

DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS LINFÓIDES AGUDAS: UMA REVISÃO.

Larissa Aparecida Moreira¹, Sílvia Caroline Batista¹, Joyce Beira Miranda da Silva².

1-Discentes do 7º semestre do curso de Biomedicina do Centro Universitário Amparense – UNIFIA.

2-Docente e coordenadora do curso de Biomedicina do Centro Universitário Amparense – UNIFIA.

RESUMO

As leucemias são consideradas neoplasias malignas, classificadas de acordo com a maturação celular, sendo aguda se ocorrer predomínio de células jovens e crônica se ocorrer predomínio de células maduras, assim como a linhagem afetada: linfóide se ocorrer na série linfocítica e mielóide, se ocorrer na série mielocítica. A leucemia linfóide aguda (LLA) tem maior incidência em crianças, com pico entre 2 a 5 anos, com leve predominância no sexo masculino e na raça branca. A sintomatologia referenciada se relacionará com o acometimento da medula óssea, uma vez que a infiltração, bem como a substituição tecidual da medula pelas células leucêmicas causam diminuição dos demais componentes sanguíneos, levando à uma desordem hematológica. O diagnóstico da LLA baseia-se nas suas características morfológicas, de acordo com a classificação de FAB (L1, L2, L3), na análise do hemograma completo, além da análise do mielograma. O hemograma é utilizado como o primeiro indicador da presença de LLA, pois nele poderá ser observada a presença de linfoblastos acima de 25%. A citogenética utilizada permitirá a identificação de compostos celulares através da coloração, sendo as mais utilizadas Sudan Black B (SBB), mieloperoxidase (MPO), a reação de ácido periódico de Schiff (PAS), a reação da fosfatase ácida e esterases inespecíficas. A positividade da LLA se dará na PAS, reação da fosfatase ácida e esterases inespecíficas, sendo negativa para SBB e MPO. A imunofenotipagem é responsável pela diferenciação das LLA quanto ao tipo linfocitário atingido (T ou B), ocorrendo através da identificação de antígenos de membrana intracelular específicos, sendo os resultados expressos através da citometria de fluxo. Outros exames associam-se ao diagnóstico, principalmente testes moleculares que visam a identificação do gene afetado, aumentando assim a efetividade do tratamento.

Palavras-chave: Leucemia, Câncer, Diagnóstico das leucemias, Linfocítica.

ABSTRACT

Leukemias are considered malignant neoplasms, classified according to cell maturation, being acute if there is predominance of young and chronic cells if there is a predominance of mature cells, as well as the affected lineage: lymphoid if it occurs in the lymphocytic and myeloid series, if it occurs in the myelocytic series. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) has a higher incidence in children, with a peak between 2 and 5 years, with a slight predominance in males and white. The referred symptomatology will be related to bone marrow involvement, since the infiltration as well as the tissue replacement of the marrow by the leukemic cells causes decrease of the other blood components, leading to a haematological disorder. The diagnosis of ALL is based on its morphological characteristics, according to the classification of FAB (L1, L2, L3), in the analysis of the complete blood count, in addition to myelogram analysis. The hemogram is used as the first indicator of the presence of ALL, as it can be observed the presence of lymphoblasts above 25%. The cytogenetics used will allow the identification of cellular compounds through staining, with the most commonly used is SBB, myeloperoxidase (MPO), Schiff periodic acid reaction (PAS), acid phosphatase and nonspecific

esterases. LLA positivity will occur in SBP, acid phosphatase and nonspecific esterases reaction, being negative for SBB and MPO. Immunophenotyping is responsible for the differentiation of ALL as to the lymphocyte type reached (T or B), occurring through the identification of specific intracellular membrane antigens, and the results are expressed through flow cytometry. Other tests are associated with the diagnosis, mainly molecular tests aimed at the identification of the affected gene, thus increasing the effectiveness of the treatment.

Key words: Leukemia, Cancer, Diagnosis of leukemias, Lymphocytic.

INTRODUÇÃO

O microambiente da medula óssea apresenta além do estroma, células sanguíneas, fibroblastos, reticulócitos, células endoteliais, monócitos, adipócitos, osteoblastos e osteoclastos. As células componentes do microambiente auxiliam na proliferação, maturação e tráfego das células hematopoiéticas. Para que ocorram formação e progressão tumoral, se faz necessária alteração no estroma. Nos casos de leucemias, é essencial a ocorrência de angiogênese a partir de estímulos gerados pelas células leucêmicas ao estroma. As quimiocinas também apresentam importância nos processos de invasão e sobrevivência dos tumores hematológicos, pois são responsáveis por ativação, diferenciação e sobrevivência celular (VASCONCELLOS, 2010).

As leucemias são caracterizadas como neoplasias malignas de origem mesenquimal, classificadas de acordo como a maturação celular, sendo designada aguda se houver o predomínio de células blásticas, ou crônica se ocorrer o predomínio de células maduras, além de classificadas conforme a linhagem afetada, denominada linfocítica quando as alterações ocorrem nos linfócitos sendo eles T ou B ou mielocítica, alterando a série mielóide. (SILVA, 2013)

No Brasil entre os anos de 2012 e 2013 foram registrados 4.570 novos casos leucêmicos em homens e 3.940 novos casos em mulheres. Em 2016, a estimativa de novos casos leucêmicos era de 10.070, sendo 5.540 homens e 4.530 mulheres. As leucemias agudas apresentam evolução rápida e fatal em casos de ausência de tratamento (SILVA, 2013; INCA, 2016).

As Leucemias Linfocíticas Agudas (LLA) apresentam o maior acometimento na infância (cerca de 70% dos casos), enquanto em adultos indicam cerca de 20% dos mesmos. Nessa doença, ocorrem alterações nas células linfoblásticas presentes na medula óssea (MO), que apresentam alta capacidade de proliferação celular, porém não de diferenciação, predominando no sangue periférico células imaturas em diferentes estágios de maturação. Essa doença apresenta seu pico de incidência entre 2 e 5 anos de idade, com leve predominância em crianças do sexo masculino, de raça branca. Sua incidência também se apresenta alta em adultos acima de 60 anos de idade, cerca de 20% dos casos (FARIAS & DE CASTRO, 2004).

Cada paciente apresenta sintomatologia diferenciada e inespecífica, podendo ser confundido com diversas doenças, como artrite reumatoide juvenil, febre reumática, lúpus eritematoso sistêmico, púrpura trombocitopênica idiopática, aplasia medular, mononucleose, entre outros, e isso pode dificultar o diagnóstico. Em muitos casos, o tratamento se inicia de forma tardia, estimando-se que em 95% dos casos diagnosticados com LLA, sem tratamento, a sobrevivência do paciente esteja em aproximadamente 1 ano (BARBOSA, 2002; SILVEIRA e ARRAES, 2008). Os sintomas ocorrem de acordo com o comprometimento da atividade medular, podendo ocasionar febre, dor óssea difusa ou localizada em cerca de 40% dos pacientes, o que nas crianças pode ser confundido com outras alterações fisiológicas; perda de peso, palidez, sangramentos mucocutâneos, artralgia, além de aumento de linfonodos. Outro

sinal importante é a esplenomegalia e hepatomegalia presente na maioria dos pacientes (BARBOSA, 2002).

Não existe ainda comprovação de como exatamente a doença se instala, sabe-se que além de fatores genéticos, são necessários fatores ambientais, entre eles radiação ionizante, agentes quimioterápicos, pesticidas ou infecções adquiridas. Durante a infância na faixa etária de 1 a 5 anos, a sobrevivência em longo prazo ocorre em 80% dos casos, já em adolescentes é de 50 a 60%, enquanto em adultos é de 30% dos casos. O que diferencia esse fator é o tipo de célula progenitora acometido. Na infância, por exemplo, a capacidade de renovação das células linfoides é limitada, diferentemente do adulto, que apresenta acometimento das células hematopoiéticas, caracterizadas por apresentarem elevado grau de renovação, além de serem resistentes a tratamentos de quimioterapia (SILVA, 2013).

MATERIAL E MÉTODO

Revisão bibliográfica feita a partir de artigos nacionais e internacionais científicos, encontrados nos sites das bibliotecas virtuais em saúde, como LILACS, PubMed, Scielo e Google acadêmico.

OBJETIVOS

Elucidar os métodos de diagnóstico laboratorial das leucemias linfoides agudas, bem como informações sobre a patologia.

DESENVOLVIMENTO

Classificação da LLA

A partir da classificação realizada pela French American British (FAB), a LLA é dividida em 3 grupos: L1, L2 e L3, sendo essa divisão de acordo com o diâmetro, formato do núcleo, número de nucléolos, e relação núcleo-citoplasma dos linfoblastos (FARIAS & DE CASTRO, 2004).

No subtipo L1, ocorre a presença de linfoblastos pequenos e homogêneos, com pouco citoplasma. No L2, os linfoblastos apresentam-se um pouco maiores e heterogênicos, com uma quantidade maior de citoplasma se comparado ao L1. Já no L3, os linfoblastos encontram-se grandes e com presença de vacúolos. Essa relação de classificações pode ser comparada na tabela 1 (FADEL, 2010).

Tabela 1 Classificação morfológica (FAB) da leucemia linfóide aguda

Aspecto morfológico	L1	L2	L3
Diâmetro celular	Predominância de células pequenas, homogêneas	Grandes, heterogêneas	Grandes, homogêneas
Cromatina nuclear	Fina ou aglomerada	Fina	Fina
Forma do núcleo	Regular, pode apresentar fenda ou indentação	Irregular, podendo apresentar fenda ou indentação	Regular, redondo ou oval
Nucléolos	Indistintos ou não-visíveis	Um ou mais por célula, grandes, proeminentes	Um ou mais por célula, grandes, proeminentes
Quantidade de citoplasma	Escassa	Moderadamente abundante	Moderadamente abundante
Basofilia citoplasmática	Ligeira	Ligeira	Evidente
Vacúolos citoplasmáticos	Variáveis	Variáveis	Evidente

Fonte: FARIAS & DE CASTRO

O acometimento de LLA em crianças é geralmente associado ao subtipo L1 da linhagem B, enquanto em adultos o subtipo mais frequente é o L2. Os linfócitos B são responsáveis por aproximadamente 85% dos casos de LLA, sendo que os linfócitos T correspondem a 15%. O subtipo L3 possui grande incidência de acometimento do sistema nervoso central, por isso associa-se a um mau prognóstico, devido a uma resposta deficiente no tratamento (PEZZINI e CASTRO, 2014; SILVEIRA e ARRAES, 2008).

Existem protocolos que separam os pacientes com LLA em dois grupos distintos relacionados a chances de recidivas, sendo eles o grupo de maior risco e o de menor risco para recidiva. De acordo com tal divisão, o tratamento passa a ser designado (LARKS ET AL., 2003).

O prognóstico inicial depende de diversos fatores, entre eles a disfunção nas células B com contagem inicial de leucócitos menor que 50.000 células/mm³ e idade entre 1 e 9 anos apresentando bom prognóstico, sendo que contagem maior, em diferentes idades gera maior risco para recidiva (SILVA, 2007).

Diagnóstico

O diagnóstico das leucemias em geral baseia-se em estudos microscópicos dos componentes sanguíneos, com ênfase na linhagem leucocitária através de amostras de sangue, aspirados e biópsias de medula óssea, sendo que em suspeitas de acometimento do sistema nervoso central, realiza-se análise de líquido cefalorraquidiano (LCR – líquido). Nesses estudos serão avaliadas a morfologia, quantidade celular, reações citoquímicas e presença ou ausência de marcadores imunofenotípicos. A morfologia celular apresenta por princípio diferenciar os blastos entre série linfóide e mielóide, principalmente em casos onde há predomínio de poucas células diferenciadas ou inexistência das mesmas (ALMEIDA, 2009).

Hemograma

O exame que primeiramente fornece a suspeita da doença é o hemograma, associado à sintomatologia, onde há predomínio de anemia normocítica e normocrômica, podendo estar presente a trombocitopenia. A contagem leucocitária apresenta-se extremamente elevada em alguns casos, porém pode também se apresentar em quantidade normal ou diminuída. Em casos de altos índices leucocitários, observa-se o aumento no número de linfoblastos, enquanto nos leucopênicos, estes se tornam quase inexistentes. A anemia, sangramento e infecções geradas nos pacientes estão associadas a invasão das células leucêmicas na medula óssea, substituindo conseqüentemente células adiposas e medulares. Ocorre também diminuição no número de reticulócitos em 75% dos casos. Pela inespecificidade do hemograma e do mielograma, pode ocorrer atrasos de diagnósticos em alguns casos, sendo entre 2 semanas a 13 meses. Em suspeitas de leucemias, podem ser indicados hemogramas seriados (BARBOSA, 2002; FARIAS & DE CASTRO, 2004).

Mielograma

Para classificar a leucemia como linfóide aguda, se faz necessário que o mielograma apresente quantidade de linfoblastos acima de 25%. Esse fato ocorre devido à substituição das células adiposas por células leucêmicas, notando uma hiper celularidade na medula óssea, sendo que em alguns casos pode ainda ocorrer fibrose medular. O aspirado da medula óssea (mielograma) pode ser submetido às reações de citoquímica, favorecendo a diferenciação dessas células (FADEL, 2010).

Citoquímica

As provas de citoquímica favorecem a diferenciação entre as células de linhagem mielóide ou linfóide. As células linfóides são caracterizadas pela presença de vacúolos após a coloração, além de apresentar uma atividade nuclear não característica (DANTAS et al., 2015).

Entre as colorações, as mais utilizadas são a Sudam Black B (SBB), Mieloperoxidase (MPO), a reação de Ácido Periódico de Schiff (PAS), a Reação da Fosfatase ácida e Esterases inespecíficas. As duas primeiras colorações relacionam-se com a série granulocítica, sendo de extrema importância no diagnóstico de células da linhagem mielóide. Já a PAS é representante da linhagem linfóide (PEZZINI e CASTRO, 2014).

A SBB é responsável pela coloração dos fosfolípidos intracelulares, sendo específica para a série mielóide acompanhando a MPO, que está presente nos grânulos, sendo fortemente positiva conforme o grau de maturação celular granulocítica. Essas colorações são úteis principalmente na diferenciação das linhagens mielocíticas e linfocíticas, uma vez que a linhagem linfocítica é negativa para ambas as colorações (DANTAS et al., 2015).

O PAS é responsável por corar o glicogênio intracelular, sendo fortemente positivo para linfoblastos nas LLA. Quando apresenta resultado negativo, correlaciona-se com LLA do tipo T, assim como a positividade na Fosfatase ácida após a Esterase inespecífica, podendo apresentar 75% de positividade na fosfatase ácida. Os mieloblastos geralmente são negativos para PAS e quando apresenta positividade, seu grau de coloração é inferior à coloração apresentada pelos linfoblastos (ALMEIDA, 2009; PEZZINI e CASTRO, 2014; FADEL, 2010).

Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Os linfoblastos leucêmicos não apresentam características morfológicas ou citoquímicas específicas, por se encontrarem em diferentes estágios de maturação, sendo o diagnóstico por citoquímica, portanto, inconclusivo se isolado. O ideal para definição diagnóstica é que se realize a imunofenotipagem, que apresenta por finalidade evidenciar a expressão de antígenos de diferenciação celular, favorecendo assim o esclarecimento referente ao grau de maturação das células. Basicamente, diferencia os linfócitos entre T e B. A detecção ocorre a partir de anticorpos monoclonais, detectando assim além da linhagem envolvida, a fase que a doença se encontra instalada (JUNIOR, 1997; SILVA 2007).

A citometria de fluxo por sua vez tem a característica de, através de um feixe de laser, direcionar as células que estão preparadas em certa suspensão a se posicionarem em apenas um fluxo unidirecional, no qual passam uma a uma de modo que o feixe de laser atinja todas as células. Este tipo de técnica permite a visualização multifatorial, além da quantificação celular quanto à morfologia e peso molecular (ALMEIDA, 2009). Portanto, esta técnica tem como principal função a diferenciação entre células T e B, independente de seu grau de maturação, ressaltando que a LLA na infância apresenta em 80% a 85% dos casos predomínio de células B, enquanto em 15% dos casos pediátricos, esse predomínio ocorre pelas células T (SILVA, 2007).

A associação das técnicas permite a criação de uma técnica mais sensível e específica com a finalidade de melhorar a conduta terapêutica através de um diagnóstico mais confiável (DANTAS et al., 2015).

Os principais antígenos expressos pelos linfócitos T são o CD2, CD3 e CD33, enquanto nos linfócitos B os mais comuns são CD10, CD19, CD22, CD79, possibilitando assim a diferenciação entre os dois, uma vez que as expressões destes antígenos são específicas para as linhagens (REGO e SANTOS, 2009).

Citogenética

Na LLA, estima-se que apenas 5% dos casos estejam relacionadas à predisposição genética, entretanto o conhecimento do fator genético é extremamente relevante, levantando informações sobre a malignidade, bem como o prognóstico do paciente acometido (ALMEIDA, 2009; FADEL, 2010).

A leucogênese, ou seja, a formação de células leucêmicas está associada a alterações na funcionalidade dos genes responsáveis pelo controle do ciclo celular, que devido a alterações em seu gene não exercem corretamente a função, abrindo espaço para a ativação de oncogenes, responsáveis então pela formação desordenada de células leucêmicas (DANTAS et al., 2015).

Sabe-se que portadores da translocação t(9,22) responsável pela formação do cromossomo Filadélfia, possuem um mau prognóstico, enquanto a translocação t(12;21) nas LLA-B em crianças, são responsáveis por um excelente prognóstico da doença, favorecendo assim a escolha de fármacos menos agressivos e tóxicos ao tratamento para este indivíduo (FARIAS e CASTRO, 2004).

Pacientes acometidos por LLA, que apresentam alterações genéticas, podem possuir inversões, deleções ou translocações em seu cariótipo, como alterações numéricas ou estruturais no cromossomo. A presença de polimorfismos genéticos também interfere por exemplo no tratamento dos pacientes, pois

se presentes em genes que codifiquem enzimas metabolizadoras, transportadoras, receptoras ou alvos farmacológicos, induz a uma interferência e diminuição no efeito do fármaco quimioterápico. Portanto, o conhecimento das alterações genéticas também se torna importante. Para isso, utiliza-se a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), que utiliza material biológico para isolar e purificar o DNA. Este primeiramente é quantificado em espectrofotômetro, que realiza também a absorvância do ácido nucleico, ou seja, verifica a pureza do material a partir da relação DNA/proteína. Posteriormente se inicia a PCR, que pode utilizar diversas técnicas distintas, como por exemplo, o Multiplex, que permite a detecção simultânea de dois ou mais polimorfismos a partir da utilização de enzimas de restrição. Para esta e todas as outras técnicas, se faz necessária à utilização de grupos controles, a fim de prevenir diagnósticos errôneos. A visualização do resultado ocorre posteriormente a partir da corrida pela eletroforese do material genético em gel de agarose ou gel de acrilamida, identificando presença ou ausência de alterações genéticas a partir das quantidades de pares de bases evidenciadas (SILVA, 2007).

Tratamento

Ressalta-se que cada paciente deve ser direcionado a um tratamento específico para seu quadro clínico, visto que fatores como índices de DNA, anomalias citogenéticas, resposta inicial ao tratamento e estado nutricional interferem diretamente no prognóstico. Porém, antes da introdução de quimioterapia no tratamento, pacientes pediátricos com LLA apresentavam sobrevida de apenas 1 a 2 meses, o que difere dos casos atuais (LARKS et al., 2003).

Os grupos de alto risco para recidiva precisam de um tratamento mais intenso, sendo ele dividido em 4 etapas: indução da remissão, consolidação, manutenção e profilaxia do sistema nervoso central (SNC). A indução a remissão consiste na diminuição de blastos na medula óssea (M.O) para menos que 5%, a fim de restaurar a correta hematopoese do paciente. Nessa fase geralmente utilizam-se 3 drogas, sendo elas glicorticóide, vincristina, asparginase e/ou daunomicina, sendo esperada uma remissão de 96% a 99%. A segunda fase (consolidação) apresenta intuito de reduzir as células leucêmicas da M.O. que não podem ser detectadas pela microscopia eletrônica, com a utilização de vários agentes quimioterápicos, promovendo também uma remissão mais prolongada da doença. A fase de manutenção consiste na erradicação das células leucêmicas residuais, com uso diário de 6-Mercaptopurina relacionado a doses semanais de metotrexato, além da utilização de vincristina e esteroides. Por fim, a profilaxia do SNC é realizada com quimioterapia atrelada a radioterapia, com aplicações intratecais periódicas de metotrexato/citarabina e dexametasona. A radioterapia craniana é indicada apenas para quadros de alta chance de recidiva, sendo que os pacientes geralmente são os que apresentam o cromossomo Philadelphia ou infiltração do SNC (SILVA, 2007).

Uma alternativa para determinados casos é o transplante de medula óssea hematopoiética alogênica, com capacidade de causar remissão maior que a quimioterapia, mas em alguns casos torna-se ineficaz no controle da doença. Entretanto, o transplante pode ocasionar sérios problemas, como a doença do enxerto contra o hospedeiro crônico, além de apresentar alto grau de mortalidade (LAMEGO et al., 2009).

CONCLUSÃO

Conclui-se que a Leucemia Linfóide Aguda apresenta evolução rápida e sintomatologia inespecífica, o que dificulta o diagnóstico. Além disso, o mesmo precisa ser realizado a partir da associação de vários exames, sendo eles o hemograma (inicialmente), gerando a suspeita da doença e

guiando, portanto, a outros exames como mielograma, citoquímica, imunofenotipagem e citogenética. A patologia não apresenta causa definida, porém pode estar relacionada com fatores genéticos, bem como fatores ambientais. Contudo, evidencia-se que as formas diagnósticas se apresentam de suma importância para diferenciação da doença referente a linhagem afetada (mielóide ou linfóide), bem como em aguda ou crônica, a fim de destacar o prognóstico do paciente, bem como selecionar melhores formas de tratamento, com maiores chances de possibilitar a remissão da doença, evitando também chances de recidivas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, T.J.B. Avanços e perspectivas para o diagnóstico da leucemia linfóide aguda. **Candombá – Revista virtual**, v.5, n.1, p.40-55, 2009.

BARBOSA, C.M.P.L. Manifestações músculo-esqueléticas como apresentação inicial das leucemias agudas na infância. **Sociedade Brasileira de Pediatria, Jornal de Pediatria**, v. 78, n.6, p. 481 a 484, 2002.

DANTAS, G.K.S. et al. Diagnóstico diferencial da leucemia linfóide aguda em pacientes infanto-juvenis. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v.13, n.2, p. 3-18, 2015.

FADEL, A.P. Investigação laboratorial de LLA. **AC&T CIENTÍFICA**, v. 1, n. 2, 2010.

FARIAS, M. G., De Castro, S. M. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.40, n.2, p.91-8, abril 2004. [ISSN 1678-4774]. [DOI: 10.1590/S1676-24442004000200008].

Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Leucemia**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia>. Acesso em 03 de novembro de 2017.

Junior, G. B. C. et al. Importância da aplicação de Anticorpos Monoclonais no Diagnóstico Laboratorial das Leucemias. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 29, 1997.

LAKS, D. Et al. Avaliação da sobrevida de crianças com leucemia linfocítica aguda tratadas com o protocolo Berlim-Frankfurt-Munique. **Jornal de Pediatria, Sociedade Brasileira de Pediatria**, v. 70, n. 2, 2003.

LAMEGO, R. M. et al . Transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas em leucemias agudas: a experiência de dez anos do Hospital das Clínicas da UFMG. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo , v. 32, n. 2, p. 108-115, 2010

PEZZINI, T.J. CASTRO, F.S. Alterações hematológicas na leucemia linfóide aguda (LLA). **Rev. Estudos, Goiânia**, v.41, n.4,p. 767-776, 2014.

REGO, E.M. SANTOS, G.A.S. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. **Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia**, v.31, n.5, p. 367-374, 2009. [ISSN: 1516-8484] [DOI: 10.1590/S1516-84842009005000081.]

SILVA, E. W. Mecanismos de citotoxicidade de chalconas isoladas e encapsuladas em nanopartículas lipídicas sobre uma linhagem celular de leucemia linfoblástica aguda e identificação de novos inibidores da proteína de resistência abcg2. [Tese de doutorado] - **Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia**, Florianópolis, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/123135>. Acesso em 02 de novembro de 2017.

SILVA, M. R. Polimorfismo do gene da tiopurina metiltransferase (TPMT) em uma população de crianças e adolescentes com leucemia linfocítica aguda. [Dissertação de mestrado] **Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de medicina**, Belo Horizonte, 2007. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/ECJS-743MKR>. Acesso em 02 de novembro de 2017.

SILVEIRA, N.A. ARRAES, S.M.A.A. A imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: uma revisão. **Arq Mudi**. v.12, n.1, p.5-14, 2008.

VASCONCELLOS, J. F. Identificação e estudo de genes diferencialmente expressos pelo estroma da medula óssea leucêmica. [Tese de doutorado], **Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas**, Campinas, SP, 2010. Disponível em: <http://libdigi.unicamp.br/document/?code=000477850>. Acesso em 02 de novembro de 2017.

.

.