

CITOQUÍMICA EM PACIENTES LEUCÊMICOS BAIXADOS NO HCPA EM 1988,
E DADOS RELATIVOS A NEOPLASIAS EM SEUS FAMILIARES

JOSÉ ARTUR BOGO CHIES

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA
UFRGS, PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE BACHAREL DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS,
ÊNFASE EM GENÉTICA.

ORIENTADOR: Profª MARIA CLARA GIMMLER DA LUZ

CO-ORIENTADOR: Profª FANI JOB

Porto Alegre

1 9 8 8

AGRADECIMENTOS

- À professora MARIA CLARA GIMMLER DA LUZ pela orientação, apoio e amizade que tanto contribuíram para a realização deste trabalho;
- à professora FANI JOB pela orientação na área de hematologia;
- à professora NANCE BEYER NARDI pelo apoio e incentivo, vitais para o início e desenvolvimento deste trabalho;
- aos médicos residentes da Unidade de Hematologia do HCPA, pela ajuda e troca de idéias em relação às técnicas citológicas;
- ao pessoal do Laboratório de Hematologia do HCPA, pelo agradável convívio;
- à LÚCIA ALVES PACHECO pelo auxílio na organização do texto e montagem de tabelas desta dissertação;
- à SOLANGE FENSTERSEIFER pela cuidadosa datilografia desta dissertação;
- a meus familiares, por tudo;
- à PROPESP - Pró-reitoria de pós-graduação e pesquisa da UFRGS, pela bolsa de Iniciação científica concedida durante o desenvolvimento deste trabalho.

S U M Á R I O

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO | 5 |
| 1 - LEUCEMIAS | 6 |
| 1.1 - Definição de Leucemia | 6 |
| 1.2 - Classificação das Leucemias | 6 |
| 1.2.1 - Classificação das leucemias linfóides agudas | 9 |
| 1.2.1.1 - Leucemia linfóide aguda - L1 | 9 |
| 1.2.1.2 - Leucemia linfóide aguda - L2 | 10 |
| 1.2.1.3 - Leucemia linfóide aguda - L3 | 10 |
| 1.2.2 - Classificação das leucemias mielóides agudas | 10 |
| 1.2.2.1 - Leucemia mieloblástica aguda - M1 | 11 |
| 1.2.2.2 - Leucemia mieloblástica aguda - M2 | 11 |
| 1.2.2.3 - Leucemia promielocítica hipergranular - M3 | 11 |
| 1.2.2.4 - Leucemia mielomonocítica aguda - M4 | 12 |
| 1.2.2.5 - Leucemia monocítica aguda - M5 | 12 |
| 1.2.2.6 - Eritroleucemia aguda - M6 | 13 |
| 1.2.2.7 - Leucemia Megacarioblástica - M7 | 13 |
| 1.2.3 - Leucemia linfóide crônica - LLC | 14 |
| 1.2.4 - Leucemia mielóide crônica - LMC | 14 |
| 1.3 - Importância das Técnicas Citoquímicas no Diagnóstico de Leucemias | 15 |
| 1.3.1 - Caracterização das técnicas citoquímicas utilizadas | 20 |
| 1.3.1.1 - Peroxidase | 20 |
| 1.3.1.2 - Reação ácido periódico-Schiff (P.A.S.) | 20 |
| 1.3.1.3 - Sudan black | 22 |
| 1.3.1.4 - Esterase não-específica | 23 |
| 1.4 - Fatores Genéticos e Neoplasias | 24 |
| 1.4.1 - Fatores genéticos em leucemias | 28 |

| | |
|---|----|
| 1.5 - Objetivos | 33 |
| 2 - MATERIAL E MÉTODOS | 34 |
| 2.1 - Reação Ácido Periódico-Schiff (P.A.S.) | 34 |
| 2.2 - Peroxidase | 35 |
| 2.3 - Sudan black | 36 |
| 2.4 - Coloração de Rotina (May-grünwalde/Giemsa) | 36 |
| 2.5 - Fosfatase Alcalina Leucocitária | 36 |
| 2.6 - Esterase Não Específica | 37 |
| 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| 3.1 - Citoquímicas | 40 |
| 3.2 - Agudização em uma Leucemia Mielóide Crônica | 48 |
| 3.3 - Ocorrência de Neoplasias em Aparentados dos Probandos | 49 |
| 3.4 - Leucemia Familiar: possibilidade de herança genética | 53 |
| 4 - RESUMO E CONCLUSÃO | 57 |
| BIBLIOGRAFIA | 59 |

I N T R O D U Ç Ã O

As principais neoplasias do sistema hematopoiético podem ser classificadas em: policitemia vera (P.V.), mielofibrose idiopatia (I.M.F.), linfomas de Hodgkin (H.D.), linfomas não-Hodgkin (N.H.L.), mieloma múltiplo (M.M.), leucemias crônicas (C.L.) e leucemias agudas (A.L.) de acordo com Wintrobe (1981).

A diferenciação entre estas neoplasias é feita através da análise clínica (sinais e sintomas) e dados laboratoriais. Além destes, a utilização da história familiar, gestacional e ocupacional do paciente pode ser útil para o diagnóstico, especialmente no que se refere a fatores genéticos e ambientais que se relacionem ao desenvolvimento de neoplasias.

O presente trabalho foi desenvolvido em pacientes leucêmicos e, para sua melhor compreensão, torna-se necessário as seguintes considerações.

1 - L E U C E M I A S

1.1 - Definição de Leucemia

Leucemia é uma doença sistêmica do aparelho hematopoiético, caracterizada por uma proliferação anômala, de caráter neoplásico dos elementos sangüíneos, com presença ou não destes elementos no sangue periférico. Clinicamente caracteriza-se como uma doença proliferativa de curso progressivo e na maioria das vezes irreversível do tecido hematopoiético.

Existem ainda outras definições de leucemia, havendo entre elas discordâncias. Alguns autores discutem a utilização genérica do termo leucemia, defendendo a idéia de que este deva restringir-se aos casos de neoplasias dos glóbulos brancos (leucócitos).

Apesar disto, atualmente o termo leucemia é usado genericamente e define uma neoplasia do tecido hematopoiético, de caráter proliferativo.

1.2 - Classificação das Leucemias

Os critérios de classificação dos diversos tipos e subtipos de leucemias são variáveis, o que ocasiona graves problemas no momento em que pretendemos comparar diferentes casos de leu-

cemias, diagnosticadas por diferentes especialistas. Na tentativa de minimizar as divergências foram estabelecidos critérios básicos.

De acordo com o grau de maturação das células leucêmicas, podemos dividir as leucemias em: a) crônicas, quando há predomínio de células diferenciadas ou maduras e b) agudas, quando há predomínio de células indiferenciadas ou imaturas, chamadas genericamente de blastos. Em sua típica evolução a leucemia aguda ocasiona infiltração e substituição da medula óssea normal por progenitores imaturos de leucócitos linfóides ou mielóides. Esse acúmulo anormal de elementos celulares imaturos na medula óssea, ocasiona problemas de ordem quantitativa na hematopoiese de todas as células ali produzidas, provocando diminuição do número de leucócitos diferenciados (maturos) no sangue, plaquetas e eritrócitos.

Com base na hematopoiese normal (Figura 1) as leucemias, tanto agudas como crônicas, podem ser classificadas de acordo com a linhagem da célula que lhe deu origem, em linfóides e mielóides.

As leucemias linfóides podem ser provenientes de linfócitos T ou B e as mielóides de elementos monocíticos, granulocíticos ou eritrocíticos, o que acarreta a formação de subgrupos. A classificação destes subgrupos é inequívoco para as leucemias crônicas, uma vez que são definidas como aquelas onde há predomínio de células diferenciadas ou maduras. Já para as leucemias mielóides agudas, onde há predomínio de células indiferenciadas, a exata classificação e definição destes subgrupos torna-se di-

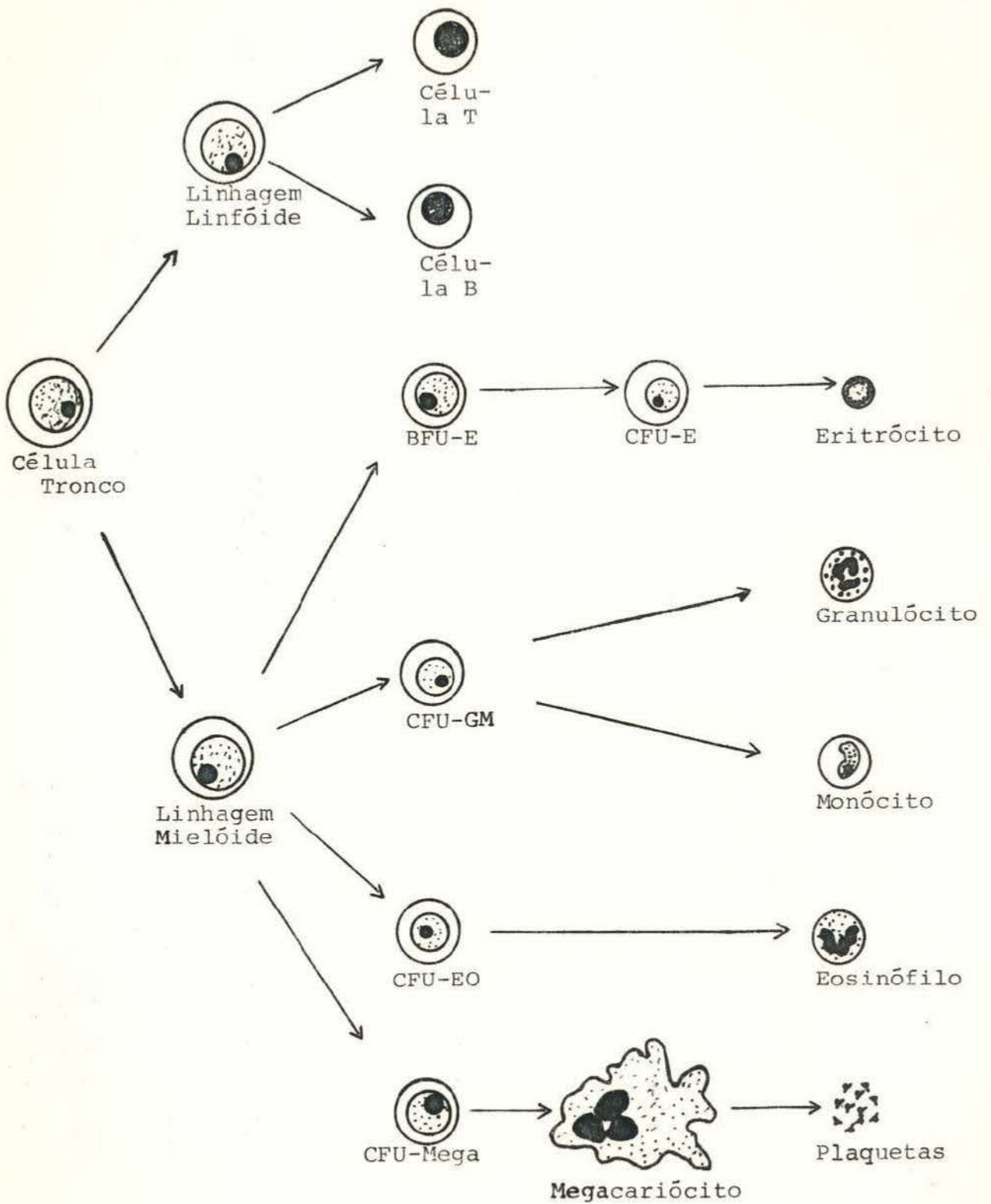


FIGURA 1 - Esquema de diferenciação normal das células do sangue, hematopoiese. BFU-E, progenitor eritrocítico; CFU, unidade formadora de colônia, conforme Koeffler e Golde (1981).

fácil e variável.

Em 1976 reuniu-se um grupo de hematologistas, que ficou conhecido como "French-American-British co-operative group" (FAB) que, com o objetivo de unificar a classificação e nomenclatura das leucemias agudas, desenvolveu a classificação FAB, sendo esta amplamente utilizada (Bennett e cols., 1976).

1.2.1 - Classificação das leucemias linfóides agudas

A leucemia linfóide aguda (LLA), tem como característica principal o comprometimento das células leucêmicas com a linhagem linfóide, apresentando ou não linfoblastos (elementos imaturos da série linfóide) em quantidade no sangue periférico. A doença pode ocorrer em indivíduos de qualquer idade, embora seja mais freqüente em crianças, com o pico de maior incidência ao redor de três anos de idade (Wintrobe, 1981). A LLA é fatal na ausência de tratamento, mas, pode apresentar aumento de sobrevida se a criança for submetida a vigorosa terapia. A freqüência de aumento de sobrevida de pacientes com LLA sofre decréscimo acentuado com o aumento da idade do paciente.

Em 1976, Bennett e colaboradores desenvolveram a classificação FAB das leucemias linfóides agudas, baseados principalmente em critérios citomorfológicos de distensões de medula óssea, subdividindo-as em três grupos que receberam a denominação de LLA-L1, -L2 e -L3.

1.2.1.1 - Leucemia linfóide aguda - L1

Morfologicamente, a LLA-L1 caracteriza-se pelo predomínio

de células pequenas, com núcleo regular e cromatina homogênea, na maioria das vezes. O nucléolo é muito pequeno e, às vezes, não visível. O citoplasma é escasso apresentando pouca vacuolização (Bennett e cols., 1976). Segundo Bennett e cols. (1981), sua ocorrência é maior em crianças (até 15 anos de idade).

1.2.1.2 - Leucemia linfóide aguda - L2

A LLA-L2 caracteriza-se morfológicamente pela presença de células grandes, com formato nuclear irregular e presença de um ou mais nucléolos bastante grandes. A quantidade do citoplasma é variável, mas geralmente é moderadamente abundante (Bennett e cols., 1976). Diferenciando-se da LLA-L1, sua ocorrência é maior em adultos (idade superior a 15 anos) (Bennett e cols., 1981).

1.2.1.3 - Leucemia linfóide aguda - L3

A presença de células leucêmicas grandes com núcleo regular, forma oval a circular, com cromatina finamente granulada e homogênea, apresentando um ou mais nucléolos proeminentes, e um citoplasma com vacúolos bastante visíveis caracterizam a LLA-L3 (Bennett e cols., 1986). Uma das características mais marcantes da LLA-L3 é a presença de antígenos específicos de linfócitos B, detectados através do anticorpo monoclonal SmIg. A LLA-L3 não apresenta faixa etária característica para a sua manifestação (Bennett e cols., 1981).

1.2.2 - Classificação das leucemias mielóides agudas

De acordo com a classificação FAB (Bennett e cols., 1976 e 1985), as leucemias mielóides agudas (LMA), dividem-se em sub-

grupos denominados M1, M2 e M3 quando apresentam diferenciação granulocítica; M4 quando apresentam diferenciação tanto granulocítica quanto monocítica; M5 com diferenciação monocítica predominante; M6 com predomínio de diferenciação eritrocítica; M7 com diferenciação megacariocítica. A diferenciação dos subgrupos está, muitas vezes embasada, em definições quantitativas.

1.2.2.1 - Leucemia mieloblástica aguda - M1

A LMA-M1 caracteriza-se pelo predomínio de mieloblastos, e é considerada uma leucemia mieloblástica aguda sem maturação. Por definição, mais de 90% das células são não eritróides; pelo menos 3% dos blastos devem ser peroxidase ou sudan black positivos (Bennett e cols., 1976).

1.2.2.2 - Leucemia mieloblástica aguda - M2

A LMA-M2 é denominada de leucemia mieloblástica aguda com maturação. Mais de 50% das células da medula óssea são mieloblastos e promielócitos. Diferentemente de M1, na M2 podem ser observados mielócitos, metamielócitos e granulócitos maduros em proporções variáveis. Deve possuir, por definição, menos de 20% de monócitos, e mais de 10% de promielócitos normais (Bennett e cols., 1985).

1.2.2.3 - Leucemia promielocítica hipergranular - M3

A LMA-M3 é considerada uma variante do subgrupo M2. É importante distinguir os promielócitos presentes em M2 e em M3, visto que os primeiros são normais enquanto que os da M3 são hipergranulares com grânulos que podem variar de normais a ovala-

dos, núcleos bilobados e presença de "feixes" de bastões de Auer ("faggots") no citoplasma, estes "faggots" são característicos do subgrupo M3 (Gralnick e cols., 1977). 50 a 100% dos blastos são peroxidase positivos. Pequena parcela de blastos pode apresentar positividade difusa para P.A.S. ("reação ao ácido periódico de Schiff", Tomonaga e cols., 1985). Ainda na medula óssea, podem ocorrer eosinófilos, basófilos ou ambos, em diferentes proporções.

1.2.2.4 - Leucemia mielomonocítica aguda - M4

Na LMA-M4 há predomínio de mieloblastos e monoblastos na medula, em proporções variáveis. Em geral aparece maior número de monócitos no sangue do que na medula (Wintrobe, 1981). Na medula óssea mais de 30% das células não eritróides, devem ser blastos. A soma dos mieloblastos, promielócitos, mielócitos e granu lócitos maduros deve estar entre 30 a 80% das células não eritróides. Mais de 20% das células não eritróides devem pertencer à linhagem monocítica, em diferentes estágios de maturação, geralmente promonócitos e monócitos. Caso esta percentagem ultrapassar a 50 a leucemia é classificada como M5 (Bennett e cols., 1985).

1.2.2.5 - Leucemia monocítica aguda - M5

A leucemia monocítica aguda existe em duas formas distintas, uma M5A em que quase a totalidade das células são blastos, e outra M5B em que há uma grande proporção de células em estágios de maturação posteriores à promonócitos (Gralnick e cols., 1977). Considera-se uma leucemia monocítica aguda do tipo M5A

aquela na qual 80% ou mais de todos os monócitos são monoblastos e M5B quando menos de 80% de todos monócitos são monoblastos, sendo os restantes predominantemente promonócitos e monócitos.

1.2.2.6 - Eritroleucemia aguda - M6

Em uma eritroleucemia aguda o sangue e a medula podem conter precursores eritrocíticos em vários estágios de maturação, mas proeritroblastos são as células predominantes. O componente eritropoiético usualmente excede 30% de todas as células nucleadas da medula óssea (Gunz e cols., 1983) e os eritroblastos apresentam-se com aparência bizarra e anormal, como: aspecto megalo blástico, binucleação, fragmentação nuclear e presença de vacúolos citoplasmáticos. Em uma eritroleucemia aparecem eritroblastos no sangue periférico, sendo uma característica marcante destes eritroblastos sua forte positividade ao P.A.S. (Bennett e cols., 1985).

1.2.2.7 - Leucemia Megacarioblástica aguda - M7

A leucemia megacarioblástica aguda foi recentemente incluída na classificação FAB, sendo caracterizada como uma leucemia em que ocorre grande quantidade de pequenos megacarioblastos mononucleados infiltrados na medula óssea. Em seu desenvolvimento a LMA-M7 pode atravessar um momento de transição onde se caracterizará como uma mielodisplasia, especificamente como mielofibrose. A expectativa de sobrevida para pacientes com LMA-M7 raramente excede um ano, sendo normalmente de poucos meses. A LMA-M7 apresenta peroxidase e esterase não-específica negativa (Jandl, 1987).

1.2.3 - Leucemia linfóide crônica (LLC)

A leucemia linfóide crônica caracteriza-se por apresentar grande quantidade de pequenos linfócitos no sangue periférico. É comum na LLC a infiltração dos nódulos linfáticos, tecidos e órgãos do sistema hematopoiético, por linfócitos.

Um dos principais sinais observados em pacientes acometidos por LLC é o lento e gradual aumento de tamanho dos linfonodos e órgãos do sistema hematopoiético, tais como o baço. Apesar desta infiltração ser, em alguns casos, bastante significativa tanto em volume quanto em quantidade, não produz danos funcionais na área infiltrada.

Considera-se provável que existam diferentes subtipos de LLC sendo estes classificados em LLC de células T e LLC pura ou leucemia prolinfocítica (Wintrobe, 1981).

1.2.4 - Leucemia mielóide crônica (LMC)

A leucemia mielóide crônica é caracterizada por uma grande elevação na contagem de leucócitos, resultante de um aumento em quantidade das formas maduras dos granulócitos. A LMC ocorre com maior frequência em homens, sendo que a maior parte dos indivíduos que apresentam esta neoplasia são jovens ou adultos jovens.

Em termos de diferenciação da LMC de acordo com prognóstico e resposta à terapia pode-se distinguir as LMC com presença de cromossomo Philadelphia (descrito posteriormente) ou ausência do mesmo.

As principais causas de morte são infecções e hemorragias,

muitas vezes associadas com uma crise blástica. Esta crise blástica caracteriza-se pelo aparecimento de grande quantidade de precursores imaturos de granulócitos no sangue periférico (Wintrobe, 1981).

1.3 - Importância das Técnicas Citoquímicas no Diagnóstico de Leucemias

A classificação de leucemias agudas, baseada apenas no uso da coloração de rotina para distensões de sangue periférico e medula óssea, é extremamente difícil, senão impossível. Interpretações conflitantes são bastante comuns quando uma mesma lâmina é analisada por mais de um especialista. Recentes avanços em técnicas quimioterápicas requerem um diagnóstico bem mais exato dos vários tipos e subtipos de leucemias, de modo a permitir uma escolha efetiva do agente quimioterápico.

Para resolver os problemas acima, cada vez mais os laboratórios de análises clínicas e hospitais utilizam as técnicas citoquímicas de coloração.

As técnicas citoquímicas são extremamente utilizadas para diferenciação de leucemias agudas visto que nestas leucemias as células envolvidas apresentam-se em estágio imaturo (blasto), sendo, portanto, difícil e até mesmo impossível sua identificação morfológica. Nas leucemias crônicas as técnicas citoquímicas não encontram campo muito amplo de atuação pois as células leucêmicas encontram-se em estágios maduros de diferenciação, sendo morfológicamente diferenciáveis. Com base nas afirmações acima, o presente trabalho apresenta ênfase em relação ao estudo

das leucemias agudas.

Segundo Schmalzl & Braunsteiner (1971) estas técnicas estão baseadas na determinação e demonstração da presença de certas organelas subcelulares, suas enzimas ou constituintes químicos, identificando, assim, o grau de maturação e diferenciação da população de células leucêmicas ou mesmo de células em desenvolvimento normal.

Podemos observar na Tabela 1 o padrão de células normais quando coradas através das técnicas citoquímicas utilizadas no presente trabalho, e na Tabela 2 o padrão de células leucêmicas para as mesmas citoquímicas. Nota-se, comparando estas duas tabelas, pequenas variações nos padrões de coloração, mas cabe salientar que, em determinados casos estas pequenas variações são consideradas como marcadores para uma determinada leucemia.

As tabelas 3 e 4 apresentam a especificidade celular das citoquímicas, seus principais usos e padrões em diversos tipos de leucemias.

Recentes avanços nas técnicas citoquímicas têm fornecido grande precisão na caracterização dos vários tipos de células sanguíneas humanas e, portanto, caracterização das leucemias correspondentes.

Tabela 1 - Caracterização citoquímica das células sanguíneas normais:

| | Peroxidase | Sudan | P.A.S. | Esterase não-específica α -naphtyl-acetato | Fosfatase alcalina |
|------------------|------------|-----------|--------|---|--------------------|
| Blastos | - | - a \pm | + | - | - |
| Mielócitos | ++ | + a ++ | \pm | - | \pm |
| Metamielócitos | ++ | + a ++ | + | - | - |
| Neutrófilos | ++ | + a ++ | ++ | - a \pm | \pm a + |
| Eosinófilos | ++ | + a ++ | - | - a \pm | \pm a ++ |
| Basófilos | - | + a ++ | - | - | - |
| Linfócitos | - | - | \pm | + | - |
| Monócitos | \pm a + | + | + | ++ | - |
| Proeritroblastos | - | - | - | - | - |
| Eritroblastos | - | - | - | - | - |
| Megacariócitos | - | \pm | + | ++ | \pm |

Escore de símbolos: -, negativo; \pm , questionável; +, positivo; ++, positividade muito nítida. Segundo Oliveira (1985) sendo esterase não específica, conforme Yam e cols.(1971).

Tabela 2 - Padrões citoquímicos para células leucêmicas, utilizados na classificação e diagnóstico de leucemias.

| | Peroxidase | Sudan | P.A.S. | Esterase não-específica α -naphtyl-ace- tato | Fosfatase alcalina |
|---------------|------------|-------|--------|--|-----------------------|
| Linfócitos T | - | - | + | ++ | - |
| Linfócitos B | - | - | + | - | - |
| Monócitos | + | ± | ± | ++ | - |
| Granulócitos | ++ | ++ | ± | - | + |
| Mieloblastos | ++ | ++ | - | - a ± | ± |
| Promielócitos | ++ | ++ | - | - a ± | ± |
| Neutrófilos | ++ | ++ | - a ± | - a ± | ++ |
| Eosinófilos | ++ | ++ | - a ± | - a ± | - |
| Basófilos | ± | + | ± | ± | + |
| Eritroblastos | - | - | + | + | - |

Escore de símbolos: -, negativo; ±, questionável; +, positivo; ++, positividade muito nítida. Conforme Yam e cols.(1971); Schmalzl & Braunsteiner(1971); Scott(1978) e Li(1981).

Tabela 3 - Especificidade celular das citoquímicas e usos principais

| Citoquímica | Especificidade celular | Usado na identificação de |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Esterase não-específica | Monócitos; Linfócitos T | LMA - M4 LMA - M5 |
| Peroxidase | Granulócitos; Monócitos | LMA |
| Sudan black | Granulócitos | LMA |
| P.A.S. | Eritroblastos; Linfócitos | LMA - M6 LLA |
| Fosfatase alcalina | Neutrófilos | LMC |

Conforme Schmalzl & Braunsteiner (1971); Koeffler & Golde (1981).

Tabela 4 - Citoquímicas em diversos tipos de leucemias agudas

| | M1 e M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 | Linfóide |
|-------------------------|--------------------|-------|--------|--------|--------------|----|---------------------|
| Esterase não-específica | - | - | + a ++ | + a ++ | - | - | + |
| Peroxidase | - a + | ++ | + a ++ | - a + | - | - | - |
| Sudan | ⁺ - a + | ++ | + a ++ | - a + | - | * | - |
| P.A.S. | - a ⁺ | - a + | + | - a + | + a ++ | * | ⁺ - a ++ |
| Fosfatase alcalina | + | + | + a ++ | + a ++ | ⁺ | * | + a ++ |

Escore de símbolos: -, negativo; ⁺, questionável; +, positivo; ++, positivo forte.

* dados não localizados.

Conforme Kaplow (1968), Schmalzl & Braunsteiner (1971) e Jandl (1987).

1.3.1 - Caracterização das técnicas citoquímicas utilizadas

1.3.1.1 - Peroxidase

A presença da enzima peroxidase é característica dos leucócitos granulócitos, sendo um ótimo marcador para as leucemias mielóides. A presença da peroxidase é demonstrado através do uso de dihidrocloreto de benzidina (Kaplou, 1965) que funciona como substrato a ser oxidado pela enzima. O composto oxidado é insolúvel e precipita na forma de grânulos ou cristais marrons ou negros no citoplasma das células positivas (Figura 2). É possível quantificar células positivas e negativas através de observação ao microscópio óptico.

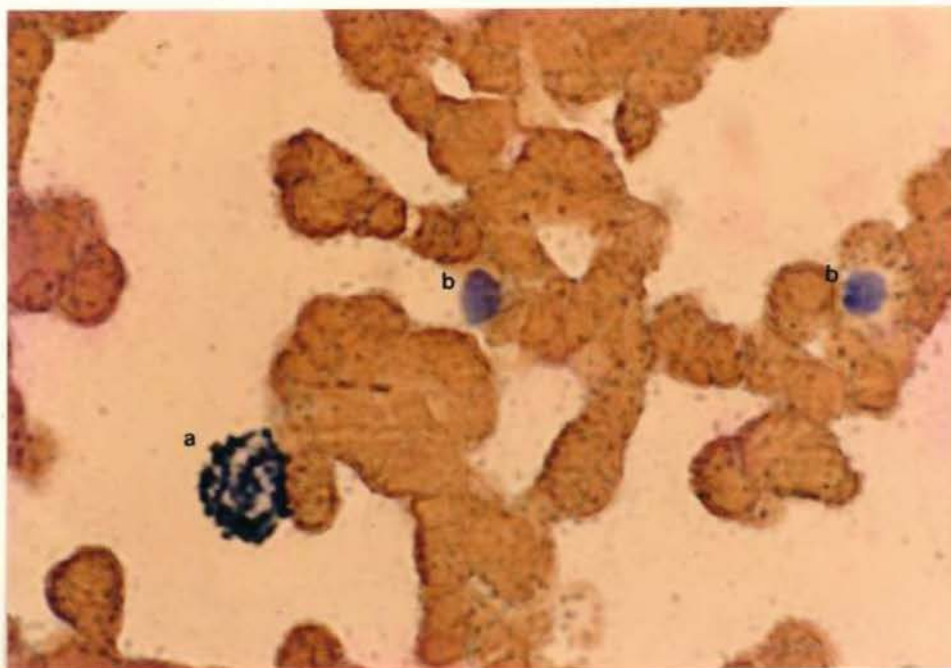


FIGURA 2 - Distensão de sangue periférico corado para Peroxidase. a) Leucócito granulócito apresentando positividade em blocos. b) Leucócitos negativos.

1.3.1.2 - Reação ácido periódico-Schiff (P.A.S.)

Caracteriza-se pelo uso de ácido periódico e reagente de Schiff, corando especificamente o glicogênio e mucopolissacarídeos presentes no citoplasma dos leucócitos e precursores eritrócitos.

Segundo Wislocki e cols. (1949) todos os granulócitos apresentam reação positiva, em diferentes graus, para o PAS. Blastos são normalmente negativos, podendo os eritroblastos apresentarem positividade variada (Quaglino & Hayhoe, 1960).

Segundo Astaldi & Verga (1957) esta técnica citoquímica pode ser usada como marcador para leucemias linfóides agudas pois os linfoblastos leucêmicos apresentam positividade aumentada para PAS. Esta afirmação é ainda hoje bastante discutida, pois podem ocorrer leucemias linfóides agudas PAS negativas.

A positividade para o PAS é observada pelo aparecimento no citoplasma de grânulos vermelhos ou coloração difusa vermelho intenso. (Figura 3)

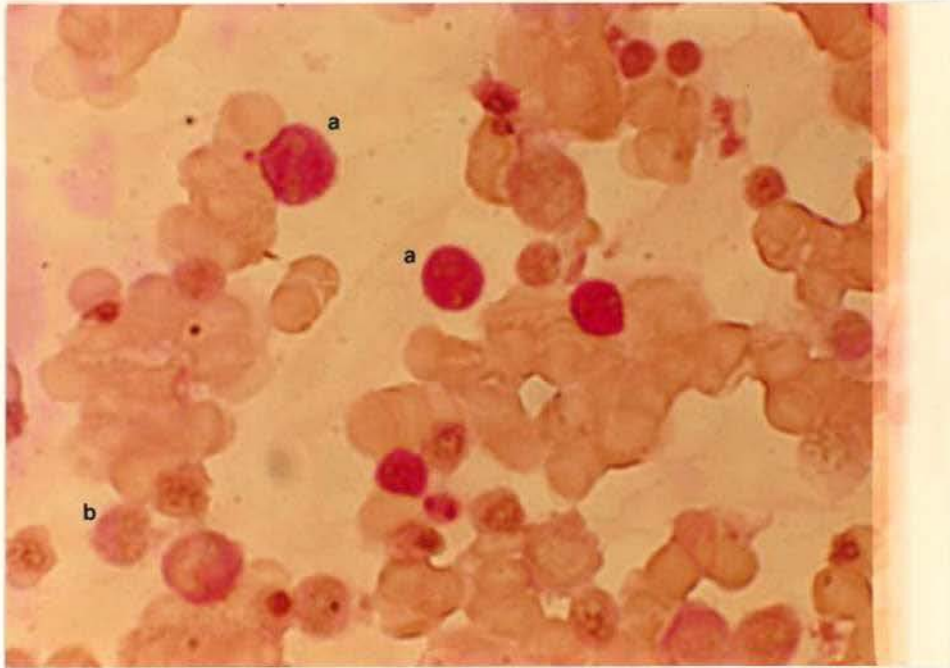


FIGURA 3 - Distensão de sangue periférico de um paciente leucêmico, corado para P.A.S. a) Leucócitos apresentando positividade em grânulos. b) Leucócitos apresentando positividade difusa.

1.3.1.3 - Sudan Black

A técnica de Sudan Black caracteriza-se por corar lipídios presentes no citoplasma das células. Segundo Dacie e Lewis (1984) esta técnica cora a membrana lipídica dos grânulos que alojam a mieloperoxidase. É uma técnica específica para granulócitos e monócitos sendo utilizada na identificação de leucemias mielóides. Os lipídios, após serem corados com Sudan apresentam coloração preta, em grânulos ou difusa, que pode ser observada em microscópio óptico (Figura 4).

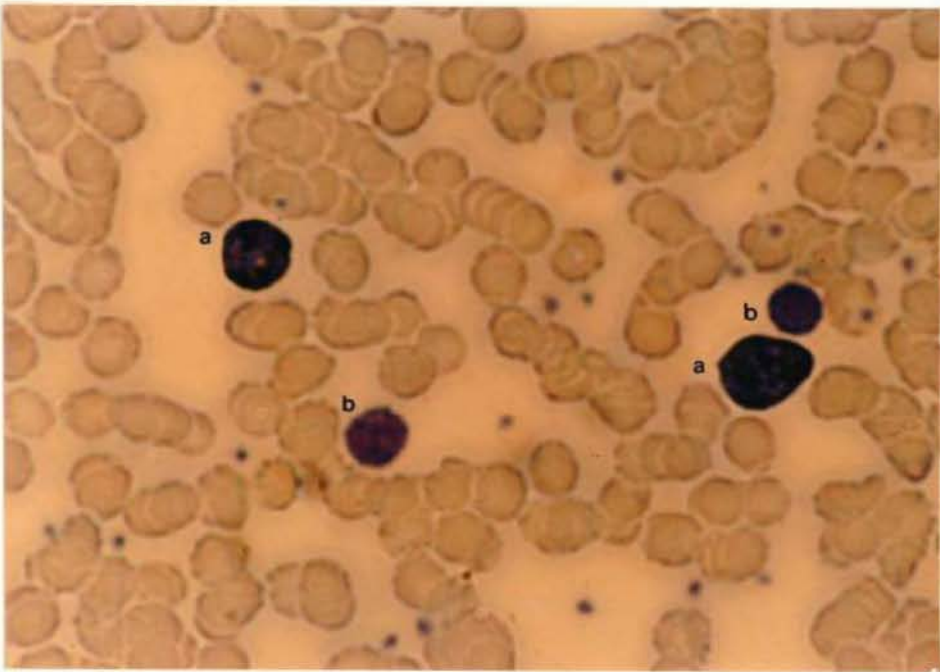


FIGURA 4 - Distensão de sangue periférico corado para Sudan black.
a) Granulócitos positivos. b) Leucócitos negativos.

1.3.1.4 - Esterase não-específica

A positividade para esterase não-específica, deve-se à presença de diferentes formas de esterases, que atuam sobre um mesmo substrato não específico, resultando no aparecimento de coloração marrom avermelhada no citoplasma das células. Esta técnica caracteriza-se por corar especificamente monócitos e linfócitos T. Segundo Pinkus e cols. (1979) a positividade em linfócitos T é focal e característica, podendo ser utilizada como marcador para leucemias linfóides. Em monócitos a coloração é difusa (Figura 5).

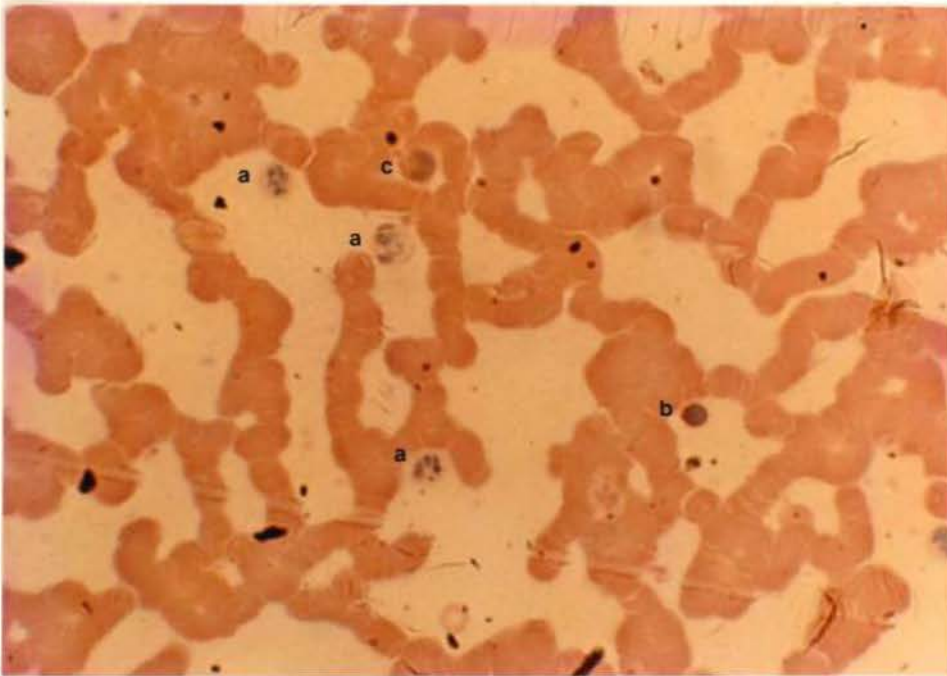


FIGURA 5 - Distensão de sangue periférico corado para Esterase não-específica. a) Leucócitos segmentados negativos. b) Linfócito T apresentando positividade focal. c) Mo_nócito apresentando positividade difusa.

Em monócitos a coloração é inibida pelo uso de fluoreto de sódio, o que não acontece com os linfócitos T que mantêm sua coloração. Segundo Li e cols. (1973) isto acontece pois a positividade nos linfócitos T e monócitos é dada por diferentes isoenzimas que atuam sobre um mesmo substrato (α -naftil acetato).

1.4 - Fatores Genéticos e Neoplasias

O desenvolvimento de uma neoplasia se caracteriza por alterações no comportamento de uma célula ancestral, que foi anteriormente uma célula normal. Como resultado desta alteração, as

células cancerosas perdem o controle de sua proliferação formando um clone de células que não respeitam os limites de sua posição, invadem tecidos adjacentes e não cumprem função equivalente à da célula normal que lhe deu origem, embora mantenham algumas de suas propriedades. Estes fatores sugerem que uma alteração no DNA celular, portanto um carácter hereditário, seja responsável pelo desenvolvimento neoplásico. Na procura do estabelecimento destes fatores, o passo importante foi a descoberta dos vírus oncogênicos. O primeiro vírus oncogênico foi descrito por Rous (1910) o que lhe valeu o Prêmio Nobel em 1966, aos 85 anos de idade. De acordo com Weinberg (1983), os trabalhos de Vogt e Dulbeco na década de 60 foram capazes de demonstrar "in vitro" a transformação de fibroblastos de embrião de hamster em células cancerosas através da infecção em vírus do polioma. Estas células cancerosas injetadas em ratos jovens, proliferaram e formaram tumores. Na etapa seguinte os genes virais foram inativados experimentalmente nas células transformadas e estas retrocederam ao status normal. Foi assim demonstrado que um pequeno complemento de DNA viral, os oncogenes, são capazes de induzir dezenas de modificações celulares, estruturais e comportamentais, estabelecendo-se assim o papel pleiotrópico dos oncogenes.

À luz da lógica, as investigações dirigiram-se à procura de mecanismos análogos de transformação, ou seja mutagênicos químicos e físicos, que não introduzem novo material genético à célula a ser transformada, mas sim alterem a informação genética pré-existente. A transformação celular foi obtida pelo tratamento com mutagênicos, e bem mais, o DNA de células transformadas

foi capaz de transformar células sãs, enquanto que o DNA de células normais não o fez. Também tumores espontâneos passaram a ser utilizados como doadores de DNA para a transformação de células normais, e entre estes estão os tumores humanos como o carcinoma de bexiga, do colon, do pulmão, fibrosarcomas, neuroblastomas e as leucemias. Se a seqüência de DNA tumoral pode transformar células, independentemente de sua espécie e tecido de origem, há um "princípio transformante" comum. As técnicas de clonagem gênica tornaram possível determiná-lo com uma simples seqüência de DNA, carregando um único gene com estrutura definida, o oncogene celular. Hoje sabe-se que as células normais possuem tais genes, sob a forma de proto-oncogene (c-onc), que após pequenas alterações, transformaram-se em oncogenes (onc). Há fortes evidências de que os c-onc estão envolvidos no desenvolvimento e crescimento celular normal, o que é reforçado pela observação de que estes são altamente conservados na escala evolutiva. Como exemplo de transformação temos o oncogene ras, isolado de tumor de bexiga humana e comparado com o proto-oncogene ras de bexiga humana normal, mostrando a substituição de um único nucleotídeo; logo uma mutação pontual como causa da mudança c-onc → onc. Foi ainda demonstrado que um c-onc, sujeito a forte regulação positiva, através de regulador viral por infecção, ou rearranjos cromossômicos, é capaz de ser transcrito com grande eficiência, o que resulta na transformação celular. A amplificação gênica de oncogenes tem sido demonstrada em células tumorais (Yunis, 1983).

Desta forma pode-se inferir quatro mecanismos genéticos de transformação celular: 1- infecção por material genético viral;

2- mutação no proto-oncogene; 3- rearranjos cromossômicos; 4- amplificação gênica.

De acordo com Faber (1984) o desenvolvimento neoplásico não é o resultado de uma única alteração celular hereditária, mas, na realidade envolve alterações específicas, independentes. Estas modificações podem ser divididas em três etapas; 1- iniciação, que resulta em mudanças hereditárias irreversíveis na célula alvo (descritas acima); 2- promoção, a célula iniciada pode permanecer dormente até que agentes promotores (não mutagênicos) estimulem sua expansão; 3- progressão, com a expansão da população de células tumorais, futuras modificações podem levar a seleção de células mais malignas (Bradshaw, 1986).

Como exemplo do processo de promoção podemos referir os fatores de crescimento (PGFs), que é um grupo heterogêneo de polipeptídios. Num primeiro passo, todos os fatores de crescimento ligam-se a receptores na superfície da célula alvo. Esta ligação gera sinais intracelulares que levam a numerosas respostas biológicas e bioquímicas, incluindo a síntese de DNA. Existem evidências de que a transformação é o resultado da alteração de alguns elementos do mecanismo mitótico normal. O fato de que algumas células transformadas secretam polipeptídios mitogênicos, sugere uma auto-regulação (Sporn e Todaro, 1980). Há exemplos em que o próprio oncogene codifica um fator de crescimento. Outros oncogenes codificam receptores para fatores de crescimento que podem ter atividade de proteína-tirosinoquinase, enzima que regula a fosforilação de proteínas e fosfolipídios, que irão funcionar como elementos de transdução do citoplasma no núcleo. E

xistem aqueles oncogenes que codificam proteínas com atividade tirosino quinase unicamente e finalmente aqueles que codificam sinais para a transcrição e replicação do DNA. (Bradshaw, 1986; Bishop, 1982 e 1986; Newmark, 1987).

No processo de alterações progressivas, é freqüente o encontro de alterações cromossômicas aleatórias (verificadas em casos esporádicos) e constantes (encontrados na maioria de certos tumores). Como exemplo das constantes podemos citar o proto-oncogene *c-myc*, que se localiza originalmente no cromossomo humano 8, mas que no linfoma de Burkitt está translocado para o cromossomo 2, 14 ou 22. Foi demonstrado que o gene *c-myc* é expresso com maior eficiência por estar translocado a regiões cromossômicas vizinhas aos genes das imunoglobulinas, sujeito assim a regulação forte. Três regiões do genoma do vírus EBV, implicado na etiologia do linfoma de Burkitt, são também transcritos regularmente nas células transformadas, funcionando como um grupo de complementação com *c-myc*, levando os linfócitos B à transformação neoplásica. Já no tumor de Wilms, no retinoblastoma e no carcinoma familiar de células renais, no neuroblastoma e no carcinoma de células pequenas do pulmão, não ocorre translocação de oncogenes, mas sim deleção de material genético, demonstrando a existência de genes reguladores antioncogenes ou supressores de câncer. O exemplo mais estudado é o gene *rb-1*, cujos dois alelos são perdidos no retinoblastoma familiar.

1.4.1 - Fatores genéticos em leucemias

Os estudos de ocorrência de leucemia familiar iniciaram-se na década de 40, sendo que, a maioria deles pertencem ao grupo

das leucemias linfocíticas, agudas e crônicas. Os casos de leucemia mielocítica crônica são muito raros. O número de afetados varia de 2 a 6. A maior agregação de casos foi descrita por Gunz e cols. (1978, 1983) com a ocorrência de 15 casos, 14 agudos entre os 302 membros de uma família. Famílias com múltiplos casos de leucemias são raras, porém a ocorrência de um caso leva a uma probabilidade de 2 a 3% de recorrência entre parentes em 1º grau para LLA ou LLC mas não para LMC. Ocorrem também maior número de linfomas, especialmente nas famílias com casos de LLC, mas não há aumento da incidência de câncer como um todo (Gunz, 1983). Estes achados não estabelecem claramente que o excesso de incidência familiar seja geneticamente determinado, uma vez que não há evidências de herança mendeliana. A herança mendeliana dominante com penetrância variável é uma hipótese, porém sua distinção da herança poligênica é muito difícil. A ausência de casamentos consanguíneos nas famílias envolvidas, tem descartado a hipótese de mecanismos de recessividade, embora Fraumeni e cols. (1969) descreva três casos de leucemia linfocítica crônica na filiação de primos em 2º grau. Nesta mesma família ocorrem anormalidades imunológicas, como baixos níveis de imunoglobulinas, levando os autores a sugerir mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento das leucemias.

Vários estudos têm tentado associar a incidência de leucemias a marcadores genéticos, como HLA, não tendo sido obtidas associações claras entre estes. Pawelec e cols. (1988) entretanto, observaram associação positiva e negativa entre os produtos gênicos do complexo de histocompatibilidade principal e LLA, mas não com LMC. Estes achados sugerem que a região HLA-DP pode con

ter genes influenciando a suscetibilidade e resistência ao desenvolvimento da leucemia. Também Bortin e cols. (1987), analisando a frequência de 35 antígenos HLA A, B, C e DR em 1834 leucêmicos caucasóides, observaram que o antígeno Cw3 foi significativamente mais frequente nos pacientes com leucemia mielogênica aguda e crônica. A frequência de Cw4 foi elevada entre os pacientes com leucemia linfoblástica aguda e com leucemia mielogênica crônica, enquanto que o antígeno Aw19 estava significativamente diminuído nos casos de LMA e LMC. Os achados sugerem que Cw3 e Cw4 podem ser marcadores para genes de suscetibilidade enquanto que Aw19 pode ser marcador de resistência à leucemias.

É sabido que certas condições genéticas, especialmente as caracterizadas por anomalias cromossômicas, estão também associadas a um aumento na incidência de leucemia. O exemplo mais conhecido é a Síndrome de Down onde ocorre um aumento dos casos de leucemia, especialmente aguda, em relação a taxa normal. Também na anemia de Fanconi, Síndrome de Bloom e ataxia talangiectasia, desordens gênicas, ocorrem um aumento de incidência de leucemia. Nestas doenças ocorre uma fragilidade cromossômica observada na cultura de linfócitos, e uma maior suscetibilidade a aberrações cromossômicas após tratamento das culturas com carcinogênicos.

A primeira descrição de uma aberração cromossômica específica em leucemia foi o cromossoma Philadelphia na Leucemia mieloide crônica. A anomalia cromossômica é uma translocação de uma região do braço longo do cromossomo 9 ao cromossomo 22. Heisterkamp e cols. (1983), por técnicas de mapeamento por enzimas de

restrição, observaram que o oncogene **c-abl** inclui-se na região translocada do cromossomo 9.

Uma revisão sobre achados cromossômicos em leucemias e condições afins foi executada por Sampaio (1983).

Haluska e cols. (1987) descrevem que neoplasias da linhagem de linfócitos B seguidamente envolvem translocação cromossômicas 11/14, o último incluindo a cadeia pesada de imunoglobulina, na posição q32 mais especificamente o segmento J e envolve a enzima V-D-J recombinase. O cromossomo 14 na região q11 possui os genes da cadeia do receptor de célula T (TCR). Uma inversão no cromossomo 14, envolvendo esta região, é descrita para LLA de célula B, que justapõe o segmento variável da cadeia pesada da imunoglobulina com o segmento TCRJ (Denny e cols. , 1986).

Maiores informações sobre os mecanismos envolvidos nas alterações cromossômicas nas Leucemias T e B, e na da diferenciação de cânceres linfóides podem ser obtidos em Haluska e cols. (1987) e Graeves (1986), respectivamente.

Conforme revisão de Mamaeva e cols. (1983) a trissomia, parcial ou total, do braço longo do cromossomo 1, foi observado em casos de LMA, LLA, LMC, LA não diferenciada, policitemia vera, mielofibrose, linfoma de Burkitt e alguns tipos de anemia. O papel da trissomia, que envolve principalmente a região distal ao segmento 1q25, não é conhecida, mas, após o seu surgimento, observa-se pronunciada resistência à terapia citostática e agrava-se o curso da doença.

Taniswaki e cols. (1987) descrevem exemplos de translocações como: $t(15:17)$ correlacionada à LMA-M3, $t(8:21)$ à M2; translocação ou deleção $q11$ à M5; inversão ou deleção no cromossomo 16 à M4 com eosinofilia anormal e descreve a evolução cariotípica de um caso LMA subtipo M4 associada com eosinofilia na medula óssea e anomalias cromossômicas específicas: $inv(16)(p13q22)$, $del(7)(q22q34)$ e ganho cromossômico # 8 e #22. O cariótipo modal é $47, XY, 7q-, inv(16)+22$, mas há três outros clones, $46, XY, inv(16)$; $47, XY, inv(16)+22$ e $48, XY, +8, inv(16)+22$. A identificação das anomalias cariotípicas e sua progressão tem sido valiosas no diagnóstico e prognose dos pacientes.

Chitambar e cols., (1983) descreve uma família na qual 8 indivíduos, dos 14 de uma geração, apresentaram anemia aplástica, leucemia mielóide aguda, ou anemia aplástica terminando em leucemia mielóide aguda. O probando desta família, apresentou-se em fase pré-leucêmica, que evoluiu para leucemia aguda associada a evolução cariotípica terminada na monossomia do cromossomo 7. Dois pacientes leucêmicos, de outra irmandade da mesma geração (primos irmãos do probando), apresentaram monossomia de cromossomas do grupo C. Em 1987, Paul e cols., voltam a descrever monossomia do cromossomo 7 em células da medula óssea de um dos dois irmãos com anemia hipoplásica (não Fanconi), quando este desenvolveu anemia "refratária" com excesso de blastos. Ambos os pacientes apresentavam inversão constitucional no cromossomo 1. Já Kaur e cols. (1972) descrevem uma família onde 5 irmãos apresentam leucemia mielóide aguda ou mielodisplasia, sendo seu pai falecido por anemia hipoplásica. Os três leucêmicos faleceram e os 2 pré-leucêmicos apresentam um clone de medula

óssea, trissômico para um representante do grupo cromossômico C.

Os dados aqui apresentados, tentam resumir os principais e xemplos que nos levam a concluir que o desenvolvimento de uma neoplasia é a complexa interação entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais.

1.5 - Objetivos

O presente trabalho foi desenvolvido junto à Unidade de hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com pacientes baixados de maio a outubro de 1988, e teve como objetivos principais:

1. o estabelecimento das técnicas citoquímicas para Sudan black, fosfatase alcalina e esterase não específica;
2. a avaliação da eficiência destas técnicas na diferenciação dos subtipos de leucemias;
3. o levantamento de dados dos familiares dos probandos , quanto a ocorrência de casos de neoplasias em suas famílias;
4. através dos dados familiares de neoplasias, verificar se há indicação de associação entre leucemia e algum tipo específico de câncer, ou repetição de casos leucêmicos, para sugerir um estudo detalhado destas famílias.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

A amostra analisada constituiu-se de pacientes baixados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre de maio de 1988 a outubro de 1988 diagnosticados como leucêmicos e descritos na tabela 5, a partir de agora, referidos como paciente 1, 2 e assim por diante. Destes pacientes foram coletados dados pessoais, laboratoriais e citoquímicos, diagnóstico clínico e com especial atenção à este trabalho, os dados relacionados a história familiar de neoplasias e doenças hematológicas. A ficha utilizada para tal coleta encontra-se no apêndice deste trabalho. O material utilizado para análise citoquímica foi um aspirado de medula óssea obtido através de punção na região da crista ilíaca. O aspirado de medula óssea imediatamente após coletado foi distendido sobre lâminas de vidro, para observação em microscópio óptico. As lâminas após secagem ao ar foram tratadas para as diferentes técnicas citoquímicas, descritas a seguir.

2.1 - Reação Ácido Periódico-Schiff (P.A.S.)

O material aspirado de medula óssea anteriormente distendido sobre as lâminas foi fixado cobrindo-se estas lâminas com uma mistura composta de 9 partes de etanol/1 parte de formol 40% durante um minuto. Lavou-se as lâminas em água corrente seguin-

do-se secagem ao ar. As distensões assim fixadas foram cobertas com uma solução de ácido periódico a 1% durante 15 minutos. Procedeu-se nova lavagem e secagem ao ar. As distensões foram então cobertas pela solução de Schiff (1 g de fucsina básica; 200 ml de água destilada; 2,0 g de bissulfito de sódio; 10 ml de ácido clorídrico 1N; 1 g de carvão vegetal, que deve ser filtrada e guardada na geladeira) e colocadas para incubar no escuro durante aproximadamente 30 minutos. Lavaram-se as lâminas em água corrente e deixou-se secar ao ar. A contracoloração foi efetuada com hematoxilina de Carazzi (400 ml de água destilada; 100 ml de glicerina; 25 g alúmen de potássio; 0,1 g de iodeto de sódio; 1 g de hematoxilina) por 10 minutos (Wilslockie e cols., 1949).

2.2 - Peroxidase

As lâminas anteriormente preparadas com material aspirado de medula óssea foram fixadas em uma mistura 9 partes de etanol: 1 parte de formol 40% por aproximadamente um minuto, sendo posteriormente lavadas e secas. As distensões assim fixadas foram cobertas (mais ou menos 1 ml) pela solução corante de peroxidase (100 ml de etanol 30%; 0,3 g de dihidrocloro de benzidina; 1,0 ml de sulfato de zinco 3,8%; 1,0 g de acetato de sódio; 1,5 ml de hidróxido de sódio 1N; 0,7 ml de água oxigenada 10 volumes) por 3 minutos. Em seguida adicionava-se sobre as lâminas 0,5 ml de uma solução de água oxigenada preparada no momento do uso (2 gotas de água oxigenada 10 volumes para 5 ml de água destilada), e deixava-se a lâmina corar por mais dois minutos. As lâminas foram então lavadas em água corrente e secas ao ar li-

vre e após isto contracoradas pela coloração de rotina, May-grünwalde/Giemsa descrita a seguir (Kaplow, 1965).

2.3 - Sudan black

As lâminas anteriormente preparadas foram fixadas deixando-as em uma atmosfera saturada de vapor de formol durante 10 minutos. Deve-se evitar o contato direto do material com o formol. Passados estes 10 minutos mergulha-se a lâmina fixada em uma cuba contendo a solução corante de Sudan black obtida da mistura de 60 ml da solução estoque de Sudan black (0,3 g de Sudanblack em pó dissolvidos em 100 ml de etanol absoluto) com 40 ml de tampão (16 g de fenol; 30 ml de etanol absoluto; 0,3 g de monofosfato de disódio 12 hidratado; 100 ml de água destilada), durante 30 a 60 minutos, conforme a quantidade de material a corar. Após este período as lâminas foram lavadas com etanol 70% para eliminar o excesso de corante. Contracorou-se pela coloração de rotina, May-grünwalde/Giemsa (Lilie e Bortner, 1953).

2.4 - Coloração de Rotina (May-grünwalde/Giemsa)

Após coloração anterior as lâminas foram fixadas por 3 minutos com o corante de rotina (9,5 g corante May-grünwalde; 11,35 g do corante Giemsa; 50 ml de glicerina; q.s.p. 5000 ml de metanol), sem lavar colocou-se água destilada sobre a lâmina em quantidade suficiente para cobri-la, e deixou-se corando por 5 minutos. Lavou-se a lâmina com água corrente e deixou-se secar ao ar.

2.5 - Fosfatase Alcalina Leucocitária

As lâminas foram fixadas no máximo 30 minutos após a coleta para que não ocorressem falsos negativos devido à inativação da enzima. As distensões foram fixadas por 30 segundos em uma solução (9:1) de etanol/formol, lavados em água corrente e secos ao ar. Os esfregaços foram então corados com a solução de diazônio que é preparada no momento do uso; 10 ml de solução substrato estoque (30 mg naphthol AS fosfato; 0,5 ml N-N dimetilformamida; 100 ml de tampão Tris HCl 0,2 M pH 9,0) com 10 mg de Fast Blue B.B., esta solução foi filtrada sobre a lâmina que permaneceu corando pelo período de uma hora. Lavou-se o material em água corrente e secou-se ao ar. A contracoloração foi feita com vermelho neutro (1 g dissolvida em 1 litro de água destilada) por 6 minutos (Kaplow, 1963 e 1968).

2.6 - Esterase Não Específica

O aspirado de medula óssea distendido sobre a lâmina foi fixado com o uso de uma mistura gelada de formol/acetona (40 mg de monofosfato de disódio; 200 mg de difosfato de monopotássio; 60 ml de água destilada; 90 ml de acetona; 50 ml de formol) no máximo 30 minutos após sua coleta para evitar perda de atividade da enzima analisada. Seguiu-se lavagem sob água corrente e secagem ao ar. Após secar, a lâmina foi coberta com uma solução resultante da mistura de 9,4 ml de tampão fosfato ph 6,0-6,3 (22,4 ml de Na_2HPO_4 1M mais 77,6 ml KH_2PO_4 1M); 0,1 ml de fucsi na hexazotizado (0,2 ml de fucsina 4% em HCl 2N mais 0,2 ml de nitrito de sódio a 2%) modificado da técnica original (Li e cols., 1973), que utilizava pararosanilina em vez de fucsina; 0,5 ml da solução de alfa naftil acetato (0,2 g de alfa naftil acetato

em 10 ml de acetona) modificado da técnica original que utiliza 2-metoxietanol em vez de acetona. Esta solução deve ser filtrada sobre a lâmina. O material foi então incubado por 45 minutos à temperatura ambiente. Lavou-se o material com água corrente e secou-se ao ar. A contracoloração foi obtida cobrindo-se a lâmina com verde de metila a 2% por dois minutos.

Cabe salientar que as modificações com relação ao emprego de reagentes foram introduzidas com o objetivo de utilizar-se o material disponível no laboratório, diminuindo-se assim o custo do exame. Os resultados obtidos através do uso da técnica adaptada demonstraram-se extremamente satisfatórios, concluindo-se que a fucsina e a acetona podem, sem perda de eficiência, substituir respectivamente a pararosanilina e o 2-metoxietanol nesta técnica citoquímica.

Em casos de esterase não específica positiva, e da necessidade de diferenciação entre componentes linfóides e monocíticos, pode-se utilizar a mesma técnica descrita acima, adicionando-se à mistura de incubação, 15 mg de fluoreto de sódio.

Tabela 5 - Apresentação dos pacientes estudados

| Nº | PACIENTE | Nº PRONTUÁRIO | IDADE | SEXO | Nº LEUCÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO |
|----|----------|---------------|-------|------|------------------------------------|
| 1 | D.M.B. | 113645/6 | 58 | F | 300 |
| 2 | A.V.L. | 400166/5 | 59 | M | 4.700 |
| 3 | A.S.C. | 380520/7 | 16 | F | * |
| 4 | R.S.C. | 234339/0 | 18 | F | * |
| 5 | L.D.P. | 402206/7 | 01 | M | 2.900 |
| 6 | M.K. | 402614/2 | 09 | M | 700 |
| 7 | D.B.K. | 398860/7 | 26 | M | 3.600 |
| 8 | A.D. | 405947/3 | 14 | F | 1.400 |
| 9 | C.C.H. | 402772/8 | 49 | M | 5.100 |
| 10 | P.M. | 327527/8 | 03 | F | 4.400 |
| 11 | J.A.V.L. | 405981/2 | 75 | F | 2.700 |
| 12 | F.S.P. | 406730/2 | 70 | F | 1.300 |
| 13 | N.D.B. | 405993/7 | 63 | F | 3.000 |
| 14 | O.B.S. | 405998/6 | 68 | F | 2.000 |
| 15 | M.M.K. | 410149/0 | 22 | M | 31.300 |
| 16 | A.M. | 394614/2 | 14 | F | 85.600 |
| 17 | W.O.R. | 366776/3 | 07 | M | 2.800 |
| 18 | N.B.G.M. | 411273/6 | 15 | M | 1.600 |
| 19 | T.L.M.T. | 408657/5 | 37 | F | 800 |
| 20 | C.P.B. | 411995/4 | 49 | M | 2.900 |
| 21 | M.C.T. | 412682/7 | 28 | F | 145.900 |
| 22 | C.P.B. | 415671/7 | 67 | F | 68.300 |
| 23 | Z.C.C. | 414914/2 | 69 | F | 24.500 |

* Dados não localizados

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Citoquímicas

Os resultados obtidos através das técnicas citoquímicas em aspirado de medula dos 23 pacientes estudados, bem como o diagnóstico da leucemia de cada um deles, encontram-se na Tabela 6.

Para melhor visualização dos resultados, os dados da Tabela 6 foram agrupados, de acordo com o diagnóstico, na Tabela 7. Esta tabela descreve os resultados obtidos para cada uma das técnicas citoquímicas utilizadas nos diferentes subtipos de leucemias.

Tabela 6 - Resultados das citoquímicas e diagnóstico para os 23 pacientes estudados

| Nº | C I T O Q U Í M I C A S | | | | OBSERVAÇÕES | DIAGNÓSTICO |
|----|-------------------------|-------------|--------|--------------|-----------------------------|-------------------|
| | Peroxidase | Sudan black | P A S | ESTERASE N-E | | CLASSIFICAÇÃO FAB |
| 01 | + | + | + | | | LMA - M2 |
| 02 | 70% + | 54% + | + | 55% + | | LMA - M4 |
| 03 | + | + | - | | | LMA - M5 |
| 04 | | | | | | LMA - M4 |
| 05 | - | - | + | - | | LMA - M6 |
| 06 | - | + | + | - | | LMA - M6 |
| 07 | + | + | - | | | LMA - M2 |
| 08 | + | + | - | | | LMA - M4 |
| 09 | - | - | + | - | Fosfatase alcalina- | LMC em agudização |
| 10 | - | - | 100% + | | | LLA - L2 |
| 11 | + | + | - | | | LMA - M1 |
| 12 | + | + | - | | | LMA - M4 |
| 13 | + | + | - | | | LMA - M1 |
| 14 | + | + | - | | | LMA - M1 |
| 15 | - | - | - | - | | LLA - L2 |
| 16 | - | - | + | - | | LLA - L2 |
| 17 | + | + | - | | | LMA - M2 |
| 18 | + | + | - | + | Inibição por NaF + | LMA - M5 |
| 19 | + | + | - | | | LMA - M2 |
| 20 | + | + | - | 50% + | Inibição incompleta por NaF | LMA - M4 |
| 21 | | + | + | 50% + | Inibição por NaF + | L. Bifenotípica |
| 22 | | + | - | | | LMA |
| 23 | | + | - | + | Inibição total por NaF | LMA - M5 |

Tabela 7 - Tabulação dos resultados obtidos nos testes citoquímicos, de acordo com o subgrupo da leucemia apresentada pelo paciente.

Excluída desta tabela a paciente número 22, que apresentava leucemia classificada apenas como LMA.

| DIAGNÓSTICO | Nº de casos | P. A. S. | | Sudan black | | PEROXIDASE | | E S T E R A S E | |
|-----------------------|-------------|----------|-----------|-------------|-----------|------------|-----------|-----------------|-----------|
| | | Testados | Positivos | Testados | Positivos | Testados | Positivos | Testados | Positivos |
| LMA - M 1 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | - | - |
| M 2 | 4 | 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | - | - |
| M 4 | 5 | 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 |
| M 5 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| M 6 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| LLA - L 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 |
| LMC EM AGUDIZAÇÃO | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | - | - |
| LEUCEMIA BIFENOTÍPICA | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | 1 | 1 |

Apoiados em revisões feitas por Schmalzl & Braunsteiner (1971), Hayhoe & Cawley (1972) e Scott (1978) a respeito das aplicações de técnicas citoquímicas no estudo das leucemias agudas, podemos afirmar que as técnicas de Sudan black e peroxidase caracterizam as leucemias mielóides agudas; P.A.S. caracteriza leucemia eritroblástica (LMA - M6) e leucemias linfóides; esterase não-específica caracteriza leucemias que apresentam componentes monocíticos ou linfócitos tipo T. Entretanto, segundo Twu e cols. (1987), as técnicas citoquímicas ainda apresentam certos problemas. Se por um lado podemos identificar com relativa precisão granulócitos, monócitos e seus precursores, o estudo dos linfócitos ainda não é satisfatório. Por exemplo, em estudo realizado por Cantú-Rajold e cols. (1986) em crianças com leucemia linfóide aguda, os resultados para as técnicas de P.A.S., esterase não-específica e fosfatase ácida foram bastante variados.

Comparando-se a Tabela 3 com os dados apresentados na Tabela 7, podemos observar que os resultados obtidos no presente trabalho coincidem com o descrito na literatura.

Dos 16 pacientes diagnosticados como portadores de leucemia mielóide aguda, o aspirado de medula de 15 deles apresentou positividade para a coloração de Sudan black. Apenas um apresentou-se negativo para esta coloração, sendo o paciente diagnosticado como portador de leucemia eritroblástica.

Os mesmos aspirados da medula dos 16 pacientes foram testados para a técnica citoquímica de P.A.S., sendo 4 análises positivas. Dos 4 pacientes cujos exames foram positivos, 2 foram diag

nosticados como portadores de LMA - M6. 15 pacientes diagnosticados como portadores de leucemia mielóide aguda tiveram sua medula testada para peroxidase, 13 apresentando resultados positivos, sendo os 2 pacientes cujos resultados foram negativos, diagnosticados como portadores de LMA - M6.

Os dados acima confirmam o esperado para as leucemias mielóides agudas M1 a M5, que tendem a ser P.A.S. negativo e Sudan black e peroxidase positivos. No caso de leucemia mielóide aguda - M6 ocorre, geralmente, positividade para a técnica de P.A.S., sendo Sudan black e peroxidase preferencialmente negativos.

Dos 8 pacientes diagnosticados como LMA - M4 e LMA - M5, ou seja com presença de componentes monocíticos, a medula de 4 foi testada para esterase não específica, todos os resultados sendo positivos (Figura 6).

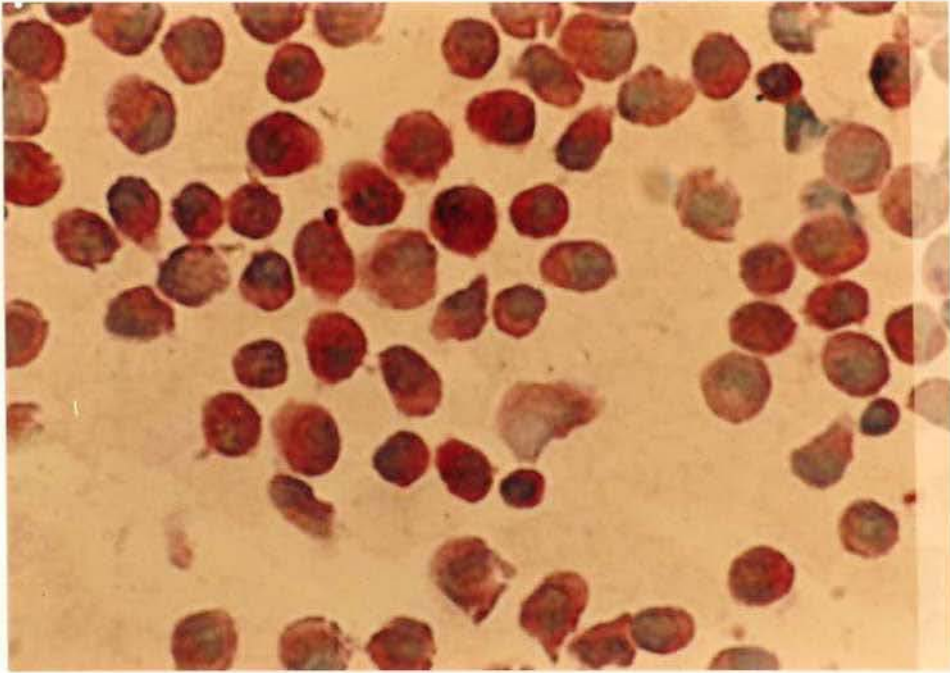


FIGURA 6 - Distensão de medula óssea. Leucemia mielóide aguda - M5. 100% de células positivas para a técnica de esterase não-específica.

A figura 7, em contraposição à figura 6, apresenta o aspecto de uma lâmina de medula óssea de uma leucemia não monocítica, corada para esterase não-específica e que teve resultado negativo. Nota-se positividade em um monócito normal e blastos negativos apresentando apenas a contracoloração do núcleo.

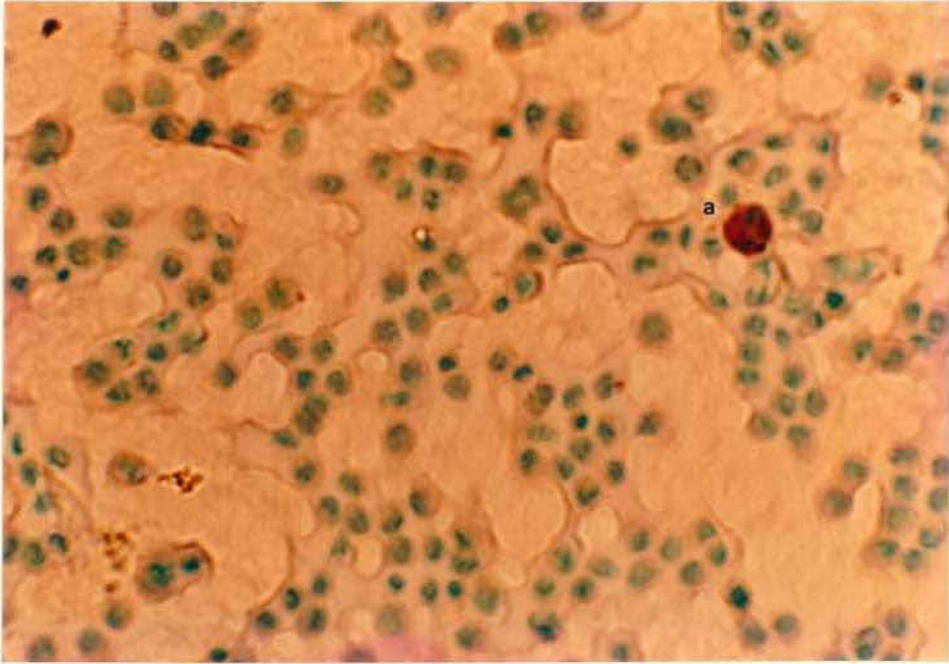


FIGURA 7 - Distensão de medula óssea corada para esterase não-específica. Leucemia não apresentando componente monocítico. a) monócito normal positivo. Blastos negativos.

Dos 3 pacientes que foram diagnosticados como LLA-L2, dois tiveram sua medula óssea testada para esterase não-específica, sendo ambos negativos, o que nos leva a crer que as células que deram origem a estes processos neoplásicos encontravam-se ainda em um grau muito pequeno de diferenciação, não proporcionando positividade para esta técnica que também caracteriza linfócitos T, ou a leucemia era derivada de linfócitos B. No que se refere ao uso da esterase não-específica para determinação de linfócitos T, algumas considerações devem ser feitas.

Segundo Li e cols. (1973) o uso de α -naftil acetato esterase como substrato para a técnica de esterase não-específica caracteriza monócitos e megacariócitos. Pinkus e cols. (1979) apresenta este mesmo substrato em técnicas de esterase não-específica como marcador para linfócitos T, salientando que, quando utilizado fluoreto de sódio para inibir a ação de determinadas isoenzimas da esterase, apenas os monócitos têm sua coloração inibida, ficando os linfócitos T corados normalmente ou com coloração ligeiramente mais fraca.

Durante as análises efetuadas para a realização do presente trabalho, foram feitas colorações para as esterases com o substrato em questão, sendo também utilizado o processo de inibição por fluoreto de sódio. Nestas colorações observou-se inibição também em linfócitos T quando adicionado o fluoreto de sódio, o que contraria as observações de Pinkus e colaboradores. Cabe salientar que a amostra estudada no presente trabalho é pequena, além da possibilidade de terem ocorrido problemas no desenvolvimento da técnica, de modo que recomendamos um maior estudo a respeito da ocorrência de esterase em linfócitos T a fim de resolver esta questão.

A medula dos casos diagnosticados como leucemia linfóide aguda foi ainda testada para as técnicas de Sudan black, peroxidase e P.A.S. Resultados positivos foram encontrados apenas para a técnica de P.A.S., o que corresponde ao descrito na literatura. A figura 8 apresenta o aspecto de uma distensão de medula óssea de um paciente com leucemia linfóide aguda, corada para Sudan black. Sendo esta coloração específica para granulócitos, ca

racterizando leucemias mielóides, o aspecto negativo dos blastos é compatível com o diagnóstico.

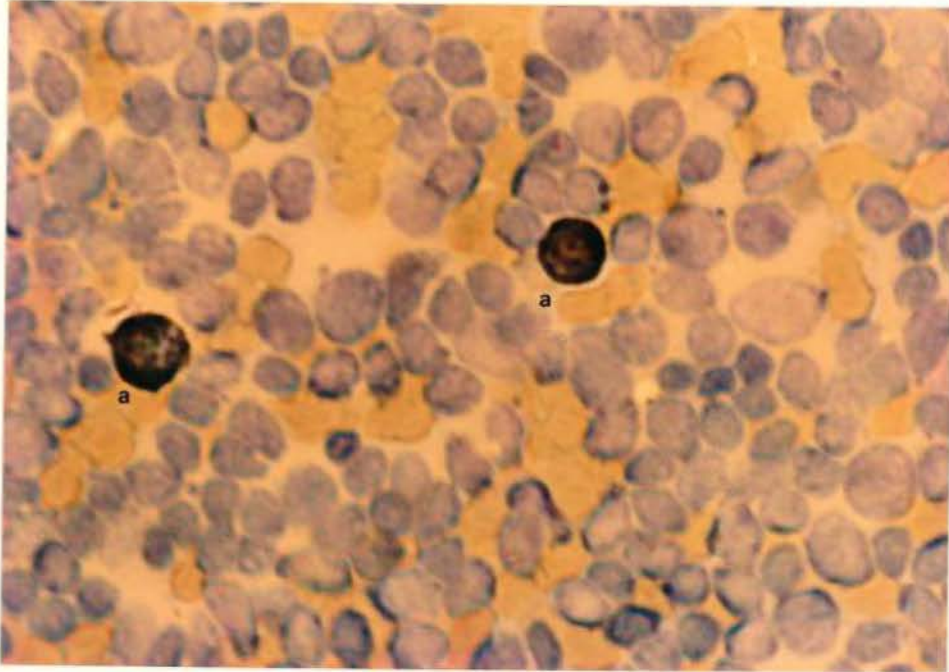


FIGURA 8 - Distensão de medula óssea de um paciente com leucemia linfóide aguda, corada para Sudan black. a) granulócitos normais positivos. Aspecto geral dos blastos negativo.

3.2 - Agudização em uma Leucemia Mielóide Crônica

O paciente número 9 apresentou quadro de leucemia mielóide crônica em processo de agudização.

Segundo Scott (1978), crise blástica é um distúrbio no qual ocorre a transição de uma leucemia mielóide crônica para uma forma aguda. É caracterizada pelo aparecimento de células imaturas demonstrando peculiaridades citoquímicas e morfológicas. Aproximadamente 90% dos indivíduos com leucemia mielóide crônica desenvolvem crise blástica, sendo esta uma das maiores causas de

morte em L.M.C.s. Cabe salientar que a agudização de uma L.M.C. é um processo considerado comum pelos hematologistas, visto sua freqüência, ocorrendo geralmente agudização linfóide, ou seja, aparecimento de células imaturas da linhagem linfóide no sangue periférico e/ou medula óssea.

Há casos como o relatado por López e cols. (1986), em que um único paciente, inicialmente diagnosticado como LLA-L1 desenvolveu LMA-M1 como um segundo distúrbio hematológico; há casos ainda como o paciente número 21 do presente trabalho, que apresenta leucemia bifenotípica, com presença de precursores leucêmicos das séries linfóide e monocítica. É importante diferenciar agudização da LMC dos casos acima pois cada um deles apresenta características e prognóstico específico.

O diagnóstico de leucemia mielóide crônica do paciente número 9 do presente trabalho foi possível pela análise morfológica das células neoplásicas diferenciadas presentes no sangue periférico. Após diversas colorações citoquímicas de distensões de medula óssea pode-se observar que os blastos (células indiferenciadas) leucêmicos apresentavam-se negativos para Sudanblack e peroxidase, e positivos para P.A.S., o que sugere agudização linfóide (vide Tabela 7), diagnóstico bastante provável se comparado ao esperado em pacientes com LMC.

3.3 - Ocorrência de Neoplasias em Aparentados dos Probandos

Através do levantamento da ocorrência de neoplasias nas 22 famílias dos pacientes estudados, observamos que 7 famílias apresentaram algum tipo de neoplasia, além do apresentado pelo pro-

bando. Em 5 destas famílias, a nova neoplasia ocorreu em parentes em primeiro grau do probando. Entretanto, somente duas destas famílias apresentaram outro caso de leucemia.

Os dados relacionados à ocorrência de neoplasias em aparentados dos probandos estão resumidos na Tabela 8, conforme o parentesco do indivíduo afetado com o probando e a neoplasia apresentada.

Tabela 8 - Número de famílias apresentando neoplasias em parentes do propósito, divididas por tipo da neoplasia e grau de parentesco do afetado com o probando

| NÚMERO DE FAMÍLIAS | NEOPLASIA | GRAU DE PARENTESCO DO AFETADO EM RELAÇÃO AO PROBANDO |
|--------------------|----------------------------|--|
| 2 | Leucemia | 1º grau |
| 2 | Câncer de mama | 1º grau |
| 2 | Câncer de estômago | 1º grau |
| 1 | Câncer de vesícula | 1º grau |
| 1 | Câncer de bexiga | 1º grau |
| 1 | Câncer de esôfago | 1º grau |
| 1 | Câncer de bexiga | 2º grau |
| 1 | Neoplasia não especificada | 2º grau |

Várias anormalidades congênitas podem ser associadas e leucemias, como a síndrome de Wiskott-Aldrich; síndrome de Blackfan Diamond; deficiência familiar de peroxidase, entre outros. (Gunz e cols., 1983). Em uma revisão de 973 casos de câncer na infância feita por Green em 1986 foram encontradas 13 famílias nas quais um irmão do probando desenvolveu alguma forma de câncer, também durante a infância. Entre estas 13 famílias 6 apresentavam pelo menos um dos afetados com leucemia, sendo assim distribuídos os casos: 2 casos em que ambos irmãos apresentaram LLA; 1 caso em que um dos afetados apresentou LLA e o outro apresentou Distúrbio de Hodgkins; 1 caso em que um dos afetados apresentou LMA e o outro teratoma maligno; 1 caso em que um dos afetados apresentou LLA e o outro neuroblastoma; 1 caso em que um dos afetados apresentou LMA e o outro craniofaringioma. Apesar dos resultados relatados acima, não foi possível estabelecer uma relação exata que possa determinar uma associação entre estas formas de câncer e as leucemias identificadas em irmãos.

O presente trabalho, através do levantamento de dados relativos à ocorrência de neoplasias em aparentados dos probandos (Tabela 8), tentou determinar uma associação entre as formas de câncer observadas e leucemias.

Não foi encontrada nenhuma forma de câncer que se repetisse entre os aparentados dos leucêmicos, em frequência que permitisse sugerir alguma associação.

Cabe salientar que para que seja feita qualquer afirmação mais conclusiva, o tamanho da amostra estudada deve ser aumentada. Para tal, sugerimos que este tipo de levantamento prossiga

nos próximos anos.

3.4 - Leucemia Familiar: possibilidade de herança genética

No presente trabalho, entre as 22 famílias estudadas, foram encontradas duas famílias que apresentavam 2 parentes em 1º grau com leucemia. É interessante notar que o esperado de ocorrência de leucemia familiar em parentes em 1º grau, segundo Gunz e cols. (1983) é entre 2 e 3% e foi localizado nesta pequena amostra o equivalente a 9,1% de ocorrência de leucemia familiar em parentes em 1º grau. Na figura 9 encontram-se as genealogias destes 2 casos, com os dados que foram possíveis de localizar até o momento, sendo, a partir de agora as duas famílias denominadas respectivamente de famílias A e B.

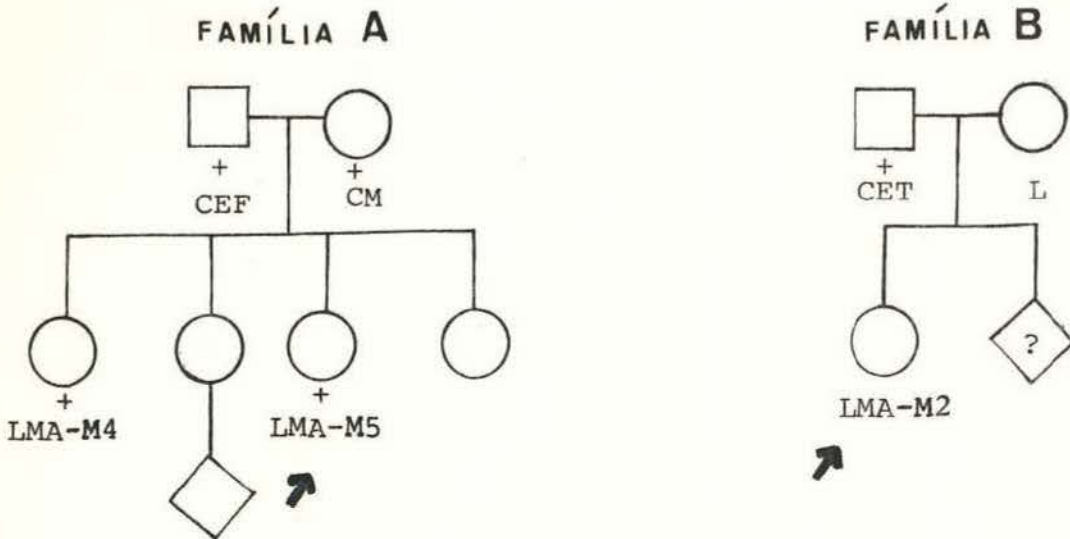


FIGURA 9 - Famílias em que houve ocorrência de leucemias em parentes em primeiro grau dos probandos. Abreviações: L, leucemia não especificada; LMA-M5, leucemia monocítica aguda; LMA-M4, leucemia mielomonocítica aguda; LMA-M2, leucemia mielóide aguda; CEF, câncer de esôfago; CET, câncer de estômago; CM, câncer de mama; +, indivíduo já falecido.

FAMÍLIA A - Paciente número 3, sexo feminino, 16 anos, portadora de leucemia mielóide aguda - M5. Paciente número 4, irmã mais velha da paciente 3. Tinha 18 anos ao ser diagnosticada como leucemia mielóide aguda - M4. De acordo com os dados familiares averiguados, o pai das pacientes faleceu de câncer de esôfago e a mãe destas apresentou câncer de mama.

FAMÍLIA B - Paciente 19, do sexo feminino e 37 anos, apresentando leucemia mielóide aguda - M2. Dois anos antes de apre-

sentar quadro leucêmico sofreu retirada de um nódulo maligno da mama, recebendo, como terapia 28 sessões de radioterapia. O pai da paciente faleceu com câncer de estômago e a mãe faleceu apresentando leucemia não especificada.

A paciente 19 deve ser estudada sob dois aspectos; primeiro levando-se em conta a possibilidade de herança genética da leucemia, visto ambos os pais apresentarem neoplasias, o que já é um indício de aumento de susceptibilidade à ocorrência de outras neoplasias na família.

Deve-se levar em conta também, o fato de a paciente ter apresentado uma neoplasia (câncer de mama), e ter sofrido radioterapia.

Rosner (1976) relata vários casos em que houve desenvolvimento de leucemia aguda após quimioterapia e/ou radioterapia em pacientes que apresentavam algum outro tipo de neoplasia.

Os dados levantados até o presente momento a respeito destas duas famílias não permite uma conclusão exata a respeito de herdabilidade ou não da leucemia familiar em questão. Novos estudos deverão suceder-se com a obtenção de mais dados destas famílias, ampliando, na medida do possível, o estudo das genealogias no sentido horizontal e vertical.

Famílias com dois ou mais casos de leucemia são as evidências mais fortes para suportar a tese de que há um fator genético responsável pelo desenvolvimento desta neoplasia. Muitos casos de leucemia familiar têm sido relatados. Dentre estes casos podemos citar aqueles em que há ocorrência de mais de um indivi-

duo com leucemia mielóide aguda em uma mesma família, tais como os descritos por Heath & Moloney (1965), McPhedran e cols. (1969), Snyder e cols. (1970), Kaur e cols. (1972), Green (1986), entre outros.

Há ainda casos de leucemia linfóide crônica familiar, como o relatado por Fraumeni e cols. (1969) ou casos de leucemia familiar associada à monossomia do cromossomo 7; Chitambar e cols. (1983), Paul e cols. (1987). É conhecido que alguns indivíduos a apresentam uma maior susceptibilidade a desenvolverem leucemia. São estes indivíduos os que apresentam alguma anormalidade cromossômica, tais como a trissomia do 21 ou síndrome de Down, a monossomia do 7, e anormalidades nos cromossomos sexuais (Gunz e cols., 1983).

Os casos aqui apresentados, embora não cariotipados, não apresentam dados clínicos compatíveis à síndrome de Down ou anomalias dos cromossomos sexuais. Os dados sobre a cariotipagem das células de suas medulas não encontram-se, ainda, à nossa disposição, para que seja efetuada alguma relação com clones de células cromossomicamente anormais e o desenvolvimento da leucemia.

4 - RESUMO E CONCLUSÃO

O presente trabalho consta de um estudo citoquímico em 23 pacientes leucêmicos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e levantamento de dados relacionados à ocorrência de neoplasias em aparentados destes pacientes. Os objetivos do trabalho foram: I - o estabelecimento das técnicas citoquímicas para esterase não-específica, fosfatase alcalina e Sudan black na rotina da Unidade de Hematologia do HCPA; II - a avaliação da eficiência destas técnicas no diagnóstico de leucemias; III - a tentativa do estabelecimento de associação entre as leucemias e algum outro tipo de neoplasia em aparentados dos probandos.

Após a análise dos resultados podemos concluir que as técnicas citoquímicas introduzidas na rotina do HCPA foram de grande ajuda no diagnóstico de determinados casos de leucemia, condizendo os resultados obtidos com o descrito na literatura. Com o auxílio das técnicas citoquímicas implantadas, o diagnóstico de pacientes leucêmicos internados no HCPA tornou-se mais rápido, favorecendo o início de uma terapia adequada.

Não observamos associação entre a ocorrência de leucemias e as diversas outras neoplasias encontradas. Resultados mais conclusivos poderão ser obtidos com a continuidade do presente estu

do e conseqüente aumento amostral. Um estudo mais aprofundado das famílias, tais como a A e B, que apresentaram dois casos de leucemia em parentes próximos dos probandos, poderá levar a achados mais conclusivos.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - ASTALDI, G. & VERGA, L., 1957. The glycogen content of the cells of Lymphatic leukaemia. Acta Haematol. 17: 129-135.
- 2 - BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D.A.G.; GRALNICK, H.R. & SULTAN, C., 1976. Proposal for the classification of the acute leukaemias. Br. J. Haematol. 33: 451-458.
- 3 - BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D.A.G.; GRALNICK, H.R. & SULTAN, C., 1981. The morphological classification of acute Lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. Br. J. Haematol. 47:553-561.
- 4 - BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D.A.G.; GRALNICK, H.R. & SULTAN, C., 1985. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. Ann. Intern. Med. 103:626-629.
- 5 - BISHOP, J.M., 1982. Oncogenes. Scient. Amer. 246:69-78.
- 6 - BISHOP, J.M., 1986. Oncogenes as hormone receptors. Nature 321:112-113.
- 7 - BORTIN, M.M.; D'AMARO, J.; BACH, F.H.; RIMM, A.A. & ROOD, J. V., 1987. HLA associations with leukemia. Blood 70:227-232.
- 8 - BRADSHAW, T.K., 1986. Cell transformation: the role of oncogenes and growth factors. Mutagenesis 1:91-97.

- 9 - CANTÚ-RAJNOLDI, A.; CATTORETTI, G.; SCHIRÓ, R.; FERRARI, M.; GUERCILENA, S.; BELFORTI, S.; MASERA, G., 1986. Morphologic, cytochemical and immunological profile in T cell acute Lymphoblastic leukemia of childhood. Haematologica 71: 467-472.
- 10- CHITAMBAR, C.R.; ROBINSON, W.A., GLODE, L.M., 1983. Familial leukemia and aplastic anemia associated with monosomy 7. Am. J. Med. 75:756-762.
- 11- DACIE, J.V. & LEWIS, S.M., 1984. Practical Haematology. Churchill Livingstone. New York, 453 pp.
- 12- DENNY, C.T.; HOLLIS, G.F.; HECHT, F.; MORGAN, R.; LINK, M. P.; SMITH, S.D.; KIRSCH, I.R., 1986. Science 234:197-200.
- 13- FABER, E., 1984. The multistep nature of cancer development. Cancer Res. 44:4217-4223.
- 14- FRAUMENI, J.F.; VOGEL, C.L.; DEVITA, V.T., 1969. Familial chronic lymphocytic leukemia. Ann. Intern. Med. 71:279-284.
- 15- GRAEVES, M.F., 1986. Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes. Science 234:697-704.
- 16- GRALNICK, H.R.; GALTON, D.A.G.; CATOVSKY, D.; SULTAN, C.; BENNETT, J.M., 1977. Classification of acute leukemia. Ann. Intern. Med. 87:740-753.
- 17- GREEN, D.M., 1986. Childhood cancer in siblings. Pediatr. Hematol. Oncol. 3:229-239.
- 18- GUNZ, F.W.; GUNZ, J.P.; VINCENT, P.C. et. al., 1978. Thirteen cases of leukemia in a family. J. Natl Cancer Inst. 60:1243. Referido por Gunz (1983).
- 19- GUNZ, F.W., 1983. Genetic factors in human leukemia. In: Leukemia. F.W. Gunz & E.S. Henderson (eds.). Grune & Stratton, New York. p. 313-328.
- 20- HALUSKA, F.G.; TSUJIMOTO, Y. and CROCE, C.M., 1987. Trends

- Genet. 3:11-15.
- 21- HAYHOE, F.G.S. & CAWLEY, J.C., 1972. Acute leukaemia: cellular morphology, cytochemistry and fine structure. Clin. Haematol. London: W.B. Saunders and Co.
- 22- HEATH, C.W. & MOLONEY, W.C., 1965. Familial leukemia. Five cases of acute leukemia in three generations. N. Engl. J. Med. 272:882-887.
- 23- JANDL, J.H., 1987. Blood Textbook of hematology. Little Brown, Boston. 1728 pp.
- 24- KAPLOW, L.S., 1963. Cytochemistry of leukocyte alkaline phosphatase. Am. J. Clinical Pathol. 39:439-448.
- 25- KAPLOW, L.S., 1965. Simplified myeloperoxidase staining using benzidine dihydrochloride. Blood 26:214.
- 26- KAPLOW, L.S., 1968. Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry - Applications and methods. Ann. N.Y. Acad. Sci. 155:911-947.
- 27- KAUR, J.; CATOVSKY, D.; VALDIMARSSON, H.; JENSSON, O. and SPIERS, A.S.D., 1972. Familial acute myeloid leukemia with acquired Pelger-Huet anomaly and aneuploidy of C. Group. Brit. Med. J. 4:327-331.
- 28- KOEFLER, H.P. & GOLDE, D.W., 1981. Chronic myelogenous leukemia: New concepts. N. Engl. J. Med. 304:1201-1209.
- 29- LI, C.Y.; LAM, K.W.; YAM, L.T., 1973. Esterases in human leukocyte. J. Histochem. Cytochem. 21:1-12.
- 30- LI, C.Y., 1981. Leukemia cytochemistry. Mayo Clin. Proc. 56:712-713.
- 31- LILIE, R.D. & BURTNER, H.J., 1953. Stable sudanophilia on human neutrophil leukocytes in relation to peroxidase and oxidase. J. Histochem. Cytochem. 1:8-26.

- 32- LOPEZ, L.M.; CABALLERO, E.A.; VILLA, A.M., 1986. Aparición de leucemia mieloide aguda en la evolución de una leucemia linfoblástica en un niño. Sangre, 31(6):759-762.
- 33- MAMAEVA, S.E.; MAMAEVA, N.N.; JARTSEVA, N.M.; BELYAEVA, L.V. and SCHERBAKOVA, E.G., 1983. Hum. Genet. 63:107-112.
- 34- MCPHEDRAN, P.; HEATH, C.W.; LEE, J., 1969. Patterns of familial leukemia. Ten cases of leukemia in two interrelated families. Cancer (Philadelphia) 24:403-407.
- 35- NEWMARK, P., 1987. Oncogenes and cell growth. Nature 327: 101-102.
- 36- OLIVEIRA, H.P. de, 1985. Hematologia Clínica. Atheneu. Rio de Janeiro, 571 pp.
- 37- PAUL, B.; REID, M.M.; DAVISON, E.V; ABELA, M. and HAMILTON, P.J., 1987. Familial myelodysplasia: progressive disease associated with emergence of monosomy 7. Brit. J. Haematol. 65:321-323.
- 38- PAWELEC, G.; EHNINGER, G.; MÜLLER, C.; BLANROCK, M.; SCHNEIDER, E.M. and WERNET, P., 1988. Human leukocyte antigen - DP in leukemia. Cancer 61:475-477.
- 39- PINKUS, G.S.; HARGREAVE, H.K.; MCLEOD, J.A.; NADLER, C.M.; ROSENTHAL, D.S. & SAID, J.W., 1979. -Naphthyl acetate esterase activity - A cytochemical marker for T Lymphocytes. Amer. J. Pathol. 97:17-42.
- 40- QUAGLINO, D. & HAYHOE, F.G.S., 1960. Periodic-acid-Schiff positivity in erythroblasts with special reference to Di Guglielmo's disease. Br. J. Haematol. 6:26-33.
- 41- ROSNER, F., 1976. Acute leukemia as a delayed consequence of cancer chemotherapy. Cancer 37:1033-1036.
- 42- SCHMALZL, F. & BRAUNSTEINER, H., 1971. The application of cytochemical methods to the study of acute leukemia. Acta. Haematol. 45:209-217.

- 43- SCOTT, C.S., 1978. Cytochemical applications in haematology, with particular reference to acute leukaemias: A review. Med. Lab. Sci. 35(2):111-136.
- 44- SAMPAIO, D.A., 1983. Avaliação quantitativa da variação de heterocromatina constitutiva em leucemias e condições afins. Dissertação de Mestrado - Curso de Pós-Graduação em Genética - UFRGS, POA-RS. p. 148.
- 45- SNYDER, A.L.; LI, F.P.; HENDERSON, E.S.; TODARO, G.J., 1970. Possible inherited leukaemogenic factors in familial acute myelogenous leukaemia. The Lancet 1:586-589.
- 46- SPORN, M.B. & TODARO, G.T., 1980. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. N. Engl. J. Med. 303: 878-880. Citação de Bradshaw, 1986.
- 47- TANIWAKI, M.; INAZAWA, J.; HORIIKE, S.; MISAWA, S.; ABE, T. and TAKINO, T., 1987. Cancer Genet. Cytogenet. 24:257-262.
- 48- TOMONAGA, M.; YOSHIDA, Y.; TAGAWA, M.; JINNAI, I.; KURIYAMA, K.; AMENOMORI, T.; YOSHIOKA, A.; MATSUO, T.; NONAKA, H.; ICHIMARU, M., 1985. Cytochemistry of acute promyelocytic leukemia (M3): Leukemic promyelocytes exhibit heterogeneous patterns in cellular differentiation. Blood 66(2):350-357.
- 49- TWU, B.H.; LI, C.Y.; SMITHSON, W.A.; HOAGLAND, H.C. & DEWALD, G.W., 1987. Acute Lymphocytic leukemia: correlation of clinical features with immunocytochemical classification. Am. J. Hematol. 25:13-27.
- 50- VILLA, L.L. & BRINTANI, R.R., 1987. Vírus e câncer. In: Genética molecular e de microorganismos. S.O.P. Costa (ed.). Manole, São Paulo, p. 469-481.
- 51- WEINBERG, R.A., 1983. Molecular basis of cancer. Scient. Amer. 249:102-116.
- 52- WINTROBE, M.M., 1981. Clinical Hematology. Lea & Febiger. Philadelphia, 1896 pp.

- 53- WISLOCKI, G.B.; RHEINGOLD, J.J.; DEMPSEY, E.W., 1949. The occurrence of the periodic-acid-Schiff reaction in various normal cells of blood and connective tissue. Blood 4:562-568.
- 54- YAM, L.T.; LI, C.Y.; CROSBY, W.H., 1971. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am. J. Clin. Pathol. 55:283-290.
- 55- YUNIS, J.J., 1983. The chromosomal basis of human neoplasia. Science 221:227-236. Citação de Bradshaw, 1986.

Citoquímica:

| | % Positivo | % Padrão | Resultado |
|-------------------------|------------|----------|-----------|
| P.A.S. | | | |
| Peroxidase | | | |
| Sudan Black | | | |
| Esterase não Específica | | | |
| Esterase Cloroacetato | | | |
| Fosfatase Alcalina | | | |
| Fosfatase Ácida | | | |

Diagnóstico:

Observações: