BARDI, G. Cytogenetic manifestations of multiple myeloma heterogeneity. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 42, n. 1, p. 44–57, Jan. 2005.

PREFFER, F.; DOMBKOWSKI, D. Advances in complex multiparameter flow cytometry technology: applications in stem cell research. **Cytometry B Clin Cytom.**, v. 76, n. 5, p.295-314, Sep. 2009.

QUIJANO, S.; LÓPEZ, A.; RASILLO, A.; SAYAGUÉS, J.M.; BARRENA, S.; SÁNCHEZ, M.L.; TEODOSIO, C.; GIRALDO, P.; GIRALT, M.; PÉREZ, M.C.; ROMERO, M.; PERDIGUER, L.; ORFAO, A. Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. **Cytometry B Clin. Cytom.**, v.74, n. 3, p. 139-49, May 2008.

QUIXABEIRA, V.B.L.; SADDI, V.A. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. **RBAC**, v. 40, n. 3, p. 199–202, Jul./Sep. 2008.

RAAB, M.S.; PODAR, K.; BREITKREUTZ, I.; RICHARDSON, P.G.; ANDERSON, K.C. Multiple myeloma. **Lancet**, v. 374, n. 9686, p. 324-39, 25 Jul. 2009.

RACHIERU-SOURISSEAU, P.;BARANGER, L.; DASTUGUE, N.; ROBERT, A.; GENEVIÉVE, F.; KUHLEIN, E.; CHASSEVENT, A. DNA Index in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a karyotypic method to validate the flow cytometric measurement. **Int. Jnl. Lab. Hem.**, n. 32, p. 288–298, 2010.

RAIMONDI, S.C.; ZHOU, Y.; SHURTLEFF, S.A.; RUBNITZ, J.E.; PUI, C.H.; BEHM, F.G. Near-triploidy and near-tetraploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia: association with B-lineage blast cells carrying the ETV6-RUNX1 fusion, T-lineage

immunophenotype, and favorable outcome. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 169, n. 1, p. 50-7, Aug. 2006.

ROBBINS, S.; COTRAN, R.; MITCHELL, R. **Fundamentos de patologia [de] Robbins & Cotran**. 7. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 2006. 829 p.

ROSS, J.S.; LINETTE, G.P.; STEC, J.; ROSS, M.S.; ANWAR, S.; BOGUNIEWICZ, A. DNA ploidy and cell cycle analysis in breast cancer. **Am J Clin Pathol.**, v.120, supl.1, S72–S84, Dec. 2003.

ROSS, J.S.; ROSS, M.S.; ANWAR, S.; BOGUNIEWICZ, A. **Chapter 12: DNA ploidy and S phase analysis in breast cancer**. IN: ROSS, J.S.; HORTOBAGYI, G.N. (Eds.). *Molecular oncology of breast cancer*. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 2005. 500 p.

SHARMA, S.K.; SHARMA, M.; SETH, T.; MISHRA, P.; CHOWDHRY, M.; MAHAPATRA, M.; SAXENA, R. Clinical profile and outcome of patients of acute myeloid leukemia with high hyperdiploidy. **Leuk. Res.**, v. 36, n. 3, p. e60–61, 2012.

SMADJA, N.V.; BASTARD, C.; BRIGAUDEAU, C.; LEROUX, D.; FRUCHART, C.; Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. **Blood.**, v. 98, n. 7, p. 2229– 38, 1 Oct. 2001.

SMADJA, N.V.; LEROUX, D.; SOULIER, J.; DUMONT, S.; ARNOULD, C.; TAVIAUX, S.; TAILLEMITE, J.L.; BASTARD, C. Further cytogenetic characterization of multiple myeloma confirms that 14q32 translocations are a very rare event in hyperdiploid cases. **Genes Chromosomes Cancer.**, v. 38, n. 3, p. 234–9, Nov. 2003.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. Ed. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4. ed., Geneva: WHO Press, 2008. 439 p.

SWERTS, K.; VAN ROY, N.; BENOIT, Y.; LAUREYS, G.; PHILIPPÉ, J. DRAQ5: Improved flow cytometric DNA content analysis and minimal residual disease detection in childhood malignancies. **Clin. Chim. Acta**, v. 379, n. 1 – 2, p. 154–157, 2007.

TABERNERO, D.; SAN MIGUEL, J.F.; GARCIA-SANZ, M.; NÁJERA, L.; GARCÍA-ISIDORO, M.; PERÉZ-SIMON, J.A.; GONZALEZ, M.; WIEGANT, J.; RAAP, A.K.; ORFAO, A. Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes. **Am. J. Pathol.**, v. 149, n. 1, p. 153-61, Jul. 1996.

WANG, S.; LI, N.; HEALD, P.; FISK, J.M.; FADARE, O.; HOWE, J.G.; McNIFF, J.M.; SMITH, B.R. Flow cytometric DNA ploidy analysis of peripheral blood from patients with sezary syndrome: detection of aneuploid neoplastic T cells in the blood is associated with large cell transformation in tissue. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 122, n. 5, p. 774-82, Nov. 2004.

WANG, F.; CHANG, D.; HU, F.L.; SUI, H.; HAN, B.; LI, D.D.; ZHAO, Y.S. DNA repair gene XPD polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis based on 56 case-control studies. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 17, n. 3, p. 507-17, Mar. 2008.

WOOD, R.D.; MITCHELL, M.; SGOUROS, J.; LINDAHL, T. Human DNA repair genes. **Science**, v. 291, n. 5507, p. 1284-9, 16 Feb. 2001.

WUILLEME, S.; ROBILLARD, N.; LODÉ, L.; MAGRANGEAS, F.; BERIS, H.; HAROUSSEAU, J.L.; PROFFITT, J.; MINVIELLE, S.; AVET-LOISEAU, H.; Intergroupe Francophone de Myélome. Ploidy, as detected by fluorescence in situ hybridization, defines different subgroups in multiple myeloma. **Leukemia**, v. 19, n. 2, p. 275-8, Feb. 2005.

ZHAO, Y.; HUANG, H; WEI, G. Novel agents and biomarkers for acute lymphoid leukemia. **J. Hematol. Oncol.**, v. 6, n. 40, 18 Jun. 2013.

ZHOU, Y.; YOU, M.J.; YOUNG, K.H.; LIN, P.; LU, G.; MEDEIROS, L.J.; BUESO-RAMOS, C.E. Advances in the molecular pathobiology of B-lymphoblastic leukemia. **Hum. Pathol.**, v. 43, n. 9, p. 1347-62, Sep. 2012.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS – CEPSH/UFSC

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pro-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



CERTIFICADO Nº 913

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584-GR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o conteúdo no Regulamento Interno do CEPSH, CERTECA, que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

APROVADO

PROCESSO: 913 FR: 359548

TÍTULO: Estudo sobre a prevalência, características clínicas e laboratoriais, sócio-demográficas e sobrevida dos pacientes com Neoplasia Hematológica atendidos no Hospital Universitário - UFSC.

AUTOR: Joannita Angela Gonzaga Del Moral, Luiza Haendchen Bento, Thais Helena Otto da Silva

FLORIANÓPOLIS, 30 de Agosto de 2010.

Magdalenato Koenich

Coordenador do CEPSH/UFSC

Profª Magda Santos Koenich
Subcoordenadora
CEPSH/PRPE/UFSC

**ANEXO B – APROVAÇÃO DO ADENDO DO CONTEÚDO
DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE
ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS –
CEPSH/UFSC**

Último Parecer enviado

Enviado em: 22/07/2013

Comentários

O CEPSH retifica o parecer do dia 24/06/2013. O Comitê tomou ciência das alterações propostas pelos pesquisadores no projeto “Estudo sobre a prevalência, características clínicas e laboratoriais, sócio-demográficas e sobrevida dos pacientes com Neoplasia Hematológica atendidos no Hospital Universitário-UFSC”, entre as quais se encontram abaixo mencionadas: a- Inclusão de alteração no “propósito” do projeto tendo como finalidade avaliação continuada da população atendida no Hospital Universitário, com diagnóstico de neoplasia hematológica, para tomada de decisões em relação a melhoria no atendimento e na escolha de melhores protocolos terapêuticos atualizados (sempre baseados no que já está consolidado na literatura). Dessa forma queremos melhorar a qualidade de vida desta população atendida, gerar futuras ações preventivas e, em contra partida, os alunos de graduação, neste projeto inseridos, fortalecerão seu aprendizado e terão a oportunidade de elaborarem, com dados colhidos, alguns trabalhos de conclusão de curso. b- Prorrogação para continuidade da pesquisa, sem mudança essencial nos objetivos e na metodologia do projeto original, tornando o nosso PROPÓSITO continuado, até pelo menos dezembro de 2017. c- Inclusão dos pesquisadores: Dra. Maria Claudia Santos da Silva, Dr. Antonio Carlos Estima Marasciulo, Ana Carolina Rabello de Moraes, Adriana Brejinski de Almeida, Chandra Chiappin Cardoso, Renata Cristina de Messores Rudolf de Oliveira e Vanessa Mengatto.

Parecer

Aprovado "ad referendum"

Data da Reunião

29/07/2013

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa – Estudo sobre a prevalência, características clínicas, sócio-demográficas e sobrevida dos pacientes com Neoplasia Hematológica atendidos no Hospital Universitário – UFSC. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine a segunda folha do documento que ficará com o pesquisador. A primeira folha é sua. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com os pesquisadores ou com a instituição. Em caso de dúvida você poderá entrar em contato com a pesquisadora principal.

Pesquisadora principal: Joanita Angela Gonzaga Del Moral

Telefone para contato: (48) 3721-9875 ou 3721-8274 (Serviço de Quimioterapia do HU)

OBJETIVO

Este estudo pretende verificar o número de pacientes com câncer no sangue que são atendidos no Hospital Universitário de Florianópolis, verificando se há relação com a região onde você mora, sua idade ou sua profissão. Também queremos saber quais são os seus sintomas e se eles melhoram após o tratamento.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

As informações sobre a sua doença serão retiradas do seu prontuário médico, e escritas em uma ficha de coleta de dados já elaborada. Em nenhum momento seu nome ou qualquer informação que o(a) identifique serão revelados.

RISCOS E DESCONFORTOS

Como a pesquisa baseia-se apenas em informações de prontuários, você não correrá nenhum risco, prejuízo, desconforto ou lesão. A pesquisa não influencia no seu tratamento, apenas observa os resultados.

CUSTO/REEMBOLSO PARA O PARTICIPANTE

Você não terá nenhum custo com a pesquisa, e também não receberá pagamento pelas informações que forem coletadas.

CONFIDENCILIDADE DA PESQUISA

É garantido o sigilo, assegurando a sua privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

Joanita Angela Gonzaga Del Moral
Pesquisadora principal - Médica hematologista
CRM-5445 / e-mail: jodelmoral@hotmail.com

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,

_____, RG _____, declaro que li as informações contidas no documento, fui devidamente informado(a) pelo(a) pesquisador(a) dos procedimentos que serão utilizados, não havendo riscos, desconfortos, benefícios ou qualquer custo/reembolso dos participantes, havendo confidencialidade da pesquisa, e concordo em participar da pesquisa. Foi-me garantido a retirada do consentimento a qualquer momento, sem que isso me leve a ter qualquer penalidade. Declaro ainda que recebi a primeira folha deste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, com todos os esclarecimentos por escrito.

Florianópolis, ____ de _____ de 201__.

Nome e assinatura do sujeito ou responsável:

Nome por extenso

Assinatura

**APÊNDICE B – QUADRO DOS ÍNDICES DE DNA
RESULTANTES DAS ANÁLISES DAS CÉLULAS DE
PACIENTES DO ESTUDO**

Neoplasia Hematológica	Índice de DNA	Porcentagem de células patológicas na imunofenotipagem
Linfoma de Burkitt	1,26	96,7% de células patológicas
	1,65	57% de células patológicas
	1,52	83,5% de células patológicas
	1,50	9% de células patológicas
Linfoma de Células do Manto	1,23	92,8% de células patológicas
	1,91	61,2% de células patológicas
Linfoma Difuso de Grandes Células B	1,30	93,5% de células patológicas
	1,69	56% de células patológicas
	1,55	61,1% de células patológicas
Linfoma Não-Hodgkin de Células B	1,52	91,1% de células patológicas
Linfoma da Zona Marginal	1,49	74,6% de células patológicas
Leucemia Linfoblástica Aguda	1,61	35,3% de blastos de LLA-B comum
	1,75	90,8% de blastos de LLA-B comum
	1,77	74,5% de blastos de LLA-B comum
	1,22	70,8% de blastos de LLA-T pré-T
	1,63	39,9% de blastos LLA-T cortical
Mieloma Múltiplo	1,29	11,9% de células plasmocitárias