

U.PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM CITOMETRIA DE FLUXO

NEUZA FILIPA DA SILVA RIBEIRO

Dissertação de Mestrado em Oncologia

2010

NEUZA FILIPA DA SILVA RIBEIRO

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM CITOMETRIA DE FLUXO

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Oncologia – Especialidade em Oncologia Molecular submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professor Doutor Carlos Lopes

Categoria – Professor Catedrático

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui expressos os meus agradecimentos a todos aqueles que de uma forma ou de outra, comigo colaboraram tornando possível a elaboração deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Doutor Carlos Lopes, orientador deste trabalho, por todo o apoio, disponibilidade, dedicação e orientação que me dispensou.

À Mestre Maria Luís e à Dra. Marta Gonçalves, orientadoras do estágio no Laboratório de Citometria, pela simpatia, disponibilidade, paciência prestadas, pela transmissão de conhecimentos e pelo aconselhamento na revisão dos textos, bem como pelo apoio valioso durante o estágio.

Ao Dr. Carlos Palmeira, pela preciosa ajuda e disponibilidade que sempre me dispensou.

A todos os elementos do Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica pela disponibilidade e simpatia com que sempre me receberam, e pelo apoio durante o estágio.

A toda a minha Família, pelo apoio e carinho, em especial aos meus Pais, por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida, pelo apoio incondicional e pelos conselhos sensatos! Sem vocês nada seria possível!

RESUMO

A utilização da citometria de fluxo em laboratórios clínicos aumentou consideravelmente nas últimas duas décadas. Esta técnica permite a rápida análise de diversas características celulares, tais como o tamanho celular, a complexidade citoplasmática, a expressão de antígenos celulares, assim como pode ser útil no estudo do ciclo celular, na determinação da ploidia de DNA em neoplasias, na contagem absoluta de células e na separação de populações celulares com fenótipos específicos (“sorting”).

O presente relatório descreve o estágio no Laboratório de Citometria de fluxo do Centro Hospitalar do Porto – Hospital Geral de Santo António, cujos objectivos foram: conhecer a rotina do Laboratório de Citometria de fluxo; aprender noções básicas da citometria de fluxo e compreender a aplicação desta técnica na área da hemato-oncologia.

O Laboratório de Citometria de fluxo está inserido no Serviço de Hematologia Clínica diagnosticando diversas patologias, entre as quais, doenças linfoproliferativas B, T e NK, hemoglobinúria paroxística nocturna, leucemias agudas, síndromes mielodisplásicas, mieloma múltiplo e gamapatia monoclonal de significado indeterminado, entre outras.

Durante o meu estágio tive a oportunidade de estudar as seguintes patologias hemoglobinúria paroxística nocturna, mieloma múltiplo e gamapatia monoclonal de significado indeterminado, linfoma folicular, linfoma do manto e leucemia linfocítica crónica B.

ABSTRACT

Flow cytometry studies in medicine are being increased from last two decades considering the large number of diseases and clinical problems in which it can be successfully used. With flow cytometry several cellular characteristics can be rapidly studied such as size, cytoplasm complexity, antigen expression, cell cycle, DNA content and separation of several cellular populations with specific phenotypes - sorting.

Presented report describes the training stage occurred in the Flow Cytometry Laboratory of Porto Hospital Centre - General Hospital of Saint António whose main objectives were: to know routine work in the Laboratory; to learn basic flow cytometry techniques; and to understand the use and application of this technology in hemato-oncology.

Flow Cytometry Laboratory is included in the Service of Clinical Hematology and contributes to the diagnosis of several diseases such as lymphoproliferative diseases B, T and NK; paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; acute and chronic leukemia, myelodysplastic syndromes; multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance.

During the training stage I had the chance to study the following diseases: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance, follicular lymphoma, mantle lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJECTIVOS	2
3. CITOMETRIA DE FLUXO	3
3.1 CITOMETRIA DE FLUXO/ CITOMETRIA DE VARRIMENTO/ MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	3
3.2 PRINCÍPIOS DA CITOMETRIA DE FLUXO.....	5
3.3 IMUNOFENOTIPAGEM.....	7
3.4 ÁREAS DE ESTUDO E APLICAÇÕES DA CITOMETRIA DE FLUXO.....	7
3.5 APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO ESTUDOS DE TUMORES SÓLIDOS	7
4. APRESENTAÇÃO DO LABORATÓRIO DE CITOMETRIA DE FLUXO	10
4.1 ESTRUTURA ORGANIZATIVA DO LABORATÓRIO.....	11
4.2 ORGANIZAÇÃO DO LABORATÓRIO	11
5. TIPOS DE AMOSTRAS	11
6. RECEPÇÃO DAS AMOSTRAS	12
7. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	13
7.1 PROTOCOLOS DE MARCAÇÃO MEMBRANAR	13
7.1.1 PROTOCOLO DOS MÍNIMOS.....	14
7.1.2 PROTOCOLO DE ESTUDO DAS DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS B 18	
7.1.3 PROTOCOLO DAS DOENÇAS DOS PLASMÓCITOS	26
7.1.4 PROTOCOLO DE ESTUDO DO DNA.....	37
7.1.5 PROTOCOLO DA HPN.....	39
7.1.6 PESQUISA DE AAP NAS PLAQUETAS	44
7.2 TÉCNICA DE MARCAÇÃO CITOPLASMÁTICA.....	46
7.3 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS COM “LINFOPREP”	47
8. CONCLUSÃO	49
9. BIBLIOGRAFIA	50

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAP** – Anticorpos anti-plaquetas
- APC** – Allophycocyanin
- Bcl-1** – B-cell leukemia/lymphoma 1
- Bcl-2** – B-cell lymphoma 2
- BD** – Becton & Dickinson
- CF** – Citometria de fluxo
- CRAB** – Hypercalcemia, renal insufficiency, anaemia, bone lesions
- CTC** – Células tumorais circulantes
- DAF** – Decay-accelerating factor
- DNA** – Desoxyribonucleic acid
- ECD** – R-Phycoerythrin-Texas Red-X
- FISH** – Fluorescence *in situ* hybridization
- FITC** – Fluorescein isothiocyanate
- FSC** – Forward Scatter
- Gp** – Glicoproteínas
- GPI** – Glycosylphosphatidylinositol
- HER2** – Human Epidermal growth factor Receptor 2
- HPN** – Hemoglobinúria Paroxística Nocturna
- Ig** – Imunoglobulina
- IgVH** – Variable regions of the immunoglobulin heavy chains
- IMF** – Intensidade Média de Fluorescência
- LF** – Linfoma follicular
- LLA** – Leucemia linfocítica aguda
- LLC** – Leucemia linfocítica crónica
- LLC-B** – Leucemia linfocítica crónica de células B
- LM** – Linfoma do manto
- LMA** – Leucemia mielóide aguda
- LMC** – Leucemia mielóide crónica
- LNH** – Linfoma Não-Hodgkin
- LNH-B** – Linfoma Não-Hodgkin de células B
- MGUS** – Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado
- MIP-1 α** – Macrophage inflammatory protein 1
- MIRL** – Membrane inhibitor of reactive lysis

MM – Mieloma Múltiplo
NK – Natural-Killer
OAF – Osteoclast activating factors
OMS – Organização Mundial de Saúde
OPG – Osteoprotegerin
PBS-BSA – Solução tampão fosfato com albumina sérica bovina
PC5 – R- Phycoerythrin cyanine 5.1
PCR – Polimerase Chain Reaction
PE – Phycoerythrin
PerCP – Peridinin Chlorophyll Protein
PIGA – Phosphatidylinositol glycan complementation class A
POEMS – Polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, M protein, skin changes
RANK – Receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANK-L – Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
SSC – Side Scatter
TCR – T cell receptor

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. A FOCAGEM HIDRODINÂMICA FORMA UMA FILA ÚNICA DE CÉLULAS.....	5
FIGURA 2. ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DE UM CITÓMETRO DE FLUXO	6
FIGURA 3. GRÁFICOS BIPARAMÉTRICOS DEMONSTRANDO A POPULAÇÃO DOS LINFÓCITOS B, DOS LINFÓCITOS T E DAS CÉLULAS NK NUM INDIVÍDUO SAUDÁVEL.....	15
FIGURA 4. GRÁFICOS BIPARAMÉTRICOS REPRESENTANDO AS POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4 E DE LINFÓCITOS T CD8 NUM INDIVÍDUO SAUDÁVEL.....	16
FIGURA 5. GRÁFICOS BIPARAMÉTRICOS COM A REPRESENTAÇÃO DAS CADEIAS LEVES K E Λ NUM INDIVÍDUO SAUDÁVEL.	16
FIGURA 6. GRÁFICOS BIPARAMÉTRICOS REPRESENTATIVOS DE UM DOENTE COM LLC-B	25
FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO DA ELECTROFORESE DAS PROTEÍNAS SÉRICAS.....	26
FIGURA 8. MEDULA ÓSSEA DE UM DOENTE COM MGUS	28
FIGURA 9. MEDULA ÓSSEA DE UM DOENTE COM MM, DEMOSNTRANDO PLASMOCITOSE	30
FIGURA 10. MM: PLASMÓCITOS ANORMAIS NA MEDULA	30
FIGURA 11. LESÕES OSTELÍTICAS NO CRÂNIO DE UM DOENTE COM MM.....	32
FIGURA 12. GRÁFICO BIPARAMÉTRICO CORRESPONDENTE A UM DOENTE COM MM	36
FIGURA 13. REPRESENTAÇÃO DE DOIS HISTOGRAMAS CORRESPONDENTES AO ESTUDO DOS ERITRÓCITOS E DE DOIS GRÁFICOS BIPARAMÉTRICOS UM PARA O ESTUDO DOS NEUTRÓFILOS E OUTRO PARA O ESTUDO DOS MONÓCITOS	43
FIGURA 14. GRÁFICO BIPARAMÉTRICO RELATIVO À MARCAÇÃO CITOPLASMÁTICA DE BCL-2 NUM DOENTE.....	46
FIGURA 15. TUBOS ANTES E DEPOIS DA CENTRIFUGAÇÃO.....	47
FIGURA 16. GRÁFICO BIPARAMÉTRICO RELATIVO ÀS CADEIAS LEVES K E Λ APÓS A SEPARAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DO "LINFOPREP".	48

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. DIFERENÇAS E SEMELHANÇAS ENTRE AS TECNOLOGIAS CF, CITOMETRIA DE VARRIMENTO E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	4
TABELA 2. CARACTERÍSTICAS DOS CITÓMETROS DE FLUXO EXISTENTES NO LABORATÓRIO DE CF.....	10
TABELA 3. COMBINAÇÕES DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MARCADOS COM FLUOROCROMOS UTILIZADAS NO PAINEL DO PROTOCOLO DOS MÍNIMOS.....	14
TABELA 4. CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DOS TECIDOS HEMATOPOIÉTICOS E LINFÓIDES, SEGUNDO A OMS.	18
TABELA 5. PAINEL DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MARCADOS COM FLUOROCROMOS UTILIZADO NO ESTUDO DAS DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS B.....	24
TABELA 6. CLASSIFICAÇÃO DAS GAMAPATIAS MONOCLONAIS.....	27
TABELA 7. CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DA MGUS.....	28
TABELA 8. CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DO MM	32
TABELA 9. DIFERENÇAS NOS CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DE MGUS, MM ASSINTOMÁTICO E MM.....	33
TABELA 10. PAINEL UTILIZADO NO ESTUDO DAS PATOLOGIAS DOS PLASMÓCITOS.....	35
TABELA 11. PROTOCOLO UTILIZADO NO ESTUDO DA HPN.	42
TABELA 12. MARCAÇÃO UTILIZADA PARA A PESQUISA DE AAP NAS PLAQUETAS.....	45

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM CITOMETRIA DE FLUXO

NEUZA FILIPA DA SILVA RIBEIRO

2010

1. INTRODUÇÃO

Na minha licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública realizei um dos estágios curriculares no Laboratório de Imunologia Celular, do Serviço de Imunologia do Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil - EPE (IPOPFG-EPE), cuja Directora é a Dra. Gabriela Martins, onde tive a oportunidade de trabalhar pela primeira vez num citómetro de fluxo e de compreender a sua importância no diagnóstico de doenças hemato-oncológicas. A minha Monografia foi também realizada neste Serviço, devido à minha curiosidade pela área de Oncologia e pelo interesse na citometria de fluxo. Foi essa curiosidade que motivou a minha candidatura ao Mestrado em Oncologia.

Neste contexto, o presente relatório pretende descrever o meu estágio no Laboratório de Citometria de fluxo (CF), o qual foi uma oportunidade de relembrar e desenvolver os conhecimentos adquiridos no estágio da Licenciatura.

Com efeito, este Laboratório, tal como o Laboratório de Imunologia Celular do IPO- Porto, dedica-se ao estudo das doenças do sangue, pelo que me pareceu interessante conhecer outro Laboratório que utilizasse a CF como meio de diagnóstico.

O Laboratório de Citometria de fluxo, cujo responsável é a Prof. Dra. Margarida Lima, encontra-se incluído no Serviço de Hematologia Clínica, do Centro Hospitalar do Porto - Hospital Geral de Santo António, cujo Director é o Dr. Manuel Campos, e está inserido no Departamento de Medicina, cujo Director é o Prof. Dr. Lopes Gomes.

2. OBJECTIVOS

Os objectivos deste estágio foram:

- Conhecer a rotina do Laboratório de citometria de fluxo;
- Aprender noções básicas da CF;
- Compreender a aplicação desta técnica na área da Hemato-Oncologia.

3. CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é um processo no qual são medidas características físicas e/ou químicas de células ou de outras partículas (Shapiro 2003).

3.1 CITOMETRIA DE FLUXO/ CITOMETRIA DE VARRIMENTO/ MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Antes do uso da CF, as células eram visualizadas com um microscópio de fluorescência. Embora os citómetros de fluxo estivessem disponíveis no comércio desde do início dos anos 70, o seu uso era em primeiro lugar para a investigação devido à raridade, ao elevado custo e à complexidade do seu funcionamento. Além disso, eram necessários técnicos especializados para o seu manuseamento (Nicholson 2002).

Na altura, os anticorpos policlonais eram produzidos por coelhos ou cabras quando injectados com células ou antigénios celulares. Os anticorpos produzidos reagiam com um número de epítopes contra os quais foram originados. Infelizmente, estes anticorpos uniam-se sem especificidade às células, causando falsos-positivos. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais em meados dos anos 70 resultou em partículas que eram altamente específicas e sensíveis, evitando as dificuldades de ligações não-específicas. Os primeiros anticorpos monoclonais produzidos foram contra os antigénios celulares de ratinho, mas no final dos anos 70 e inícios dos anos 80, os anticorpos monoclonais foram desenvolvidos e utilizados para detectar os antigénios nos linfócitos humanos. Assim foram utilizados no estudo de doentes com HIV, tendo-se verificado que com o evoluir da doença havia um decréscimo das células T CD4⁺, imunodeficiência grave e morte (Nicholson 2002).

Há várias técnicas que utilizam a fluorescência, entre os quais a CF, a citometria de varrimento e a microscopia de fluorescência. Na Tabela 1 estão descritas diferenças e semelhanças entre cada uma destas técnicas.

Tabela 1. Diferenças e semelhanças entre as tecnologias CF, citometria de varrimento e microscopia de fluorescência (adaptado do Curso “Aplicações clínicas da citometria” – Curso de Citometria para TDT, organizado pelo Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do CHP-HSA, organizado pela Prof. Dra. Margarida Lima).

Tecnologias/ Características	CF	Citometria de varrimento	Microscopia de fluorescência
Alvo de análise	Células em suspensão em meio líquido	Células imobilizadas em lâmina	Células imobilizadas em lâmina
Fonte de luz	Laser	Laser	Lâmpada
Detecção	Electrónica	Electrónica/ Visual	Visual
Visualização	Gráficos	Células e gráficos	Células
Avaliação	Qualitativa e Quantitativa	Qualitativa e Quantitativa	Qualitativa
Número de células	Centenas - Milhões	Centenas	Centenas
Velocidade	500-5.000 células/ segundo	100 células/ segundo	100 células/ minuto

Uma característica comum entre a citometria de varrimento e a microscopia de fluorescência é o facto da amostra se encontrar em lâmina. No entanto, na citometria de varrimento a marcação celular é realizada em tubo e depois uma pequena quantidade da suspensão é colocada numa lâmina (Kamentsky 2001), enquanto na microscopia de fluorescência a marcação é realizada na própria lâmina. Por outro lado, na CF as células encontram-se em suspensão em meio líquido.

Outra diferença entre a citometria de varrimento e a microscopia de fluorescência é que na primeira as células não são fixadas, encontram-se a fresco.

Na citometria de varrimento a detecção é electrónica ou visual. Quando for necessário observar ao microscópio alguma célula com mais pormenor, isso é possível devido ao facto deste citómetro gravar no computador as coordenadas de cada célula analisada, permitindo a sua rápida localização, caso seja necessário, no microscópio. Esta característica é uma vantagem desta tecnologia. Na CF este aspecto não é possível, devido ao sistema de fluxo, pois a posição das células não é mantida (Kamentsky 2001).

Na citometria de varrimento, após a análise, a lâmina pode ser retirada do equipamento e corada com as colorações convencionais (Giemsa, hematoxilina e eosina), para ser

novamente analisada. Os dados das duas análises são atribuídas à mesma célula, visto que as suas coordenadas são conhecidas (Tárnok 2002).

A CF tem uma velocidade de análise superior às outras duas tecnologias, visto que consegue ler entre 500 a 5.000 células por segundo. A microscopia de fluorescência é a tecnologia mais morosa, uma vez que analisa 100 células por minuto.

Na CF e na citometria de varrimento, como têm um computador acoplado, os sinais vão depois ser convertidos em dados digitais para serem representados através de gráficos monoparamétricos e biparamétricos. Na citometria de varrimento também é possível observar as células através do microscópio. No entanto, na microscopia de fluorescência os resultados obtêm-se apenas pela observação das células coradas com fluorocromos no microscópio

3.2 PRINCÍPIOS DA CITOMETRIA DE FLUXO

A suspensão celular é injectada no citómetro, dirigindo-se para o núcleo central contido na câmara de fluxo. Nesta câmara existe um líquido de envolvimento (Sheath fluid) que não se mistura com a suspensão celular (Figura 1). No núcleo central as células formam um fluxo laminar que mantém, hidrodinamicamente, as células alinhadas de forma que estas passem uma a uma em frente ao feixe luminoso (Research antibody division of MorphoSys [<http://www.abdserotec.com/>]).

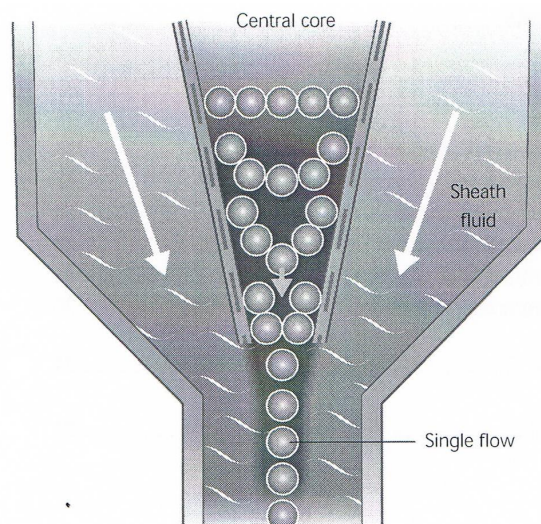


Figura 1. A focagem hidrodinâmica forma uma fila única de células (adaptado de Research antibody division of MorphoSys [<http://www.abdserotec.com/>])

A interacção das células ou das partículas com o feixe luminoso origina sinais que vão ser alcançados por detectores adequados. A informação recolhida pode agrupar-se em dois tipos fundamentais: a que é originada pela dispersão da luz e a que está relacionada com a emissão de luz por fluorocromos presentes na célula ou na partícula, ao serem excitados pela fonte luminosa (Figura 2). A dispersão da luz é um processo físico em que uma célula interage com a luz incidente e muda a direcção da luz. As características celulares que contribuem para a dispersão da luz são o tamanho celular, a membrana celular, o núcleo e o material granular do interior da célula. A luz não se dispersa de igual forma em todas as direcções. A luz que dispersa para a frente (“forward scatter”, FSC) é uma medida do tamanho celular, enquanto a luz que é dispersa em ângulo recto (“side scatter”, SSC) depende da complexidade celular (Orfão e Buitrago 1995).

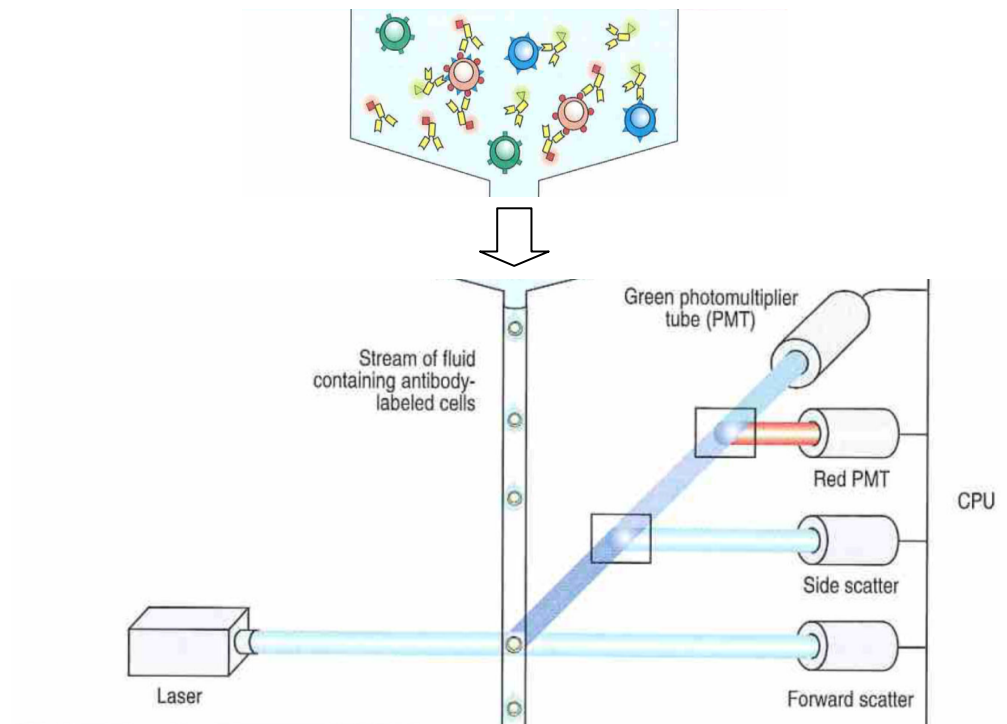


Figura 2. Esquema de funcionamento de um citómetro de fluxo (adaptado de Janeway 2001).

A fluorescência é indicada como a emissão de energia luminosa pelos compostos fluorescentes que se encontram ligados aos anticorpos monoclonais. Estes compostos absorvem energia, fazendo com que um electrão passe a um nível energético superior. No momento em que esse electrão regressa ao seu estado de repouso, emite um fóton e liberta energia (Orfão e Buitrago 1995).

Os sinais vão depois ser convertidos em dados digitais para serem representados através de gráficos monoparamétricos e biparamétricos (Orfão e Buitrago 1995).

3.3 IMUNOFENOTIPAGEM

A imunofenotipagem é actualmente uma das maiores aplicações da CF. Este método consiste na detecção de células, que possuem antigénios celulares específicos, através da sua incubação com anticorpos marcados com fluorocromos e detectando a emissão de fluorescência quando incide uma fonte luminosa. Se a intensidade de fluorescência for a que é esperada, então é normal. Se houver qualquer alteração, quer seja aumento, diminuição ou ausência, não é uma situação normal (Orfão e Buitrago 1995; Nicholson 2002).

A imunofenotipagem é utilizada para auxiliar no diagnóstico de doenças hematológicas, nomeadamente linfomas e leucemias. Pode também acompanhar a eficácia dos tratamentos clínicos (Orfão e Buitrago 1995; Nicholson 2002).

3.4 ÁREAS DE ESTUDO E APLICAÇÕES DA CITOMETRIA DE FLUXO

A CF tem utilidade em diversas áreas como a Imunologia, a Hematologia, a Oncologia, a Anatomia Patológica e a Biologia Celular.

Esta técnica permite a análise de diversas características, tais como o tamanho celular, a complexidade citoplasmática, a expressão de antigénios celulares, assim como pode ser realizado o estudo do ciclo celular, a determinação da ploidia de DNA em neoplasias, na contagem absoluta de células e na separação de populações celulares com fenótipos específicos (“sorting”), e o estudo de diversos parâmetros celulares como a concentração do Ca^{2+} intracelular, o pH intracelular e a apoptose (Brown e Wittwer 2000; Orfão e Buitrago 1995).

3.5 APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO ESTUDOS DE TUMORES SÓLIDOS

Nos chamados tumores sólidos o diagnóstico é feito, normalmente, por diversas técnicas que não a CF. A aplicação da CF a este grupo de neoplasias, tem sido fundamentalmente na detecção de células metastáticas, por exemplo em gânglios linfáticos ou na medula óssea, e na pesquisa de células tumorais circulantes (CTC) no

sangue periférico. Estas informações são importantes quer ao nível do estadiamento, quer na definição do prognóstico. Para essa detecção a CF utiliza vários marcadores específicos, tais como as citoqueratinas, moléculas de adesão como as EpCAM, o conteúdo de DNA, de forma isolada ou combinando estes diferentes marcadores em painéis multiparamétricos.

A grande maioria das mortes por neoplasias é devida à metastização do tumor primário. A detecção das CTC tem sido considerada como uma forma de se avaliar a agressividade do tumor e a resposta ao tratamento (Cruz e col 2005; Gerges e col 2010). Um estudo realizado em 2005 por Cruz e colaboradores em doentes com cancro da mama verificou que a análise combinada da expressão de citoqueratinas (CK18) e do conteúdo de DNA por CF é um método sensível de identificação específica de células tumorais nesta neoplasia em amostras de sangue. Quando se trata de neoplasias da mama em estádios iniciais os resultados já não são tão conclusivos. Krishnamurthy e colaboradores (2010) correlacionaram a presença das CTC com outros marcadores de prognóstico, tais como a classificação do tumor (T1 ou T2), o grau histológico, o receptor de estrogénio, o receptor de progesterona, o HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) e a invasão ganglionar. Estes autores concluíram que as CTC e as células metastáticas não se correlacionaram com os marcadores de prognóstico considerados no estudo.

As CTC e as células metastáticas existem em pequena quantidade, e uma forma de se conseguir detectá-las é utilizando métodos de enriquecimento da amostra. Estes podem ser métodos de centrifugação por diferentes gradientes de densidade, como o Ficoll, assim como procedimentos imunomagnéticos positivos ou negativos e esferas imunomagnéticas (Riethdorf e Pantel 2008).

Garrigós e colaboradores (2010) realizaram um estudo em doentes com cancro colorectal nos estádios II e III, com o objectivo de avaliar dois métodos diferentes de isolamento de células tumorais em circulação e duas técnicas de contagem dessas mesmas células, para determinar qual a combinação mais eficiente. Os dois métodos de isolamento foram a centrifugação diferencial e as esferas imunomagnéticas, e as duas técnicas de contagem foram o real-time PCR e a CF. Os investigadores concluíram que as esferas imunomagnéticas e a CF foram a combinação mais eficiente, e que alterações na quantidade de CTC durante o seguimento dos doentes poderiam indicar a recidiva do tumor.

Em 2007 num estudo efectuado em amostras de sangue periférico, de doentes com neoplasias metastizadas do pulmão, da próstata, do pâncreas, da mama e do cólon, Nagrath e col descrevem a separação das CTC através da marcação destas com o

anticorpo EpCAM. Concluíram que esta técnica proporciona uma nova e efectiva ferramenta de identificação das CTC nos doentes com esse tipo de neoplasia.

No que diz respeito à detecção de CTC através de painéis multiparamétricos, um estudo em doentes com sarcoma de Ewing (DuBois e col 2010) foi realizado com base na expressão celular de CD99 e de CD45. Estas células são CD99⁺ e CD45⁻. Este estudo concluiu que a utilização do CD99 e do CD45 proporciona uma estratégia alternativa para a detecção de células do sarcoma de Ewing. Bozzi e restantes investigadores (2006) realizaram um estudo com casos de neuroblastoma, utilizando um painel de marcação de três cores combinando o CD56 e o CD45 com o anticorpo específico intracelular anti-NB84, para a detecção de CTC na medula óssea. Estas células têm o fenótipo NB84⁺, CD56⁺ e CD45⁻. Os autores desenvolveram um ensaio rápido e fiável.

A CF também pode ser útil no estudo de populações aneuplóides e na imunofenotipagem de efusões para a detecção de células malignas. Um dos anticorpos utilizados pode ser o anti-Ber-EP4, específico para as células epiteliais (Davidson e col 2007).

Outra área de aplicação da CF em grande desenvolvimento, é o estudo das células endoteliais e seus progenitores endoteliais em circulação. Estas células desempenham um papel diferente no desenvolvimento do cancro, representando um possível marcador de destruição vascular (células endoteliais em circulação) e na formação de novos vasos (células progenitoras endoteliais em circulação). Dados clínicos sugerem que a determinação da quantidade de células endoteliais em circulação é útil para definir o melhor tratamento, enquanto as células progenitoras endoteliais em circulação parecem ter um papel catalítico em várias fases da progressão do cancro e na renovação após a terapia (Mancuso e Bertolini 2010). Têm sido desenvolvidas várias técnicas para a detecção e quantificação das células endoteliais em circulação, entre elas a CF, mas a falta de consenso no fenótipo destas células, assim como o seu reduzido número no sangue, não permitiu ainda o estabelecimento de “guidelines” definitivas (Strijbos e col 2008).

4. APRESENTAÇÃO DO LABORATÓRIO DE CITOMETRIA DE FLUXO

O Laboratório de CF está inserido no Serviço de Hematologia Clínica diagnosticando diversas patologias, entre as quais, doenças linfoproliferativas B, T e NK (natural-killer), hemoglobinúria paroxística nocturna (HPN), leucemias agudas, síndromes mielodisplásicas, mieloma múltiplo (MM) e gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), entre outras. Das amostras que me foram atribuídas para estudo durante o estágio, tive a oportunidade de identificar doentes com as seguintes patologias, HPN, MM, MGUS, linfoma folicular (LF), linfoma do manto (LM) e leucemia linfocítica crónica B (LLC-B).

Neste laboratório é possível encontrar quatro citómetros de fluxo diferentes: o EPICS-XL-MCL™, o Cytomics FC 500, o FACSCalibur e o FACSCanto II. Na Tabela 2 estão representadas as diferenças entre eles.

Tabela 2. Características dos citómetros de fluxo existentes no Laboratório de CF.

Citómetros de fluxo/ Características	EPICS-XL- MCL	Cytomics FC 500	FACSCalibur	FACSCanto II
Casa comercial	Beckman Coulter	Beckman Coulter	BD	BD
Número de lasers	Um	Dois	Dois	Três
Cores	Quatro	Cinco	Quatro	Oito

No decorrer do meu estágio todos os protocolos que realizei foram analisados nos citómetros EPICS-XL-MCL™ (Beckman Coulter) e FACSCalibur (BD).

4.1 ESTRUTURA ORGANIZATIVA DO LABORATÓRIO

O Laboratório de CF é constituído por três Médicas: a Prof. Dra. Margarida Lima, que é a Responsável pelo Laboratório, a Dra. Maria dos Anjos Teixeira e a Dra. Catarina Lau. É constituído também por duas Técnicas Superiores, a Mestre Maria Luís Queirós e a Dra. Marta Gonçalves, e por três Técnicas de Diagnóstico e Terapêutica, a Dra. Ana Helena Santos, a Dra. Marlene Santos e a Dra. Sónia Fonseca.

4.2 ORGANIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

O Laboratório de CF é constituído pelas salas de recepção das amostras, de processamento das amostras, de aquisição e análise de dados e pela sala de computadores, onde se executam os relatórios.

5. TIPOS DE AMOSTRAS

- Sangue periférico;
- Aspirado de medula óssea;
- Líquidos de derrame (pleural, pericárdico, ascítico);
- Líquido Cefalorraquidiano;
- Produtos de lavado (bronco-alveolar, vesical, etc);
- Biópsias.

6. RECEPÇÃO DAS AMOSTRAS

No Laboratório de CF é destacado um técnico para a recepção das amostras.

Quando uma amostra chega ao laboratório, o técnico responsável confere se o nome que consta na requisição coincide com o nome do doente colocado no recipiente com o produto a analisar. De seguida, faz o registo na folha de Distribuição das amostras dando um número interno (por exemplo, 1000576), identificando o doente, colocando o tipo de amostra, o técnico que irá processar esse mesmo produto e, após realizar o hemograma, o número de leucócitos no sangue. Posteriormente, fazem-se três esfregaços, que depois irão ser corados, e o hemograma no contador automático GEN-S (Beckman Coulter). Na ficha do hemograma de cada doente o técnico insere os seguintes dados: o nome e apelidos, o sexo, a data de nascimento, o número do processo e o hospital de origem. Neste laboratório é utilizado um programa informático, o GILab Soft, para dar a entrada dos doentes e respectivos produtos, inserir os resultados e fazer os relatórios, permitindo-lhes ainda ter acesso aos resultados de eventuais estudos anteriores que tenham sido realizados para cada doente.

Assim, o técnico procede à pesquisa de resultados de estudos anteriores de um determinado doente e, em caso afirmativo, regista-os. De seguida, regista o novo episódio do doente no programa GILab Soft para a recepção de amostras. Se o doente for de outro hospital as Administrativas terão de atribuir um número (LAB) do Centro Hospitalar do Porto - Hospital Geral de Santo António. Depois do registo do episódio, insere-se o número interno, o médico requisitante, o produto, o método de colheita e os respectivos tubos de colheita, a informação clínica, o estudo solicitado e o técnico responsável pela recepção.

O estudo dos anticorpos anti-plaquetários é realizado às terças-feiras pelo técnico destacado para tal efeito. Nos restantes dias semanais só são aceites amostras de doentes com trombocitopenias graves (abaixo das $30.000 \times 10^3 \mu\text{l}$ plaquetas).

O hemograma e a informação clínica dada pelo médico requisitante são aspectos fundamentais para a orientação do estudo, pois são estes que dão a informação de qual o tipo de estudo que se irá realizar posteriormente.

7. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

No Laboratório de CF existem dois tipos de marcação celular: a marcação de membrana e a marcação citoplasmática.

A marcação de membrana é realizada para marcar antígenos que existem na membrana celular. Esta marcação pode ser directa ou indirecta. Na marcação directa utiliza-se um anticorpo que está ligado a um fluorocromo. Esse anticorpo vai ligar-se ao antígeno que se encontra na membrana da célula. A marcação indirecta é realizada em dois passos porque o anticorpo primário não está marcado. Assim o anticorpo primário liga-se ao antígeno situado na membrana celular, e só numa segunda fase é que se adiciona o anticorpo secundário, marcado com um fluorocromo, que por sua vez se liga ao anticorpo primário.

A marcação citoplasmática é uma técnica para marcação de antígenos que não existem na membrana, mas no interior da célula. Nestes casos, a membrana tem de ser permeabilizada.

Durante o meu estágio neste laboratório tive a oportunidade de realizar algumas marcações de membrana e de observar uma marcação citoplasmática.

Na sala de processamento das amostras os técnicos têm à sua disposição vários protocolos de marcação dependendo das células que se pretende estudar.

7.1 PROTOCOLOS DE MARCAÇÃO MEMBRANAR

Um conceito muito importante que me transmitiram no início do meu estágio em CF foi que na CF é essencial conhecer o aspecto fenotípico das células normais para em situações patológicas conseguir identificar as alterações apresentadas.

Ao longo do meu estágio pude realizar alguns dos protocolos para marcação de membrana utilizados na rotina deste laboratório, entre os quais o Protocolo dos Mínimos; o Protocolo das doenças Linfoproliferativas B; o Protocolo das doenças dos Plasmócitos; o Protocolo de estudo do DNA; o Protocolo da HPN e o Protocolo de pesquisa de anticorpos anti-plaquetas (AAP) nas plaquetas. A marcação de membrana utilizada é a marcação directa.

Todos os protocolos que realizei são descritos de seguida.

7.1.1 PROTOCOLO DOS MÍNIMOS

Este protocolo é utilizado em casos de suspeita de doenças linfoproliferativas e inclui diversas combinações de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos, os quais estão descritos na Tabela 3. Este estudo é realizado com um painel de quatro cores no primeiro tubo (FITC/PE/ECD/PC5) e de três cores nos restantes (FITC/PE/PC5). A aquisição dos dados e posterior análise foi realizada no citómetro EPICS-XL-MCL™ (Beckman Coulter).

O protocolo de marcação começa com a adição de todas as combinações anticorpo+fluorocromo e a amostra a cada um dos tubos. De seguida, incubaram à temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, procedeu-se à lise dos eritrócitos, através de um dos aparelhos automáticos existentes no laboratório: o Coulter TQ-Prep (Beckman Coulter) ou o Multi-Q-Prep (Beckman Coulter). Os tubos foram depois colocados no frigorífico durante uns minutos para estabilizar a marcação. Posteriormente procedeu-se à aquisição de dados no citómetro.

No tubo 5 o primeiro passo foi a lavagem das células do doente (sangue periférico, medula óssea, etc) com solução tampão fosfato com albumina sérica bovina a 2% (PBS-BSA 2%), para eliminar as imunoglobulinas. Esta lavagem foi efectuada duas vezes. Só após este passo é que se procedeu à marcação com a combinação anticorpo+fluorocromo λ -FITC/ κ -PE/CD19-PC5, e à lise dos eritrócitos.

Tabela 3. Combinações de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizadas no painel do protocolo dos mínimos.

Tubos	Anticorpo + Fluorocromo
1.	CD3-FITC/CD16+CD56-PE/CD45-ECD/CD19-PC5
2.	CD20-FITC/CD5-PE/CD19-PC5
3.	CD8-FITC/CD4-PE/CD3-PC5
4.	CD38-FITC/CD10-PE/CD19-PC5
5.	λ -FITC/ κ -PE/CD19-PC5

O tubo CD3-FITC/CD16+CD56-PE/CD45-ECD/CD19-PC5 fornece diversas informações, entre as quais a percentagem de cada população de células NK, de linfócitos B e de linfócitos T; a percentagem total de linfócitos; o tamanho dos linfócitos B e T e a distribuição das células de acordo com a sua complexidade (através do dot-plot SSC/CD45-ECD).

No primeiro tubo, o anticorpo anti-CD19 marca os linfócitos B; o anticorpo anti-CD45 é um marcador PAN-leucocitário, ou seja, marca todos os leucócitos; a combinação do anticorpo anti-CD16 com o anticorpo anti-CD56 marca as células NK; o anticorpo anti-CD16 também marca os neutrófilos; e o anticorpo anti-CD3 marca os linfócitos T (Figura 3).

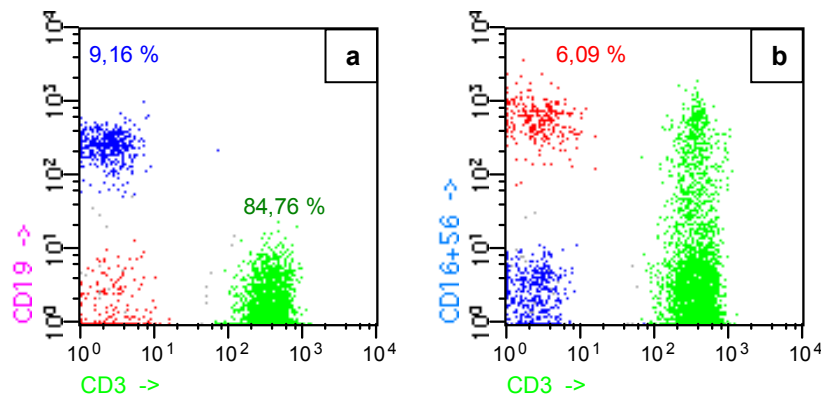


Figura 3 (a-b). Gráficos biparamétricos demonstrando a população dos linfócitos B (azul), dos linfócitos T (verde) e das células NK (vermelho) num indivíduo saudável.

No segundo tubo, o anticorpo anti-CD5 marca os linfócitos T enquanto o anticorpo anti-CD20 marca os linfócitos B. Em situações normais, os linfócitos B marcam CD19 e CD20, e uma pequena quantidade destas células marcam CD5.

O terceiro tubo serve para se estudar as sub-populações dos linfócitos T. O anticorpo anti-CD3 marca os linfócitos T; o anticorpo anti-CD4 marca os linfócitos T helper (CD4) e o anticorpo anti-CD8 marca os linfócitos T citotóxicos (CD8). No sangue periférico é normal encontrar-se uma maior quantidade de CD4 do que de CD8 (60% para 40%), enquanto na medula óssea há uma inversão da proporção (Figura 4).

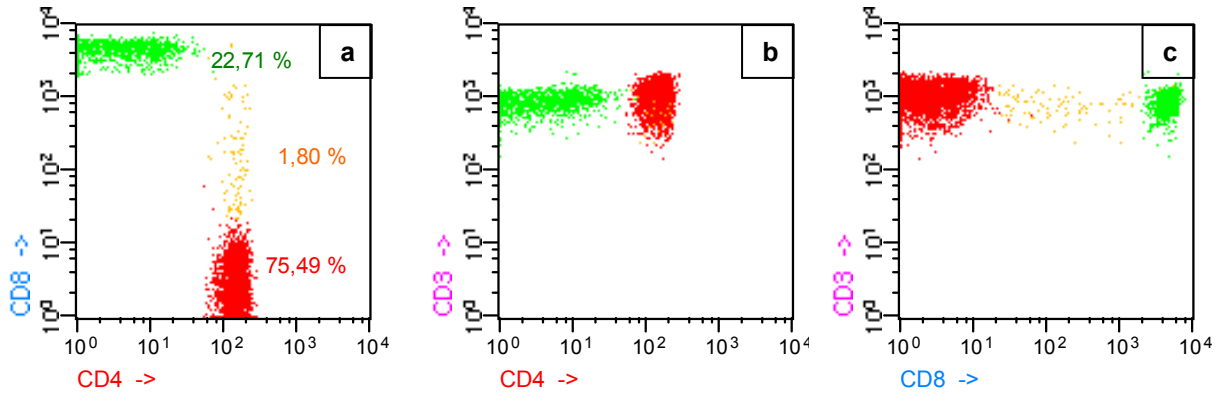


Figura 4 (a-c). Gráficos biparamétricos representando as populações de linfócitos T CD4 (vermelho) e de linfócitos T CD8 (verde) num indivíduo saudável.

O quarto tubo serve para identificar células precursoras de linfócitos e plasmócitos na medula óssea.

A presença de linfócitos B monoclonais CD10 positivos no sangue periférico faz suspeitar de um Linfoma folicular; a presença de células imaturas no sangue periférico faz suspeitar de uma Leucemia aguda.

O quinto tubo é de grande utilidade na detecção de monoclonalidade B nas amostras biológicas estudadas. Os anticorpos anti- κ e anti- λ marcam as cadeias leves das imunoglobulinas. Em situação normal existem ambas as cadeias e a quantidade de κ é superior à quantidade de λ (Figura 5).

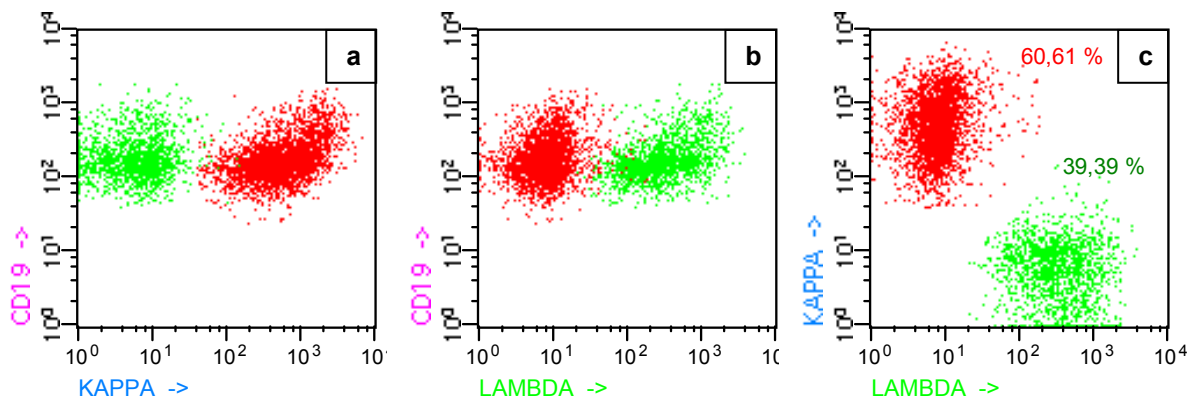


Figura 5 (a-c). Gráficos biparamétricos com a representação das cadeias leves κ (vermelho) e λ (verde) num indivíduo saudável.

Cada um dos tubos não deve ser avaliado isoladamente, ou seja, todos os tubos têm de ser considerados em conjunto, pois cada um deles dá uma informação única.

Consoante os resultados neste protocolo prossegue-se ou não o estudo. Se forem encontrados linfócitos B monoclonais, continua-se o estudo dos linfócitos B; se forem encontradas alterações nos linfócitos T ou células NK, procede-se com o Protocolo dos Mínimos das Neutropenias e/ou o Protocolo completo com o estudo dos receptores da célula T.

7.1.2 PROTOCOLO DE ESTUDO DAS DOENÇAS LINFOPROLIFERATIVAS B

Segundo a OMS a classificação dos tumores dos tecidos hematopoiéticos e linfóides é a seguinte (Jaffe e col 2001):

Tabela 4. Classificação dos tumores dos tecidos hematopoiéticos e linfóides, segundo a OMS.

Doenças mieloproliferativas crónicas	
Doenças mieloproliferativas	mielodisplásicas/
Síndromes mielodisplásicas	
Leucemias mielóides agudas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Leucemia mielóide aguda com anomalias citogenéticas recorrentes; ▪ Leucemia mielóide aguda com displasia multi-linhagem; ▪ Leucemia mielóide aguda e síndrome mielodisplásico, relacionado com a terapia; ▪ Leucemia mielóide aguda não categorizada; ▪ Leucemia mielóide aguda de linhagem ambígua.
Neoplasias da célula B	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Neoplasias de precursores da célula B; ▪ Neoplasias da célula B madura; ▪ Proliferações da célula B de potencial maligno incerto
Neoplasias da célula T e da célula NK	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Neoplasias de precursores da célula T; ▪ Neoplasias da célula T madura e da célula NK madura; ▪ Proliferações da célula T de potencial maligno incerto
Linfoma de Hogkin	
Neoplasias dos histiócitos e das células dendríticas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Neoplasias dos macrófagos/ histiócitos; ▪ Neoplasias das células dendríticas
Mastocitose	

LINFOMA

O linfoma é um tumor maligno do sistema linfóide. Normalmente, o crescimento neoplásico dos linfócitos ocorre nos gânglios linfáticos, que depois aumentam de volume. Podem acumular-se na medula óssea, no sangue, no baço, ou noutros locais como o intestino, os pulmões, ou o cérebro (Holman e col 2004).

Os linfomas dividem-se em dois tipos principais: doença de Hodgkin e linfomas não-Hodgkin (LNH). O tipo específico de linfoma depende da natureza dos linfócitos que deram origem à doença e o aspecto que apresentam para o patologista no momento que os analisa ao microscópio (Holman e col 2004). Os LNH podem ser linfomas de células B (LNH-B) ou de células T, conforme a respectiva célula afectada. Os LNH-B apresentam diferentes características celulares e manifestações clínicas, tendo em comum uma expansão clonal das células B malignas (Braylan 1993; Harris 2001). Para a sua distinção e caracterização, contribuem dados clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e, em alguns casos, as características moleculares e citogenéticas (Harris 2001).

Os LNH-B, em termos de prognóstico, podem ser classificados em tumores “indolentes” (baixo grau) e tumores “agressivos” (alto grau). Os tumores “indolentes” geralmente crescem mais lentamente e o seu diagnóstico é feito com base na observação ao microscópio. Os linfócitos que caracterizam o tumor são normalmente pequenos e tendem a crescer em grupos circulares de células, denominados nódulos ou folículos. Alguns exemplos de LNH-B “indolentes” são o linfoma MALT, LF de grau 1 e grau 2, linfoma linfoplasmocítico, entre outros (Holman e col 2004).

Os tumores “agressivos” são os linfomas de crescimento mais rápido e, por isso o tratamento é mais urgente. Podem envolver apenas um ou dois locais na altura do diagnóstico, mas estão associados muitas vezes com sintomas eminentes (Holman e col 2004). Um dos tipos de linfomas pertencentes a este grupo é o linfoma difuso de grandes células B, o linfoma mais comum a nível mundial (Harris 2001).

Neste relatório irei abordar o LF e o LM, pois foram os tipos de LNH-B que tive a oportunidade de observar durante o estágio.

LINFOMA FOLICULAR

O LF é o tipo de linfoma indolente mais comum. Este linfoma representa 22% de todos os LNH e 80% dos linfomas de células B indolentes (Liu e col 2007), e está associado com uma sobrevivência média de 9 anos (Hoffbrand e col 2001a).

Características clínicas

Os doentes com LF apresentam linfadenopatias (Armitage e Longo 2005; Liu e col 2007), esplenomegalia, hepatomegalia. Aproximadamente 15% dos doentes têm febre, suores nocturnos e perda de peso, e em 50% existe envolvimento medular (Liu e col 2007; Vitolo e col 2008).

A maioria dos doentes encontra-se em fases mais avançadas da doença no momento do diagnóstico (estádios III e IV) com linfadenopatias generalizadas (Hoffbrand e col 2001a; Liu e col 2007).

Características imunofenotípicas e moleculares

O LF é uma neoplasia de células B maduras (Liu e col 2007). A maioria dos LF de grau 1 e 2 expressam imunoglobulinas e marcadores das células B. Esta patologia expressa também CD10, Bcl-6 e Bcl-2 (Fisher e col 2005; Harris e col 2008; Hoffbrand e col 2001a; Liu e col 2007; Schwarting e col 2006; Vitolo e col 2008).

A proteína Bcl-2 pode ser útil na distinção entre a neoplasia e folículos reactivos, visto que estes últimos não a expressam (Harris e col 2008).

A proteína Bcl-2 é sobreexpressa nos LF e protege as células da apoptose. A inibição da apoptose prolonga a vida celular, resultando num número aumentado de células B com um risco elevado de defeitos moleculares possivelmente envolvidos na transformação maligna (Baliga e Kumar 2002).

Através da citogenética é possível detectar a translocação t(14;18)(q32;q21) em cerca de 80 a 90% dos casos (Liu e col 2007). Como resultado desta translocação ocorrem rearranjos no gene Bcl-2. Este gene localiza-se no cromossoma 18q21 e é unido com a região do gene da imunoglobulina de cadeia pesada (IgH) no cromossoma 14q32. O gene Bcl-2 fica sob a influência dos elementos reguladores do gene IgH (Liu e col 2007).

Esta translocação ocorre numa fase precoce do desenvolvimento das células B (Vitolo e col 2008).

LINFOMA DO MANTO

O LM é constituído por células linfóides pequenas. É um tipo de linfoma agressivo, embora morfológicamente possa parecer um linfoma de células B indolente (Sneed e col 2007). É um linfoma que não responde bem à quimioterapia (Dono e col 2004).

Esta neoplasia pode ocorrer em indivíduos de meia-idade e idosos (Dono e col 2004).

Características clínicas

Nesta patologia, os locais atingidos incluem os gânglios linfáticos, o baço, a medula óssea (aproximadamente 60% dos doentes) e locais extra-ganglionares, tais como o tracto gastrointestinal (polipose linfomatosa) (Fisher e col 2005; Sneed e col 2007; Swerdlow e col 2008).

A maioria dos doentes na altura do diagnóstico apresenta-se em fases mais avançadas da doença (estádios III e IV) com linfadenopatias generalizadas (Fisher e col 2005; Hoffbrand e col 2001a; Sneed e col 2007).

Características imunofenotípicas e moleculares

Estudos imunofenotípicos demonstraram que o LM expressa imunoglobulinas, CD5, CD79b, FMC7, CD20, e não expressa CD10, CD23 e Bcl-6 (Dono e col 2004; Sneed e col 2007; Swerdlow e col 2008).

Estudos citogenéticos detectaram mutações nos genes p16, p53 e ATM (Sneed e col 2007). E demonstraram também que em cerca de 70 a 100% dos doentes tinham a translocação t(11;14) que incluía o locus do Bcl-1 justaposto à região da cadeia pesada da Ig (Dono e col 2004).

LEUCEMIA

A leucemia é uma neoplasia maligna do sistema hemolinfoide com envolvimento medular e presença de células neoplásicas em circulação no sangue periférico. Existem diversos tipos de leucemia, e todas têm em comum o crescimento descontrolado de um dos tipos de leucócitos. Há quatro grandes grupos de leucemia que são a leucemia mielóide aguda (LMA), a leucemia mielóide crónica (LMC), a leucemia linfóide aguda (LLA) e a leucemia linfóide crónica (LLC) (Ball e Kagan 2008).

A LLA é uma neoplasia de células linfóides que se inicia de uma forma rápida e dramática. Esta neoplasia é mais frequente em crianças, mas também aparece em adultos. (Ball e Kagan 2008).

A LMA ocorre geralmente em adultos. A incidência aumenta com a idade, e vários doentes desenvolvem a neoplasia como consequência do tratamento de outros tumores. A LMA tem como sintomas: a fadiga, febre, infecções e hemorragias. Se esta doença não for tratada é rapidamente fatal, no entanto, o tratamento com quimioterapia é altamente eficaz levando a remissão completa (Ball e Kagan 2008).

A LMC é o tipo de leucemia que se manifesta em adultos e é diagnosticada em exames de rotina, pois é uma doença crónica, de crescimento lento, que não revela sintomas prévios à elevação da contagem leucocitária. (Ball e Kagan 2008).

Neste relatório irei mencionar apenas a LLC, pois foi o tipo de leucemia que tive a oportunidade de estudar durante o estágio.

LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA

A LLC é uma patologia hematopoiética monoclonal, de progressão lenta, caracterizada por uma expansão progressiva de linfócitos B. Estes linfócitos, pequenos e de aparência madura, acumulam-se no sangue, na medula óssea, nos gânglios linfáticos e no baço (Ball e Kagan 2008; Wierda e col 2008).

Características clínicas

A maioria dos doentes com LLC, na altura do diagnóstico, tem idade superior a 60 anos (Ball e Kagan 2008; Borthakur e col 2007). Nos doentes assintomáticos a patologia é diagnosticada em análises de rotina (Borthakur e col 2007). Nos doentes sintomáticos, a

fadiga, as infecções e a linfadenopatia estão presentes (Borthakur e col 2007; Wierda e col 2008).

Características imunofenotípicas

A clonalidade da LLC é confirmada pela restrição das cadeias leves lambda ou kappa da superfície da membrana celular (Wierda e col 2008).

As células de LLC expressam CD19, CD20, CD21, CD23 e CD24. Estas células expressam também CD5, que é um antigénio normalmente encontrado nas células T. O CD5 pode ser encontrado numa pequena percentagem de células B normais (Wierda e col 2008).

Mutação no gene variável das cadeias pesadas das imunoglobulinas

Cerca de 30 a 40% dos doentes com LLC apresentam hipermutações somáticas nas regiões variáveis das cadeias pesadas das Igs (IgVH) (Moreno e Montserrat 2008). Um estudo realizado por Hamblin e colaboradores (1999) concluiu que a mutação IgVH separa a LLC em duas formas clínicas distintas com prognósticos diferentes. Os doentes com os genes IgVH não mutados tinham uma forma mais agressiva da doença e uma sobrevivência mais curta do que os que tinham mutações somáticas.

Características laboratoriais

A linfocitose é uma característica da LLC, que consiste em linfócitos maduros (Borthakur e col 2007; Wierda e col 2008).

A infiltração medular pelos linfócitos é comum nesta patologia. A quantidade de linfócitos vai aumentando com o tempo. São células pequenas e maduras, mas pode haver variação na sua morfologia, com algumas delas maiores ou atípicas (Wierda e col 2008).

A anemia e a trombocitopenia são também duas características laboratoriais da LLC e são frequentes com a progressão da doença (Wierda e col 2008).

7.1.2.1 TÉCNICA

Este protocolo é realizado nos casos em que forem encontrados linfócitos B monoclonais no Protocolo dos Mínimos e ainda, nos casos em que na informação clínica e/ou no hemograma haja uma suspeita de doença linfoproliferativa B.

O protocolo de marcação utilizado no estudo das doenças linfoproliferativas B encontra-se apresentado na Tabela 5. É utilizado um painel de três cores (FITC/PE/PC5). A leitura dos tubos deste protocolo foi realizada no citómetro EPICS-XL-MCL™ (Beckman Coulter).

A realização do protocolo começa com a adição de todas as combinações anticorpo+fluorocromo e a amostra a cada um dos tubos. De seguida, incubaram à temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, procedeu-se à lise dos eritrócitos. Os tubos foram depois colocados no frigorífico durante uns minutos para estabilizar a marcação, e por fim foram adquiridos e analisados os dados relativos às células estudadas no citómetro.

Tal como no tubo 5 do protocolo dos mínimos, nos tubos 5 e 6 o primeiro passo foi a lavagem (duas vezes) das células do doente com PBS-BSA 2%. Só após este passo é que se procedeu à marcação com a combinação anticorpo+fluorocromo IgG-FITC/IgM-PE/CD19-PC5 e CD27-FITC/IgD-PE/CD19-PC5, e à lise dos eritrócitos.

Tabela 5. Painel de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizado no estudo das doenças linfoproliferativas B.

Tubos	Anticorpo + Fluorocromo
1.	FMC7-FITC/CD23-PE/CD19-PC5
2.	CD9-FITC/CD79b-PE/CD19-PC5
3.	DR-FITC/CD11c-PE/CD19-PC5
4.	CD103-FITC/CD25-PE/CD19-PC5
5.	IgG-FITC/IgM-PE/CD19-PC5
6.	CD27-FITC/IgD-PE/CD19-PC5

7.1.2.2 ANÁLISE DE RESULTADOS

Com este protocolo podem ser identificadas diversas patologias dos linfócitos B maduros, entre as quais a LLC-B, o LM e o LF, com base no seu perfil fenotípico.

A LLC-B corresponde a uma linfocitose B (Figura 6) que normalmente apresenta o seguinte fenótipo: CD19 positivo; CD20 positivo fraco ou negativo; CD5 positivo; CD23 positivo; CD79b positivo fraco ou negativo; imunoglobulinas negativas ou positivas fracas; CD38 positivo ou negativo; FMC7 positivo fraco ou negativo.

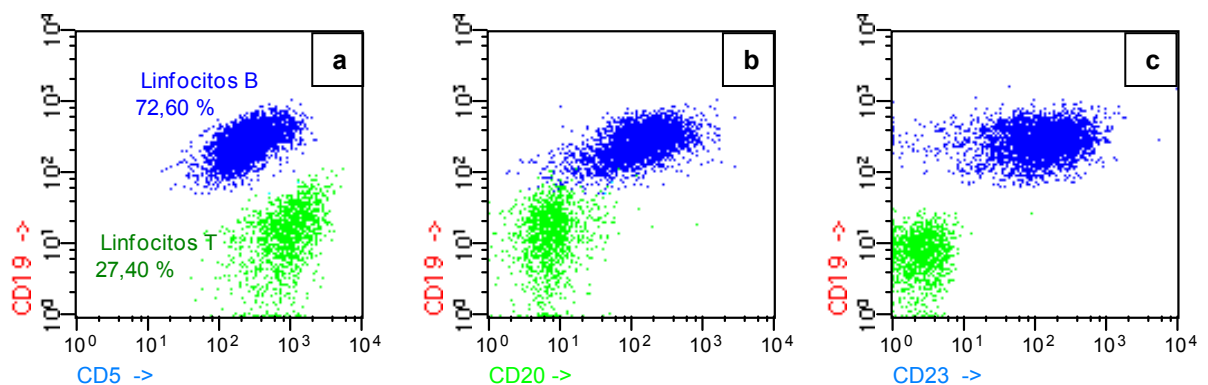


Figura 6 (a-c). Gráficos biparamétricos representativos de um doente com LLC-B. A população azul corresponde aos linfócitos B e a população verde aos linfócitos T.

O LM tal como a LLC-B, é CD19 e CD5 positivos no entanto distingue-se dela pelo facto dos seus linfócitos B serem CD20 positivo forte, CD23 negativo, CD79b positivo, FMC7 positivo e imunoglobulinas positivas

Os linfócitos B do LF caracterizam-se por terem o seguinte fenótipo: CD19 positivo forte, CD20 forte ou muito forte, CD5 negativo, CD10 positivo, CD38 negativo ou positivo; Igs positivas.

A principal característica que distingue esta patologia das acima descritas é o facto de o CD10 ser positivo. Sempre que se suspeita de um LF prepara-se também o seguinte tubo: Bcl-2-FITC/CD10-PE/CD19-PC5. Este tubo permite, em amostras da medula óssea, a distinção das células normais que marcam Bcl-2, das precursoras que não marcam, e das células de linfoma que sobreexpressam Bcl-2.

7.1.3 PROTOCOLO DAS DOENÇAS DOS PLASMÓCITOS

As gamopatias monoclonais constituem um grupo de doenças caracterizadas pela proliferação clonal de plasmócitos que produzem uma proteína homogénea de carácter monoclonal (componente M ou paraproteína) que se detecta no soro e/ou na urina – Figura 7 (McKenna e col. 2008).

Cada proteína M é constituída por duas cadeias pesadas da mesma classe: a γ faz parte da IgG, a α é encontrada na IgA, a μ está presente na IgM, a δ constitui a IgD e a IgE é caracterizada por ϵ . O componente M é também constituído por duas cadeias leves do mesmo tipo: kappa (κ) e lambda (λ). As Ig (imunoglobulina) policlonais são produzidas por vários clones de plasmócitos e são heterogéneas no que diz respeito às cadeias pesadas e têm também duas cadeias leves (Kyle e Rajkumar 2007).

O melhor método para a detecção e quantificação do componente M é a electroforese. Depois de se observar um pico na electroforese, é necessário recorrer à imunofixação para confirmar a presença da proteína M e para determinar o tipo de cadeia leve e pesada (Bladé 2006; Bladé e col 2008; Keren e col 1999; Kyle e Rajkumar 2006; Kyle e Rajkumar 2007; Kyle e Rajkumar 2010).

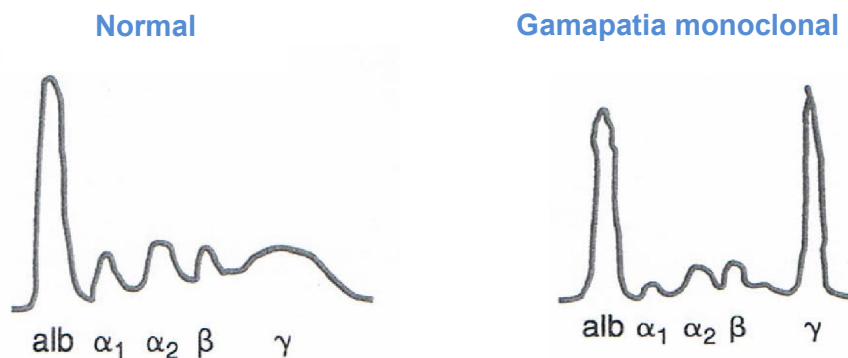


Figura 7. Representação da electroforese das proteínas séricas. Na imagem da esquerda pode observar-se a distribuição normal das proteínas séricas. A existência de várias Igs no soro traduz numa diferente mobilidade destas num campo eléctrico resultando em diferentes picos. Na imagem da direita está presente a distribuição das proteínas séricas num caso de gamapatia monoclonal (adaptado de Longo e Anderson 2005).

Estas gamopatias monoclonais podem ser classificadas em MGUS, MM, plasmacitoma, doenças de depósitos de Ig e mieloma osteoclerótico (Síndrome de POEMS - Polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, M protein, skin changes) – Tabela 6

(McKenna e col 2008). O MM é dividido em três variantes, o mieloma assintomático, o mieloma não secretor e a leucemia de plasmócitos.

Neste ponto do relatório apenas irei referir a MGUS e o MM, pois foram as patologias que estudei durante o meu estágio.

Tabela 6. Classificação das gamopatias monoclonais (adaptado de McKenna e col 2008).

Gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS)

Mieloma múltiplo

Variantes:

Mieloma assintomático

Mieloma não secretor

Leucemia de plasmócitos

Plasmacitoma

Plasmacitoma ósseo

Plasmacitoma extramedular

Doenças de depósitos de Ig

Amiloidose primária

Depósitos sistêmicos de cadeias pesadas e leves

Mieloma osteoclerótico (síndrome de POEMS)

MGUS

O termo gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) diz respeito à presença de uma proteína monoclonal em indivíduos sem qualquer característica de MM, macroglobulinemia de Waldenström, amiloidose primária ou outras patologias associadas (Bladé e col 2008).

Epidemiologia

A MGUS é encontrada em aproximadamente 3% dos indivíduos com idade superior a 50 anos e em 5% dos indivíduos com mais de 70 anos, sendo mais comum nos homens do que nas mulheres (Kyle e col 2006; Kyle e Rajkumar 2007; McKenna e col. 2008).

Quadro clínico

Os doentes não apresentam sintomas ou sinais relacionados com a gamapatia. É encontrado o componente M na electroforese das proteínas séricas, em que aproximadamente 70% são IgG, 15% IgM, 12% IgA e 3% biclonais; 20% são de cadeias leves (McKenna e col 2008).

Crítérios de diagnóstico

Esta doença é definida pela presença de componente monoclonal no soro <30 g/L, plasmocitose medular <10% (Figura 8), ausência de lesões líticas e ausência de sintomas ou lesões de órgão relacionados com o mieloma - Tabela 7 - (Katzel e col. 2007; Kyle e Rajkumar 2007; Kyle e Rajkumar 2010; McKenna e col 2008).

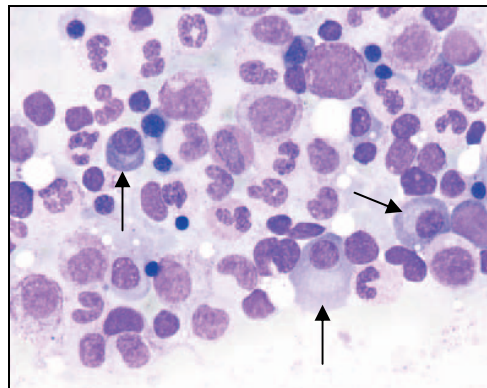


Figura 8. Medula óssea de um doente com MGUS. As setas indicam os plasmócitos (adaptado de Bladé 2006).

Tabela 7. Critérios de diagnóstico da MGUS (adaptado de McKenna e col 2008).

Componente M no soro <30 g/L

Plasmocitose medular <10%

Ausência de lesões líticas

Ausência de sintomas ou lesões de órgão relacionados com o mieloma (CRAB: hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas)

Risco de transformação maligna

A MGUS é uma condição pré-maligna que pode progredir para MM. A taxa de transformação maligna é de 1% por ano (Katzel e col 2007; Kyle e col 2002). A presença de uma paraproteína IgM (MGUS IgM) está associada com um clone linfoplasmocítico que pode progredir para linfoma linfoplasmocítico e/ou para macroglobulinemia de Waldenström. A MGUS não-IgM (IgG, IgA) está associada com a presença de clone de plasmócitos e pode progredir para MM ou amiloidose (McKenna e col 2008).

Factores preditivos de transformação maligna

Existem parâmetros que podem ser úteis na previsão da progressão de MGUS para MM. Um dos parâmetros é a quantidade de paraproteína. Num estudo realizado por Kyle e colaboradores (2002), o risco de progressão para MM, ou para outra patologia relacionada, 20 anos após o diagnóstico de MGUS foi de 14% para doentes com um valor de proteína M ≤ 5 g/L, de 49% para um valor de 25 g/L, e de 64% para um valor de 30 g/L. Parâmetros como a idade, o sexo, a presença de hepatoesplenomegalia, os níveis de hemoglobina, a creatinina e a albumina séricas, o tipo e a quantidade de cadeias leves na urina e a quantidade de plasmócitos na medula óssea não foram factores preditivos de progressão maligna.

Outro parâmetro é o tipo de proteína M. E quanto a este mesmo parâmetro o referido estudo (Kyle e col 2002) concluiu que os doentes com a MGUS do tipo IgM ou IgA tinham um risco de transformação maligna aumentado comparando com os doentes com MGUS IgG.

A razão das cadeias leves livres no soro é também um factor preditivo de transformação maligna. Esta razão é medida através da nefelometria, tendo como valores normais o intervalo 0,26-1,65 (Kyle e Rajkumar 2007). Uma razão de cadeias livres anormal, seja com valores abaixo de 0,26 (excesso de cadeias lambda) ou acima de 1,65 (excesso de cadeias kappa), é considerado um marcador de expansão clonal (Bladé 2006).

MIELOMA MÚLTIPLO

O MM é uma doença caracterizada pela proliferação clonal de plasmócitos na medula óssea (Figura 9), e, geralmente, pela presença de uma Ig monoclonal no sangue e/ou urina (Singhal e Mehta 2006)

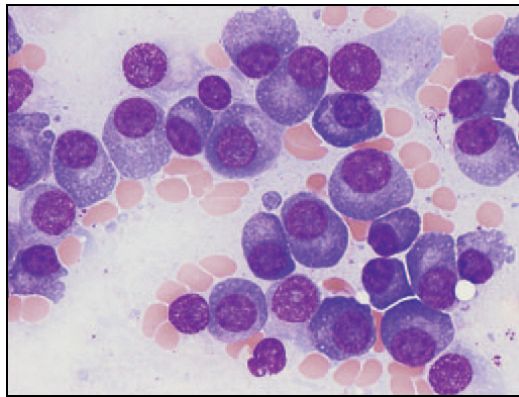


Figura 9. Medula óssea de um doente com MM, demonstrando plasmocitose (adaptado de Singhal e Mehta 2006).

Os plasmócitos muitas vezes apresentam uma morfologia anormal, com mais características imaturas e uma variação de tamanho superior ao que normalmente é encontrada nos plasmócitos normais (Figura 10) (Hoffbrand e Pettit 2001b).

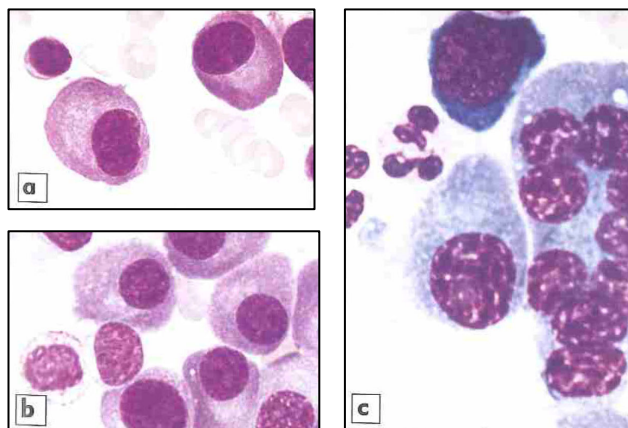


Figura 10 (a-c). MM: plasmócitos anormais na medula. Está presente uma variação do tamanho nuclear e citoplasmático; uma das células apresentadas é multinucleada (c) (adaptado de Hoffbrand e Pettit 2001b).

Epidemiologia

O MM representa 1% dos tumores malignos, 10-15% das neoplasias hematológicas e causa 20% das mortes por estas neoplasias. É mais comum nos homens do que nas mulheres e 90% dos casos de MM ocorre após os 50 anos de idade (McKenna e col 2008).

Etiopatogénese

Foram identificados inúmeros factores de risco para o MM. A predisposição genética é um dos factores de risco, devido à maior incidência desta patologia nos parentes de primeiro grau dos doentes de MM e por uma maior frequência da doença em negros (Schwartzing e col 2006).

A exposição a certas substâncias tóxicas ou radiações tem sido associada com um aumento da incidência de MM (McKenna e col 2008).

A estimulação de um antígeno crónico pode constituir um factor de risco (McKenna e col. 2008; Schwartzing e col 2006).

A maioria dos doentes não tem história de exposição a substâncias tóxicas nem de estímulo de antígeno crónico (McKenna e col 2008).

A maioria dos casos de MM manifesta-se com a secreção de IgG ou IgA. Raramente se observa a secreção de IgD ou IgE. Em 85% dos casos são secretadas Igs completas, porém em 15% são produzidas apenas cadeias leves (Schwartzing e col 2006).

Quadro clínico

As manifestações clínicas do MM são lesões líticas, insuficiência renal, anemia, hipercalcemia e imunodeficiência. Os sintomas mais comuns são a fadiga, as dores ósseas e infecções frequentes (Katzel e col 2007).

O doente com MM apresenta sintomas de lesões de órgão (CRAB: hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas), paraproteína monoclonal no soro ou urina (50% IgG, 20% IgA, 20% cadeias leves, <10% IgD, IgE, IgM e biclonal) e plasmócitos monoclonais na medula óssea (McKenna e col 2008).

Em 70% dos casos o doente apresenta lesões líticas (Figura 11), osteoporose ou fracturas associadas a dor óssea e hipercalcemia à data do diagnóstico (McKenna e col 2008).

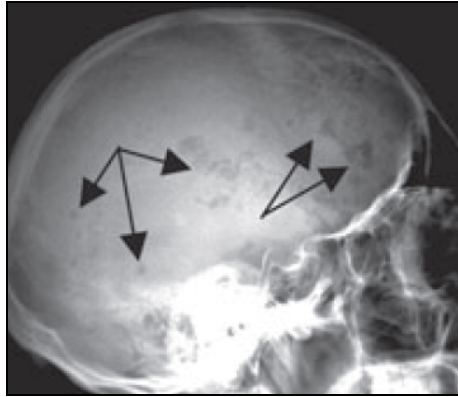


Figura 11. Lesões osteolíticas no crânio de um doente com MM. Estas lesões são provocadas pela activação dos osteoclastos (adaptado de Caers e col 2008).

Critérios de diagnóstico

O MM é caracterizado pela presença de componente monoclonal no soro ou na urina superior a 30 g/L - Tabela 8 (Lust e Donovan 1998). Esta patologia possui plasmocitose medular superior a 10%, presença de sintomas ou disfunções orgânicas (CRAB) (McKenna e col 2008).

Tabela 8. Critérios de diagnóstico do MM (adaptado de McKenna e col 2008).

Componente M no soro >30 g/L

Plasmocitose medular >10%

Presença de sintomas ou lesões de órgão (CRAB: hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas)

O MM assintomático (ou indolente) é um tipo de MM que se caracteriza pela presença de proteína monoclonal IgG ou IgA no soro ≥ 30 g/L e/ou plasmocitose medular $\geq 10\%$, mas sem evidência de lesões de órgão (CRAB). Os doentes com este tipo de MM têm um

maior risco de progressão maligna do que os doentes com MGUS (Kyle e Rajkumar 2007).

A diferenciação entre o MM e a MGUS ou o MM assintomático é baseada principalmente na presença ou na ausência de lesões de órgão relacionados com o mieloma (CRAB) – Tabela 9. A MGUS e o MM assintomático são distinguidos pela quantidade de proteína M sérica e pela plasmocitose medular (Kyle e Rajkumar 2007).

Tabela 9. Diferenças nos critérios de diagnóstico de MGUS, MM assintomático e MM.

MGUS	MM assintomático	MM
Componente M no soro <30 g/L	Componente M no soro ≥30 g/L	Componente M no soro >30 g/L
Plasmocitose medular <10%	Plasmocitose medular ≥10%	Plasmocitose medular >10%
Ausência de sintomas ou lesões de órgão	Ausência de sintomas ou lesões de órgão	Presença de sintomas ou lesões de órgão

As características mais importantes que diferenciam a MGUS do MM são as lesões líticas, a osteoporose, a hipercalcemia e as fracturas patológicas (Kyle e Rajkumar 2006; Kyle e Rajkumar 2007).

O desenvolvimento de lesões ósseas, com a progressão de MGUS para MM, é causado pela activação dos osteoclastos assim como pela inibição da diferenciação dos osteoblastos. A sobreexpressão de várias citoquinas, principalmente o RANK-L (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) e a MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1- α), desempenham um importante papel no desenvolvimento das lesões ósseas (Kyle e Rajkumar 2006; Kyle e Rajkumar 2010).

A ligação do RANK-L com o seu receptor, o RANK (receptor activator of nuclear factor kappa-B), exerce um importante papel na diferenciação dos osteoclastos e na reabsorção do osso. O RANK-L está também envolvido na activação de osteoclastos maduros para aumentar a reabsorção óssea (Burgess e col 1999). Foi identificado um receptor denominado OPG (osteoprotegerin), que se liga ao RANK-L, inibindo a sua interacção com o RANK e, desta forma, evitando a formação de osteoclastos (Simonet e col 1997). Em 2001, Croucher e colaboradores concluíram que o receptor OPG poderá vir a ser uma opção no tratamento da doença óssea do mieloma (Croucher e col 2001).

Diagnóstico

O diagnóstico e o estadiamento do MM requerem a realização de certos exames, tais como:

- Hemograma completo;
- Creatinina sérica, cálcio sérico, microglobulina- β_2 , lactato desidrogenase;
- Electroforese de proteínas do soro e da urina;
- Imunofixação do soro e da urina;
- Quantificação dos plasmócitos na medula óssea;
- Quantificação das cadeias leves livres;
- Imunofenotipagem;
- Citogenética;
- FISH (fluorescence *in situ* hybridization);
- Avaliação radiológica dos ossos (Kyle e Rajkumar 2009; Ribas e Colleoni 2005).

A CF apresenta algumas vantagens no diagnóstico e no acompanhamento dos doentes com gamopatias monoclonais: o diagnóstico do mieloma baseia-se na quantificação de plasmócitos na medula óssea e na demonstração do seu fenótipo monoclonal; a identificação de marcadores de prognóstico independentes, em especial aqueles que conseguem demonstrar o risco de progressão dos doentes com MGUS e com MM assintomático, baseando-se na percentagem de plasmócitos normais e anormais. E, por último, avaliar a doença residual mínima para se ter conhecimento da eficácia da terapia (Rawstron e col 2008).

7.1.3.1 TÉCNICA

Este protocolo é utilizado em casos de suspeita de doenças dos plasmócitos: MM ou MGUS.

No momento em que se suspeita de MGUS ou MM, realiza-se o tubo CD138-FITC/CD56-PE/CD38-PC5 e o CD38-FITC/CD10-PE/CD19-PC5. O tubo CD138-FITC/CD56-PE/CD38-PC5 é útil para quantificar e avaliar a monoclonalidade dos plasmócitos. O tubo CD38-FITC/CD10-PE/CD19-PC5 permite avaliar o perfil de maturação dos linfócitos B, distinguindo os precursores linfóides, dos linfócitos maduros e dos plasmócitos (estádio

final de maturação dos linfócitos B) permitindo ainda suspeitar se os plasmócitos são monoclonais ou não, com base na expressão de CD19 e na intensidade de expressão de CD38.

Na Tabela 10 abaixo representada descreve-se o painel utilizado para o estudo das patologias dos plasmócitos. A aquisição e análise dos dados obtidos foi efectuada no citómetro EPICS XL-MCL™ (Beckman Coulter).

A técnica de marcação foi realizada da seguinte forma: adicionaram-se os diferentes anticorpos e a amostra do doente. De seguida, os tubos incubaram à temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, procedeu-se à lise dos eritrócitos, através de um dos aparelhos automáticos: o Coulter TQ-Prep (Beckman Coulter) ou o Multi-Q-Prep (Beckman Coulter). Os tubos foram depois colocados no frigorífico durante uns minutos para estabilizar a marcação, e adquiridos no citómetro.

Tabela 10. Painel utilizado no estudo das patologias dos plasmócitos.

Tubos	Anticorpo + Fluorocromo
1.	CD138-FITC/CD56-PE/CD38-PC5
2.	CD138-FITC/CD19-PE/CD38-PC5
3.	CD57-FITC/CD45-PE/CD38-PC5
4.	CD20-FITC/CD28-PE/CD38-PC5

O anticorpo anti-CD138 é um marcador específico de plasmócitos, por isso tanto as células malignas como as normais marcam com este anticorpo. O anticorpo anti-CD38 marca praticamente todas as células, não é específico para plasmócitos. No entanto é possível identificá-los porque este marcador tem um padrão de expressão característico para estas células, que corresponde a uma marcação muito forte. Assim sendo, quando se está perante um caso de MM ou de MGUS esta marcação está diminuída. Os plasmócitos normais não marcam com anticorpo anti-CD56, no entanto os plasmócitos patológicos de MM e MGUS marcam.

O anticorpo anti-CD28 é um marcador de prognóstico, o que significa que quando é positivo o caso é de mau prognóstico.

7.1.3.2 ANÁLISE DE RESULTADOS

O fenótipo mais frequente nos casos de MM é o seguinte: CD38 positivo/ positivo forte, portanto com intensidade diminuída (em plasmócitos normais a marcação do CD38 é muito forte), o CD138 positivo e o CD19 negativo (Figura 12), o CD56 pode ser positivo ou negativo, o CD45 negativo, CD20 negativo, CD57 negativo.

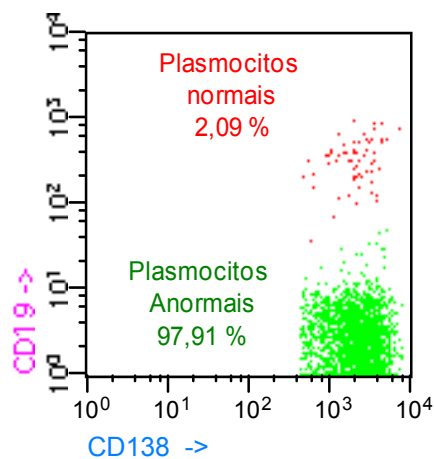


Figura 12. Gráfico biparamétrico correspondente a um doente com MM. A vermelho estão representados os plasmócitos normais e a verde estão os plasmócitos anormais.

Os doentes com MGUS geralmente têm duas populações de plasmócitos, uma de plasmócitos normais ou policlonais e outra de plasmócitos anormais (Bladé e col 2008).

7.1.4 PROTOCOLO DE ESTUDO DO DNA

Na análise de DNA através da CF, as células são coradas utilizando um corante que se liga ao DNA, o iodeto de propídeo ou outro corante, que sob condições adequadas origina um sinal de fluorescência proporcional ao DNA existente em cada célula (Shankey e Rabinovitch 2002).

Numa população homogénea, as células em fase S são células com um conteúdo de DNA superior ao das células em fase G₁, e menor ao das células em fase G₂/M.

Uma das vantagens mais importantes da análise do conteúdo de DNA por CF é que esta técnica não inclui na análise as células em metáfase, e abrange as células em todas as fases do ciclo celular (Shankey e Rabinovitch 2002).

A aneuploidia de DNA entende-se como todas as alterações quantitativas de DNA nas células. As células denominadas aneuplóides, demonstram uma quantidade de DNA diferente daquela que é detectada nas células normais diplóides, na mesma fase do ciclo celular. A alteração pode ser por excesso ou por defeito, sendo designadas, respectivamente, por hiperploídia ou hipoploídia de DNA. Para se avaliar o grau de alteração é utilizado o Índice de DNA. Este representa o quociente entre a quantidade de fluorescência detectada para a moda de células patológicas nas fases G₀/G₁ e a moda de fluorescência obtida para as células normais diplóides nas mesmas fases do ciclo celular. Desta forma, quando o índice de DNA é igual a 1 é considerada diploidia de DNA, e nos casos em que o índice é diferente de 1 considera-se aneuploidia de DNA (superior a 1 é hiperploídia, inferior a 1 é hipoploídia) (Orfão e Buitrago 1995).

A CF tem-se revelado nos últimos anos, uma técnica fundamental nos estudos do ciclo celular, tanto das células normais como de células patológicas. Nestes estudos podem ser avaliados diversos parâmetros, entre a distribuição de uma população ao longo das fases do ciclo celular, a duração de cada uma das fases do ciclo celular, a determinação da fase proliferativa, o cálculo do número de ciclos realizados por célula ou grupo de células durante um determinado período de tempo, e a análise da expressão de proteínas relacionadas com a proliferação celular (Orfão e Buitrago 1995).

A análise de DNA é uma aplicação importante na CF, pois tanto as anomalias fenotípicas como no DNA demonstraram vantagem no conhecimento da agressividade clínica e da resposta ao tratamento, assim como na distinção entre gamapatia monoclonal e mieloma. Por este motivo, após o diagnóstico destas patologias é necessário o estudo do seu DNA (Lima e col. 2000).

7.1.4.1 TÉCNICA

Neste protocolo foi realizada uma dupla marcação: marcação dos plasmócitos com o anticorpo anti-CD38 e marcação do DNA com iodeto de propídio.

O primeiro passo foi a colocação de anticorpo anti-CD38-FITC num tubo e a adição de amostra do doente. Neste estudo fez-se em paralelo a marcação de DNA de um dador de sangue periférico. Depois os tubos incubaram à temperatura ambiente e no escuro, e de seguida realizou-se uma lavagem com solução tampão PBS com azida, para eliminar as ligações não-específicas, e retirou-se o sobrenadante. Adicionou-se um revelador (Ig policlonais de coelho anti-ratinho-FITC); incubou-se e seguiu-se uma nova lavagem com PBS com azida. De seguida adicionaram-se duas soluções: uma solução lisante de eritrócitos e permeabilizante das membranas celulares, e uma solução de marcação de DNA (iodeto de propídeo) com RNAses para destruir o RNA; incubou-se novamente. De seguida, foi feita a aquisição no citómetro EPICS XL-MCL™ (Beckman Coulter).

7.1.4.2 ANÁLISE DE RESULTADOS

No processo de leitura do DNA, em primeiro lugar, inseriu-se o tubo do dador no citómetro e foi ajustado o canal médio do pico G_0/G_1 dos linfócitos normais para 200 ± 10 . De seguida, inseriu-se o tubo do doente e deixou-se a contagem atingir as 2500 células. Os dupletos celulares foram excluídos, e no dotplot para o CD38, os plasmócitos positivos e as restantes células de medula normais, foram separadas no histograma SSC/CD38.

O conteúdo de DNA e a distribuição no ciclo celular de cada população de células foram analisados individualmente utilizando o programa Multicycle. O Índice de DNA foi calculado como uma razão entre o valor modal do pico G_0/G_1 dos plasmócitos positivos para CD38 e o valor modal do pico G_0/G_1 da expressão de CD38 pelas restantes células de medula normais (considerada população controlo ou de referência). Os plasmócitos foram considerados aneuplóides quando o índice de DNA estivesse fora do intervalo 0,95-1,05; valores inferiores a 0,95 foram considerados hipoplóides, e valores superiores a 1,05 foram considerados hiperplóides.

7.1.5 PROTOCOLO DA HPN

A HPN é uma doença clonal adquirida da “stem cell”, causada por uma mutação no gene PIGA (phosphatidylinositol glycan complementation class A) (Hsi 2000; Röth e Dührsen 2007; Rotoli e col 2006), localizado no braço curto do cromossoma X (Xp22.1). A célula que sofreu essa mutação é incapaz de formar a “âncora” GPI (glycosylphosphatidylinositol), que é necessária para a ligação de várias proteínas à superfície da célula (Rotoli e col 2006), entre as quais o CD55 (DAF – decay-accelerating factor) e o CD59 (MIRL – membrane inhibitor of reactive lysis). Estas proteínas regulam o complemento; o CD55 actua numa fase mais precoce da activação do complemento, através da inibição da C3 convertase de ambas as vias clássica e alternativa. O CD59 bloqueia a formação do complexo de ataque à membrana, inibindo a agregação do C9 com esse complexo (Brodsky 2008a; Brodsky 2009; Luzzatto e Gianfaldoni 2006). A ausência destas proteínas nos eritrócitos é responsável pela lise destas células pelo complemento (Bessler e col 2001; Brodsky 2008a; Richards e col. 2007).

O complemento pode ser activado por três vias: a via clássica, a via da lectina e a via alternativa. Os eritrócitos afectados pela HPN encontram-se vulneráveis à activação do complemento por qualquer uma destas vias (Brodsky 2008a).

A HPN pode ser dividida em dois tipos: a HPN hemolítica, caracterizada por episódios de anemia hemolítica com hemoglobinúria, e com clones de HPN maiores; HPN hipoplásica, com citopenias (neutropenia, trombocitopenia e/ou anemia), com ausência de hemólise e, normalmente com pequenos clones HPN (Hillmen e Richards 2000; Richards e col 2000).

Quadro clínico

As características mais comuns na HPN são a anemia hemolítica, a trombose e as citopenias devido à falência medular (Bunn e Rose 2005; Richards e Hillmen 2001; Luzzatto e Gianfaldoni 2006; Richards e col 2007).

A anemia hemolítica pode ser explicada pela susceptibilidade aumentada dos eritrócitos HPN à lise mediada pelo complemento (Rotoli e col 2006).

O nível de hemólise depende do tamanho do clone HPN e, por isso do número de células afectadas. A hemólise que não seja tratada geralmente torna-se crónica, com episódios de crise hemolítica e a urina da manhã fica com uma cor acastanhada devido à perda de hemoglobina (Bessler e col 2001; Röth e Dührsen 2007).

Durante os períodos de hemólise intravascular, a hemoglobina livre é libertada na circulação. A haptoglobina, uma proteína produzida pelos hepatócitos no fígado, liga-se à hemoglobina e este complexo é degradado naquele órgão. Este processo faz com que a hemoglobina fique livre pelo que se liga irreversivelmente ao óxido nítrico. O óxido nítrico desempenha um papel importante na manutenção do aspecto vascular pelo relaxamento do músculo liso que consequentemente causa a dilatação venosa (Kelly e col 2009). A depleção de óxido nítrico nos indivíduos leva a distonia do músculo liso que pode ser responsável por vários sintomas da doença. Estes incluem espasmos esofágicos e disfagia, dor abdominal, letargia severa e disfunção erétil nos homens (Brodsky 2008b; Moyo e col 2004; Kelly e col 2009).

A trombose, outra característica desta doença, ocorre principalmente nas veias abdominais (esplénica, hepática e portal) e nas veias intra-cranianas (Brodsky 2008a; Luzzatto e Gianfaldoni 2006; Röth e Dührsen 2007), e é a principal causa de morte (Bessler e col 2001; Brodsky 2008a; Brodsky 2008b; Brodsky 2009; Hillmen e col 1995; Kelly e col 2009; Luzzatto e Gianfaldoni 2006; Rotoli e col 2006).

O risco de trombose, assim como a hemólise, está relacionado com o tamanho do clone de HPN, sendo maior em doentes com o tipo hemolítico da doença (Brodsky 2008a; Brodsky 2008b; Luzzatto e Gianfaldoni 2006; Moyo e col 2004; Parker e col 2005; Rotoli e col 2006).

Diagnóstico

Inicialmente, o diagnóstico da HPN era realizado pelo teste de Ham (Brodsky 2009; Krauss 2003), pelo teste da sacarose (Brodsky 2009; Krauss 2003) e pelo ensaio de lise do complemento. Este ensaios centrados nos eritrócitos não quantificavam as células de HPN (Brodsky 2009), apenas determinavam a sensibilidade dos eritrócitos relativamente à lise mediada pelo complemento (Dworacki e col 2005). Estes testes foram substituídos pela CF. O teste de Ham apresentava algumas desvantagens relativamente à CF; era um teste não-específico, pouco sensível (Brodsky 2008a; Kelly e col 2009; Röth e Dührsen 2007), não detectava pequenas populações de eritrócitos (<5%), não diferenciava os eritrócitos tipo III dos eritrócitos tipo II e não permitia estudar outras linhagens celulares além dos eritrócitos (Hillmen e Richards 2000).

A CF substituiu o teste de Ham passando a ser a técnica “gold standard” no diagnóstico da HPN (Kelly e col 2009; Krauss 2003; Luzzatto e Gianfaldoni 2006; Richards e Hillmen 2001; Richards e col 2000). Com este método é possível avaliar a expressão reduzida ou ausente de GPI em todas as células sanguíneas (Dworacki e col 2005). É descrita como

a técnica de diagnóstico de células sanguíneas mais sensível e específica (Hsi 2000; Richards e Hillmen 2001; Rotoli e col 2006). A sua análise multiparamétrica possibilitou a detecção de pequenos clones de HPN nas diferentes linhagens celulares (Hillmen e Richards 2000; Rotoli e col 2006).

A condição mínima de diagnóstico por CF é a ausência de pelo menos duas proteínas ligadas ao GPI diferentes em, pelo menos, duas linhas celulares (Brodsky 2008b; Luzzatto e Gianfaldoni 2006; Röth e Dührsen 2007).

Através da CF é possível detectar eritrócitos tipo III, que apresentam deficiência total de DAF (CD55) e de MIRL (CD59); eritrócitos tipo II, com deficiência parcial das mesmas proteínas; e eritrócitos tipo I, com expressão normal das proteínas DAF e MIRL (Holguin e col 1989a; Holguin e col 1989b; Kelly e col 2009; Luzzatto e Gianfaldoni 2006; Parker e col 2005).

O diagnóstico da HPN deve ser realizado com base na CF e também baseado noutros parâmetros, tais como, o hemograma completo, a contagem de reticulócitos, a avaliação de LDH, a hemossiderina na urina, a hemoglobina na urina, a concentração de eritropoietina no soro e o doseamento do ferro sérico (Luzzatto e Gianfaldoni 2006; Parker e col 2005).

O hemograma completo informa a presença de trombocitopenia, leucopenia ou ambos, que sugere uma disfunção da “stem-cell”. A contagem de reticulócitos demonstra a capacidade de resposta da medula óssea à anemia. Valores normais ou minimamente aumentados de LDH não suportam a hemólise como um factor importante na anemia. A presença de hemossiderinúria indica hemólise intravascular crónica, enquanto grandes quantidades hemoglobinúria indica hemólise intravascular clinicamente significativa. A concentração de eritropoietina deve ser determinada, visto que a disfunção renal pode complicar a HPN. A deficiência de ferro é comum (Parker e col 2005).

HPN e anemia aplásica

A HPN ocorre frequentemente em indivíduos com anemia aplásica e, alguns deles apresentam na altura do diagnóstico granulócitos HPN de pequeno a moderado número. Por este motivo a HPN e a anemia aplásica são várias vezes confundidas (Brodsky 2008a).

Os doentes com anemia aplásica têm sintomas de anemia, trombocitopenia, e neutropenia devido à produção insuficiente da medula óssea (Brodsky 2008a).

7.1.5.1 TÉCNICA

O protocolo utilizado no laboratório onde decorreu o meu estágio, no estudo da HPN está apresentado na Tabela 11. A aquisição e análise dos dados obtidos foi realizada no citómetro FACSCalibur (BD).

O primeiro passo para a realização desta técnica foi a colocação dos anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos e a amostra do doente nos tubos. De seguida, os tubos incubaram à temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, adicionou-se ao tubo dos neutrófilos e dos monócitos uma solução de lise dos eritrócitos (FACS lysing), e incubaram novamente. Após a incubação centrifugaram-se os tubos e retirou-se o sobrenadante. De seguida realizou-se uma lavagem com PBS com azida, retirou-se o sobrenadante e os tubos foram adquiridos no citómetro. Quanto ao tubo dos eritrócitos, após a incubação da amostra diluída com os anticorpos monoclonais, efectuou-se uma lavagem com PBS e em seguida procedeu-se à aquisição e análise dos dados no citómetro.

Tabela 11. Protocolo utilizado no estudo da HPN.

Linhas celulares	Anticorpo + Fluorocromo
Neutrófilos	CD66b-FITC/ CD87-PE/ CD16-PC5/ CD4-APC
Monócitos	CD48-FITC/ CD87-PE/ CD4-PercP/ CD14-APC
Eritrócitos	CD59-FITC/ CD55-PE/ */ *

7.1.5.2 ANÁLISE DE RESULTADOS

Para ser considerado doente com HPN tem de apresentar deficiência ou ausência de proteínas ligadas ao GPI em pelo menos duas linhas celulares, e a percentagem de células deve ser superior a 5%. Se o resultado for inferior a 5%, o indivíduo deve repetir o estudo no período de seis meses.

Estudo nos neutrófilos:

Seleção da população a estudar com base nas características de dispersão da luz (no dot-plot FSC/SSC) e avaliação das proteínas ligada ao GPI nos neutrófilos: CD16, CD66b e CD87. Os neutrófilos HPN caracterizam-se pela ausência ou diminuição da intensidade de expressão destas proteínas (Figura 13).

Estudo nos monócitos:

A seleção da população e estudar é efectuada com base nas características de dispersão da luz (dot plot FSC/SSC) e também com base na expressão de CD4. Nestas células é estudada a intensidade de expressão das proteínas ligadas ao GPI CD14, CD48 e CD87, que nos monócitos HPN está diminuída ou ausente (Figura 13).

Estudo nos eritrócitos:

Tal como nos estudos das outras células a seleção dos eritrócitos totais é efectuada com base nas características de dispersão de luz (dot plot FSC/SSC), sendo depois avaliada a intensidade de expressão de CD55 e CD59, que nos eritrócitos HPN está ausente ou diminuída. No exemplo apresentado na Figura 13 o doente apresenta uma HPN tipo III, uma vez que os eritrócitos HPN não expressam nenhum CD59.

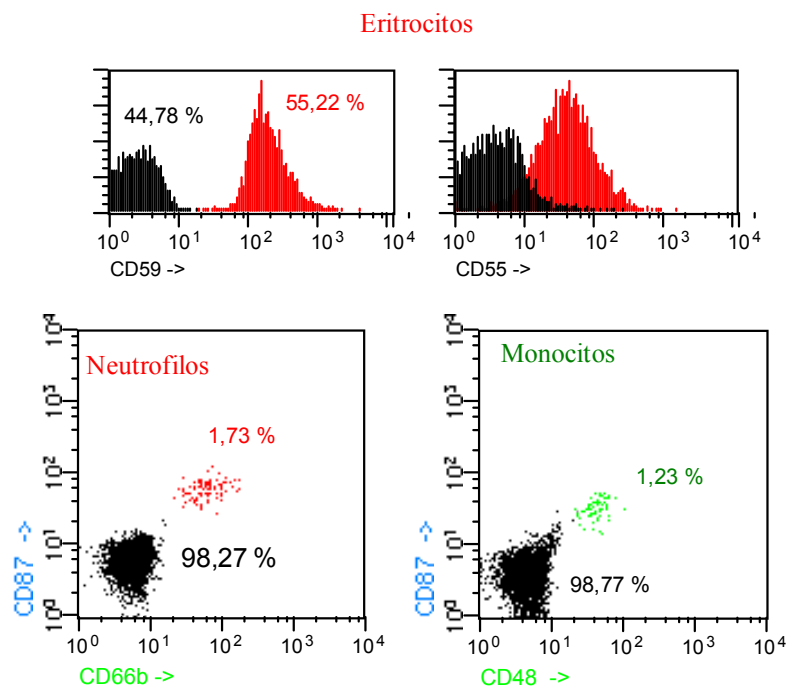


Figura 13. Representação de dois histogramas correspondentes ao estudo dos eritrócitos (a vermelho estão os eritrócitos normais e a preto está o clone HPN) e de dois gráficos biparamétricos um para o estudo dos neutrófilos (população vermelha corresponde aos neutrófilos normais e a população preta aos neutrófilos HPN) e outro para o estudo dos monócitos (população verde corresponde aos monócitos normais e a população preta aos monócitos HPN).

7.1.6 PESQUISA DE AAP NAS PLAQUETAS

Os AAP podem condicionar a destruição periférica das plaquetas e estão frequentemente envolvidos na origem de trombocitopenias. Mais raramente, pode estar na base de disfunções plaquetárias adquiridas, ao interferirem com a função das glicoproteínas (Gp) plaquetárias para os quais são específicos (Instrução de trabalho IT.SHC.LC.061/2 – Plaquetas: Anticorpos anti-plaquetas do Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica).

Os ensaios para a pesquisa de AAP à superfície das plaquetas são mais correctamente denominados por ensaios para avaliação das Igs associadas às plaquetas, já que permitem identificar todas as Igs associadas à superfície plaquetária e não apenas auto- ou alo-anticorpos (Instrução de trabalho IT.SHC.LC.061/2 – Plaquetas: Anticorpos anti-plaquetas do Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica).

As Igs à superfície das plaquetas correspondem, nos indivíduos normais a quantidades inferiores a 1% do total de Igs das plaquetas. Os níveis de Igs em ambos os compartimentos podem estar aumentados em doentes com trombocitopenias de outras etiologias, reflectindo a presença de plaquetas gigantes com mais grânulos alfa, produzidas sob stress (Instrução de trabalho IT.SHC.LC.061/2 – Plaquetas: Anticorpos anti-plaquetas do Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica).

A pesquisa de AAP nas plaquetas tem particular interesse no estudo das púrpuras trombocitopénicas auto-imunes (Instrução de trabalho IT.SHC.LC.061/2 – Plaquetas: Anticorpos anti-plaquetas do Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica).

7.1.6.1 TÉCNICA

A técnica para pesquisa de AAP nas plaquetas permite detectar a presença de Igs (IgG e IgM) à superfície das plaquetas a avaliá-la de uma forma semi-quantitativa.

Nesta técnica utilizam-se amostras de sangue periférico de três indivíduos normais e sangue periférico do doente, colhidas em tubo de EDTA-K3. As amostras são centrifugadas para a obtenção de plasma rico em plaquetas. Depois de três lavagens consecutivas, procede-se à marcação dupla das plaquetas com anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos (Tabela 12). Utiliza-se o CD42b pois, além de ser específico para as plaquetas, permite realizar o despiste da Doença de Bernard Soulier (Instrução de

trabalho IT.SHC.LC.061/2 – Plaquetas: Anticorpos anti-plaquetas do Laboratório de citometria do Serviço de Hematologia Clínica).

Tabela 12. Marcação utilizada para a pesquisa de AAP nas plaquetas.

Tubos	Anticorpo + Fluorocromo
Tubo 1	IgG-FITC/CD42b-PE
Tubo 2	IgM-FITC/CD42b-PE

A aquisição é realizada no citómetro EPICS-XL-MCL™ (Beckman Coulter), utilizando o protocolo de aquisição específico.

As amostras de indivíduos normais são úteis para definir o “cut-off”.

O critério de positividade é estabelecido por comparação com o resultado obtido nas plaquetas normais.

7.1.6.2 ANÁLISE DE RESULTADOS

A leitura no citómetro de fluxo deve ser iniciada com a selecção das plaquetas com base nas características de dispersão da luz (FSC/SSC) e na expressão de CD42b-PE.

Posteriormente, deve ser quantificada a intensidade média de fluorescência (IMF) das imunoglobulinas, que por sua vez, traduz a ligação dos anticorpos anti-IgM-FITC ou anti-IgG-FITC às plaquetas e, portanto, a quantidade de IgM ou IgG à superfície das mesmas. O relatório clínico é realizado com base na comparação da média aritmética dos dados com o valor obtido no doente.

7.2 TÉCNICA DE MARCAÇÃO CITOPASMÁTICA

Como já foi referido anteriormente, a marcação citoplasmática é uma técnica para marcação de antigénios que se encontram no interior das células. Por este motivo, não podem ter os mesmos procedimentos que as marcações membranares. Neste tipo de marcação as membranas têm de ser permeabilizadas de forma a deixarem o anticorpo marcado entrar na célula.

O protocolo de marcação citoplasmática que observei durante o meu estágio foi a marcação de Bcl-2 nos casos de suspeita de LF (CD19-PC5/CD10-PE/Bcl-2-FITC).

As marcações CD10-PE/CD19-PC5 são marcações de membrana, enquanto a marcação de Bcl-2-FITC é uma marcação citoplasmática.

O primeiro passo deste protocolo foi a colocação dos anticorpos anti-CD10-PE e anti-CD19-PC5 num tubo e a adição da amostra do doente. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente e no escuro, e de seguida realizou-se uma lavagem com PBS com azida. Depois retirou-se o sobrenadante e colocou-se o reagente Fix & Perm Medium A, cujo objectivo foi fixar as células. O tubo foi incubado novamente à temperatura ambiente e no escuro. De seguida procedeu-se a uma nova lavagem com solução tampão, retirou-se o sobrenadante, e adicionou-se o reagente Fix & Perm Medium B, para permeabilizar as células facilitando o acesso do anticorpo monoclonal às estruturas intracelulares simultaneamente com a adição deste reagente, procedeu-se à marcação citoplasmática com anti-Bcl-2-FITC. Posteriormente incubou-se o tubo à temperatura ambiente e no escuro, e realizou-se uma lavagem com PBS com azida. A aquisição do tubo foi realizada no citómetro EPICS-XL-MCL™ (Beckman Coulter).

A interpretação dos resultados é feita com base na IMF nos linfócitos B e T. Na Figura 14 a IMF dos linfócitos B está aumentada relativamente aos linfócitos T.

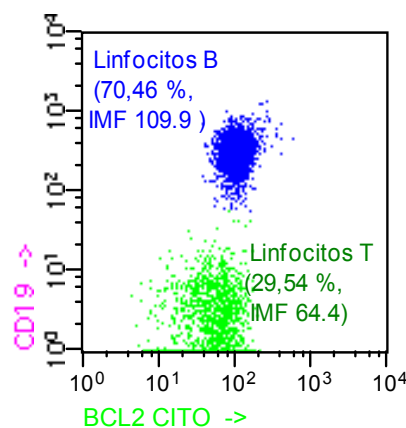


Figura 14. Gráfico biparamétrico relativo à marcação citoplasmática de Bcl-2 num doente. A população azul corresponde aos linfócitos B e a população a verde aos linfócitos T.

7.3 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS COM “LINFOPREP”

O “linfoprep” é utilizado para separar as células sanguíneas. Os linfócitos têm menor densidade do que os eritrócitos e os restantes leucócitos, por este motivo não depositam no fundo do tubo.

A técnica utilizada para células mononucleares foi a seguinte: adicionou-se sangue periférico a um tubo de centrifuga com “linfoprep”, tendo sempre o cuidado para não se misturarem as fases. Após a centrifugação (Figura 15) retirou-se o anel de células mononucleares para um novo tubo e procedeu-se à lavagem das células com PBS-BSA 0,2%. Esta lavagem foi efectuada três vezes.

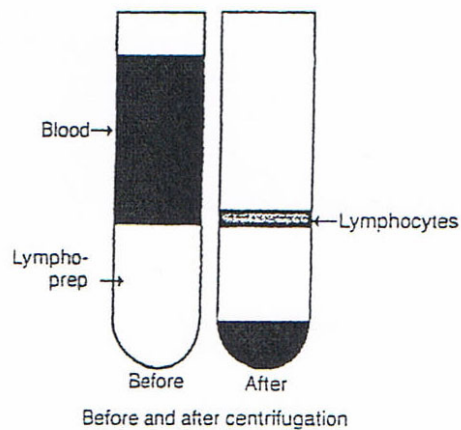


Figura 15. Tubos antes e depois da centrifugação (adaptado de <http://www.freewebs.com/eldri123/Package%20insert/Lymphoprep.pdf>).

No laboratório onde decorreu o meu estágio utilizam esta forma de isolamento de células sanguíneas para marcar as imunoglobulinas (Figura 16) ou para congelar para estudos de Biologia Molecular.

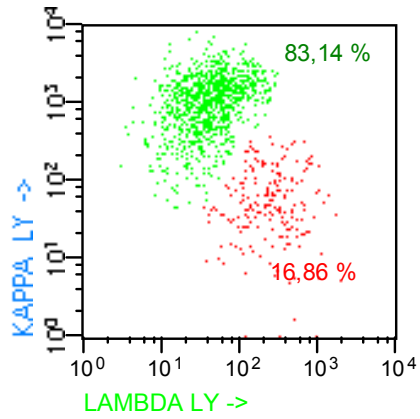


Figura 16. Gráfico biparamétrico relativo às cadeias leves κ (população verde) e λ (população vermelha) após a separação celular através do "linfoprep".

8. CONCLUSÃO

A análise por CF tornou-se cada vez mais uma técnica indispensável para a avaliação rápida e objectiva das características da superfície celular e intra-celulares (Orfão e col 1995).

O estágio realizado no Laboratório de Citometria de fluxo do Centro Hospitalar do Porto – Hospital Geral de Santo António, no âmbito do mestrado que frequento, permitiu-me relembrar, aprofundar e alargar os conhecimentos adquiridos durante o plano curricular da minha licenciatura.

O laboratório de Citometria de fluxo dedica-se ao estudo das doenças do sangue, tais como, doenças linfoproliferativas B, T e NK, HPN, leucemias agudas, síndromes mielodisplásicas, MM, MGUS, entre outras. Esta avaliação é feita ao nível do diagnóstico, da avaliação da doença residual mínima, assim como da detecção de eventuais recaídas, enquanto nos tumores sólidos se centra na detecção de células patológicas em circulação e em células metastáticas, e no estadiamento.

Tal como era meu objectivo aprendi noções básicas da citometria, tais como o funcionamento do citómetro, o procedimento de preparação das amostras para a posterior aquisição e análise no citómetro de fluxo, a interpretação de gráficos biparamétricos, etc, o que me permitiu conhecer não só o padrão de expressão normal das células como o imunofenótipo característico de algumas patologias, como a LLC-B, o LF, o LM, o MM e a MGUS. Conheci a rotina do laboratório, o processo de recepção das amostras, os procedimentos que utilizavam para as patologias B, para as gamopatias monoclonais, para a HPN e para os AAP; efectuei marcações e interpretei os resultados obtidos para atingir os objectivos dos estudos (diagnóstico, reavaliação, etc).

Concluindo, os objectivos foram atingidos e este estágio foi uma mais-valia não só para me tornar uma melhor profissional no âmbito da minha licenciatura, mas também como candidata ao grau de Mestre em Oncologia.

9. BIBLIOGRAFIA

Armitage, JO; Longo DL. (2005). Malignancies of lymphoid cells. In: Kasper, DL; Braunwald, E; Fauci, AS. Harrison's principles of internal medicine. USA: McGraw-Hill; 641-655

Ball, ED; Kagan, A. (2008). Facts about leukemia: risks, diagnosis, and effects. In: Ball, ED; Kagan, A. 100 Questions & Answers about leukemia. USA: Jones and Bartlett; 1-4

Baliga, BC; Kumar, S. (2002). Role of Bcl-2 family of proteins in malignancy. Hematol Oncol; 20: 63-74

Bessler, M; Schaefer, A; Keller, P. (2001). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: insights from recent advances in molecular biology. Transfusion Medicine Reviews; 4(15): 255-267

Bladé, J. (2006). Monoclonal gammopathy of undetermined significance. The New England Journal of Medicine; 355: 2765-2770

Bladé, J; Rosiñol, L; Cibeira, MT; Larrea, CF. (2008). Pathogenesis and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance. Leukemia; 22: 1651-1657

Borthakur, G; Bueso-Ramos, CE; O'Brien, S. (2007). Chronic lymphocytic leukemia and associated disorders. In: Kantarjian, HM; Wolff, RA; Koller, CA. The MD Anderson: Manual of medical oncology. New York: McGraw-Hill; 39-55

Bozzi, F; Gambirasio, F; Luksch, R; Collini, P; Brando, B; Fossatti-Bellani, F. (2006). Detecting CD56⁺/NB84⁺/CD45⁻ immunophenotype in the bone marrow of patients with metastatic neuroblastoma using flow cytometry. Anticancer research; 26: 3281-3288

Braylan, RC. (1993). Lymphomas. In: Bauer, KD; Duque, RE; Shankey, TV. Clinical flow cytometry: Principles and application. Baltimore: Williams & Wilkins; 203-234

Brodsky, RA. (2008a). Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: The Physiology of Complement-Related Hemolytic Anemia. Ann Intern Med; 148: 587-595

Brodsky, RA. (2008b). Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood reviews*; 22: 65-74

Brodsky, RA. (2009). How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*; 26(113): 6522-6527

Brown, M; Wittwer, C. (2000). Flow cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry*; 46(8B): 1221-1229

Bunn, HF; Rose, W. (2005). Hemolytic anemias and acute blood loss. In: Kasper, DL; Braunwald, E; Fauci, AS; Hauser, SL; Longo, DL; Jameson, JL. *Harrison's principles of internal medicine*. USA: McGraw-Hill; 607-616

Burgess, TL; Qian, Y-X, Kaufman, S; Ring, BD; Van G; Capparelli, C e col. (1999). The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *The Journal of Cell Biology*; 3(145): 527-538

Caers, J; Vande broek, I; De Raeve, H; Michaux, L; Trullemans, F; Schots, R; e col. (2008). Multiple myeloma – na update on diagnosis and treatment. *European Journal of Haematology – Journal Compilation*; 81: 329-343

Croucher, PI; Shipman, CM; Lippitt, J; Perry, M; Asosingh, K; Hijzen, A; e col. (2001). Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood*; 98: 3534-3540

Cruz, I; Ciudad, J; Cruz, JJ; Ramos, M; Gómez-Alonso, A; Adansa, JC e col. (2005). Evaluation of multiparameter flow cytometry for the detection of breast cancer tumor cells in blood samples. *Am J Clin Pathol*; 123: 66-74

Davidson, B; Dong, HP; Holth, A; Berner, A; Risberg, B. (2007). Flow cytometric immunophenotyping of cancer cells in effusion specimens: diagnostic and research applications. *Diagnostic cytopathology*; 9(35): 568-578

Dono, M; Cerrutti, Giannamaria; Zupo, S. (2004). The CD5+ B-cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 36: 2105-2111

DuBois, SG; Epling, CL; Teague, J; Matthay, KK; Sinclair, E. (2010). Flow cytometry detection of Ewing sarcoma cells in peripheral blood and bone marrow. *Pediatr Blood Cancer*; 54: 13-18

Dworacki, G; Sikora, J; Mizera-Nyczak, E; Trybus, M; Mozer-Lisewska, I; Czyz, A e col. (2005). Flow cytometric analysis of CD55 and CD59 expression on blood cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Folia Histochemica et Cytobiologica*; 2(43): 117-120

Fisher, RI; Mauch, PM; Harris, NL; Friedberg, JW. (2005). Non-Hodgkin lymphomas: Specific disease entities. In: DeVita, Jr, V; Hellman, S; Rosenberg, SA. *Cancer: Principles & Practice of oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1971-1989

Garrigós, N; Gallego, J; Guillén-Ponce, C; Guaraz, P; García-Bautista, M; Castillejo, A; e col. (2010). Circulating tumour cell analysis as an early marker for relapse in stage II and III colorectal cancer patients: a pilot study. *Clin Transl Oncol*; 12(2): 142-147

Gerges, N; Rak, J; Jabado, N. (2010). New technologies for the detection of circulating tumour cells. *Br Med Bull*; 94: 49-64

Hamblin, TJ; Davis, Z; Gardiner, A; Oscier, DG; Stevenson, FK. (1999). Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 94: 1848-1854

Harris, NL. (2001). Mature B-cell neoplasm. In: Jaffe, ES; Harris, NL; Stein, H; Vardiman, JW. *World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press; 121-187

Harris, NL; Swerdlow, SH; Jaffe, ES; Ott, G. (2008). Follicular lymphoma. In: Swerdlow, SH; Campo, E; Harris, NL; Jaffe, ES; Pileri, SA; Stein, H; Thiele, J; Vardiman. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC; 220-228

Hillmen, P; Lewis, SM; Bessler, M; Luzzatto, L; Dacie, JV. (1995). Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *The New England Journal of Medicine*; 19(333): 1253-1258

Hillmen, P; Richards, SJ. (2000). Implications of recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British Journal of Haematology*; 108: 470-479

Hoffbrand, AV; Pettit, JE. (2001b). Mieloma Múltiplo e condições relacionadas: Mieloma Múltiplo. In: Hoffbrand, AV; Pettit, JE. *Atlas colorido de Hematologia clínica*. São Paulo: Manole; 233-240

Hoffbrand, AV; Pettit, JE; Moss, PAH. (2001a). Malignant lymphomas. In: Hoffbrand, AV; Pettit, JE; Moss, PAH. *Essential Haematology*. Milan: Blackwell Science Ltd; 199-214

Holguin, MH; Fredrick, LR; Bernshaw, NJ; Wilcox, LA; Parker, CJ. (1989a). Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *The Journal of Clinical Investigation*; 84: 7-17

Holguin, MH; Wilcox, LA; Bernshaw, NJ; Rosse, WF; Parker, CJ. (1989b). Relationship between the membrane inhibitor of reactive lysis and the erythrocyte phenotypes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *The Journal of Clinical Investigation*; 84: 1387-1394

Holman, P; Garrett, J; Jansen, W. (2004). Diagnosis and classification of lymphoma. In: Holman, P; Garrett, J; Jansen, W. *100 Questions & Answers about lymphoma*. USA: Jones and Bartlett; 17-20

Hsi, ED. (2000). Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Testing by Flow Cytometry. *Am J Clin Pathol*; 114: 798-806

Jaffe, ES; Harris, NL; Stein, H; Vardimen, JW. (2001). Summary of the WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. In: Jaffe, ES; Harris, NL; Stein, H; Vardimen, JW. *Pathology & Genetics: Tumours of hematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press; 10-11

Janeway, CA; Travers, P; Walport, M; Shlomchik. (2001). Isolation of lymphocytes. In: Janeway, CA; Travers, P; Walport, M; Shlomchik. *Immunobiology*. New York: Garland; 637

Kamentsky, LA. (2001). Laser Scanning Cytometry. In: Darzynkiewicz, Z; Crissman, HÁ; Robinson, JP. Methods in Cell Biology. USA: Academic Press; 51-85

Katzel, JA; Hari, P; Vesole, DH. (2007). Multiple myeloma: Charging toward a bright future. CA Cancer J Clin; 57: 301-318

Kelly, R; Richards, S; Hillmen, P; Hill, A. (2009). The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and treatment with eculizumab. Therapeutics and Clinical Risk Management; 5: 911-921

Keren, DF; Alexanian, R; Goeken, JA; Gorevic, PD; Kyla, RA, Tomar, RH. (1999). Guidelines for clinical and laboratory evaluation patients with monoclonal gammopathies. Archives of Pathology and Laboratory Medicine; 123: 106-107

Krauss, JS. (2003). Laboratory diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Annals of Clinical & Laboratory Science; 4(33): 401-406

Krishnamurthy, S; Cristofanilli, M; Singh, B; Reuben, J; Gao, H; Cohen, EN; e col. (2010). Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer. Cancer; 116(14): 3330-3337

Kyle, RA; Rajkumar, SV. (2006). Monoclonal gammopathy of undetermined significance. British Journal of Haematology; 134: 573-589

Kyle, RA; Rajkumar, SV. (2007). Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering multiple myeloma: emphasis on risk factors for progression. British Journal of Hematology; 139: 730-743

Kyle, RA; Rajkumar, SV. (2009). Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. Leukemia; 23: 3-9

Kyle, RA; Rajkumar, SV. (2010). Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. Curr Hematol Malig Rep; 5: 62-69

Kyle, RA; Therneau, TM; Rajkumar, SV; Larson, DR; Plevak, MF; Offord, JR; e col. (2006). Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. The New England Journal of Medicine; 354: 1362-1369

Kyle, RA; Therneau, TM; Rajkumar, SV; Offord, JR; Larson, DR; Plevak, MF; Melton, LJ. (2002). A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *The New England Journal of Medicine*; 346: 564-569

Lima, M; Teixeira, MA; Fonseca, S; Gonçalves, C; Guerra, M; Queirós, ML; e col. (2000). Immunophenotyping Aberrations, DNA Content, and Cell Cycle Analysis of Plasma Cells in Patients with Myeloma and Monoclonal Gammopathies. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*; 26(6): 634-645

Liu, NS; Medeiros, LJ; McLaughlin. (2007). The indolent lymphomas. In: Kantarjian, HM; Wolff, RA; Koller, CA. *The MD Anderson: Manual of medical oncology*. New York: McGraw-Hill; 77-100

Longo, DL; Anderson, KC. (2005). Plasma cell disorders. In: Kasper, DL; Braunwald, E; Fauci, AS; Hauser, SL; Longo, DL, Jameson, JL. *Harrison's principles of internal medicine*. USA: McGraw-Hill; 656-662

Luzzatto, L; Gianfaldoni, G. (2006). Recent advances in biological and clinical aspects of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *International Journal of Hematology*; 84: 104-112

Mancuso, P; Bertolini, F. (2010). Circulating endothelial cells as biomarkers in clinical oncology. *Microvasc Res*; 79(3): 224-228

McKenna, RW; Kyle, RA; Kuehl, WM; Grogan, TM; Harris, NL; Coupland, RW. (2008). Plasma cell neoplasms. In: Swerdlow, SH; Campo, E; Harris, NL; Jaffe, ES; Pileri, SA; Stein, H; Thiele, J; Vardiman. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC; 200-219

Moreno, C; Montserrat, E. (2008). New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Reviews*; 22: 211-219

Moyo, VM; Mukhina, GL; Garrett, ES; Brodsky, RA. (2004). Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *British Journal of haematology*; 126: 133-138

Nagrath, S; Sequist, LV; Maheswaran, S; Bell, DW; Irimia, D; Ulkus, L; e col. (2007). Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*; 450(7173): 1235-1239

Nicholson, JKA. (2002). Immunophenotyping of Lymphocytes by Flow Cytometry. In: Rose, NR; Hamilton, RG; Detrick, B. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington DC: ASM Press; 137-139

Orfão, A; Ruiz-Arguelles, A; Lacombe, F; Ault, K; Basso, G; Danova, M. (1995). Flow cytometry: its applications in hematology. *Haematologica*; 80: 69-81

Orfão, A; Buitrago, JMG. (1995). Fundamentos de la citometría de flujo. In: Orfao, A; Buitrago, JMG. *La Citometría de flujo en el Laboratorio Clínico*. Salamanca: SEQC; 11-30

Parker, C; Omine, M; Richards, S; Nishimura, J; Bessler, M; Ware, R; e col. (2005). Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*; 12(106): 3699-3709

Rawstron, AC; Orfao, A; Beksac, M; Bezdickova, L; Brooimans, RA; Bumbea, H e col. (2008). Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*: 93(3): 431-438

Research antibody division of MorphoSys [<http://www.abdserotec.com/>]

Ribas, C; Colleoni, GWB. (2005). Neoplasias hematológicas: Mieloma Múltiplo. In: Forones, NM; Filho, RJG; Takodono, H; Freire, CAR. *Guias de Medicina ambulatorial e hospitalar*. Brasil: Manole; 345-355

Richards, SJ; Hill, A; Hillmen, P. (2007). Recent advances in the diagnosis, monitoring, and management of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry Part B: Clinical cytometry*; 72B: 291-298

Richards, SJ; Hillmen, P. (2001). Advances in the laboratory diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Clinical and Applied Immunology Reviews*; 1: 315-330

Richards, SJ; Rawstron, AC; Hillmen, P. (2000). Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry*; 42: 223-233

Riethdorf, S; Pantel, K. (2008). Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization. *Pathobiology*; 75: 140-148

Röth, A; Dührsen, U. (2007). Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Dtsch Arztebl*; 4 (104): 1-9

Rotoli, B; Nafa, K; Risitano, AM. (2006). Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. In: Runge, MS; Patterson, C. *Principles of Molecular Medicine*. New Jersey: Humana Press, Inc; 838-847

Schwarting, R; Kocher, WD; McKenzie, S; Alomar, M. (2006). Hematopatologia. In: Rubin, E; Gorstein, F; Rubin, R; Schwarting, R; Strayer, D. *Rubin Patologia: Bases clinicopatológicas da Medicina*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1039-1144

Shankey, TV; Rabinovitch, PS. (2002). DNA Content Flow Cytometry. In: Rose, NR; Hamilton, RG; Detrick, B. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington DC: ASM Press; 171-182

Shapiro, HM. (2003). What (And What Good) Is Flow Cytometry?. In: Shapiro, HM. *Practical Flow Cytometry*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 1-2

Simonet, WS; Lacey, DL; Dunstan, CR; Kelley, M; Chang, MS; Luthy, R; e col. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*; 89: 309-319

Singhal, S; Mehta, J. (2006). Multiple myeloma. *Clin J Am Soc Nephrol*; 1: 1322-1330

Sneed, TB; Medeiros, LJ; Rodriguez, MA. (2007). Aggressive and highly aggressive lymphomas. In: Kantarjian, HM; Wolff, RA; Koller, CA. *The MD Anderson: Manual of medical oncology*. New York: McGraw-Hill; 101-140

Strijbos, MH; Gratama, JW; Kraan, J; Lamers, CH; Bakker, MA; Sleijfer, S. (2008). Circulating endothelial cells in oncology: pitfalls and promises. *British Journal of Cancer*; 98: 1731-1735

Swerdlow, SH; Campo, E; Seto, M; Müller-Hermelink, HK. (2008). Mantle cell lymphoma. In: Swerdlow, SH; Campo, E; Harris, NL; Jaffe, ES; Pileri, SA; Stein, H; Thiele, J; Vardiman. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; 229-232

Tárnok, A; Gerstner, AOH. (2002). Clinical Applications of Laser Scanning Cytometry. Cytometry; 50:133-143

Wierda, WG; Keating, MJ; O'Brien, S. (2008). Chronic lymphocytic leukemias. In: DeVita, Jr, VT; Lawrence, TS; Rosenberg, SA. Cancer: Principles & Practice of oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2278-2282

Vitolo, U; Ferreri, AJM; Montoto, S. (2008). Follicular lymphomas. Critical reviews in Oncology/ Hematology; 66: 248-261

