

Universidade da Beira Interior
Faculdade de Ciências da Saúde
Mestrado Integrado em Medicina



UBI
Covilhã
Portugal

Valor do estudo das Linfocitoses por Citometria de Fluxo

Diana Virgínia Souto Brito

Covilhã, Junho de 2010

Dissertação de Mestrado

Universidade da Beira Interior
Faculdade de Ciências da Saúde
Mestrado Integrado em Medicina



UBI
Covilhã
Portugal

Valor do estudo das Linfocitoses por Citometria de Fluxo

Diana Virgínia Souto Brito

Orientadora: Prof. Doutora Ana Macedo

Covilhã, Junho de 2010

Dissertação de Mestrado

RESUMO

VALOR DO ESTUDO DAS LINFOCITOSES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Diana Virgínia Souto Brito

Introdução: A linfocitose pode ocorrer no contexto de doença linfoproliferativa crónica. Neoplasias linfóides de células maduras como a leucemia linfática crónica (LLC), a tricoleucemia, o linfoma de células do manto, linfomas de zona marginal incluindo o linfoma esplénico de zona marginal, o linfoma folicular, a leucemia prolinfocítica e outras doenças de células T e NK podem apresentar-se inicialmente com linfocitose.

A citometria de fluxo (CMF) é uma técnica utilizada rotineiramente em meio laboratorial na imunofenotipagem linfocitária. Se aplicada em amostras de sangue periférico para estudo de linfocitose pode diagnosticar patologia linfoproliferativa sem outra expressão clínica.

Este trabalho pretende precisamente demonstrar a utilidade da CMF no estudo de linfocitoses em hemogramas de rotina para a detecção de síndromes linfoproliferativas sem outra expressão clínica e o valor da implementação deste estudo.

Métodos: Realizou-se um estudo de tipo retrospectivo documental, no qual foram incluídos todos os doentes com linfocitose em amostras de sangue periférico, entre 2007 e 2009, que foram estudados por CMF no laboratório de Patologia Clínica do CHCB. Reuniram-se os vários parâmetros recolhidos numa base de dados utilizando o software Microsoft Office Excel 2007, através do qual se efectuou também o tratamento estatístico com vista a uma análise descritiva.

Resultado/Discussão: Os resultados deste estudo demonstram que, no total da amostra de 54 estudos de linfocitose de novo, foi detectada patologia linfoproliferativa em 44, perfazendo 82%. Destes, 76% correspondiam a casos em que se detectou monoclonalidade de células B, 6% a linfocitoses T e NK e apenas 18% dos casos foram normais. Dentro dos casos com monoclonalidade B o fenótipo mais frequente foi de LLC, com 66% dos casos.

Conclusões: Foi demonstrado que o estudo de linfocitoses através da CMF é importante no diagnóstico precoce de patologia linfoproliferativa crónica sem outra evidência clínica, com elevada detecção de monoclonalidade. A CMF é também uma ferramenta importante na caracterização imunofenotípica dos tumores linfóides. A implementação do estudo de rotina das linfocitoses por CMF é recomendável, uma vez que existe associação entre estas e SLPC.

Palavras-chave: Linfocitose, citometria de fluxo, síndromes linfoproliferativas, monoclonalidade, leucemia linfática crónica, linfomas não-Hodgkin.

ABSTRACT

VALUE OF THE STUDY OF LYMPHOCYTOSIS BY FLOW CYTOMETRY

Diana Virgínia Souto Brito

Introduction: Lymphocytosis can be a sign of chronic lymphoproliferative disease (CLPD). Lymphoid malignancies of mature cells such as chronic lymphocytic leukemia (CLL), hairy cell leukemia, mantle cell lymphoma, marginal zone lymphomas including splenic marginal zone lymphoma, follicular lymphoma, prolymphocytic leukemia and other T-cell and NK-cell disorders may initially present with lymphocytosis.

Flow cytometry (FC) is a technique used routinely in lymphocyte immunophenotyping. If applied in peripheral blood samples for the study of lymphocytosis, it can diagnose lymphoproliferative disease without other clinical expression. This paper seeks specifically to demonstrate the usefulness of FC in the study of lymphocytosis, in routine blood tests, for the detection of lymphoproliferative syndromes without another clinical expression, and the value of implementation of this study.

Methods: We conducted a retrospective analysis, which included all patients with lymphocytosis in peripheral blood samples between 2007 and 2009, which were studied by FC in the laboratory of clinical pathology of CHCB. Several parameters were

collected in a database using the Microsoft Office Excel 2007 software, through which was also made the processing of data to a descriptive statistical analysis.

Results/Discussion: The results of this study show that, in the total sample of 54 lymphocytosis studies, was detected lymphoproliferative disease in 44, accounting for 82%. Of these, 76% were cases in which we detected B-cell monoclonality, 6% had T and NK lymphocytosis and only 18% of cases were normal. Within the cases with B-cell monoclonality the CLL phenotype was the most frequent, with 66% of cases.

Conclusions: We demonstrated that the study of lymphocytosis with FC is important in early diagnosis of chronic lymphoproliferative disease with no other clinical evidence, with high detection of monoclonality. FC is also an important tool in the immunophenotypic characterization of lymphoid tumors. The implementation of the routine study of lymphocytosis by FC is recommendable, since there is association between it and CLPD.

Key-Words: lymphocytosis, flow cytometry, chronic lymphoproliferative disorders, chronic lymphocytic leukemia, non-Hodgkin lymphomas.

AGRADECIMENTOS:

Um agradecimento especial à Prof. Doutora Ana Macedo, minha orientadora neste trabalho, pela disponibilidade apesar dos seus inúmeros projectos, pela sua simpatia, preocupação e dedicação à faculdade e aos alunos.

À Dr.^a Andreia Monteiro pela disponibilidade e toda a ajuda durante a recolha de dados.

Ao Dr. Jorge Gama por se ter prontificado a ajudar-me com algumas dúvidas relativas à parte estatística.

Aos meus pais pelo apoio incondicional e paciência.

À minha irmã Isabel, que tanto me desencaminhava no meu trabalho, como se sentava a fazer-me companhia a trabalhar quando não havia solução.

Aos meus amigos, em especial a Vânia, a Mariana e o João pelo estímulo constante, companheirismo e suporte persistentes, mesmo quando as coisas correram menos bem.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS:

ATLL- Adult T cell leukemia/lymphoma

CD- Cluster of differentiation

CHCB- Centro Hospitalar Cova da Beira

CLL- Chronic lymphocytic leukemia

CMF- Citometria de fluxo

EU- União Europeia

FL- Follicular lymphoma

GB- Grã-Bretanha

HCL- Hairy cell leukemia (tricoleucemia)

HSC- Hematopoietic stem cell (célula estaminal hematopoiética)

Ig- Imunoglobulina

Igs- Imunoglobulina de superfície

LLC- Leucemia linfática crónica

LNH- Linfoma não-Hodgkin

MCL- Mantle cell lymphoma

NK- Natural killer

NK-LGLL- NK-cell large granular lymphocyte leukemia

PLL- Prolymphocytic leukemia

SLVL- Splenic lymphoma with villous lymphocytes

SS- Sézary syndrome

Tc- T citotóxicas

TCR- T-cell receptor (receptor da célula T)

Th- T helper

T-LGLL- T-cell large granular lymphocyte leukemia

T-PLL- T cell prolymphocytic leukemia

UK- United Kingdom

WHO- World Health Organization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

Ilustrações:

Ilustração 1: Hematopoiese (9)	6
Ilustração 2: Ontogenia das células B (12)	8
Ilustração 3: Ontogenia das células T (12).....	9
Ilustração 4: Citómetro de fluxo FACSCalibur	15
Ilustração 5: esquema do funcionamento de um citómetro de fluxo	16

Gráficos:

Gráfico 1: Número de novos casos e taxas de incidência específicas por idade, por sexo, LNH, UK 2006 (19)	13
Gráfico 2: Taxas de incidência LNH, por sexo, EU, 2002 (19)	13
Gráfico 3: Taxas de incidência LNH, por sexo, GB 1975-2006 (19)	14
Gráfico 4: Distribuição da amostra por sexo	27
Gráfico 5: Distribuição da amostra por faixa etária	28
Gráfico 6: Procedência dos pedidos de análise	29
Gráfico 7: Procedência dos pedidos de análise por especialidades.....	29
Gráfico 8: Classificação do fenótipo da amostra	30
Gráfico 9: Classificação imunofenotípica dos casos de monoclonalidade B.....	31
Gráfico 10: Expressão de cadeias leves nos casos de monoclonalidade B	32
Gráfico 11: Distribuição dos casos patológicos por sexo	33

Tabelas:

Tabela 1: Recomendações do Consenso Internacional de Bethesda quanto às indicações médicas de caracterização por CMF (3,7)	5
Tabela 2: Marcadores para o diagnóstico de síndromes linfoproliferativos B (14)	19
Tabela 3: Marcadores para o diagnóstico de síndromes linfoproliferativos T (14)	20

ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Linfopoiese.....	5
2.1.1 Linfócitos	6
2.1.2 Linfócitos B	7
2.1.3 Linfócitos T	8
2.1.4 Células NK.....	9
2.2 Linfocitose	10
2.3 Síndromes linfoproliferativas crônicas	11
2.4 Incidência de Síndromes Linfoproliferativas Crônicas	12
2.5 Citometria de fluxo	14
2.6 A citometria de fluxo no diagnóstico e classificação de neoplasias linfóides	17
3. OBJECTIVOS	23
4. MÉTODOS.....	23
4.1 Tipo de estudo	23
4.2 População alvo	23
4.3 Recolha de dados	23
4.4 Metodologia de análise	24

4.5 Tratamento de dados.....	25
5. RESULTADOS	27
4.1 Características da amostra.....	27
4.2 Resultados.....	30
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÕES	39
8. BIBLIOGRAFIA	42

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A linfocitose pode ocorrer como consequência de doença linfoproliferativa. Neoplasias linfóides de células maduras, como a Leucemia Linfática Crônica (LLC) e outros Linfomas não-Hodgkin (LNH), são patologias que se podem manifestar com linfocitose. Esta, decorrente da leucemização do tumor, pode ocorrer mesmo em fase subclínica da doença, ou seja, sem que haja outra expressão clínica de patologia. (1-4)

A Citometria de Fluxo (CMF) é actualmente uma ferramenta fundamental no diagnóstico hemopatológico, amplamente utilizada em contexto laboratorial. Permite a identificação de células maduras de imunofenótipo anormal sendo, portanto, um instrumento de diagnóstico aplicável, por exemplo, na suspeita de síndromes linfoproliferativas crónicas. Esta técnica tem aplicações importantes para o diagnóstico, como a detecção da presença de células de fenótipo anormal e do estadio de maturação das populações analisadas, além de avaliar a presença de marcadores associados com o prognóstico ou alvos terapêuticos. Portanto, permite identificar linfócitos patológicos, por exemplo, no contexto de uma linfocitose, com a detecção de monoclonalidade e posterior classificação da patologia através da imunofenotipagem. (1-3,5-6)

A CMF tem revelado cada vez mais importância já que a classificação de tumores do tecido hematopoiético e linfóide preconiza uma abordagem diagnóstica de acordo com parâmetros morfológicos, fenotípicos e genotípicos, apesar de não ser aconselhável do ponto de vista custo-benefício realizarem-se múltiplos testes em todas as amostras. Assim o Consenso Internacional de Bethesda em 2006 fez

recomendações quanto às indicações médicas de CMF, nas quais se inclui a linfocitose.

(1,3,7)

Tabela 1: Recomendações do Consenso Internacional de Bethesda quanto às indicações médicas de caracterização por CMF (3,7)

CMF indicada	CMF não indicada
Bicitopenia e pancitopenia	Neutrofilia
Linfocitose	Hipergamaglobulinemia policlonal
Monocitose	Policitemia,
Eosinofilia	Trombocitose
Blastos no sangue periférico, medula óssea ou líquidos corporais	Basofilia
Plasmocitose ou gamopatia monoclonal	

2. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

2.1 Linfopoiese

Todas as células sanguíneas derivam das células estaminais hematopoiéticas (HSC), que são células que têm a capacidade de auto-renovação, proliferação e renovação. (8-9) Nos seus estadios mais precoces diferenciam-se em duas vias originando células progenitoras linfóides e células progenitoras mielóides. Posteriormente as células progenitoras perdem a capacidade de auto-renovação e dão origem, cada uma delas, apenas a uma linhagem celular. As células da linhagem linfóide são os linfócitos B, T e células natural killer (NK). As células progenitoras

mielóides dão origem às restantes linhas de eritrócitos, granulócitos, monócitos e megacariócitos produtores de plaquetas. (8-9)

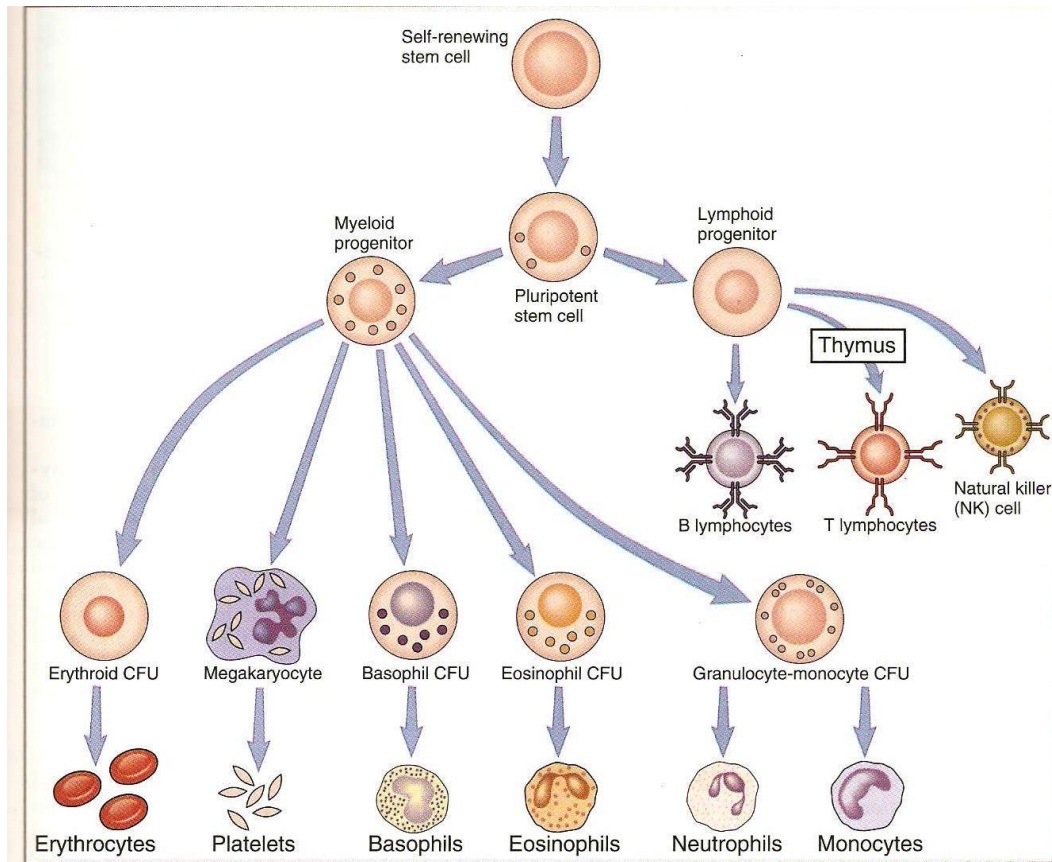


Ilustração 1: Hematopoiese (9)

2.1.1 Linfócitos

Os linfócitos maduros constituem 20-40% dos glóbulos brancos do sangue periférico. Circulam continuamente e são capazes de migrar para espaços tecidulares e órgãos linfóides, servindo como ponte entre diferentes estruturas do sistema imunitário. (8-10)

As populações linfóides B, T e NK são diferentes quanto à sua função mas indistinguíveis morfológicamente, daí que as proteínas de membrana sejam de importância fundamental como marcadores fenotípicos para os distinguir. (8-9)

2.1.2 Linfócitos B

As células B formadas na medula óssea circulam, depois, para os órgãos linfóides secundários onde sofrem a sua diferenciação em células efectoras após activação por antígeno. Durante esta fase do desenvolvimento as células B iniciam o rearranjo da sua cadeia pesada de Ig (células pró-B), produzem a cadeia pesada (células pré-B), expressam o receptor de células pré-B na superfície celular (células pré-B tardias), completam o rearranjo das cadeias leves e expressam IgM de superfície (células B imaturas), expressam tanto IgM como IgD na superfície celular (células B maduras), reagem com o respectivo antígeno (células B activadas) e acabam por perder a expressão da Ig de superfície tornando-se produtoras de anticorpos (plasmócitos). Durante todo este processo podemos caracterizar estes tipos celulares e estudar a progressão do desenvolvimento das células B através da expressão de marcadores de superfície presentes durante toda a diferenciação, como o CD19, ou específicos de cada estadio, como o CD34, o CD10, o CD20, o CD21, o CD24 e o CD38. (8-13)

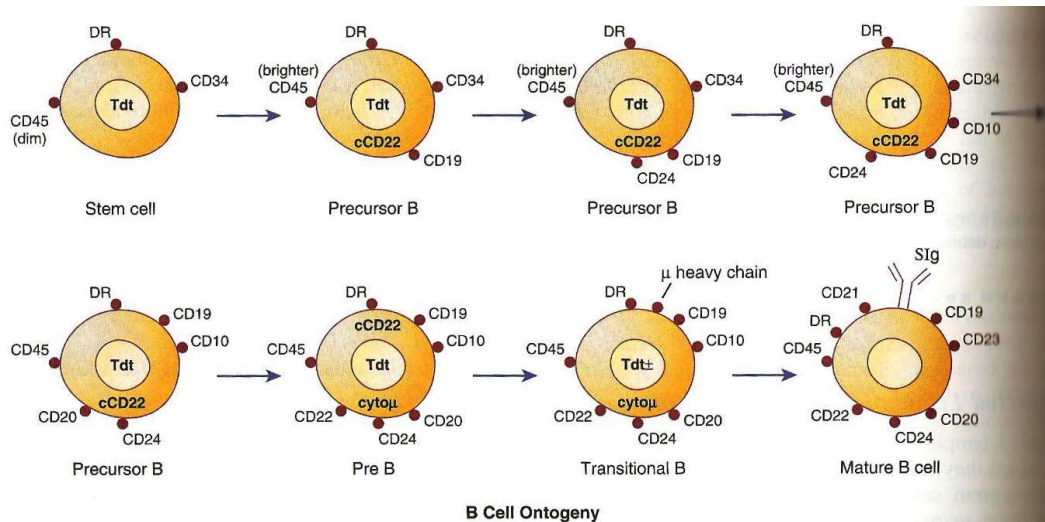


Ilustração 2: Ontogenia das células B (12)

A células B maduras correspondem a 10-15% dos linfócitos circulantes e caracterizam-se pela expressão de CD19 e CD20, e de cadeias leves (λ e κ) da imunoglobulina de superfície. Expressam cadeias κ ou λ mas nunca as duas, num ratio κ - λ de 3:2 (ou 60%-40%). (6,8-9,13)

2.1.3 Linfócitos T

Os linfócitos T correspondem a cerca de 70-80% dos linfócitos circulantes no sangue periférico. Durante a sua maturação no timo passam a expressar uma molécula de ligação a antígenos que é o receptor de célula T (TCR). Posteriormente adquirem outros marcadores como o CD3, CD2, CD5 e CD7. Podemos distinguir duas subpopulações funcionalmente distintas de células T, que se denominam T “helper” (Th) e T citotóxicas (Tc), pela presença de CD4 e ausência de CD8 e vice-versa, respectivamente. O ratio normal de células CD4:CD8 é de 2:1, mas pode estar alterado

nas imunodeficiências, doenças auto-imunes e outras patologias, nomeadamente leucemias e linfomas. (8-9,13)

No seu desenvolvimento saem da medula óssea numa forma imatura e migram para o timo onde atingem formas maduras antes de circularem para os órgãos linfóides secundários. Durante o processo de maturação sofrem proliferação, rearranjo dos genes do seu receptor (TCR) para produzir um grande leque de especificidades antigénicas, e adquirem marcadores de superfície específicos de células T. Os estadios do desenvolvimento das células T são definidos pelo estatuto do rearranjo e expressão do TCR e pela expressão de CD4 e CD8 que segue a sequência: CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4-CD8+ (célula Tc) ou CD4+CD8- (célula Th).(8-12)

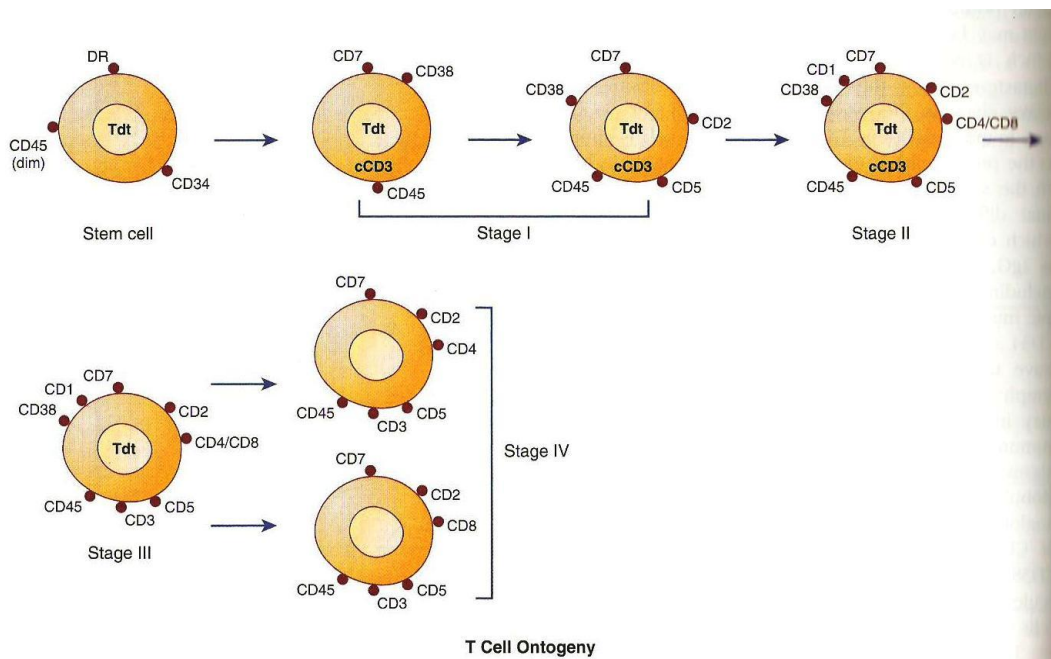


Ilustração 3: Ontogenia das células T (12)

2.1.4 Células NK

As células NK também se formam na medula óssea mas pouco se sabe da sua maturação. Caracterizam-se pela expressão de marcadores como CD16, CD56, CD57 e, mais importante, pela não expressão de CD3. Representam 10-15% dos linfócitos circulantes. (8-9,12-13)

2.2 Linfocitose

A linfocitose corresponde a um número aumentado de linfócitos circulantes, superior a $4,0 \times 10^9$ (14). Entre as causas mais importantes de linfocitose destacam-se:

1. Linfocitose fisiológica da infância (do nascimento até aos 2 anos);
2. Infecções, (como a tosse convulsa, rubéola, varicela, influenza, e em geral todas as doenças exantemáticas da infância. Também o vírus Epstein-Barr, vírus Cocksackie, adenovírus tipos 25 e 12, toxoplasmose e citomegalovírus, ou infecções como brucelose, tuberculose, sífilis secundária, HIV e infecções por Rickettsias);
3. Situações diversas, como alergias medicamentosas, doença do soro, esplenectomia, doença de Addison, hipopituitarismo, hipertireoidismo e em fumadores crónicos, e também nas beta-talassémias intermédias e outros síndromes hemolíticos crónicos;
4. Síndromes linfoproliferativas crónicas, principalmente a Leucemia Linfática Crónica, e os linfomas não-Hodgkin leucemizados. (15)

2.3 Síndromes linfoproliferativos crônicos

Os síndromes linfoproliferativos são proliferações autônomas de células maduras da linhagem linfóide B, T ou NK, mais frequentemente B. (14,16-17)

Apesar de na denominação de síndrome linfoproliferativo se enquadrarem todas as proliferações linfóides, na prática clínica o uso encontra-se restrito a um grupo heterogêneo de neoplasias linfóides que se caracterizam por um acúmulo no sangue periférico de linfócitos B ou T de aparência madura e função anormal, expressão de infiltração da medula óssea ou de outros tecidos linfóides (especialmente gânglios e baço). (18) Como consequência da invasão medular estes doentes podem ter anemia mais ou menos grave e trombocitopenia. As doenças linfoproliferativas podem também cursar com adenopatias e hepato-esplenomegalia. Mas em algumas destas patologias dá-se a expressão da doença através da linfocitose, consequência da leucemização do tumor. Alguns exemplos de doença linfoproliferativa nas quais a linfocitose pode ser o sintoma de apresentação são a LLC, a tricoleucemia, o linfoma de células do manto, o linfoma de zona marginal incluindo o linfoma esplênico de zona marginal, o linfoma folicular, a leucemia prolinfocítica e outras patologias das células T e NK. (1-2,4,12,16-18)

As neoplasias crônicas de células B englobam mais de 85% dos linfomas não-Hodgkin no mundo. Os tipos mais comuns são o linfoma de grandes células B e o linfoma folicular, que correspondem a 50% dos linfomas não Hodgkin. As células B neoplásicas imitam estádios normais da diferenciação B e tipicamente têm características morfológicas e imunofenotípicas que permitem a classificação de

acordo com as células de origem assim como a distinção entre elas no diagnóstico diferencial. (1,14,16,17)

As neoplasias de células T e NK são relativamente incomuns apesar de demonstrarem variação geográfica significativa. A diferenciação destas neoplasias baseada em características morfológicas, imunofenóticas e genéticas é geralmente imprecisa, pelo que as manifestações clínicas desempenham um papel importante na definição destas doenças. (1)

2.4 Incidência de Síndromes Linfoproliferativos Crônicos

Em geral as neoplasias de células B maduras correspondem a 4% dos novos câncros diagnosticados por ano em todo o mundo. São mais comuns em países desenvolvidos como EUA, Austrália, Nova Zelândia e Europa. A incidência anual varia entre 15/100000 nos EUA e 1,2/100000 na China. (1)

De acordo com os dados do Cancer Reserch UK, a incidência de linfomas não Hodgkin em 2006 para a população em geral do Reino Unido é de 13,8/100000 aumentando com a idade. (19)

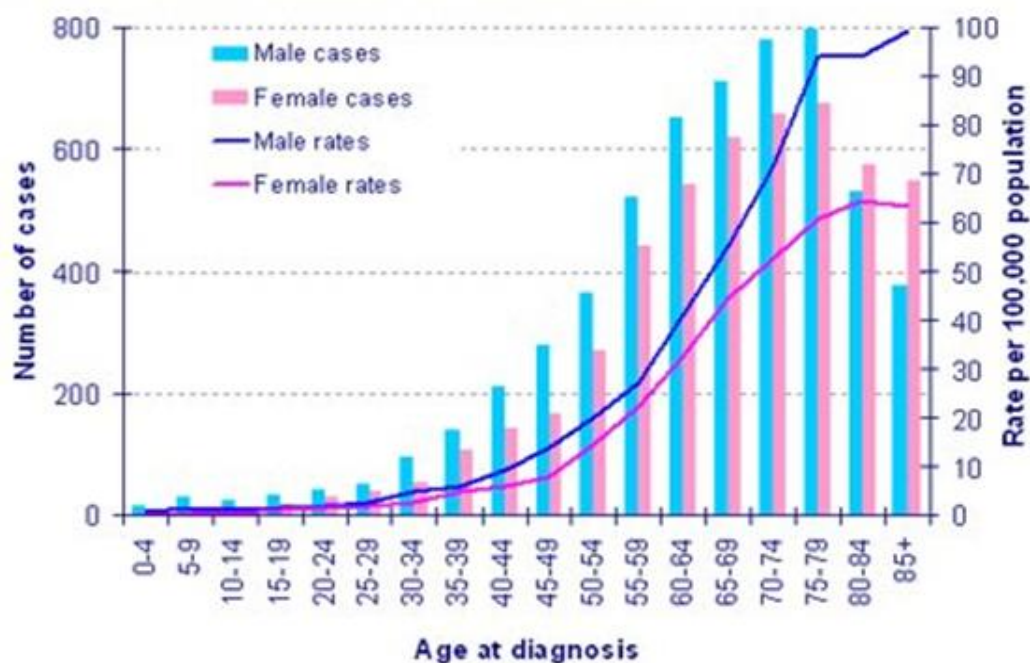


Gráfico 1: Número de novos casos e taxas de incidência específicas por idade, por sexo, LNH, UK 2006 (19)

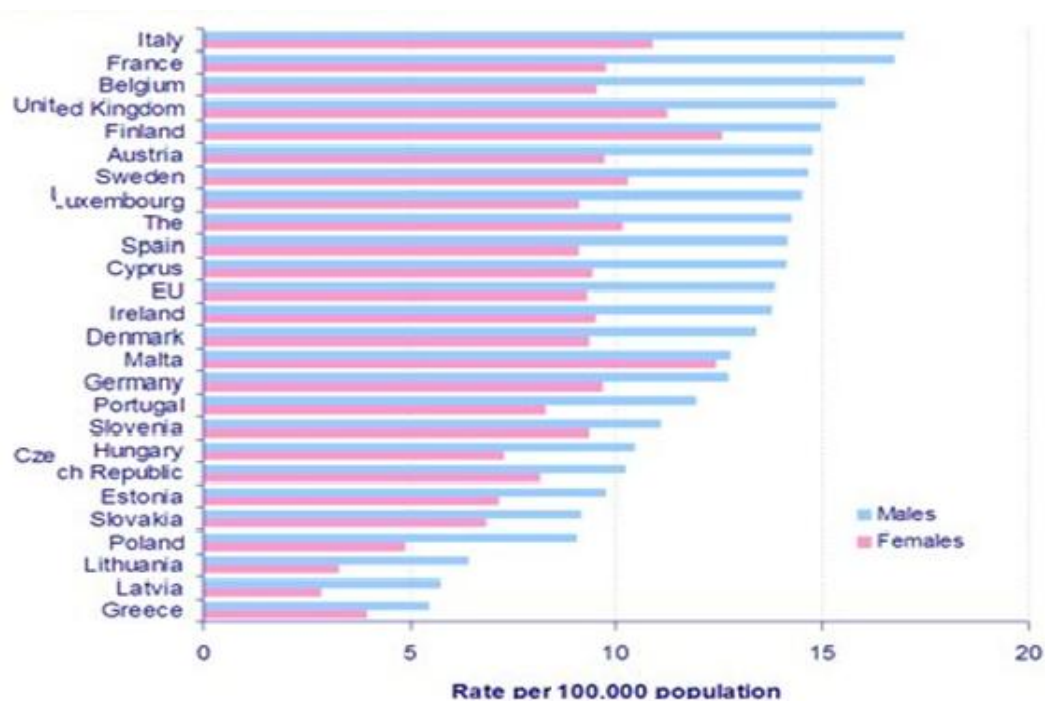


Gráfico 2: Taxas de incidência LNH, por sexo, EU, 2002 (19)

De acordo com o gráfico, no ano de 2002 Portugal apresentou uma incidência de 12/100000 para homens e 8,3/100000 para mulheres. (19)

No Reino Unido a tendência da incidência tem sido crescente ao longo dos anos. (19)

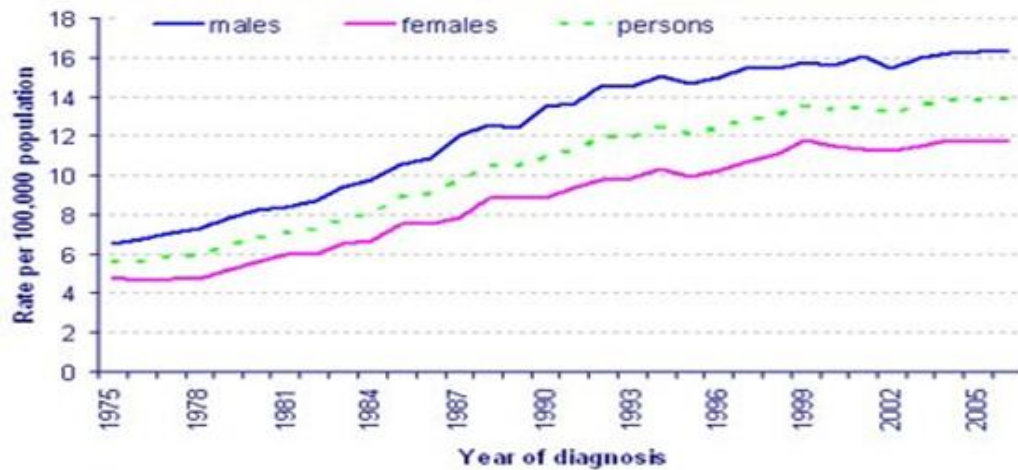


Gráfico 3: Taxas de incidência LNH, por sexo, GB 1975-2006 (19)

A LLC é a leucemia crônica de tecido linfóide mais frequente, representando cerca de 90% destas nos EUA e também na Europa. Aproximadamente 6,7% dos LNH são diagnosticados como LLC. (1,20)

2.5 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um processo de análise multiparamétrica mediante o qual as características físicas e/ou químicas das células são medidas enquanto circulam numa corrente líquida alinhadas uma a uma em frente a um laser. O impacto do laser em cada célula produz sinais que representam diferentes parâmetros da célula e que depois são recolhidos por detectores. Estes detectores convertem os sinais recebidos em sinais electrónicos que depois são digitalizados e armazenados em suporte

Valor do estudo das Linfocitoses por Citometria de Fluxo

informático. Para isso, os citómetros dispõem de um sistema hidráulico para a circulação do fluxo contínuo monocelular, de um sistema de luz laser que incide sobre as células, de um sistema óptico e electrónico que recolhe a luz dispersada e de um sistema informático para processar os dados. (5,21-22)

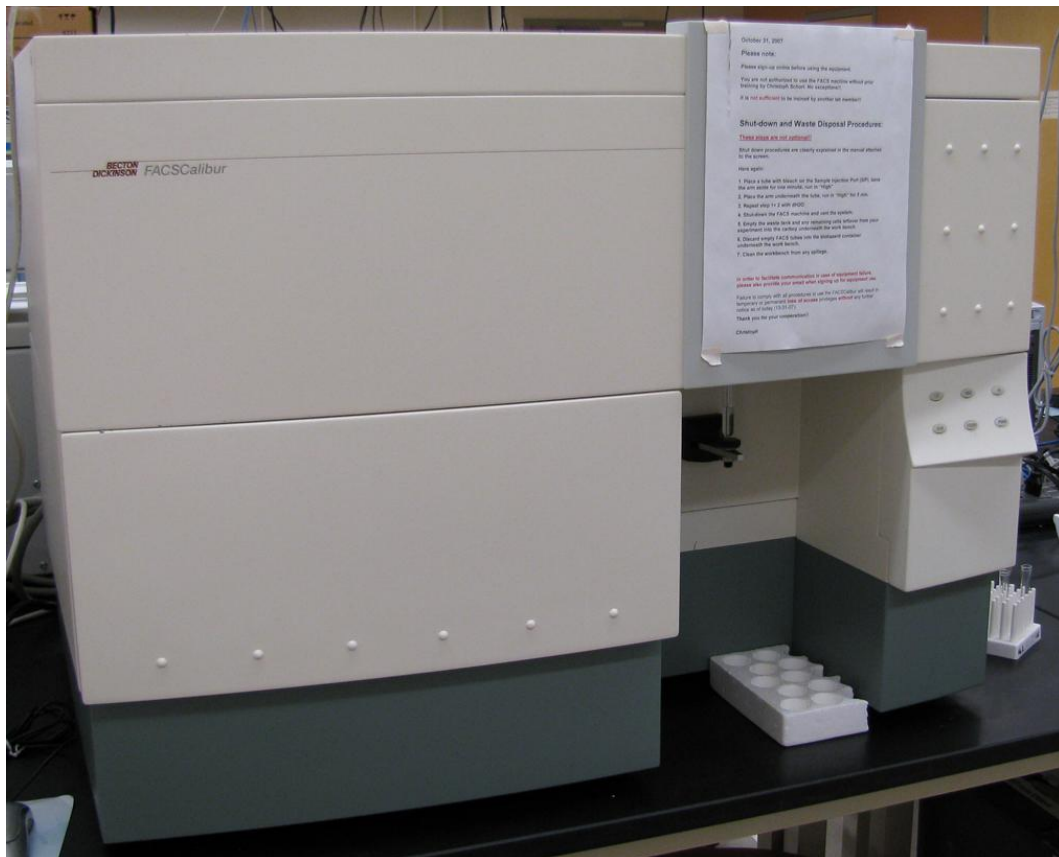


Ilustração 4: Citómetro de fluxo FACSCalibur

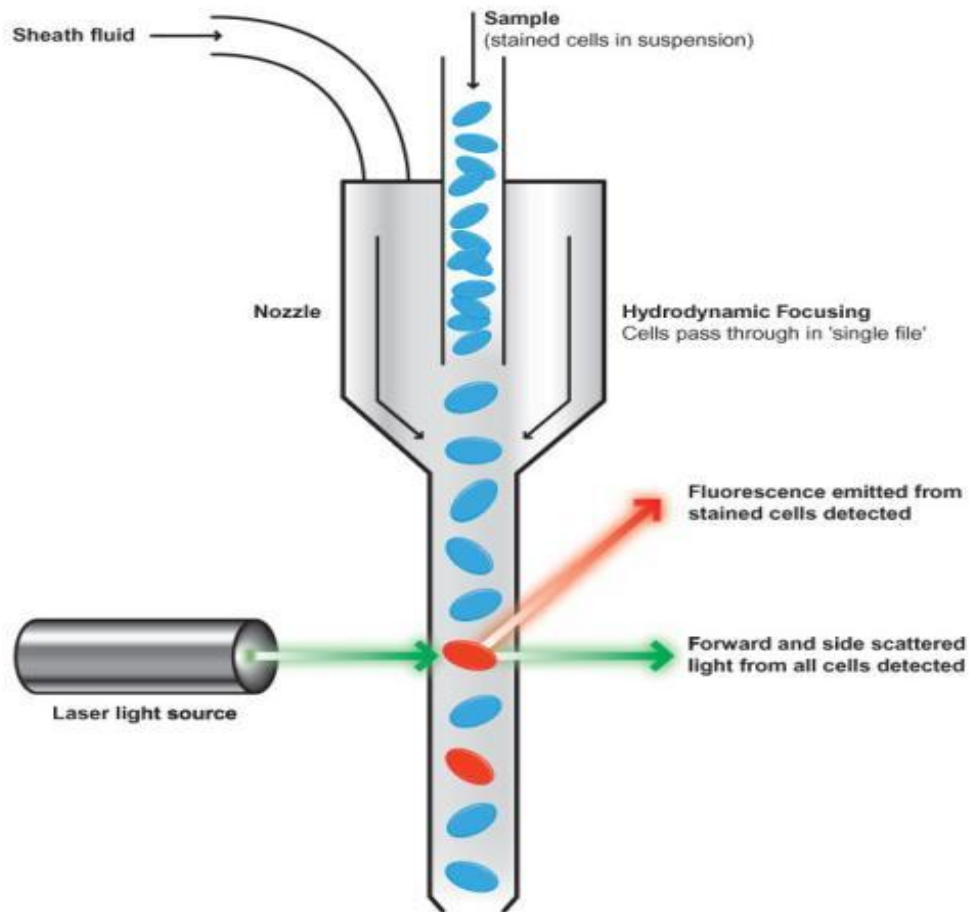


Ilustração 5: esquema do funcionamento de um citômetro de fluxo

Apesar de a citometria ser uma técnica utilizada em vários autoanalisadores hematológicos, o termo restringe-se para os aparelhos que lêem e interpretam reacções em que intervêm substâncias fluorescentes. Os parâmetros medidos podem ser relacionados com características intrínsecas da célula, como tamanho e complexidade do núcleo e citoplasma, que são baseados em sinais de dispersão, ou parâmetros relacionados com propriedades antigénicas da célula, que se baseiam em sinais de fluorescência. (5,15,21)

Os sinais de dispersão resultam da interação física da luz monocromática com uma partícula, como uma célula, que produz uma mudança na direção da luz em todas as direções. As características morfológicas fornecidas são o tamanho celular, características de membrana, do núcleo e do material granular no interior da célula. (21)

Os sinais de fluorescência devem-se aos fluorocromos. Os complexos antígeno-anticorpo são marcados com um fluorocromo que emite luz a determinado comprimento de onda quando excitado pela luz do laser. (21)

Entre as várias aplicações da citometria de fluxo encontra-se a imunofenotipagem, ou seja a identificação de populações e subpopulações de leucócitos com base nos antígenos de membrana. (5,22)

2.6 A citometria de fluxo no diagnóstico e classificação de neoplasias linfóides

A citometria de fluxo é uma técnica importante no diagnóstico e caracterização de neoplasias hematológicas. Permite a identificação de células de imunofenótipo anormal, sendo uma ferramenta diagnóstica mesmo que não haja expressão clínica. A imunofenotipagem de linfócitos é das potencialidades de citometria mais utilizadas como teste de diagnóstico. (6,22)

Nas neoplasias da linhagem B, pela sua maior frequência, melhor conhecimento dos fenótipos patológicos e maior disponibilidade de marcadores, a CMF é amplamente utilizada. Nas neoplasias de células T, em contraste com as B, ainda é

difícil identificar fenótipos aberrantes e muitas neoplasias são categorizadas como linfoma T não especificado. No entanto, quando utilizada em conjunto com outras informações clínicas, morfológicas, imuno-histoquímicas e citogenéticas, a imunofenotipagem pode auxiliar no diagnóstico. (1,3,15,23)

Podem ser pesquisadas 2 evidências de doença neoplásica da linhagem B:

- A monoclonalidade para a cadeia da imunoglobulina de superfície (Igs): As neoplasias da linhagem B habitualmente apresentam um único clone derivado de uma célula com Igs, ou κ ou λ , em contraste com o padrão policlonal dos casos de linfocitose reactiva (com ratio κ/λ normal);
 - Expressão de fenótipos aberrantes relacionados com doenças específicas.
- (1,3,15)

Na actualidade, apesar de a pesquisa de monoclonalidade ser utilizada como sinónimo de neoplasia, é aconselhada uma avaliação cuidadosa uma vez que pode ocorrer a não expressão de cadeias leves da Igs (alguns estudos referem ser um fenómeno raro outros referem até 1/3 dos LNH) e há também estudos que descrevem a expressão dupla de cadeias leves em células B malignas evidenciando a existência de dois ou mais clones patológicos. (3,24-27)

O fenótipo é pesquisado com vários CDs marcados com fluorocromos, nos quais se incluem marcadores para diferenciar células T, células B e células NK, além de marcadores para antígenos específicos das células neoplásicas que permitem a sua classificação. (6,22,28)

Tabela 2: Marcadores para o diagnóstico de síndromes linfoproliferativas B (14)

Mature B-cell lymphoproliferative disorders						
Marker	CLL	PLL	HCL	SLVL	FL	MCL
Surface Ig	Weak	++	++	++	++	++
CD5	+	-/+	-	-	-	-
CD10	-	-/+	-	-	+	-
CD11c	-/+	-	+	+/-	-	-
CD19	++	++	++	++	++	++
CD20	-/+	+	+	+	+	++
CD22	-/weak	+	+	+	+/-	+/-
CD23	++	-/+	-	+/-	-/+	-
CD25	+/-	-	++	-/+	-	-
CD79b	weak/-	++	+	++	++	++
FMC7	-/+	+	+	++	++	++
CD103	-	-	+	-/+	-	-
HC2	-	-	+	-/+	-	-
Cyclin D1	-	+	-/weak	-	-	++
CLL, chronic lymphocytic leukaemia; PLL, prolymphocytic leukaemia; HCL, hairy cell leukaemia; SLVL, splenic lymphoma with villous lymphocytes; FL, follicular lymphoma; MCL, mantle cell lymphoma.						

Tabela 3: Marcadores para o diagnóstico de síndromes linfoproliferativas T (14)

Mature T-cell lymphoproliferative disorders					
Marker	T-LGLL	NK-LGLL	T-PLL	ATLL	SS
TdT*	-	-	-	-	-
CD2	+	+	+	+	+
CD3	++	-	++	++	++
CD4	-	-	+/-	++	++
CD5	+	+	+	+	+
CD7	-/+	-	+++	-	-/+
CD8	++	-	-/+	-	-
CD16	+	+	-	-	-
CD25	-	-	-/+	++	-
CD56	-/+	+	-	-	-
other		CD11b+ CD16+ CD57+		HTLV1+	
T-LGLL, T-cell large granular lymphocyte leukaemia; NK-LGLL, NK-cell large granular lymphocyte leukaemia; T-PLL, T cell prolymphocytic leukaemia; ATLL, adult Tcell leukaemia/lymphoma; SS, Sézary syndrome.*TdT: terminal deoxynucleotidyl transferase differentiates these cells from lymphoblasts of ALL.					

Uma vez que a classificação proposta para as neoplasias linfóides da WHO é baseada no conceito de que a morfologia, o imunofenótipo, as anomalias genéticas e

as características clínicas podem ser utilizadas para definir diferentes entidades, a citometria de fluxo pode ter um papel significativo na sua distinção. Isto tem relevância particular nos tumores leucemizados. (1,6)

OBJECTIVOS/ MÉTODOS

3. OBJECTIVOS

Comprovar a utilidade da citometria de fluxo na detecção de síndromes linfoproliferativos crónicos com expressão de linfocitose no sangue periférico, sem outras características clínicas de suspeita do diagnóstico.

Demonstrar o valor da implementação do estudo das linfocitoses prolongadas por citometria de fluxo para detecção precoce de síndromes linfoproliferativos na rotina de um laboratório hospitalar.

4. MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo de tipo retrospectivo documental.

4.2 População alvo

Foram incluídos neste estudo todos os doentes com linfocitose no sangue periférico, estudada por citometria de fluxo entre 2007 e 2009 na secção de Hematologia do Laboratório de Patologia Clínica do CHCB.

4.3 Recolha de dados

Todos os dados foram recolhidos a partir do arquivo do serviço de Patologia Clínica do CHCB, onde estão incluídos todos os estudos de citometria realizados no laboratório. Foram seleccionados os casos investigados por presença de linfocitose em hemogramas de rotina e recolhidos vários dados referentes a estes doentes incluindo a presença/ausência de monoclonalidade, o fenótipo encontrado por citometria e o diagnóstico atribuído pela imunofenotipagem, além de dados referentes à idade, sexo, valor absoluto de linfócitos, nível de hemoglobina e plaquetas. Os dados foram depois introduzidos numa base de dados utilizando o software Microsoft Office Excel 2007.

4.4 Metodologia de análise

As amostras recebidas no laboratório foram analisadas no citómetro de fluxo FACSCalibur. Numa primeira análise foi feita a pesquisa de monoclonalidade com marcadores para as cadeias leves κ e λ , CD19, para marcação de células B, e CD5, para a identificação de linfócitos T e despiste de LLC. Caso não se detectassem alterações nas cadeias leves nem na expressão de CD5 a amostra era considerada normal e não se procedia a mais análises. Em caso de alteração destes marcadores a amostra era considerada patológica e prosseguia-se a análise com um painel específico para definir o fenótipo e caracterizar a população leucémica que incluía o FMC7, o CD23, o CD20, o CD79b, o CD103, o CD25, o CD11c, o CD10, o CD38 e o Bcl2. Os estudos subsequentes das proliferações das linhagens T e NK foram enviadas para um laboratório de referência a nível nacional. Sendo assim neste hospital só se realiza a imunofenotipagem de células B.

4.5 Tratamento de dados

O tratamento dos dados foi efectuado utilizando uma folha de cálculo do software Microsoft Office Excel 2007, tendo sido analisados através de testes de funções básicas de estatística descritiva.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

4.1 Características da amostra

O número total de estudos requisitados para pesquisa de patologia clonal em doentes com linfocitose foi de 54, que perfaz a amostra. Esta amostra corresponde a 2,49% do número total de estudos de CMF realizados no laboratório entre 2007 e 2009, que foi de 2164. Destes estudos totais 688 foram realizados no ano de 2007, 724 em 2008 e 752 em 2009.

Desta amostra, um total de 28 indivíduos eram do sexo masculino, correspondendo a 52%, e os restantes 26 do sexo feminino, perfazendo 48% (gráfico 4).

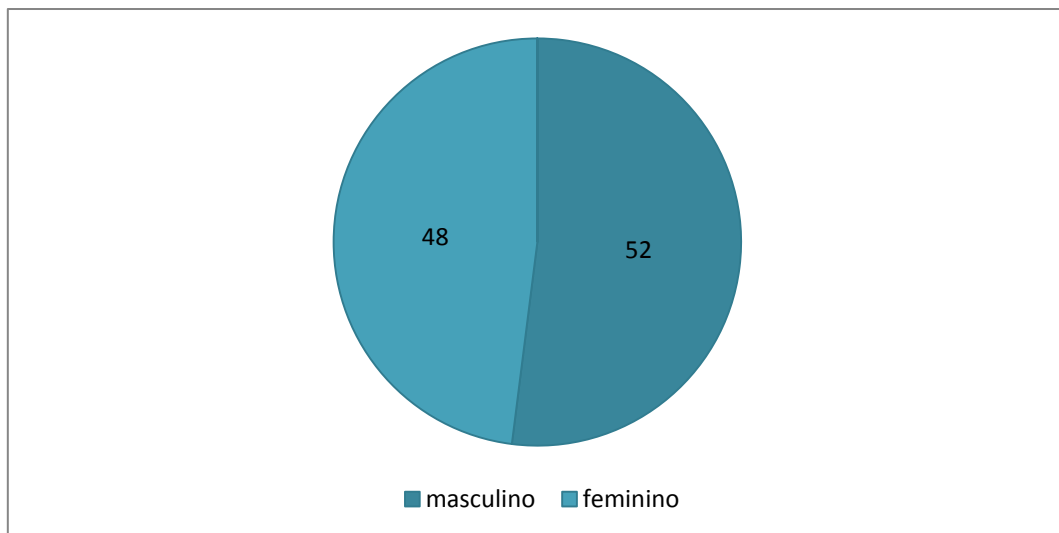


Gráfico 4: Distribuição da amostra por sexo

Os resultados referentes à idade dos indivíduos estudados estão representados no gráfico 5, apresentando um valor máximo de 92 e valor mínimo de 18 anos, com uma média de 71,72 anos.

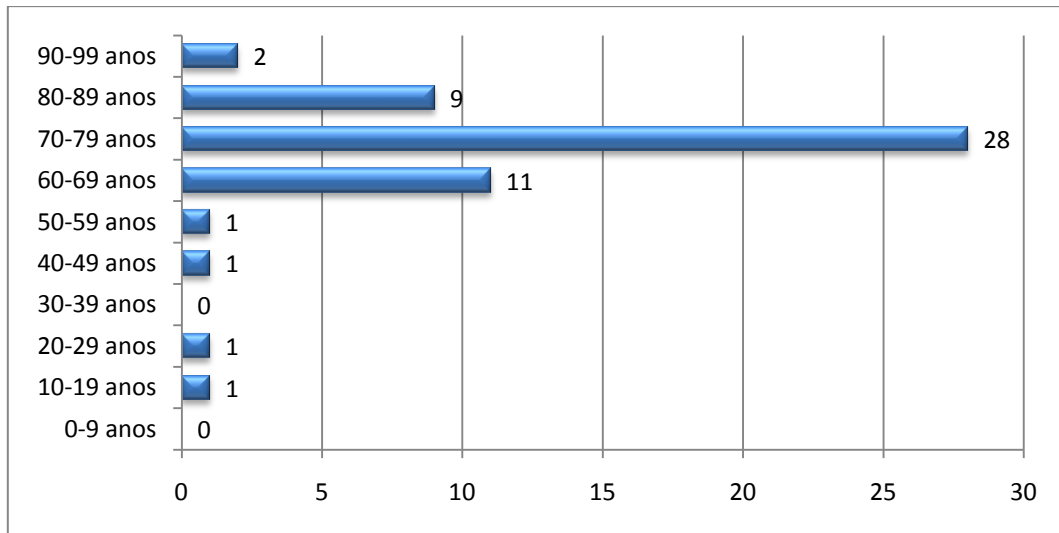


Gráfico 5: Distribuição da amostra por faixa etária

Quanto aos valores absolutos de linfócitos, apresentavam um valor máximo de $54,6 \times 10^3$ e um mínimo de $4,2 \times 10^3$.

O valor máximo de hemoglobina (g/dL) encontrado foi de 17,4 e o mínimo de 6,2, com uma média de $12,8 \pm 2,35$.

A contagem de plaquetas situou-se entre um valor máximo de 395×10^3 e um mínimo de 18×10^3 (média de $203,7 \times 10^3 \pm 88,6$).

No que diz respeito à procedência do pedido de análise, um total de 27 foram da consulta externa, 18 dos serviços de internamento, 3 da urgência e 2 casos da unidade de cuidados intensivos (gráfico 6). Das requisições da consulta, 13 foram enviados pela Hematologia, 14 por outras áreas médicas e 0 pelas cirúrgicas. Através

do internamento não houve requisições pela Hematologia, 15 foram pedidos por outras áreas médicas e 3 por áreas cirúrgicas (gráfico 7).

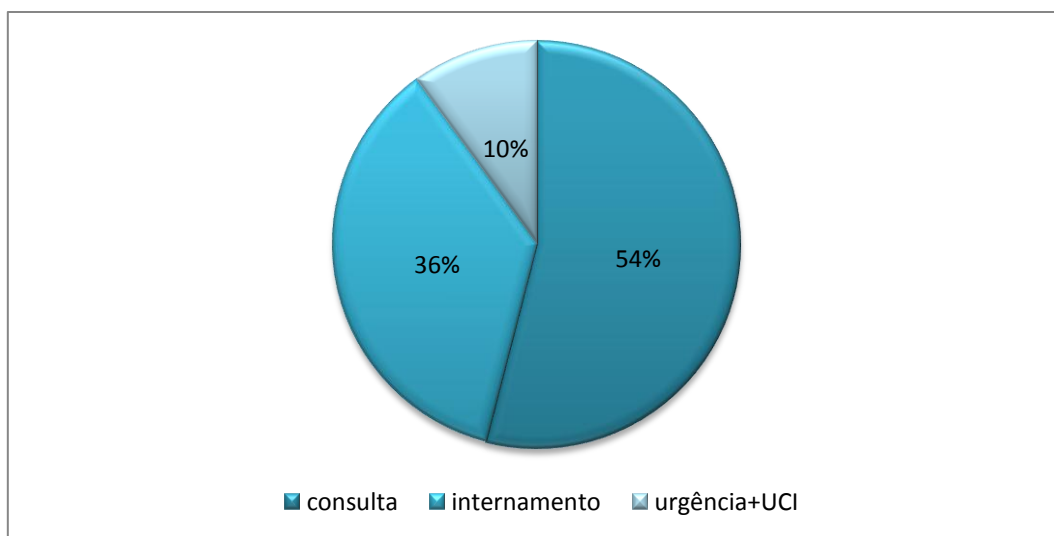


Gráfico 6: Procedência dos pedidos de análise

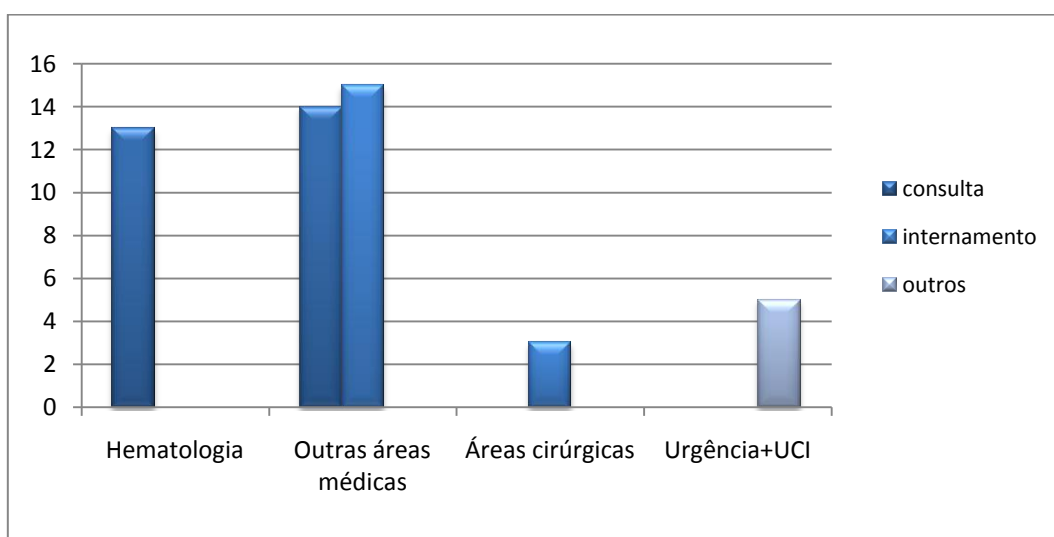


Gráfico 7: Procedência dos pedidos de análise por especialidades

4.2 Resultados

No gráfico 8 encontram-se representados os resultados referentes ao achado de populações patológicas nos estudos de CMF. Dos 54 indivíduos da amostra que foi analisada apenas 10 apresentaram fenótipo normal, perfazendo 18%, e 44 apresentaram fenótipo patológico, representando 82%. Destes casos com fenótipo patológico 41 apresentaram monoclonalidade B, 2 apresentaram linfocitose T e 1 indivíduo apresentou linfocitose NK.

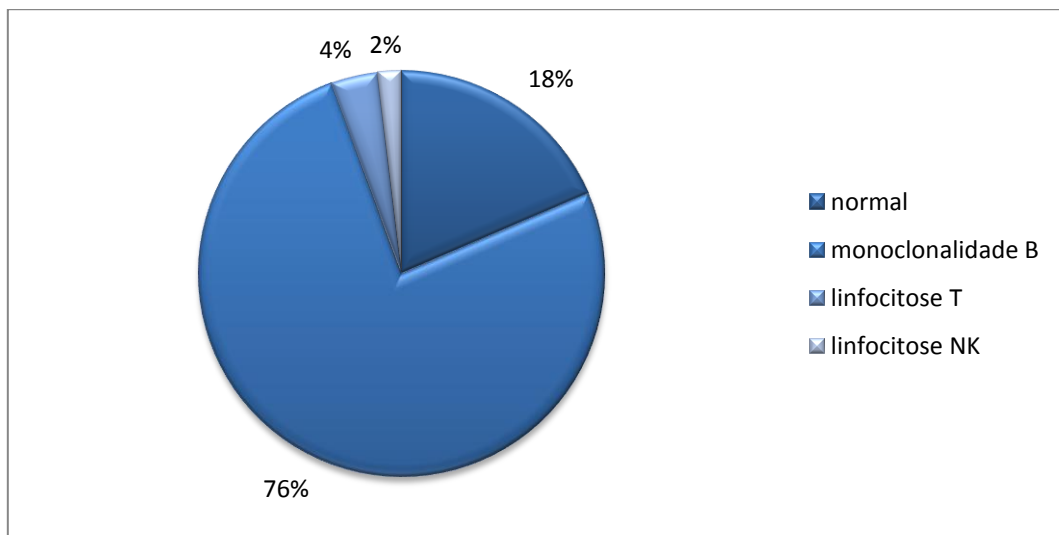


Gráfico 8: Classificação do fenótipo da amostra

Quanto à classificação imunofenotípica, dentro dos 41 casos com monoclonalidade B caracterizaram-se 27 indivíduos com LLC-B, 4 indivíduos com LNH-B, 9 casos com SLPC-B não classificado e 1 caso com dois fenótipos LLC-B+LNH-B (gráfico 9).

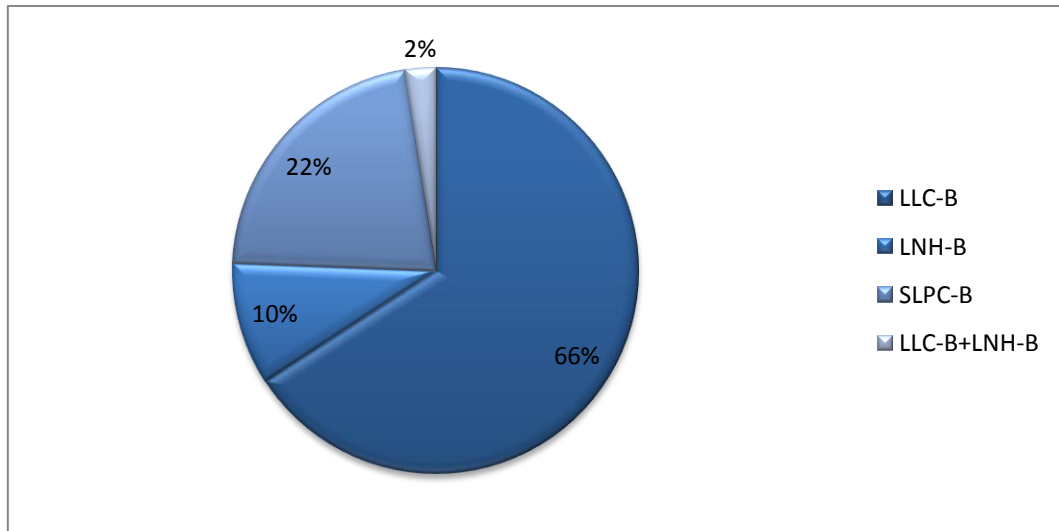


Gráfico 9: Classificação imunofenotípica dos casos de monoclonalidade B

Em relação à expressão de cadeias leves nos casos de monoclonalidade B, 22 indivíduos expressaram unicamente a cadeia κ , 10 indivíduos expressaram a cadeia λ , 5 não expressaram cadeias leves e 1 caso expressou as duas cadeias em proporções relativamente normais (gráfico 10). Três casos não foram incluídos por impossibilidade de se fazer a recolha dos dados ou pela sua complexidade de análise.

Em todos os indivíduos sem patologia a relação da expressão de cadeias leves era normal.

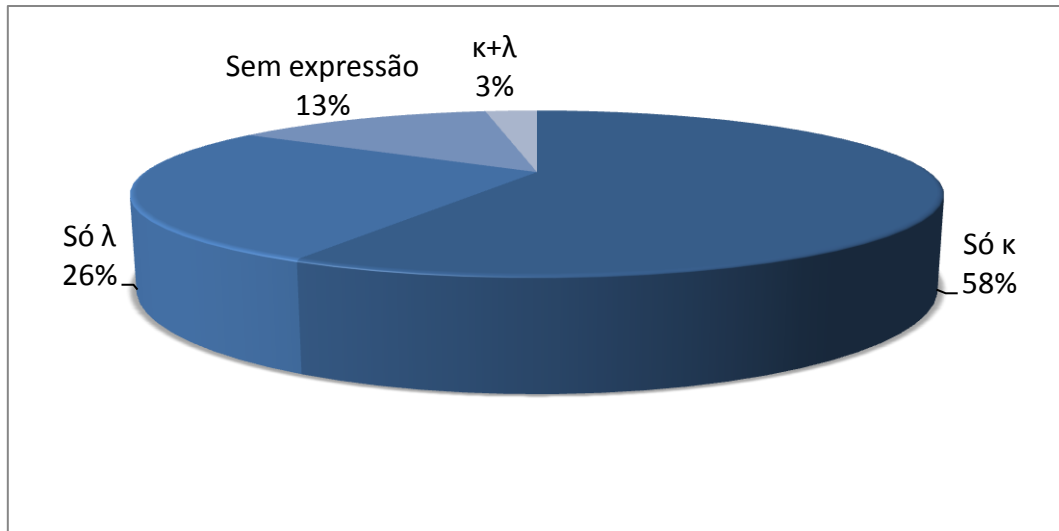


Gráfico 10: Expressão de cadeias leves nos casos de monoclonalidade B

Ainda dentro dos que apresentaram monoclonalidade B, 9 indivíduos tinham uma população de células normais em percentagem variável (de 0,3% a 3%) concomitantemente à população patológica o que equivale a uma percentagem de 22%.

A média de idade para a população que apresentou fenótipo normal foi de 55,8 \pm 21,1 anos. Para a população patológica a média de idades é de 75,3 \pm 7,7 anos.

A média do valor absoluto de linfócitos encontrada na população de fenótipo normal foi de $15,1 \times 10^3 \pm 12,2$. Na população de fenótipo patológico a média do valor absoluto de linfócitos foi de $19,3 \times 10^3 \pm 13,0$.

Quanto aos valores de hemoglobina (g/dL), na população normal a média foi de $12,7 \pm 1,0$. Na população patológica a média de hemoglobina foi de $12,9 \pm 2,6$.

A população de fenótipo normal apresentou valor médio de plaquetas de $278,9 \times 10^3 \pm 84,1$; a população patológica apresentou como média $185,9 \times 10^3 \pm 80,8$ plaquetas.

Dentro dos 10 casos normais, 7 eram do sexo feminino e 3 do sexo masculino. Na população patológica houve predominância do sexo masculino, com 25 indivíduos, e 19 do sexo feminino (gráfico 11).

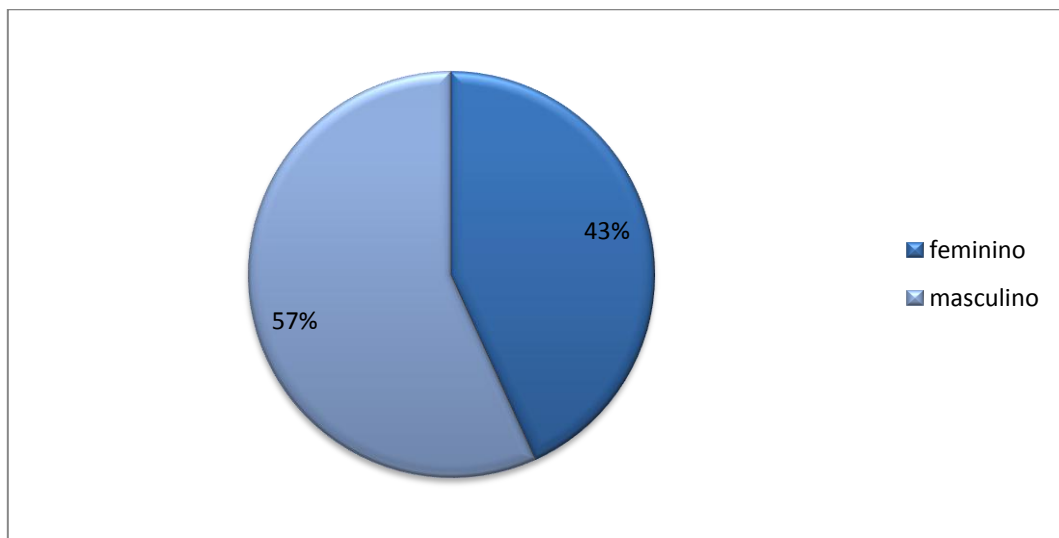


Gráfico 11: Distribuição dos casos patológicos por sexo

DISCUSSÃO/ CONCLUSÕES

6. DISCUSSÃO

A amostra seleccionada encontrava-se distribuída uniformemente em relação ao sexo. Quanto à idade notou-se um predomínio de indivíduos nas faixas etárias superiores a 60 anos, com mais de metade dos casos na faixa dos 70 aos 79 anos. Todos os indivíduos apresentavam valor absoluto de linfócitos superior a 4000, que é o limite inferior considerado para linfocitose. Os valores de hemoglobina e plaquetas acompanhavam a literatura actual. (1-3)

Na análise da proveniência dos pedidos de análise não se verificaram discrepâncias importantes que necessitassem de aprofundamento de estudo.

A CMF é uma ferramenta de diagnóstico amplamente utilizada em meio laboratorial, nomeadamente para pesquisa de monoclonalidade e imunofenotipagem linfocitária. De acordo com a literatura a linfocitose é um critério importante de estudo por CMF para exclusão ou diagnóstico de patologia linfoproliferativa. (2-3,7,15,21-22,29,30)

Neste momento, no CHCB, o estudo de linfocitoses por CMF tem sido feito com base experimental, e sempre que é detectada uma linfocitose suspeita num hemograma de rotina é feito o pedido ao médico que requisitou o exame para se prosseguir com a fenotipagem por CMF, não estando, portanto, protocolado este tipo de estudo.

Os resultados deste estudo mostram que foi encontrada monoclonalidade de células B através da avaliação das cadeias leves da Igs em 41 dos 54 estudos avaliados. Sabendo-se que, actualmente, a presença de monoclonalidade é tida como sinónimo

de presença de doença maligna, não sendo comum que uma linfocitose reactiva seja monoclonal, pode dizer-se que havia evidência de patologia linfoproliferativa em 76% dos casos. Nestes casos foi depois aplicado um painel específico de marcadores para imunofenotipagem de diagnóstico. Além destes, também foram encontrados dois casos de linfocitose de células T e um caso de linfocitose de células NK, que foram referenciados para outro laboratório uma vez que no CHCB apenas se faz a imunofenotipagem de células B. Juntamente com estes casos o número de diagnósticos patológicos encontrados em 54 hemogramas com linfocitose perfaz 44 (82%). (1-3,29-30)

Assim demonstra-se uma forte evidência de relação entre a linfocitose prolongada e a presença de patologia linfoproliferativa. (2-3,7)

Em face dos resultados deste estudo, com detecção de 82% de casos de doença linfoproliferativa através do estudo de linfocitoses, e sabendo que este tipo de patologia se manifesta com frequência com linfocitose, parece importante que seja protocolado o estudo das linfocitoses por CMF rotineiramente para a detecção precoce, mesmo em fase subclínica, de síndromes linfoproliferativas. (2-4,7,19-20)

Quanto à aplicação do painel de anticorpos monoclonais para imunofenotipagem aos 41 casos de monoclonalidade B, foi possível estabelecer-se um diagnóstico definitivo a 27 com LLC, a 4 com LNH e encontrou-se 1 caso com 2 imunofenótipos patológicos diferentes, correspondentes a LLC e LNH. Os restantes 9 casos permaneceram com o diagnóstico de síndrome linfoproliferativo não especificado.

A detecção do fenótipo da LLC parece ser mais eficaz, isso pode dever-se ao facto de o fenótipo ser mais conhecido e amplamente pesquisado. Para os restantes LNH a classificação pode ser mais difícil, uma vez que se tratam de várias patologias com fenótipo, evolução e prognóstico diferentes, pelo que possivelmente seria necessário um painel maior de anticorpos para as distinguir. (1-4,22,27,31-33)

Alguns SLPC podem manifestar-se com linfocitose além das leucemias (LLC, HCL, leucemia prolinfocítica) como são os casos do linfoma de células do manto, linfoma de células marginais incluindo o linfoma esplénico de células B de zona marginal, linfoma folicular, e outras patologias de células T e NK [35]. Apesar de o linfoma folicular estar descrito na literatura como o SLPC que tem maior incidência (representa 35% LNH nos E.U.A. e 22% em todo o mundo) e de este poder estar associado com linfocitose, a LLC é o SLPC mais frequentemente diagnosticado nos estudos de sangue periférico efectuados a partir de hemogramas patológicos. (1-2,4)

Na literatura as neoplasias de células T e NK são descritas como relativamente incomuns, e em conjunto perfazem cerca de 12% do total de LNH, com uma variação geográfica significativa. Neste estudo foram encontrados dois casos de linfocitose T e um de linfocitose NK com suspeita de neoplasia, o que perfaz 6% dos casos patológicos encontrados, o que está de acordo com as fontes pesquisadas. (1,7,23,29-30)

Dos indivíduos em que se detectou monoclonalidade para a Igs, 84% expressaram apenas uma cadeia leve, com uma percentagem superior de casos a expressarem unicamente a cadeia κ (58%). Em 5 dos casos não se detectaram cadeias leves e um caso apresentou expressão dos dois tipos de cadeias. Estes resultados acompanham a literatura actual. (24-27)

Dentro dos casos com monoclonalidade B, em 9 indivíduos foi possível detectar-se a presença de uma população de células de fenótipo normal concomitantemente à patológica, o que perfaz 22%. Apesar de este fenómeno parecer estar associado a melhor prognóstico da doença, não se encontram na literatura grandes series que demonstrem tal facto pelo que seria necessário um acompanhamento destes doentes e um estudo prospectivo, para demonstrar tal evidência. Seria um estudo interessante para se fazer no futuro. (34)

Está globalmente descrito que a patologia linfoproliferativa crónica tem maior incidência com a idade avançada. Por exemplo, na LLC, que é o expoente máximo das leucemias crónicas e a patologia mais frequente neste estudo, a maior parte dos doentes tem mais de 50 anos, com uma média de 65 anos. Os outros LNH acompanham esta tendência. Neste estudo a idade média da amostra foi de 71,7 anos, com uma predominância de casos (>50%) na faixa etária dos 70-79 anos. Detectou-se também diferença na média de idade dos indivíduos que apresentaram fenótipo normal (média de 55,8 anos) e na população com fenótipo anormal (média de 75,3 anos). Este resultado demonstra que existirá evidência provável de que a linfocitose juntamente com a idade mais avançada são bons indicadores de patologia linfoproliferativa crónica. Logo, seria recomendável algum nível de suspeita clínica numa linfocitose prolongada, especialmente num paciente idoso. (1-4)

Dentro da população com fenótipo patológico detectou-se uma ligeira predominância do sexo masculino, com 57% dos casos. De acordo com as fontes estudadas há uma incidência maior de SLPC susceptíveis de produzir linfocitose no sexo masculino. Esta diferença de incidência por sexo é mais ligeira na LLC (ratio

homem: mulher 2:1) e mais evidente por exemplo na tricoleucemia (ratio homem:mulher 5:1). Neste estudo como a maior parte dos fenótipos patológicos foram identificados como LLC, a predominância do sexo masculino acompanha a tendência descrita na literatura. (1-4)

De referir apenas que se encontraram diferenças na média do valor absoluto de linfócitos entre a população normal e patológica, com contagens superiores na patológica, o que era um resultado esperado de acordo com a literatura. (1-4)

Quanto aos valores de hemoglobina e plaquetas não se encontraram diferenças significativas e os seus valores acompanham a literatura. (1-4)

Neste trabalho foram também recolhidos vários dados referentes à imunofenotipagem dos casos patológicos. Como só foi considerado o diagnóstico final da CMF, não se procedeu a um estudo metuculoso dos marcadores utilizados e da sua importância na classificação patológica. Este seria também um estudo de elevado interesse científico.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados deste trabalho podemos concluir que:

- O estudo de linfocitoses prolongadas detectadas em hemogramas de rotina, utilizando o citómetro de fluxo, é importante no diagnóstico de patologia linfoproliferativa sem outra expressão clínica.

- A CMF, que actualmente é uma técnica amplamente utilizada em meio laboratorial, é uma ferramenta efectivamente útil no estudo das linfocitoses, com elevada detecção de monoclonalidade e alto valor na caracterização imunofenotípica de SLPC.
- O SLPC detectado com maior frequência neste estudo foi a LLC, de acordo com a literatura pesquisada.
- Parece haver evidência de forte associação entre a linfocitose em idade avançada e a presença de patologia linfoproliferativa.
- A implementação do estudo protocolado das linfocitoses prolongadas encontradas em hemogramas de rotina, especialmente em pacientes de idade avançada, é recomendada.

BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds.). World Health Organization classification of tumors: Pathology and Genetics: Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues". Lyon: IARC Press; 2001. p. 119-235.
2. Andrews JM, Cruser DL, Myers JB et al. Using peripheral smear review, age and absolute lymphocyte count as predictors of abnormal peripheral blood lymphocytosis diagnosed by flow cytometry. Leukemia Lymphoma. 2008; No 49 (9): p. 1659-1661.
3. Rego EM, Santos GA. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial de pancitopenias e linfocitoses. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2009; vol 31 (5): p. 367-374.
4. Carney D. Peripheral blood lymphocytosis: what is the threshold for further investigation?. Leuk Lymphoma. 2008 (Sep); 49(9): 1659-1661.
5. Keren DF, Hanson CA, Hurtubise, PE. Flow Cytometry and Clinical Diagnosis. American Society of Clinical Pathologists. Chicago.
6. Stevenson MS, Braylan RC. Flow Cytometric Analysis of Lymphomas and Lymphoproliferative Disorders. Seminars in Hematology. 2001; Vol 38 (2): p. 111-123.
7. Davis BH, Holden JT, Bene MC, Borowitz MJ, Braylan RC, Cornfield D, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hemato-lymphoid neoplasia: medical indications. Cytometry B Clin Cytom. 2007; 72 Suppl 1:S5-13.

8. Kindt T, Goldsby R. Kuby immunology. 6ª edição. W. H. Freeman and Company. 2007; p. 23-49.
9. Abbas A, Lichtman A. Cellular and molecular immunology. 4ª edição. W.B. Saunders Company. 2000; p. 3-38.
10. Vander A, Sherman J, Luciano D. Human Physiology. 8ª edição. McGraw-Hill. 2001; p. 687-723.
11. Rich R et al. Clinical immunology: Principles and practice. 2ª edição. Mosby. 2001; p. 8.1-9.13.
12. Rodak B. Hematology: Clinical principles and applications. 2ª edição. W.B. Saunders Company. 2002; p. 545-557.
13. Hillman R, Ault K, Rinder H. Hematology in clinical practice. 4ª edição. McGraw-hill. 2005; p. 253-292.
14. Braunwald E, Fauci A. Harrison's: principles of internal medicine. 17ª edição. McGraw-Hill. 2008.
15. Vives J, Aguilar J. Manual de técnicas de laboratório en hematologia. 2ª edição. Masson. p.172-181, 274-277.
16. Guzmán FJ. Patología general: Introducción a la medicina clínica. Masson. 2004; p. 459-471.
17. Pozo S. Manual de patologia general. 5ª edição. Masson. 2003; p. 327-334.
18. Miguel J, Guijo F. Questiones en Hematologia. 2ª edição. Ediciones Harcourt.
19. Non-Hodgkin lymphoma - UK incidence statistics [online]. 2009 Sep 1 [cited 2010 May 10]; Available from: URL: <http://info.cancerresearchuk.org>.
20. Leukemia statistics- Key factors [online]. [cited 2010 May 10]; Available from: URL: <http://info.cancerresearchuk.org>.

21. Manual [online]. [cited 2010 May 10]; Available from: URL: www.citometriadeflujo.com.
22. Marti GE, Stevenson M, Blessing JJ, Fleisher TA. Introduction to Flow Cytometry. Seminars in Hematology. 2001; Vol 38 (2): p. 93-98.
23. Cady FM, Morice WG. Flow cytometric assessment of T-cell chronic lymphoproliferative disorders. Clin Lab Med. 2007; 27(3): 513-532.
24. Kaleem Z, Zehnbaauer BA, White G et al. Lack of expression of surface immunoglobulin light chains in B cell non-Hodgkin lymphomas. American Journal of Clinical Pathology. 2000; No 113: p. 399-405.
25. Li S, Eshleman JR, Borowitz MJ. Lack of surface immunoglobulin light chain expression by flow cytometric immunophenotyping can help diagnose peripheral B cell lymphoma. American Journal of Clinical Pathology. 2002; No 118: p. 229-234.
26. Xu D. Dual surface immunoglobulin light chain expression in B cell lymphoproliferative disorders. Arch Pathol Lab Med. 2006; vol 130: p. 853-856.
27. Echeverri C, Fisher S, Craig F. Immunophenotypic variability of B cell non-Hodgkin Lymphoma: a retrospective study of cases analysed by flow cytometry. American Journal of Clinical Pathology. 2002; No 117 (4).
28. Provan D, Singer C. Oxford handbook of clinical hematology. 2ª edição. Oxford University Press. 2004.
29. Dunphy CH. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hemopathology. Arch Pathol Lab Med. 2004; No 128 (9): p. 1004-1022.

30. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008; No 111 (8): p. 3941-3947.
31. Rawstron A, Hillmen P, Houlston R. Clonal Lymphocytes in persons without known Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): implications of recent findings in family members of CLL patients. *Seminars in Hematology*. 2004; Vol 41 (3): p. 192-200.
32. Rawstron A, Bennett F, Hillman P. The biological and clinical relationship between CD5+CD23+ monoclonal B cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*. No 139: p. 724-729.
33. Rawstron A, Bennett F, O'Connor SJ et al. Monoclonal B cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 2008; No 359: p. 575-583.
34. Monteiro A, Amantegui P, Macedo A. Resultados preliminares do valor prognóstico do achado de uma população de linfócitos B de fenótipo normal no diagnóstico de leucemia linfática crônica B. X Congresso da Sociedade Ibérica de Citometria. Livro de abstracts: S088.
35. Marti G, Abbasi F, Raveche E et al. Overview of monoclonal B cell lymphocytosis. *British Journal of Haematology*. 2007; No 139: p. 701-708.
36. Marti G, Rawstron A, Ghia P et al. Diagnostic criteria for monoclonal B cell lymphocytosis. *British Journal of Haematology*. 2005; No 130: p. 325-332.
37. Falcão RP. Proliferação monoclonal B CD5+ subclínica. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2005; No 27 (4): p. 267-271.

38. Rawstron A, Green MJ, Kuzmick A et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of “indolent” chronic lymphocytic leukemia are present in 3,5% of adults with normal blood counts. *Blood*. 2002; Vol 100 (2): p. 635-639.
39. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani, P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005; 55: p. 74-108.
40. Non-Hodgkin Lymphoma [online]. [cited 2010 May 10]; Available from: URL: <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/non-hodgkin>.
41. Yamamoto M, Figueiredo V. Epidemiologia da leukemia linfocítica crónica e leucemia linfocítica crónica familiar. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2005; Nº 27 (4): p. 229-232.