

BIANCA CHIESA BIGARDI

**A IMPORTÂNCIA DA IMUNOFENOTIPAGEM NO
DIAGNÓSTICO DAS LEUCEMIAS, COM DESTAQUE
PARA A LEUCEMIA BIFENOTÍPICA**

São Jose do Rio Preto- SP

2017

BIANCA CHIESA BIGARDI

**A IMPORTÂNCIA DA IMUNOFENOTIPAGEM NO
DIAGNÓSTICO DAS LEUCEMIAS, COM DESTAQUE
PARA A LEUCEMIA BIFENOTÍPICA**

Trabalho de Conclusão de Curso para
obtenção do título de pós-graduação
em Hematologia clínica, laboratorial e
banco de sangue apresentado à
Academia de Ciências e Tecnologia.

São Jose do Rio Preto - SP

2017

“A IMPORTÂNCIA DA IMUNOFENOTIPAGEM NO DIAGNÓSTICO DAS LEUCEMIAS, COM DESTAQUE PARA A LEUCEMIA BIFENOTÍPICA”.

“THE IMPORTANCE OF IMUNOPHENOTHING IN THE DIAGNOSIS OF LEUKEMIA, WITH A HIGHLIGHT FOR BIPHENOTHIC LEUKEMIA”.

IMPORTANCIA DA IMUNOFENOTIPAGEM.

Bianca Chiesa Bigardi¹

*Endereço de Correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050-130, São José do Rio Preto, SP
e-mail: a.c.t.@terra.com.br

1. Acadêmico do curso de pós graduação Latu Sensu em Hematologia Clínica, laboratorial e Banco de Sangue – Academia de Ciências e Tecnologia (São José do Rio Preto).

O autor do presente estudo declara que não possuem nenhum potencial conflito de interesse em relação ao presente artigo.

Trabalho desenvolvido na área de Biomedicina

Resumo

As leucemias consistem em alteração neoplásica hematológica que causam alterações genéticas na célula, afetando, assim, sua diferenciação celular, maturação e proliferação, resultando em extravasamento de células imaturas para o sangue periférico e, em algumas vezes, infiltração de órgãos e tecidos. As leucemias podem ser classificadas em: i) leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia mieloide aguda (LMA) e ii) leucemia linfóide crônica (LLC) e leucemia mieloide crônica (LMC). A leucemia aguda bifenotípica (LAB) consiste em proliferação de blastos que expressam marcadores de superfície da linhagem linfóide e mieloide simultaneamente, dando origem a sua ambiguidade. A LAB é rara, agressiva e com pouca incidência, tornando-a pouco delimitada e dificultando a escolha do tratamento. As leucemias são as neoplasias mais comuns em crianças e adolescentes. A imunofenotipagem é o exame de maior importância utilizado para diferenciar os marcadores de superfície dos blastos conseguindo assim caracterizar se a leucemia é linfóide ou mieloide.

Descritores: Oncologia; leucemia aguda bifenotípica; imunofenotipagem.

Abstract

Leukemias consist of hematological neoplastic alterations that cause genetic alterations in the cell, thus affecting its cellular differentiation, maturation and proliferation, resulting in extravasation of immature cells into the peripheral blood and, sometimes, infiltration of organs and tissues. Leukemias can be classified into: i) acute lymphoid leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML); and ii) chronic lymphocytic leukemia (CLL) and chronic myeloid leukemia (CML). Acute biphenotypic leukemia (LAB) consists of proliferation of blasts that express surface markers of the lymphoid and myeloid lineage simultaneously, giving rise to its ambiguity. LAB is rare, aggressive and with little incidence, making it poorly delimited and making it difficult to choose the treatment. Leukemias are the most common neoplasms in children and adolescents. Immunophenotyping is the most important test used to differentiate surface markers from blasts, thus characterizing whether leukemia is lymphoid or myeloid.

Descriptors: Oncology; acute biphenotypic leukemia; immunophenotyping.

INTRODUÇÃO

O câncer infanto-juvenil é a segunda maior causa de morte em adolescentes de até 19 anos por se tratar de uma patologia extremamente invasiva, de menor tempo de latência, que se desenvolve rapidamente e que normalmente tem causas desconhecidas, diferentemente do que acontece na grande maioria dos casos em adultos, que tem como causa a grande exposição a fatores de risco. Entre os tipos de câncer mais comuns nesta faixa etária e em ordem de prevalência estão as leucemias (15 a 45%), os linfomas (5 a 25%) e os tumores de sistema nervoso central (5 a 22%) ^{2, 8, 16}.

As leucemias consistem em neoplasias hematológicas que alteram geneticamente as células progenitoras conhecidas também como blastos que são derivadas das *stem cells* ou células indiferenciadas e que teriam potencial de diferenciação em linfoide ou mieloide. Há uma proliferação clonal que pode afetar as células progenitoras de linhagem linfoide ou mieloide causando, assim, um acúmulo das mesmas na medula óssea ⁴.

O acúmulo de células leucêmicas que ocorre na medula faz com que as células hematopoiéticas comuns sejam substituídas progressivamente, devido a uma disputa nutricional e de espaço provocada pelas células alteradas, inibindo assim, a hematopoese normal, e o excesso provoca infiltração das mesmas tanto no sangue periférico como em órgãos e tecidos ³.

A diferenciação das leucemias ocorre através de marcadores de superfície dos blastos, que diferenciam a linhagem em mieloide ou linfoide, pela maturação e pela quantidade das células ^{4, 6}.

A imunofenotipagem tem grande importância no diagnóstico, após a primeira indução e até mesmo na avaliação para identificação de recidiva em pacientes que já fizeram o tratamento e estão em período de manutenção onde é feito frequentemente exames para avaliar possíveis metástases ou recidivas ¹⁰.

Na imunofenotipagem existem diversos marcadores de todas as linhagens, como cCD22, cCD3, cd79a, MPO, CD10, CD2, CD5, CD13, CD33, CD20, CD8, CD117, CD19, TdT, CD7, CD14, CD15, CD24, CD64 entre outros ¹¹.

O diagnóstico de leucemia linfoide aguda (LLA) e leucemia mieloide aguda (LMA) se caracterizam por anaplasia que dará origem a presença de grande quantidade de blastos no sangue periférico e medula óssea, e a diferenciação

entre a mieloide e linfoide é feita através de exames imunofenotípicos que indicarão, com precisão, a linhagem dos antígenos presentes nos blastos e sua maturação⁹.

Já a leucemia linfoide crônica (LLC) e a leucemia mieloide crônica (LMC) se caracterizam pela grande quantidade de células maduras no sangue periférico e medula óssea, de blastos a linfócitos na LLC e a segmentados na LMC¹².

A leucemia aguda bifenotípica (LAB), também conhecida como híbrida ou de linhagem mista, consiste em uma neoplasia das células progenitoras sanguíneas que expressam antígenos de superfície tanto da linhagem linfoide como mieloide²².

A LAB é muito agressiva, rara e é responsável por cerca de 5% das leucemias agudas. Em estudos recentes as estatísticas indicam que a incidência da LAB em crianças é de cerca de 2 a 4,4% dos casos¹³.

Existem células hematopoiéticas normais que se expressam de maneira aberrantes, o que pode confundir-se com as LAB's e, assim, dificultar a identificação do melhor tratamento. É indicada para diferenciação a utilização de anticorpos monoclonais e que se utilize o sistema de pontuação do Grupo Europeu para Classificação Imunológica das Leucemias (EGIL)^{6,12}.

O tratamento para a LAB consiste em uma quimioterapia extremamente agressiva para um possível transplante de medula óssea, então, nestes casos, o diagnóstico não é feito pela morfologia, mas sim pela expressão imunofenotípica, que é essencial para o diagnóstico e escolha adequada do tratamento, pois indicará se a expressão dos antígenos de membrana são de predomínio da linhagem linfoide ou mieloide²¹.

LEUCEMIAS

A medula óssea consiste em um tecido composto principalmente por células-tronco do sangue, células gordurosas e tecidos que tem como função o desenvolvimento e maturação das células sanguíneas e está localizada no interior de ossos específicos de acordo com a idade. Em crianças ela é encontrada em praticamente todos os ossos enquanto que nos adultos encontra-se nos ossos da costela, esterno, vértebras, crânio, pélvis e nas porções distais de osso longos como fêmur e úmero e tem como principal responsabilidade a produção de todas as células sanguíneas (glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas)¹.

A leucemia é a neoplasia que atinge as células sanguíneas com maior incidência sobre os glóbulos brancos. Esse tipo de neoplasia hematológica altera geneticamente as células progenitoras que nos casos dos glóbulos brancos podem ser chamadas de blastos e estão presentes na medula óssea. Estas células são derivadas das *stem cells* (células tronco) ou células indiferenciadas que após o processo de maturação se diferenciariam entre linhagem linfóide ou mielóide¹.

O processo de alteração genética faz com que ocorra uma proliferação clonal descontrolada causando um acúmulo de blastos na medula óssea e, conseqüentemente a infiltração de células imaturas para sangue periférico assim como órgãos e tecidos^{1,7}.

As leucemias de podem ser de linhagem linfóide ou mielóide e podem se apresentar de forma crônica ou aguda^{1,9}.

Nos casos de leucemias crônicas o infiltrado medular consiste em sua maioria de células diferenciadas e de uma determinada linhagem que em seu início conseguem desenvolver suas funções normalmente e o diagnóstico da doença ocorre normalmente em exames de rotina ou após um agravo da doença onde acontece o aumento considerável das células leucêmicas maduras causando inchaço nos linfonodos ou infecções⁹.

Em leucemias de fase aguda o infiltrado medular consiste em blastos ou células no início de sua maturação que não conseguem desenvolver suas funções normais e nestes casos as células leucêmicas crescem rapidamente agravando ainda mais a doença^{1,13}.

As leucemias crônicas atingem uma população diferente de acordo com a linhagem, nas de linhagem mieloide ocorre principalmente em adultos e na linfóide a maioria dos pacientes tem mais de 55 anos e em raros casos afetam crianças ¹⁷.

Os casos de leucemias agudas agem de forma mais agressiva em sua maioria e tanto nas de linhagem mieloide quanto linfóide podem ocorrer o acometimento de adultos e crianças, porém nos de linhagem linfóide a predominância é em crianças de 3 a 5 anos ¹.

Existem diversos outros subgrupos de leucemias mieloide aguda como: as leucemia mieloblástica sem maturação, mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia e megacarioblástica. Já as leucemias linfóide aguda se subdividem em LLA L1, LLA L2 e LLA L3, essa classificação se dá devido a morfologia das células ¹⁵.

O principal exame utilizado para a diferenciação dos tipos de leucemias é a imunofenotipagem que pode utilizar o citometro de fluxo ou a imunohistoquímica para diferenciar os marcadores de superfície dos blastos e assim diferenciar a linhagem, o grau de maturação e a identificação de marcadores com valor prognóstico ¹⁵.

IMUNOFENOTIPAGEM

A imunofenotipagem é a análise da expressão antigênica da células através da ligação do antígeno com anticorpo e fluorocromo. Os anticorpos monoclonais se ligam as células nos epítomos em sua membrana, citoplasma e intranuclearmente ¹⁴.

O exame utiliza um aparelho de citometria de fluxo ou a imunocitoquímica para a leitura da reação dos anticorpos monoclonais associados ao fluorocromo que quando ligados através da ligação antígeno-anticorpo aos marcadores de superfície liberam fluorescência. Existe um painel de marcadores específicos que definem cada linhagem e a partir de sua identificação consegue-se definir o melhor tratamento, a medicação mais específica e também é utilizado para avaliar o grau de maturação das células neoplásicas e possíveis recidivas ^{1,15}.

Os marcadores mais utilizados para a linhagem mieloide são: CD13, CD33, CD65, MPO, CD11c, CD14, CD15, CD36, CD235a, CD41,CD61,CD42, CD34,

H-antígeno, CD117, HLA-DR e TdT ²⁰.

Tabela 1.²⁰

Classificação da imunofenotipagem da LMA					
Marcadores	LMA-M0/M1/M2	LMA-M3	LMA-M4/M5a/M5b	LMA-M6	LMA-M7
CD13/CD33	++	++	++	+	++
CD65	±/+/>++	+	++	±	±
MPO	-/+/>++	++	++	+	-
CD11c	- ou ±	-	++	-	-
CD14	-	-	+/>+/>++	-	-
CD15	±/±/>++	±	-	-	-
CD36	-	-	+	++	+
H-antígeno	-	-	-	++	+
CD235a (Glicoforina A)	-	-	-	+	-
CD41/CD61	-	-	-	-	++
CD42	-	-	-	-	+
CD34	++/>++/>+	±	±/>+/>±	+	++
CD117	++	+	+	+	+
HLA-DR	++/>++/>+	-	++	+	++
TdT	+	±	+	+	±

-: < 10% das leucemias são positivas; ±: 10%-25% das leucemias são positivas; +: 25%-75% das leucemias são positivas; ++: > 75% das leucemias são positivas. Adaptado de Szczepanski et al., 2003.

Para a leucemia de linhagem linfóide são utilizados os seguintes marcadores: HLA-DR, TdT, CD19, CD22(c), CD10, CD20, cμ, Smlg, CD7, CD2, CD3(c), CD1a, CD3, CD4 E CD8 ¹⁹.

Tabela 2.¹⁹

Perfil imunofenotípico das leucemias linfóides							
Marcador	Linhagem B				Linhagem T		
	Pró-B	Comum	Pré-B	B	Pré-T	Intermediário	T
HLA-DR	+	+	+	+	+/-	-	-
TdT	+	+	+	+/-	+	+	+
CD19	+	+	+	+	-	-	-
CD22(c)	-/+	+	+	+	-	-	-
CD10	-	+	+	-/+	-/+	-/+	+/-
CD20	-	-/+	+	+	-	-	-
cμ	-	-	+	-	-	-	-
Smlg	-	-	-	+	-	-	-
CD7	-	-	-	-	+	+	+
CD2	-	-	-	-	-	+	+
CD3(c)	-	-	-	-	+/-	+	+
CD1a	-	-	-	-	-	+/-	-
CD3	-	-	-	-	-	-	+
CD4/CD8	-	-	-	-	-	+/-	+

TdT = Terminal desoxinucleotidil transferase; CD22(c) = CD22 intracitoplasmático; cμ = cadeia μ citoplasmática; Smlg = imunoglobulina de superfície; +: expressão do antígeno; +/-: expressão variável, frequentemente positiva; -: ausência de expressão do antígeno; -/+ : expressão variável, frequentemente negativa. Adaptação de Souza et al.

A técnica da imunofenotipagem por citometria oferece grande sensibilidade, objetividade, rapidez e precisão na análise da característica celular e conteúdo do DNA/RNA, com isso analisa-se a quantidade de antígeno celular, a resistência celular a drogas e a análise do citoplasmática^{14,18}.

O citometro de fluxo avalia dois principais parâmetros, o de luz dispersa que avalia o tamanho e complexibilidade interna da célula e o outro avalia a presença de um ou mais anticorpos associados a marcadores fluorocromos específicos caracterizando assim o grau de diferenciação, linhagem, entre outras¹⁴.

Outros exames podem ser associadas a imunofenotipagem, como, mais comumente, o cariótipo, porém outros como citogenética convencional e molecular, *Southern blotting*, amplificação de DNA ou RNA por PCR, PCR em tempo real, hibridização *in situ* entre outras técnica podem ser realizadas com intuito de melhor entendimento da patologia e causas genéticas ligadas a determinadas linhagens leucêmicas^{3, 14}.

Tabela 3.¹⁴

Classificação e prognóstico de leucemias de acordo com as alterações genéticas.

Alteração cromossômica	Tipo de leucemia	Prognóstico
t(4;11) MLL/AF4	LLA-B	PIOR
t(12; 1) TEL/AML1	LLA-B	FAVORÁVEL
HIPERDIPLOIDIA	LLA-B	FAVORÁVEL
t(9;22) BCR/ABL	LLA-B	DESFAVORÁVEL
t(1;19) E2A/PBX1	LLA-B	DESFAVORÁVEL OU COMUM
TAL1 deletion SIL-TAL1	LLA-T	...
t(8;14)(q24;q11) c-MYC-TRCA/D	LLA-T	...
t(11;14)(p15;q11) LMO1-TCRD	LLA-T	...
t(11 ;14)(p13 ;q11) LMO2-TCRD	LLA-T	...
t(11;14)(p34;q11) TAL1-TCRD	LLA-T	...
t(10;14) (q24; q11) HOX11-TCRD	LLA-T	...
t(8;21)AML1/ETO	LMA (FAB M2)	FAVORÁVEL
t(15;17) PML/RARa	LMA (FAB M3)	FAVORÁVEL
Inv16CBFb/SMMHC	LMA (FAB M4)	FAVORÁVEL
11q23	LMA (FABM4/M5)	INTERMEDIÁRIO OU DESFAVORÁVEL
t(1;22) OTT/LAM	LMA (FAB M7)	DESFAVORÁVEL
TRISSOMIADO 12	LLC	...
t(11;14) (q13;q32)	LLC	...
t(9;22) BCR-ABL	LMC	FAVORÁVEL

LEUCEMIA BIFENOTÍPICA

Entre as leucemias agudas existe um tipo raro que consiste em uma neoplasia das células progenitoras sanguíneas que expressam antígenos de superfície de ambas as linhagem, portanto suas células expressam marcadores de linhagem linfóide e mielóide, essas são as leucemias aguda bifenotípicas (LAB), híbrida ou mista como também podem ser chamadas ⁵.

A LAB é responsável por 5% das leucemias agudas devido a não dupla expressão de linhagem afetada, tem um prognóstico péssimo e não há um protocolo de tratamento, pois não consegue-se definir o foco para ele. O tratamento é mais agressivo e na grande maioria é voltado para possibilitar um transplante de medula óssea após a primeira remissão ^{5,13, 18}.

O transplante de medula óssea é realizado após a identificação de um doador compatível e uma depressão profunda quase nula do sistema imunológico do paciente com o intuito de reduzir assim as chances de uma rejeição ^{1,13}.

A classificação das LAB's se dá pelo EGIL que utiliza o resultado da imunofenotipagem para gerar um *score* mostrando se há uma maior expressão de linhagem linfóide ou mielóide¹⁸.

Tabela 4. ¹⁸

Sistemas de classificação de leucemias agudas	
Grupo	Classificação
FAB* (1976)	Primeira classificação mundialmente aceita Critérios: morfológicos e citoquímicos Blastos na LA > 30% na medula óssea LMA (M1 a M6) Em 1985, essa classificação foi revisada e adotaram-se critérios imunofenotípicos, incluindo o subtipo LMA M7, através da confirmação de blastos plaquetários, e o subtipo M0, através de marcadores monoclonais
MIC**	Critérios: morfológicos, imunológicos e citogenéticos
EGIL*** (1995)	Critérios: imunológicos (expressão de antígenos na superfície celular a partir de painéis de anticorpos monoclonais) Definição de leucemias bifenotípicas agudas (BAL)
WHO**** (1997)	Foi proposta a classificação que separa e define os subtipos de leucemias agudas (mielóide, linfóide ou bifenotípica) Blastos na LA > 20% na medula óssea LMA passa a ser valorizada através de seus dados de recorrência citogenética e da história clínica e/ou aspectos displásicos na medula óssea

*French-American-British.

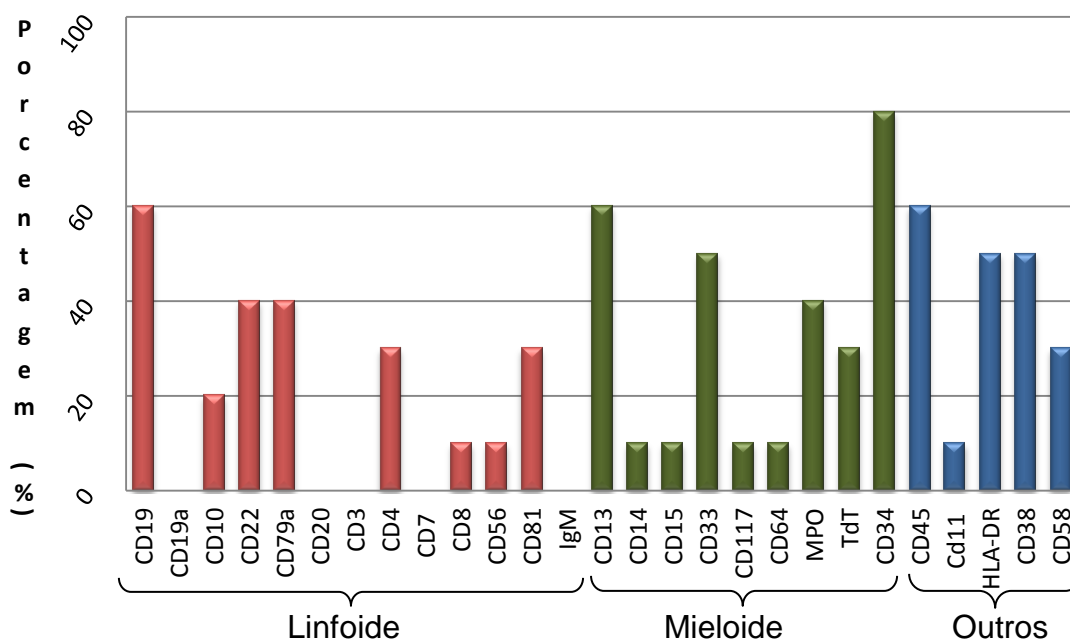
**Morphological-Immunological-Cytogenetic.

***European Group for the Immunological Characterization of Leukemias.

****World Health Organization.

Em um estudo recente realizado no interior de São Paulo utilizando como fonte um hospital especializado no diagnóstico e tratamento de neoplasias em crianças de 0-19 anos constatou-se que a LAB realmente é rara, pois atinge cerca de 4% dos seus paciente e com uma revisão desses casos utilizando como fonte principal o exame de imunofenotipagem, não foi possível encontrar um padrão entre os casos no comparativo dos marcadores, presença de alterações genéticas e na resposta que cada indivíduo teve frente ao tratamento. Os marcadores que apresentaram uma maior positividade como representados foram: CD34 com 80%, CD19, CD13 e CD45 com 60%. Houve positividade parecida em relação à quantidade de marcadores linfoide e mieloide, pois se identificou positividade de 8 marcadores linfoide e 9 marcadores mieloide, porém não podemos considerar uma comparação fidedigna porque foram avaliados 13 marcadores linfoides e apenas 9 marcadores mieloides⁵.

Gráfico 1. Marcadores com positividade nas imunofenotipagens avaliadas⁵.



CONCLUSÃO

A leucemia é uma das neoplasias com maior incidência e com grande chances de recuperação devido ao avanço no tratamento e diagnóstico ¹⁶.

A imunofenotipagem tem um papel importante no diagnóstico para a detecção e identificação das leucemias e seus subtipos, devido a utilização de anticorpos monoclonais que aumentam sua especificidade que é de extrema necessidade no momento de diagnóstico e para a definição do protocolo de tratamento a se seguir ¹¹.

Os exames que tem como base a identificação de alterações genéticas também são considerados exames de grande importância pois foi identificado uma incidência significativa de positividade dessas alterações associadas as alguns subtipos leucemias ¹⁸.

A LAB é considerada “rara”, pois apesar da grande ocorrência de leucemias, poucos são os casos deste subtipo de leucemia. Os estudos a ela destinados ainda são escassos, o que dificulta o direcionamento para o protocolo de tratamento e também o entendimento do desenrolar desta patologia ¹⁶.

De acordo com o estudo realizado por Aribi, 2007 não foi encontrada nenhuma alteração cromossômica que explicasse ou que estivesse associada à ocorrência e evolução da LAB ⁴.

O exame de imunofenotipagem é eficaz e pode ser considerada a melhor forma de se diagnosticar a LAB devido à apresentar com exatidão os tipos de marcadores e assim direcionar o médico em qual protocolo seguir ¹¹.

Os marcadores encontrado na LAB não apresentam um padrão, portanto podem ter sua maior quantidade voltada para a linhagem linfóide ou mieloide, e neste ponto o score apresentado pelo EGIL é muito importante para definir o tratamento que será realizado ^{6,12}.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A.C.Camargo Câncer Center. Leucemias Infantis [Acesso em setembro, 2017]. Disponível em <http://www.accamargo.org.br/tudo-sobre-o-cancer/leucemias-infantis/23/>.
2. Almeida TJB. Avanços e perspectivas para o diagnóstico da leucemia linfóide aguda. Candombá, 2009. 5.
3. Alves, EB. Aspectos morfológicos, cito químicos e imunológicos da leucemia mieloide aguda no estado do Amazonas. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2005.
4. Aribi A, Ramos CB, Estey E, Estro VZ, O'Brien S, Giles F. et al. Biphenotypic acute leukaemia: a case series. *British Journal of Haematology*, 2007, v. 138.
5. Bigardi BC. Leucemia Bifenotípica: Estudo de casos com comparativo entre as imunofenotipagens durante a evolução. Jundiaí- Universidade Paulista Instituto de Ciências e Saúde, São Paulo, 2013.
6. Emerenciano M, Bossa Y, Zanrosso CW, Alencar DM, Campos MM, Dobbin J, Carriço K, Oliveira MSP. Frequência de Imunofenótipos aberrantes em Leucemias Agudas. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2004, p. 183-189. 50.
7. Farias MG, Castro SM. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2004, vol. 40, n.2, pp.91-98.
8. Instituto Nacional do Câncer. Incidência de câncer no Brasil, estimativa 2010. [Acesso em agosto, 2017]. Disponível em <http://www.inca.gov.br>.
9. Lafayette TCS, Oliveira LTO, Landell M, Valente P, Alves SH, Pereira WV. *Dipodascus capitatus* (*Geotrichum capitalum*): infecção sistêmica fatal em

pacientes com leucemia mielocítica aguda. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2011, p.648-650. 44.

10. Lorand-metze I. LLC: Critérios Diagnósticos, imunofenotipagem e diagnóstico diferencial. Rev. Bras. Hematol. Hemoter, 2005, v 27.

11. Martins SLR, Falcao, R. P. A importância da imunofenotipagem na Leucemia Mieloide Aguda. Rev. Assoc. Med. Chem. Bras, 2000, v 46.

12. Mesquita DR. Diagnóstico Citogenético e Molecular das Alterações Genéticas Recorrentes em Leucemias da Infância no Distrito Federal. Dissertação (Especialização em Ciências Médicas). Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2009.

13 Noronha EP. Estudo imunofenotípico das leucemias agudas no centro oncológico de referência do estado do Maranhão. Dissertação (Mestrado em saúde materno-infantil). Maranhão: Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, 2010.

14. Quixabeira VBL, Saddi VA. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. RBAC, vol. 40(3): 199-202, 2008.

15. Rego EM, Santos GAS. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2009.

16. Reis RS, Santos MO, Thuler LCS. Incidência de tumores pediátricos no Brasil. Revista Brasileira de Cancerologia, 2007, p.05-15.

17. Santos CCS, Ribeiro JT, Teixeira J. Leucemia- sociedade em riscos. Rolim de Moura- Faculdade e universidade São Paulo, 2014.

18. Silva GCS. et al. Diagnóstico laboratorial das leucemias mieloides agudas. *Bras. Patol. Med. Lab*, 2006, p. 77-84. 42.
19. SOUZA J M, COELHO CJ. Leucemias e Leucoses. In: XXV Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, 1998, Porto Alegre.
20. SZCZEPANSKI T, VELDEN VHJ, DONGEN JJM. Classification systems for acute and chronic leukemias. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2003, vol. 16, n. 4, pp. 561-82.
21. Troussard X, Maarouf N. Leucémies biphénotypiques (BAL): mythe, réalité, perspectives. *SPECTRA BIOLOGIE (COLLOQUE DU SNBH 2005)*, 2006, p. 34-38. 152.
22. Vandenberg AV, Silva DEM, Rodrigues MPC, Rossy MCNB, Pelaes, TS. A importância da imunofenotipagem no diagnóstico da leucemia aguda bifenotípica: Estudo de prontuários de dois casos, 2008..
23. Xu XQ, Wang JM, Lü SQ, Chen L, Yang JM, Zhang WP, et al. Clinical and biological characteristics of adult biphenotypic acute leukemia in comparison with that of acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a case series of a Chinese population. *Haematologica*, 2009, p. 919-927. 94.
24. Zheng C, Wu J, Liu X, Ding K, Cai X, Zhu W. What is the optimal treatment for biphenotypic acute leukemia? *Hematologica*, 2009, p. 1778-1780.

