

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

GABRIELA ALVES BERNARDINO

**ESTUDO COMPARATIVO DA CONTAGEM DIFERENCIAL DO ESFREGAÇO DO  
ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA RECÉM-COLHIDA PARA COM A AMOSTRA  
DO TUBO DESTINADA À IMUNOFENOTIPAGEM**

SÃO LUÍS

2018

GABRIELA ALVES BERNARDINO

**ESTUDO COMPARATIVO DA CONTAGEM DIFERENCIAL DO ESFREGAÇO DO  
ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA RECÉM-COLHIDA PARA COM A AMOSTRA  
DO TUBO DESTINADA À IMUNOFENOTIPAGEM**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao curso de Farmácia, da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira

SÃO LUÍS

2018

Alves Bernardino, Gabriela.

ESTUDO COMPARATIVO DA CONTAGEM DIFERENCIAL DO ESFREGAÇO DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA RECÉM-COLHIDA PARA COM A AMOSTRA DO TUBO DESTINADA À IMUNOFENOTIPAGEM / Gabriela Alves Bernardino. - 2018.

43 f.

Orientador(a): Raimundo Antonio Gomes Oliveira.  
Monografia (Graduação) - Curso de Farmácia,  
Universidade Federal do Maranhão, DEFAR, 2018.

1. Blastos. 2. Eritroblastos. 3. Imunofenotipagem.  
4. Medula óssea. 5. Mielograma. I. Gomes Oliveira,  
Raimundo Antonio. II. Título.

GABRIELA ALVES BERNARDINO

**ESTUDO COMPARATIVO DA CONTAGEM DIFERENCIAL DO ESGREGAÇO DO  
ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA RECÉM-COLHIDA PARA COM A AMOSTRA  
DO TUBO DESTINADA À IMUNOFENOTIPAGEM**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao curso de Farmácia, da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira

Aprovado em: \_\_\_\_/12/2018

**BANCA EXAMINADORA**

Orientador: Raimundo Antônio Gomes Oliveira

Instituição: DEFAR - UFMA

Assinatura: \_\_\_\_\_

2º Avaliador: \_\_\_\_\_

Instituição: UFMA

Assinatura: \_\_\_\_\_

3º Avaliador: \_\_\_\_\_

Instituição: UFMA

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho de conclusão de curso, aos meus pais por todo sacrifício e amor e a meus amigos conquistados durante a graduação, que sempre me incentivaram e torceram pelas minhas conquistas.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela possibilidade de ter alcançado meus objetivos, por capacitar-me constantemente e principalmente por ter abençoado a minha vida com pais e amigos maravilhosos que sempre me acolheram nos momentos difíceis e a oportunidade de podermos desfrutar juntos desta conquista;

Ao meu orientador Prof. Dr. Raimundo Antônio Gomes Oliveira pela atenção, disponibilidade, confiança, ensinamentos e oportunidades. Obrigada pelo acolhimento no Centro de Pesquisa Clínica desde o quarto período da graduação e por ser um grande exemplo de farmacêutico e professor!

Ao Centro de Pesquisa Clínica (CEPEC-HUUFMA) pela disponibilidade e autorização para a coleta dos dados;

Aos funcionários do CEPEC, em especial à Nilma Pinheiro, Thaiana Rabelo, Khalil Lima e Ingrid Miranda, pela disponibilidade, amizade e conhecimentos conquistados durante esses três anos.

A minha família, pela motivação que sempre souberam compartilhar. Em especial ao meus pais, Rodrigo e Euline, pelo apoio em todos os passos da minha jornada acadêmica e por serem o meu pilar durante todos esses anos. Obrigada por acreditarem e investirem em mim.

Aos professores do curso de farmácia. Em especial às professoras Leila, Ana Cláudia, Coeli, Andrea, Elizabeth, Lili e Sally pelos conhecimentos adquiridos, amizade e comprometimento para a formação profissional com qualidade e dedicação;

A turma 86 do curso de Farmácia, em especial, Laís, Suelen, Ivana, Haymê, Carol, Giuliane, Andreza, Rafaela Patrícia, Daniela, Alzirene, André Felipe, Carlos Diego, Flávio, Paulo Gabriel, Victor e Rafael por toda amizade, companheirismo, incentivos, aventuras e dificuldades que vivemos juntos durante esses cinco anos, que me fizeram amadurecer e que com certeza contribuíram para minha formação;

A LAHEL que contribuiu para os meus conhecimentos e possibilitou que eu me apaixonasse pela hematologia desde o terceiro período da graduação e aos amigos feitos em especial: André do Vale, Tone Leite e Paulo Gabriel Furtado;

Aos meus amigos do colégio, Luiza, Pedro, Gabriel, Victor, Luciana e Kaio, que me deram suporte emocional por mais de dez anos, e mesmo com a distância, nada ter mudado;

A banca examinadora que gentilmente aceitou o convite de participar na defesa desta defesa de monografia;

E a todos que cooperaram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

*“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá”.*

*(Ayrton Senna da Silva)*



## RESUMO

A citometria de fluxo não é referência para determinação do percentual de blastos para diagnóstico de leucemias agudas e outras neoplasias hematológicas, devido à perda de expressão do CD34 em alguns casos, e à tendência a maior hemodiluição dos espécimes de medula óssea usados para a citometria em relação aos primeiros espécimes colhidos para constituírem os esfregaços de medula óssea para mielograma, em razão disso, o método clássico para estimar o percentual de blastos é a microscopia (mielograma). A comparação dos resultados das metodologias pode levar a grandes inconsistências, podendo prejudicar a interpretação dos resultados. O presente trabalho se propôs a avaliar a equivalência e a correlação entre a contagem diferencial de blastos e eritroblastos em 20 pacientes com leucemia linfóide aguda e 20 pacientes sem neoplasia hematológica que tiveram exames realizados pelo Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da UFMA (CEPEC-HUUFMA) através da contagem diferencial de 200 células nucleadas da medula óssea “*recém-colhida*”, da medula óssea “*do tubo*” destinado à imunofenotipagem e da imunofenotipagem da medula óssea “*do tubo*”. Apesar de se tratar da mesma amostra biológica, a comparação de algumas das contagens diferenciais do % de blastos entre o mielograma “*recém-colhido*” com o mielograma “*do tubo*” foram discrepantes pois há hemodiluição da amostra destinada a imunofenotipagem e que há perda de eritroblastos quando a amostra é submetida a citometria de fluxo. Por isso é fundamental que a análise imunofenotípica seja atrelada a análise morfológica do aspirado de medula óssea “*recém-colhida*” que irá representar mais fidedignamente a celularidade do tecido.

**Palavras-chaves:** Medula óssea; Imunofenotipagem; Mielograma; Blastos; Eritroblastos.

## ABSTRACT

Flow cytometry is not a reference for the determination of the percentage of blasts for the diagnosis of acute leukemias and other hematological malignancies, due to the loss of CD34 expression in some cases, and to the trend towards greater hemodilution of the bone marrow specimens used for cytometry in the first specimens collected to constitute bone marrow smears for myelogram, so the classic method for estimating the percentage of blasts is microscopy (myelogram). The comparison of the results of the methodologies can lead to great inconsistencies, which may hinder the interpretation of the results. The present study aimed to evaluate the correlation between the differential count of blasts and erythroblasts in 20 patients with acute lymphoid leukemia and 20 patients without haematological malignancies who were examined by the Clinical Research Center of the University Hospital of UFMA (CEPEC-HUUFMA) through of the differential count of 200 nucleated cells from "freshly harvested" bone marrow, from "tube" bone marrow for immunophenotyping, and from "tube" bone marrow immunophenotyping, it being found that despite being the same biological sample, the comparison of some of the differential counts of the% of blasts between the "freshly harvested" myelogram with the "tube" myelogram were discrepant since there is hemodilution of the sample destined for immunophenotyping and that there is loss of erythroblasts when the sample is submitted to citometry flow. It is therefore essential that the immunophenotypic analysis be linked to the morphological analysis of the aspirate of bone marrow "freshly harvested" that will represent more reliably the cellularity of the tissue.

**Keywords:** Bone marrow; Immunophenotyping; Myelogram; Blasts; Erythroblasts.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Gráfico de regressão linear para obtenção do  $R^2$  do % de blastos obtido pelo método A e método B nos pacientes do grupo 1..... 22
- Figura 2:** Gráfico de regressão linear para obtenção do  $R^2$  do % de blastos obtido pelo método A e método C nos pacientes do grupo 1..... 24
- Figura 3:** Gráfico de regressão linear para obtenção do  $R^2$  do % de blastos obtido pelo método B e método C nos pacientes do grupo 1..... 26
- Figura 4:** Gráfico de regressão linear para obtenção do  $R^2$  do % de eritroblastos obtido pelo método A e método B nos pacientes do grupo 2. .... 28
- Figura 5:** Gráfico de regressão linear para obtenção do  $R^2$  do % de eritroblastos obtido pelo método A e método C nos pacientes do grupo 2. .... 30
- Figura 6:** Gráfico de regressão linear para obtenção do  $R^2$  do % de eritroblastos obtido pelo método B e método C nos pacientes do grupo 2. .... 32

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Estudo comparativo entre a contagem diferencial dos blastos obtida por mielograma da medula óssea entre os métodos A e B nos pacientes do grupo 1. ....	21
<b>Tabela 2:</b> Estudo comparativo entre a contagem diferencial dos blastos obtida por mielograma da medula óssea entre os métodos A e C nos pacientes do grupo 1. ....	23
<b>Tabela 3:</b> Estudo comparativo entre a contagem diferencial dos blastos obtida por mielograma da medula óssea entre os métodos B e C nos pacientes do grupo 1. ....	25
<b>Tabela 4:</b> Estudo comparativo entre a contagem diferencial dos eritroblastos obtida por mielograma da medula óssea entre os métodos A e B nos pacientes do grupo 2 .....	27
<b>Tabela 5:</b> Estudo comparativo entre a contagem diferencial dos eritroblastos obtida por mielograma da medula óssea entre os métodos A e C nos pacientes do grupo 2 .....	29
<b>Tabela 6:</b> Estudo comparativo entre a contagem diferencial dos eritroblastos obtida por mielograma da medula óssea entre os métodos B e C nos pacientes do grupo 2.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEPEC – Centro de Pesquisa Clínica

CMF – Citometria de Fluxo

F – Feminino

Ht – Hematócrito

HUUFMA – Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão

IMF – Imunofenotipagem

IMOAB – Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo

LLA – Leucemia Linfóide Aguda

M – Masculino

NRBC – Eritroblastos

OMS – Organização Mundial da Saúde

PI – Plaquetas

Prec. Mielóides – Precursores mielóides

RBC – Red Blood Cells (eritrócitos)

S. granulocítica – Série granulocítica

S. monocítica – Série monocítica

UFMA – Universidade Federal do Maranhão

WBC – White Blood Cells (leucócitos)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
3. OBJETIVOS .....	17
3.1. Objetivo Geral.....	17
3.2. Objetivos Específicos.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
5.1. Avaliação de discrepâncias entre as contagens de blastos para o grupo 1 .....	20
5.2. Avaliação de discrepâncias entre as contagens de blastos para o grupo 2 .....	26
6. CONCLUSÃO .....	33
REFERÊNCIAS .....	34
ANEXO A – Tabela de Rumke para comparação das contagens entre os métodos A, B e C .....	35
APÊNDICE A - Dados do hemograma dos pacientes do grupo 1 .....	36
APÊNDICE B - Dados do hemograma dos pacientes do grupo 2 .....	37
APÊNDICE C - Contagem diferencial com a média da contagem de 200 células do mielograma da medula óssea “recém-colhida” dos pacientes do grupo 1 .....	38
APÊNDICE D - Contagem diferencial com a média da contagem de 200 células do mielograma da medula óssea “recém-colhida” dos pacientes do grupo 2 .....	39
APÊNDICE E - Contagem diferencial com a média da contagem de 200 células do mielograma da medula óssea “do tubo” dos pacientes do grupo 1 .....	40
APÊNDICE F - Contagem diferencial com a média da contagem de 200 células do mielograma da medula óssea “do tubo” dos pacientes do grupo 2 .....	41
ANEXO G - Contagem diferencial da imunofenotipagem proveniente da medula óssea “do tubo” do grupo 1 .....	42
APÊNDICE H - Contagem diferencial da imunofenotipagem proveniente da medula óssea “do tubo” do grupo 2 .....	43

## 1. INTRODUÇÃO

Por mais de duas décadas, a imunofenotipagem vem fornecendo informações relevantes para o diagnóstico, classificação e monitoramento de neoplasias hematológicas. (FOON *et al*, 1986; van DONGEN *et al*, 1988). A imunofenotipagem juntamente com o mielograma, é crucial para a identificação, enumeração e caracterização de células de leucemias e linfomas. (SWERDLLOW *et al*, 2016).

Os primeiros sistemas de classificação das neoplasias hematológicas eram baseados somente em investigações citomorfológicas e citoquímicas. A morfologia ainda representa um modelo central, mas foi incorporada em sistemas de classificações atuais, como imunofenotipagem para um delineamento mais preciso da linhagem hematopoiética, e estágio de diferenciação de leucemias em particular. Assim, na atualidade, o diagnóstico e a classificação das neoplasias hematológicas apoiam-se, em grande parte, nos estudos imunofenotípicos por citometria de fluxo, permitindo avançar na identificação de determinados subgrupos dificilmente classificáveis do ponto de vista morfológico (DOUER, 2003; SZCZEPANSKI, *et al*, 2003).

De acordo com o *guideline* da classificação OMS de 2016 para as neoplasias hematológicas agudas, deve-se fazer uma análise morfológica prévia à análise imunofenotípica. Segundo a OMS: a determinação do percentual de blastos pela análise imunológica do CD34+ por citometria não é recomendada como substituto da contagem morfológica dos blastos por microscopia, devido à perda de expressão do CD34 em alguns casos, e à tendência a maior hemodiluição dos espécimes de medula óssea usados para a citometria em relação aos primeiros espécimes colhidos para constituírem os esfregaços de medula óssea. A imunofenotipagem é imprescindível para a determinação da linhagem e da sublinhagem do blasto (SWERDLLOW *et al.*, 2016).

Considerando que apesar de todas as suas referidas vantagens, a citometria de fluxo não é referência para determinação do percentual de blastos para diagnóstico de leucemias agudas e outras neoplasias hematológicas, este trabalho se propõe a avaliar e comparar os valores percentuais de células nucleadas obtidos pelo mielograma do aspirado de medula óssea “*recém-colhido*” com a amostra destinada à imunofenotipagem através do mielograma “*do tubo*” e da imunofenotipagem “*do tubo*” em 20 pacientes com leucemias agudas e 20 pacientes sem neoplasia hematológica.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

O diagnóstico de neoplasias hematológicas requer a combinação de achados clínicos e laboratorial. Neste, é essencial a combinação da análise morfológica do sangue periférico e medula óssea juntamente com a imunofenotipagem. O estudo imunofenotípico permite diferenciar a doença clonal de reacional ou benigna e caracterização da célula neoplásica (OLIVEIRA, 2015).

O método clássico para estimar o percentual de blastos é a microscopia (mielograma), embora, por analisar milhares de células, a citometria de fluxo (CMF) seja um método muito preciso em estimar o percentual de células imaturas na amostra. No entanto, limitações inerentes ao procedimento de coleta podem prejudicar a interpretação dos resultados e pode haver grandes inconsistências se os métodos forem comparados para este fim. As amostras enviadas à CMF frequentemente contêm menos espículas ósseas e são mais diluídas com sangue periférico quando comparadas às amostras usadas para preparar a distensão da microscopia (mielograma). Por outro lado, o denominador usado para determinar a porcentagem de blastos é diferente entre os métodos. Nas contagens por microscopia, o denominador são as células nucleadas, e, na CMF, são todas as células analisadas, sendo que, usualmente, antes da imunofenotipagem é feita a lise de eritrócitos, o que leva à lise variável de eritroblastos. Devido a estas limitações, a microscopia ainda representa o método de escolha nos dias de hoje para a contagem de blastos (ORAZI, 2007).

Existe um problema técnico adicional na obtenção de contagens de blastos reprodutíveis de aspirados de medula óssea que contêm uma quantidade variável de sangue misturado com as células imaturas residentes na medula (BAIN, 2001). Dependendo da técnica usada para obter o aspirado e a quantidade total de amostra, as células imaturas estão contaminadas com células maduras do sangue. A falta de correlação entre a contagem de blastos na morfologia e na contagem por citometria de fluxo ocorre, em partes, devido à variabilidade da hemodiluição do espécime (ISLAM, 2007; WILKINS *et al*, 1988; DOUGLAS *et al*, 1989).

A carga total de células clonais pode, no entanto, parecer falsamente baixa em um aspirado de medula óssea hemodiluída e é um dos principais fatores de confusão no diagnóstico e monitorização de neoplasias hematológicas. Quando se analisa a contagem em citometria de fluxo em pacientes neoplásicos, como uma porcentagem de todos os eventos adquiridos, pode não haver uma correlação entre as porcentagens das células clonais e os resultados do mielograma (LOKEN *et al*, 2009).



É importante mencionar que em neoplasias agudas, mieloides ou linfoides, os blastos podem perder a expressão do CD34 (principal marcador de imaturidade), do HLA-DR (outro antígeno de imaturidade), do CD45 e pode haver perda do marcador TdT em LLA. Tudo isso reforça a importância de uma análise associada entre morfologia e imunofenótipo (OLIVEIRA *et al*, 2016).

Dessa forma o presente trabalho pretende fazer um estudo comparativo entre a contagem diferencial de células nucleadas do esfregaço do aspirado de medula óssea “*recém-colhida*” e os valores obtidos da contagem diferencial do mielograma e imunofenotipagem “*do tubo*”.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Comparar a contagem diferencial de células nucleadas feito a partir de esfregaço de medula óssea recém-colhida (mielograma “*recém-colhido*”), com a contagem diferencial morfológica da medula óssea destinada à imunofenotipagem (mielograma “*do tubo*”) e por análise imunofenotípica (imunofenotipagem “*do tubo*”) obtidas da amostra do tubo enviado para imunofenotipagem em pacientes hematológicos.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar se há ou não diferenças percentuais significativas (discrepâncias) entre a contagem diferencial de células nucleadas obtidos pelo mielograma “*recém-colhido*” em relação ao mielograma “*do tubo*” e a imunofenotipagem “*do tubo*”;
- Avaliar a correlação entre os valores percentuais de células nucleadas obtidos pelo mielograma “*recém-colhido*” em relação ao mielograma “*do tubo*” e a imunofenotipagem “*do tubo*”;

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho realizou um estudo observacional através da coleta de dados retrospectivos, referentes à contagem diferencial de células nucleadas em citometria de fluxo, mielograma de medula óssea recém-coletada e de amostra (“do tubo”) destinada à imunofenotipagem em 40 pacientes, separados em dois grupos, no primeiro grupo (grupo 1) foram incluídos 20 pacientes com leucemias linfoides agudas com < 20% de blastos em sangue periférico (APÊNDICE A) e no segundo grupo (grupo 2) incluiu-se 20 pacientes sem neoplasia hematológica (APÊNDICE B), da rotina do Serviço de Diagnóstico Oncohematológico realizado pelo Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da UFMA (CEPEC) ao Instituto Maranhense de Oncologia Hospital Aldenora Bello (IMOAB).

Todos os pacientes incluídos no grupo 1 neste trabalho possuíam diagnóstico de leucemia linfóide aguda e os pacientes incluídos no grupo 2 não tinham critério de neoplasia hematológica. Os pacientes de ambos os grupos obrigatoriamente haviam realizado imunofenotipagem e mielograma no Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da UFMA e possuíam lâminas coradas de medula óssea provenientes da seringa da amostra recém colhida e do tubo destinado à imunofenotipagem.

Dessa forma foram avaliados a contagem diferencial do total de células nucleadas por três diferentes métodos: mielogramas das lâminas de medula óssea “recém-colhida” (APÊNDICES C e D), das lâminas com a medula óssea “do tubo” (APÊNDICES E e F) destinado à imunofenotipagem e da imunofenotipagens (APÊNDICES G e H) de 40 da nossa casuística.

- Método A (Mielograma da lâmina): contagem diferencial de 200 células nucleadas do mielograma do esfregaço do aspirado de medula óssea da “seringa recém-colhida” (método de referência).
- Método B (Mielograma “do tubo”): contagem diferencial de 200 células nucleadas do mielograma do aspirado de medula óssea coletado para o tubo da imunofenotipagem.
- Método C (Imunofenotipagem “do tubo”): contagem diferencial feita por imunofenotipagem do aspirado de medula óssea coletado para o tubo da imunofenotipagem .

Para análise de equivalência das contagens diferenciais do total de células nucleadas entre imunofenotipagem e mielograma “*recém-colhido*” e mielograma “*do tubo*” dos grupos 1 e 2 foi utilizada a tabela de Rumke CL, 1960 (ANEXO A) para avaliar se há discrepâncias nas variações das contagens do total de células nucleadas entre os métodos A, B e C.

Para avaliação da correlação entre as contagens de blastos para o grupo 1 entre os métodos A, B e C e para avaliação da correlação entre as contagens de eritroblastos para o grupo 2 de casos com discrepâncias entre as contagens de eritroblastos para o grupo 2 foram aplicados os testes de regressão linear com  $R^2$  com definição da equação da reta no programa Windows Excel.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo comparativo visou avaliar a equivalência entre a contagem diferencial de células nucleadas do esfregaço do aspirado de medula óssea “*recém-colhida*” e os valores obtidos da contagem diferencial do mielograma e imunofenotipagem “*do tubo*”.

### 5.1. Avaliação de discrepâncias entre as contagens de blastos para o grupo 1

O estudo comparativo visou avaliar a equivalência entre a contagem diferencial de blastos obtida entre os métodos A, B e C nos diferentes grupos.

Os resultados obtidos na tabela 1 demonstram que houve subestimação significativa da contagem de blastos pelo método B em comparação ao método A em 40% dos pacientes (pacientes 1, 3, 6, 8, 9, 11, 12 e 15). Isto muito provavelmente pode ter decorrido devido a hemodiluição das amostras do aspirado coletado no tubo para avaliação da imunofenotipagem em relação aos primeiros espécimes de medula coletada de onde são feitas as lamina no método A (com pouca hemodiluição).

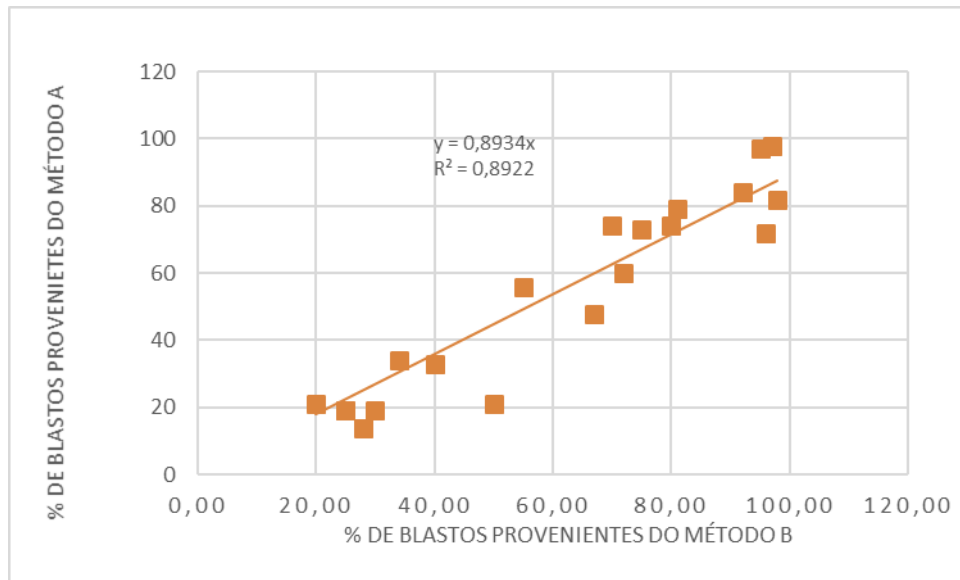
Essas discrepâncias demonstram que, de fato, a definição de blastos deveria ser da amostra recém-colhida pois está menos propensa à hemodiluição em comparação com as amostras coletadas para o tubo principalmente quando as amostras avaliadas são de pacientes com poucos blastos no sangue, como ocorre em boa parte das LLA cuja medula óssea já demonstra estar com % relevante de blastos, apesar de poucos blastos no sangue. Os espécimes de sangue com poucos blastos tendem a diminuir o % total de blastos no aspirado de medula óssea do tubo.

**Tabela 1:** Estudo comparativo entre a contagem diferencial dos blastos obtida por mielograma da medula óssea entre os métodos A e B nos pacientes do grupo 1.

<b>Pacientes</b>	<b>(%) blastos obtidos pelo Método A</b>	<b>(%) blastos obtidos pelo Método B</b>
<b>Paciente 01</b>	30,00	20,00
<b>Paciente 02</b>	80,00	74,00
<b>Paciente 03</b>	92,00	84,00
<b>Paciente 04</b>	95,00	95,00
<b>Paciente 05</b>	20,00	20,00
<b>Paciente 06</b>	98,00	80,00
<b>Paciente 07</b>	75,00	72,00
<b>Paciente 08</b>	72,00	60,00
<b>Paciente 09</b>	67,00	42,00
<b>Paciente 10</b>	70,00	72,00
<b>Paciente 11</b>	96,00	70,00
<b>Paciente 12</b>	50,00	22,00
<b>Paciente 13</b>	55,00	55,00
<b>Paciente 14</b>	81,00	74,00
<b>Paciente 15</b>	28,00	14,00
<b>Paciente 16</b>	25,00	21,00
<b>Paciente 17</b>	97,00	95,00
<b>Paciente 18</b>	40,00	35,00
<b>Paciente 19</b>	34,00	34,00
<b>Paciente 20</b>	25,00	20,00

Aplicando-se o gráfico de regressão linear  $R^2$  e equação da reta (Figura 1), a representatividade da variável x (% de blastos obtidos pelo método A) em relação a variável y (% de blastos obtidos pelo método B) foi de  $y = 0,89x$ . O  $R^2$  foi utilizado para medir o grau da correlação linear entre o % de blastos provenientes do método A e o % de blastos provenientes do método B, obtendo-se o valor positivo relativamente satisfatório de 0,892.

**Figura 1:** Gráfico de regressão linear para obtenção do  $R^2$  e equação da reta do % de blastos obtido pelo método A e método B nos pacientes do grupo 1.



De modo semelhante ao ocorrido entre os métodos A e B, os resultados obtidos na tabela 2 demonstram novamente subestimação da contagem de blastos no tubo pela imunofenotipagem (método C) em relação ao método A em 40% dos pacientes (pacientes 1, 3, 8, 9, 11, 12 e 15). Isto reforça a regra que a definição do % de blastos deve ser feita pela morfologia do esfregaço “*recém-colhido*”, mas não pelo % de blastos obtidos por imunofenotipagem. Desse modo é prudente que no laudo da imunofenotipagem deva incluir o dado morfológico do percentual de blastos definidos pela morfologia e a imunofenotipagem tenha a missão de caracterizar a linhagem e fase maturativa dos blastos. Isso implicaria na liberação no laudo da imunofenotipagem o % morfológico de blastos definidos pela amostra recém-colhida, o que não é uma regra nos diferentes serviços de imunofenotipagem. Nossos dados estão de acordo com o que preconiza a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) que dita que o percentual de blastos deve ser definido pela morfologia na lâmina nos primeiros espécimes de medula coletado (com mínima hemodiluição), mas não pela imunofenotipagem.

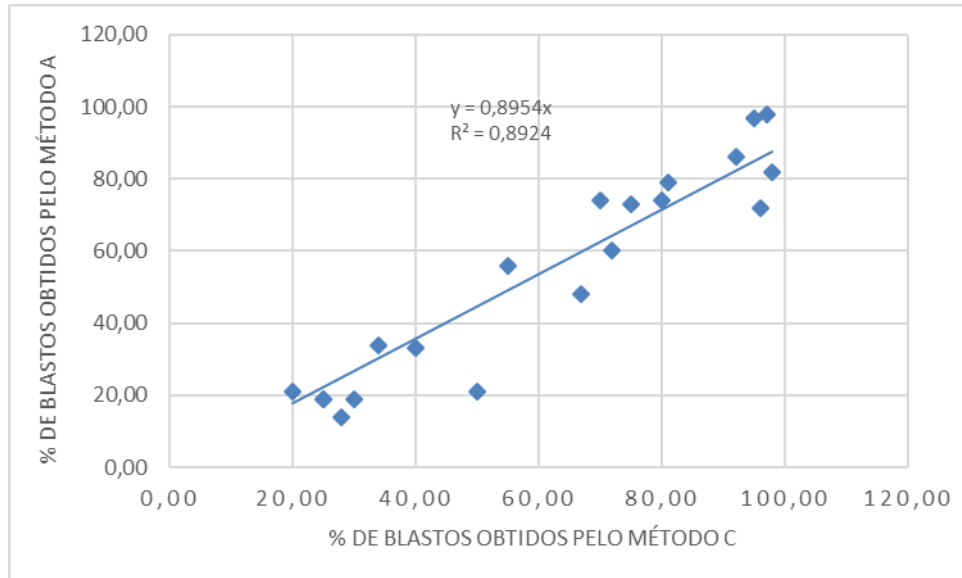
**Tabela 2:** Estudo comparativo entre a contagem diferencial dos blastos obtida por mielograma da medula óssea entre os métodos A e C nos pacientes do grupo 1.

Pacientes	(%) blastos obtidos pelo Método A	(%) blastos obtidos pelo Método C
Paciente 01	30,00	19,00
Paciente 02	80,00	74,00
Paciente 03	92,00	86,00
Paciente 04	95,00	97,00
Paciente 05	20,00	21,00
Paciente 06	98,00	82,00
Paciente 07	75,00	73,00
Paciente 08	72,00	60,00
Paciente 09	67,00	48,00
Paciente 10	70,00	74,00
Paciente 11	96,00	72,00
Paciente 12	50,00	21,00
Paciente 13	55,00	56,00
Paciente 14	81,00	79,00
Paciente 15	28,00	14,00
Paciente 16	25,00	19,00
Paciente 17	97,00	98,00
Paciente 18	40,00	33,00
Paciente 19	34,00	34,00
Paciente 20	25,00	19,00

Aplicando-se o gráfico de regressão linear e equação da reta (Figura 2), a representatividade da variável x (% de blastos obtidos pelo método A) em relação a variável y (% de blastos obtidos pelo método C) foi de  $y = 0,89x$ , reforçando que a imunofenotipagem isoladamente não irá representar fidedignamente o % de blastos em relação a amostra proveniente da medula óssea “*recém-colhida*”, assim como o mielograma “*do tubo*”. O  $R^2$  foi utilizado para medir o grau da correlação linear entre o (%) de blastos provenientes do método A e o (%) de blastos provenientes do método B, obtendo-se o valor de 0,892, ou seja, uma correlação positiva satisfatória, com um valor muito próximo ao obtido pela comparação entre os métodos A e B.



**Figura 2:** Gráfico de regressão linear para obtenção do  $R^2$  e equação da reta do % de blastos obtido pelo método A e método C nos pacientes do grupo 1.



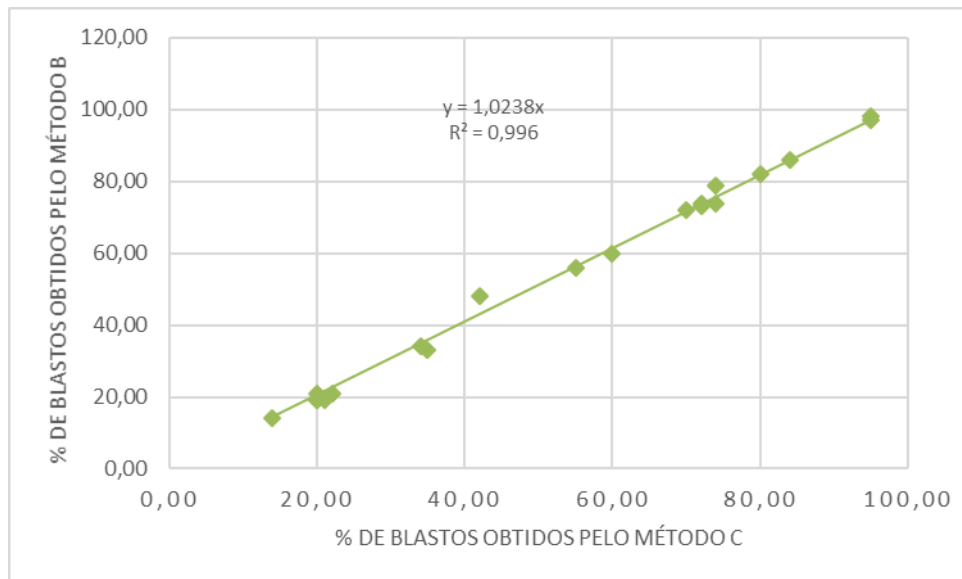
Através dos resultados obtidos na tabela 3, pelos métodos B e C, foi percebido que não houve subestimação do número de blastos em nenhum dos pacientes pela imunofenotipagem em relação ao mielograma “do tubo” (método B) e que a contagem dos blastos da imunofenotipagem da medula-óssea “do tubo” possui melhor equivalência com o mielograma da medula-óssea “do tubo”, e que ambas são subestimadas em relação ao mielograma da medula-óssea “recém-colhida”, provando que há hemodiluição na amostra “do tubo” para realização da imunofenotipagem em relação aos primeiros espécimes de medula coletado de onde são feitas as lâminas (com pouca hemodiluição), reforçando que o percentual de blastos a ser considerado é o do mielograma da medula óssea “recém-colhida” como preconizado pela OMS, e que a imunofenotipagem é necessária para definição de linhagem e estágio de diferenciação do blasto.

**Tabela 3:** Estudo comparativo entre a contagem diferencial dos blastos obtida por mielograma da medula óssea entre os métodos B e C nos pacientes do grupo 1.

Pacientes	(%) blastos obtidos pelo Método B	(%) blastos obtidos pelo Método C
Paciente 01	20,00	19,00
Paciente 02	74,00	74,00
Paciente 03	84,00	86,00
Paciente 04	95,00	97,00
Paciente 05	20,00	21,00
Paciente 06	80,00	82,00
Paciente 07	72,00	73,00
Paciente 08	60,00	60,00
Paciente 09	42,00	48,00
Paciente 10	72,00	74,00
Paciente 11	70,00	72,00
Paciente 12	22,00	21,00
Paciente 13	55,00	56,00
Paciente 14	74,00	79,00
Paciente 15	14,00	14,00
Paciente 16	21,00	19,00
Paciente 17	95,00	98,00
Paciente 18	35,00	33,00
Paciente 19	34,00	34,00
Paciente 20	20,00	19,00

Aplicando-se o gráfico de regressão linear (Figura 3) e equação da reta, a representatividade da variável x (% de blastos método B) em relação a variável y (% de blastos provenientes do método C) foi de  $y = 1,02x$ , representando quase a unidade. O  $R^2=0,996$  foi próximo a 1 demonstrando uma excelente correlação, bem superior às encontradas quando comparadas ao método A, reforçando que a medula óssea enviada para imunofenotipagem é diluída em sangue periférico.

**Figura 3:** Gráfico de regressão linear para obtenção do  $R^2$  e equação da reta do % de blastos obtido pelo método B e método C nos pacientes do grupo 1.



## 5.2. Avaliação de discrepâncias entre as contagens de eritroblastos para o grupo 2

O estudo comparativo visou avaliar a equivalência entre os eritroblastos na contagem diferencial obtida entre os métodos A, B e C nos diferentes grupos.

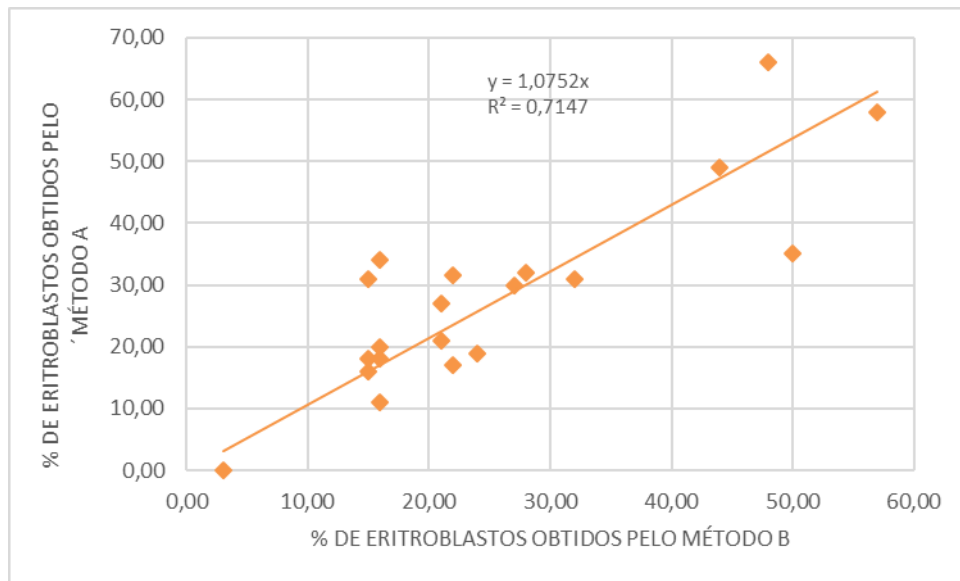
Os resultados obtidos na tabela 4 mostra que houve superestimação significativa da contagem de eritroblastos pelo método B em comparação ao método A em 20% dos pacientes (pacientes 25, 33, 35 e 40). Isto muito provavelmente pode ter decorrido devido a esses pacientes possuírem eritroblastos em sangue periférico, sugerindo hemodiluição das amostras do aspirado coletado no tubo para avaliação da imunofenotipagem em relação aos primeiros espécimes de medula coletada de onde são feitas as lamina no método A (com pouca hemodiluição). A tabela 4 também mostra que houve subestimação significativa da contagem de eritroblastos pelo método B em comparação ao método A em 5% dos pacientes (paciente 28), provavelmente devido a hemodiluição por parte dos granulócitos maduros.

**Tabela 4:** Estudo comparativo entre a contagem diferencial dos eritroblastos obtida por mielograma da medula óssea entre os métodos A e B nos pacientes do grupo 2

<b>Pacientes</b>	<b>(%) eritroblastos obtidos pelo Método A</b>	<b>(%) eritroblastos obtidos pelo Método B</b>
<b>Paciente 21</b>	24,00	19,00
<b>Paciente 22</b>	44,00	49,00
<b>Paciente 23</b>	22,00	17,00
<b>Paciente 24</b>	3,00	0,00
<b>Paciente 25</b>	15,00	31,00
<b>Paciente 26</b>	15,00	18,00
<b>Paciente 27</b>	57,00	58,00
<b>Paciente 28</b>	50,00	35,00
<b>Paciente 29</b>	32,00	31,00
<b>Paciente 30</b>	28,00	32,00
<b>Paciente 31</b>	16,00	11,00
<b>Paciente 32</b>	21,00	27,00
<b>Paciente 33</b>	16,00	34,00
<b>Paciente 34</b>	21,00	21,00
<b>Paciente 35</b>	48,00	66,00
<b>Paciente 36</b>	15,00	16,00
<b>Paciente 37</b>	16,00	20,00
<b>Paciente 38</b>	27,00	30,00
<b>Paciente 39</b>	16,00	18,00
<b>Paciente 40</b>	22,00	31,50

Aplicando-se o gráfico de regressão linear e equação da reta (Figura 4), a representatividade da variável x (% de eritroblastos obtidos pelo método A) em relação a variável y (% de eritroblastos obtidos pelo método B) foi de  $y = 1,07x$ . O  $R^2$  foi utilizado para medir o grau da correlação linear entre a % de eritroblastos provenientes do método A e % de eritroblastos provenientes do método B, obtendo-se um valor não satisfatório de 0,715.

**Figura 4:** Gráfico de regressão linear para obtenção do  $R^2$  e equação da reta do % de eritroblastos obtido pelo método A e método B nos pacientes do grupo 2.



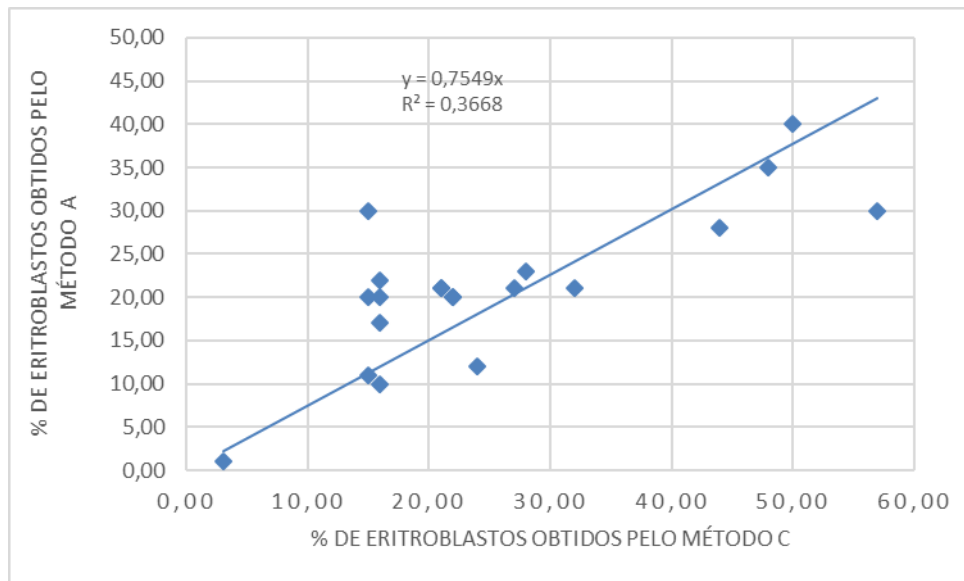
De modo semelhante ao ocorrido entre os métodos A e B, os resultados obtidos na tabela 5 demonstra novamente subestimação da contagem de eritroblastos no tubo pela imunofenotipagem (método C) em relação ao método A (mielograma da lâmina “recém-colhida”) em 30% dos pacientes (pacientes 21, 22, 27, 28, 29 e 35). Isto reforça a hipótese que quando a medula óssea é submetida a CMF, pode haver perda variável de eritroblastos, já que a técnica possui uma fase de lise no preparo da reação para promover o rompimento dos eritrócitos, assim, removendo também parte das células nucleadas eritroides mais maduras. Em 1 paciente (paciente 25) houve superestimação da contagem de eritroblastos devido à presença dos mesmos em sangue periférico, provando que há hemodiluição das amostras do aspirado coletado no tubo para avaliação da imunofenotipagem. Tudo isso pode dificultar o diagnóstico das eritroleucemias isoladamente por citometria de fluxo, já que o critério diagnóstico requer  $> 50\%$  de precursores eritroides e  $> 20\%$  de mieloblastos do total de células nucleadas.

**Tabela 5:** Estudo comparativo entre a contagem diferencial dos eritroblastos obtida por mielograma da medula óssea entre os métodos A e C nos pacientes do grupo 2

Pacientes	(%) eritroblastos obtidos pelo Método A	(%) eritroblastos obtidos pelo Método C
Paciente 21	24,00	12,00
Paciente 22	44,00	28,00
Paciente 23	22,00	20,00
Paciente 24	3,00	1,00
Paciente 25	15,00	30,00
Paciente 26	15,00	20,00
Paciente 27	57,00	30,00
Paciente 28	50,00	40,00
Paciente 29	32,00	21,00
Paciente 30	28,00	23,00
Paciente 31	16,00	10,00
Paciente 32	21,00	21,00
Paciente 33	16,00	22,00
Paciente 34	21,00	21,00
Paciente 35	48,00	35,00
Paciente 36	15,00	11,00
Paciente 37	16,00	17,00
Paciente 38	27,00	21,00
Paciente 39	16,00	20,00
Paciente 40	22,00	20,00

Aplicando-se o gráfico de regressão linear e equação da reta (Figura 5), a representatividade da variável x (% de eritroblastos obtidos pelo método A) em relação a variável y (% de eritroblastos obtidos pelo método C) foi de  $y = 0,75x$ . O  $R^2$  foi utilizado para medir o grau da correlação linear entre a % de blastos provenientes do método A e % de blastos provenientes do método C, obtendo-se o valor de 0,36 que é considerado bem insatisfatório.

**Figura 5:** Gráfico de regressão linear para obtenção do  $R^2$  e equação da reta do % de eritroblastos obtido pelo método A e método C nos pacientes do grupo 2.



Através dos resultados obtidos na tabela 6, através dos métodos B e C, foi percebido que houve subestimação do número de eritroblastos em 35% dos pacientes (pacientes 22, 27, 29, 33, 35, 38 e 40) pela imunofenotipagem (método C) em relação ao mielograma “do tubo” (método B), provando que há perda de eritroblastos na etapa de lise de eritrócitos quando a medula óssea “do tubo” é submetida a CMF e conseqüentemente dificultando o diagnóstico de doenças em que seu % é critério de diagnóstico, além de que quando o % de uma linhagem é subestimada, outra linhagem será superestimada, podendo ocasionar diagnósticos equivocados caso não haja uma análise morfológica prévia.

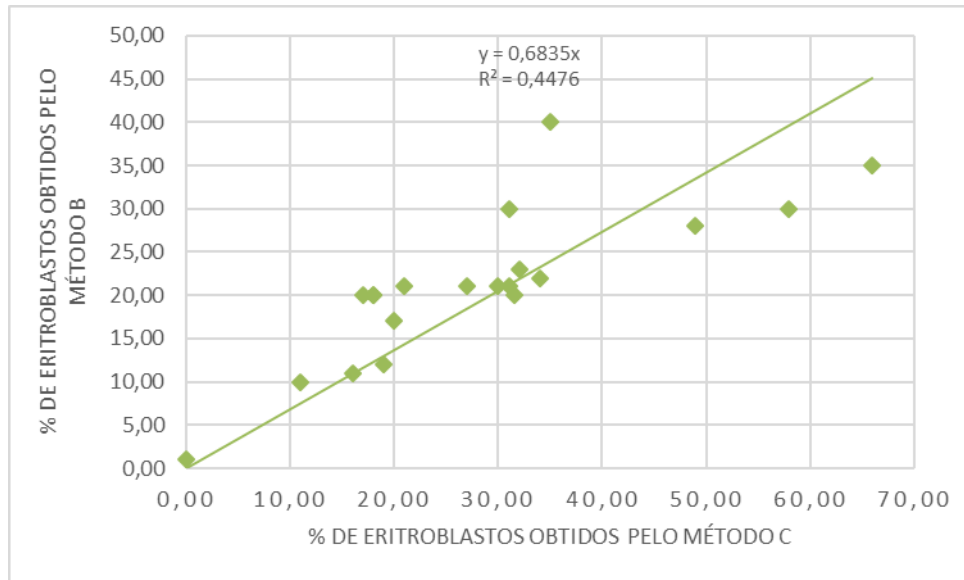
**Tabela 6:** Estudo comparativo entre a contagem diferencial dos eritroblastos obtida por mielograma da medula óssea entre os métodos B e C nos pacientes do grupo 2

Pacientes	(%) eritroblastos obtidos pelo Método B	(%) eritroblastos obtidos pelo Método C
Paciente 21	19,00	12,00
Paciente 22	49,00	28,00
Paciente 23	17,00	20,00
Paciente 24	0,00	1,00
Paciente 25	31,00	30,00
Paciente 26	18,00	20,00
Paciente 27	58,00	30,00
Paciente 28	35,00	40,00
Paciente 29	31,00	21,00
Paciente 30	32,00	23,00
Paciente 31	11,00	10,00
Paciente 32	27,00	21,00
Paciente 33	34,00	22,00
Paciente 34	21,00	21,00
Paciente 35	66,00	35,00
Paciente 36	16,00	11,00
Paciente 37	20,00	17,00
Paciente 38	30,00	21,00
Paciente 39	18,00	20,00
Paciente 40	31,50	20,00

Aplicando-se o gráfico de regressão linear e equação da reta (Figura 6), a representatividade da variável x (% de eritroblastos provenientes da medula-óssea “do tubo”) em relação a variável y (% de eritroblastos provenientes da imunofenotipagem da medula óssea “do tubo”) foi de  $y = 0,68x$ , ou seja, comprovando que há subestimação do % de eritroblastos na imunofenotipagem quando comparadas ao método B, reforçando que a medula óssea enviada para imunofenotipagem sofre perda de eritroblastos na etapa de lise de eritrócitos. Aplicou-se o  $R^2$  para medir o grau da correlação linear entre a % de eritroblastos obtidos pelo método B e a % de eritroblastos provenientes obtidos pelo método C, obtendo-se o valor de 0,447, entre as duas variáveis, sendo considerado insatisfatório.



**Figura 6:** Gráfico de regressão linear para obtenção do  $R^2$  e equação da reta do % de eritroblastos obtido pelo método B e método C nos pacientes do grupo 2.



## 6. CONCLUSÃO

O estudo comparativo da contagem diferencial do esfregaço do aspirado de medula óssea *recém-colhida* para com a amostra do tubo destinada à imunofenotipagem provou que apesar da utilização da mesma amostra, os resultados obtidos pelos três métodos (mielograma da medula óssea “*recém-colhida*”, mielograma “*do tubo*” e imunofenotipagem “*do tubo*”) podem ser diferentes e o uso isolado da imunofenotipagem é recomendado.

Serviços que realizam imunofenotipagem devem considerar que a medula óssea submetida a citometria podem estar hemodiluídas devido a procedimentos de coleta, modificando o % de blastos, e que as próprias etapas da bancada de imunofenotipagem podem lisar algumas células nucleadas, podendo subestimar a contagem de eritroblastos, alterando o laudo e comprometendo o diagnóstico do paciente. Por isso é fundamental que a análise imunofenotípica seja atrelada a análise morfológica do aspirado de medula óssea “*recém-colhida*” que irá representar mais fidedignamente a celularidade do tecido. Por esse motivo, a OMS preconiza que o percentual de blastos a ser considerado é o da medula óssea *recém-colhida* e todo laudo de imunofenotipagem deveria constar o percentual de blastos obtidos pela morfologia, a fim de guiar o médico para melhor conduta terapêutica.

## REFERÊNCIAS

- DOUER, D. **The epidemiology of acute promyelocytic leukemia.** Best Pract Res Clin Haematol, v. 16, n. 3, p. 357-67, 2003.
- DOUGLAS DD, RISSDALL RJ. **Bone marrow biopsy technic.** Artifact induced by aspiration. Am J Clin Pathol 1984; 82: 92–94.
- FOON KA, TODD RF. **Immunologic classification of leukemia and lymphoma.** Blood. 1986.
- ISLAM A. **Bone marrow aspiration before bone marrow core biopsy using the same bone marrow biopsy needle: A good or bad practice?** J Clin Pathol 2007; 60: 212–215.
- LOKEN MR, CHU S- C, FRITSCHLE W, KALNOSKI M, WELLS DA. **Normalization of Bone Marrow Aspirates for Hemodilution in Flow Cytometric Analyses.** Cytometry Part B 2009; 76B: 27–36
- OLIVEIRA, R.A. **Hemograma: como fazer e interpretar.** 2ª Edição, RED publicações. São Paulo-SP. 2015.
- OLIVEIRA, R.A.; PEREIRA, J.; BEITLER, B. **Mielograma e Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo em Hematologia.** Rocca. São Paulo, 2016
- ORAZI, A. **Histopathology in the diagnosis and classification of acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and myelodysplastic/myeloproliferative diseases.** Pathobiology. 2007;74 (2): 97-114.
- SWERDLOW S.H, CAMPO E, HARRIS N.L, *et al.* **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.** Lyon, France: IARC Press; 2008.
- SWERDLOW SH, CAMPO E, PILERI SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. **The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms.** Blood 2016.
- SZCZEPANSKI, T.; van VELDEN, V.H.J.; van DONGEN, J.J.M. **Classification systems for acute and chronic leukemias.** Best Pract Res Clin Haematol, v. 16, n. 4, p. 561-82, 2003.
- van DONGEN JJ, ADRIAANSEN HJ, HOOIJKAAS H. **Immunophenotyping of leukaemias and non-Hodgkin's lymphomas. Immunological markers and their CD codes.** Neth J Med. 1988;33:298–314.
- WILKINS BS, O'BRIEN CJ. **Techniques for obtaining differential cell counts from bone marrow trephine biopsy specimens.** J Clin Pathol 1988; 41: 558–561.

## ANEXO A – Tabela de Rumke para comparação das contagens entre os métodos A, B e C

NINETY-FIVE PER CENT CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS PERCENTAGES OF BLOOD CELLS OF A GIVEN TYPE AS DETERMINED BY DIFFERENTIAL COUNTS					
a	n = 100	n = 200	n = 500	n = 1000	n = 10,000
0	0.0– 3.6	0.0– 1.8	0.0– 0.7	0.0– 0.4	0.0– 0.1
1	0.0– 5.4	0.1– 3.6	0.3– 2.3	0.5– 1.8	0.8– 1.3
2	0.2– 7.0	0.6– 5.0	1.0– 3.6	1.2– 3.1	1.7– 2.3
3	0.6– 8.5	1.1– 6.4	1.7– 4.9	2.0– 4.3	2.6– 3.4
4	1.1– 9.9	1.7– 7.7	2.5– 6.1	2.9– 5.4	3.6– 4.5
5	1.6– 11.3	2.4– 9.0	3.3– 7.3	3.7– 6.5	4.5– 5.5
6	2.2– 12.6	3.1– 10.2	4.1– 8.5	4.6– 7.7	5.5– 6.5
7	2.9– 13.9	3.9– 11.5	4.9– 9.6	5.5– 8.8	6.5– 7.6
8	3.5– 15.2	4.6– 12.7	5.8– 10.7	6.4– 9.9	7.4– 8.6
9	4.2– 16.4	5.4– 13.9	6.6– 11.9	7.3– 10.9	8.4– 9.6
10	4.9– 17.6	6.2– 15.0	7.5– 13.0	8.2– 12.0	9.4– 10.7
15	8.6– 23.5	10.4– 20.7	12.0– 18.4	12.8– 17.4	14.3– 15.8
20	12.7– 29.2	14.7– 26.2	16.6– 23.8	17.6– 22.6	19.2– 20.8
25	16.9– 34.7	19.2– 31.6	21.3– 29.0	22.3– 27.8	24.1– 25.9
30	21.2– 40.0	23.7– 36.9	26.0– 34.2	27.2– 32.9	29.1– 31.0
35	25.7– 45.2	28.4– 42.0	30.8– 39.4	32.0– 38.0	34.0– 36.0
40	30.3– 50.3	33.2– 47.1	35.7– 44.4	36.9– 43.1	39.0– 41.0
45	35.0– 55.3	38.0– 52.2	40.6– 49.5	41.9– 48.1	44.0– 46.0
50	39.8– 60.2	42.9– 57.1	45.5– 54.5	46.9– 53.1	49.0– 51.0
55	44.7– 65.0	47.8– 62.0	50.5– 59.4	51.9– 58.1	54.0– 56.0
60	49.7– 69.7	52.9– 66.8	55.6– 64.3	56.9– 63.1	59.0– 61.0
65	54.8– 74.3	58.0– 71.6	60.6– 69.2	62.0– 68.0	64.0– 66.0
70	60.0– 78.8	63.1– 76.3	65.8– 74.0	67.1– 72.8	69.0– 70.9
75	65.3– 83.1	68.4– 80.8	71.0– 78.7	72.2– 77.7	74.1– 75.9
80	70.8– 87.3	73.8– 85.3	76.2– 83.4	77.4– 82.4	79.2– 80.8
85	76.5– 91.4	79.3– 89.6	81.6– 88.0	82.6– 87.2	84.2– 85.7
90	82.4– 95.1	85.0– 93.8	87.0– 92.5	88.0– 91.8	89.3– 90.6
91	83.6– 95.8	86.1– 94.6	88.1– 93.4	89.1– 92.7	90.4– 91.6
92	84.8– 96.5	87.3– 95.4	89.3– 94.2	90.1– 93.6	91.4– 92.6
93	86.1– 97.1	88.5– 96.1	90.4– 95.1	91.2– 94.5	92.4– 93.5
94	87.4– 97.8	89.8– 96.9	91.5– 95.9	92.3– 95.4	93.5– 94.5
95	88.7– 98.4	91.0– 97.6	92.7– 96.7	93.5– 96.3	94.5– 95.5
96	90.1– 98.9	92.3– 98.3	93.9– 97.5	94.6– 97.1	95.5– 96.4
97	91.5– 99.4	93.6– 98.9	95.1– 98.3	95.7– 98.0	96.6– 97.4
98	93.0– 99.8	95.0– 99.4	96.4– 99.0	96.9– 98.8	97.7– 98.3
99	94.6– 99.9	96.4– 99.9	97.7– 99.7	98.2– 99.5	98.7– 99.2
100	96.4– 100.0	98.2– 100.0	99.3– 100.0	99.6– 100.0	99.9– 100.0

n is the number of cells counted; a, the observed percentage of cells of the given type. The limits for n = 100, 200, 500, and 1000 are exact; for n = 10,000, they have been determined with Freeman and Tukey's approximation as described in the Geigy tables.

Courtesy of Prof. C. L. Rümke.

**APÊNDICE A - Dados do hemograma dos pacientes do grupo 1**

Pacientes	Sexo	Idade	RBC	Hb	WBC	Blastos	PI	NRBC
Paciente 01	F	6 anos	3,24x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	8,5 g/dL	1.540/mm <sup>3</sup>	5%	81.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 02	F	3 anos	3,33x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	10,0 g/dL	5.080/mm <sup>3</sup>	6%	35.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 03	F	6 anos	3,39x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	9,3 g/dL	2.680/mm <sup>3</sup>	6%	25.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 04	M	24 anos	4,17x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	12,1 g/dL	2.800/mm <sup>3</sup>	2%	136.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 05	M	8 anos	3,41x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	9,1 g/dL	2.240/mm <sup>3</sup>	5%	316.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 06	M	11 anos	3,41x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	9,5 g/dL	3.760/mm <sup>3</sup>	0%	72.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 07	F	9 anos	5,17x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	13,4 g/dL	2.540/mm <sup>3</sup>	0%	138.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 08	F	3 anos	3,03x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	8,78 g/dL	2.380/mm <sup>3</sup>	3%	9.610/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 09	F	4 anos	2,94x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	9,1 g/dL	1.900/mm <sup>3</sup>	0%	82.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 10	M	14 anos	4,08x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	11,2 g/dL	3.360/mm <sup>3</sup>	0%	241.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 11	M	1 ano	2,92x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	7,9 g/dL	2.520/mm <sup>3</sup>	0%	34.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 12	M	14 anos	4,84x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	12,9 g/dL	7.260/mm <sup>3</sup>	0%	307.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 13	M	13 anos	2,58x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	7,93 g/dL	1.290/mm <sup>3</sup>	0%	38.400/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 14	M	12 anos	2,83x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	8,27 g/dL	1.080/mm <sup>3</sup>	4%	50.900/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 15	M	7 anos	3,20x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	9,1 g/dL	4.150/mm <sup>3</sup>	8%	338.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 16	M	18 anos	5,19x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	18,3 g/dL	7.070/mm <sup>3</sup>	0%	79.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 17	M	9 anos	2,56x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	6,9 g/dL	1.470/mm <sup>3</sup>	10%	12.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 18	M	3 anos	3,18x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	7,7 g/dL	1.530/mm <sup>3</sup>	4%	50.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 19	F	3 anos	2,05x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	7,28 g/dL	1.580/mm <sup>3</sup>	4%	9.850/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 20	F	5 anos	3,52 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	9,4 g/dL	2.360/mm <sup>3</sup>	2%	44.000/mm <sup>3</sup>	Não

**APÊNDICE B - Dados do hemograma dos pacientes do grupo 2**

Pacientes	Sexo	Idade	RBC	Hb	WBC	Blastos	PI	NRBC
Paciente 21	M	1 ano	4,23 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	10,6 g/dL	8.450/mm <sup>3</sup>	0%	243.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 22	M	4 meses	2,63 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	7,84 g/dL	6.280/mm <sup>3</sup>	0%	240.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 23	M	77 anos	3,63 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	10,3 g/dL	8.240/mm <sup>3</sup>	0%	189.000	Não
Paciente 24	F	49 anos	4,86 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	13,9 g/dL	9.270/mm <sup>3</sup>	0%	254.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 25	M	81 anos	2,41 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	7,66 g/dL	4.530/mm <sup>3</sup>	0%	92.500/mm <sup>3</sup>	Sim
Paciente 26	F	3 anos	3,15 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	9,10 g/dL	9.960/mm <sup>3</sup>	0%	404.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 27	M	22 anos	2,33 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	7,90 g/dL	2.330/mm <sup>3</sup>	0%	10.800/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 28	M	62 anos	5,65 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	16,5 g/dL	5.500/mm <sup>3</sup>	0%	181.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 29	M	32 anos	4,07 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	12,0 g/dL	3.990/mm <sup>3</sup>	0%	132.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 30	F	59 anos	4,70 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	15,0 g/dL	4.110/mm <sup>3</sup>	0%	85.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 31	F	32 anos	3,91 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	11,2 g/dL	7.770/mm <sup>3</sup>	0%	187.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 32	F	65 anos	3,53 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	10,8 g/dL	7.240/mm <sup>3</sup>	0%	123.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 33	F	2 anos	3,63 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	8,4 g/dL	2.940/mm <sup>3</sup>	0%	90.000/mm <sup>3</sup>	Sim
Paciente 34	F	70 anos	2,65 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	7,6 g/dL	4.740/mm <sup>3</sup>	0%	209.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 35	M	1 ano	3,22 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	7,5 g/dL	6.930/mm <sup>3</sup>	0%	96.000/mm <sup>3</sup>	Sim
Paciente 36	F	43 anos	3,90 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	11,8 g/dL	7.270/mm <sup>3</sup>	0%	282.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 37	M	72 anos	3,62 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	14,2 g/dL	5.210/mm <sup>3</sup>	0%	281.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 38	M	3 anos	3,17 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	7,8 g/dL	2.440/mm <sup>3</sup>	0%	52.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 39	F	4 anos	2,50 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	6,6 g/dL	5.000/mm <sup>3</sup>	0%	104.000/mm <sup>3</sup>	Não
Paciente 40	M	7 meses	3,08 x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	8,9 g/dL	6.110/mm <sup>3</sup>	0%	91.000/mm <sup>3</sup>	Sim

**APÊNDICE C - Contagem diferencial com a média da contagem de 200 células do mielograma da medula óssea “recém-colhida” dos pacientes do grupo 1**

<b>Pacientes</b>	<b>S. Granulocítica (%)</b>	<b>S. Eritroide (%)</b>	<b>Linfócitos (%)</b>	<b>S. Monocítica (%)</b>	<b>Blastos (%)</b>
<b>Paciente 01</b>	0,00	10,00	60,00	0,00	30,00
<b>Paciente 02</b>	2,00	2,00	16,00	0,00	80,00
<b>Paciente 03</b>	0,00	0,00	8,00	0,00	92,00
<b>Paciente 04</b>	0,00	1,00	4,00	0,00	95,00
<b>Paciente 05</b>	27,00	26,00	26,00	1,00	20,00
<b>Paciente 06</b>	0,00	0,00	2,00	0,00	98,00
<b>Paciente 07</b>	3,00	12,00	10,00	0,00	75,00
<b>Paciente 08</b>	1,00	4,00	23,00	0,00	72,00
<b>Paciente 09</b>	11,00	3,00	19,00	0,00	67,00
<b>Paciente 10</b>	3,00	16,00	9,00	2,00	70,00
<b>Paciente 11</b>	1,00	0,00	3,00	0,00	96,00
<b>Paciente 12</b>	34,00	4,00	12,00	0,00	50,00
<b>Paciente 13</b>	4,00	15,00	26,00	0,00	55,00
<b>Paciente 14</b>	0,00	3,00	16,00	0,00	81,00
<b>Paciente 15</b>	11,00	17,00	42,00	2,00	28,00
<b>Paciente 16</b>	41,00	11,00	23,00	0,00	25,00
<b>Paciente 17</b>	0,00	0,00	3,00	0,00	97,00
<b>Paciente 18</b>	4,00	0,00	54,00	2,00	40,00
<b>Paciente 19</b>	0,00	17,00	49,00	0,00	34,00
<b>Paciente 20</b>	8,00	12,0	54,00	1,00	25,00

**APÊNDICE D - Contagem diferencial com a média da contagem de 200 células do mielograma da medula óssea “recém-colhida” dos pacientes do grupo 2**

<b>Pacientes</b>	<b>S. Granulocítica (%)</b>	<b>S. Eritroide (%)</b>	<b>Linfócitos (%)</b>	<b>S. Monocítica (%)</b>	<b>P. Mieloides (%)</b>
<b>Paciente 21</b>	41,00	24,00	33,00	0,00	2,00
<b>Paciente 22</b>	40,00	44,00	13,00	1,00	2,00
<b>Paciente 23</b>	51,00	22,00	19,00	6,00	2,00
<b>Paciente 24</b>	62,00	3,00	30,00	4,00	1,00
<b>Paciente 25</b>	70,00	15,00	12,00	2,00	1,00
<b>Paciente 26</b>	44,00	15,00	31,00	7,00	3,00
<b>Paciente 27</b>	22,00	57,00	16,00	3,00	2,00
<b>Paciente 28</b>	29,00	50,00	18,00	2,00	1,00
<b>Paciente 29</b>	54,00	32,00	10,00	2,00	2,00
<b>Paciente 30</b>	42,00	28,00	26,00	4,00	0,00
<b>Paciente 31</b>	70,00	16,00	13,00	1,00	0,00
<b>Paciente 32</b>	52,00	21,00	22,00	4,00	1,00
<b>Paciente 33</b>	57,00	16,00	21,00	2,00	4,00
<b>Paciente 34</b>	53,00	21,00	21,00	4,00	1,00
<b>Paciente 35</b>	32,00	48,00	16,00	3,00	1,00
<b>Paciente 36</b>	67,00	15,00	14,00	3,00	1,00
<b>Paciente 37</b>	52,00	16,00	27,00	3,00	2,00
<b>Paciente 38</b>	50,00	27,00	20,00	1,00	2,00
<b>Paciente 39</b>	35,00	16,00	47,00	2,00	0,00
<b>Paciente 40</b>	33,00	22,00	37,00	7,00	1,00



**APÊNDICE E - Contagem diferencial com a média da contagem de 200 células do mielograma da medula óssea “do tubo” dos pacientes do grupo 1**

<b>Pacientes</b>	<b>S. Granulocítica (%)</b>	<b>S. Eritroide (%)</b>	<b>Linfócitos (%)</b>	<b>S. Monocítica (%)</b>	<b>Blastos (%)</b>
<b>Paciente 01</b>	6,00	5,00	67,00	2,00	20,00
<b>Paciente 02</b>	3,00	6,00	16,00	1,00	74,00
<b>Paciente 03</b>	2,00	0,00	14,00	0,00	84,00
<b>Paciente 04</b>	0,00	0,00	5,00	0,00	95,00
<b>Paciente 05</b>	15,00	26,00	32,00	7,00	20,00
<b>Paciente 06</b>	8,00	0,00	10,00	2,00	80,00
<b>Paciente 07</b>	10,00	8,00	10,00	0,00	72,00
<b>Paciente 08</b>	3,00	5,00	32,00	0,00	60,00
<b>Paciente 09</b>	25,00	6,00	27,00	0,00	42,00
<b>Paciente 10</b>	5,00	10,00	9,00	4,00	72,00
<b>Paciente 11</b>	19,00	3,00	8,00	0,00	70,00
<b>Paciente 12</b>	64,00	4,00	9,00	1,00	22,00
<b>Paciente 13</b>	8,00	17,00	20,00	0,00	55,00
<b>Paciente 14</b>	1,00	3,00	22,00	0,00	74,00
<b>Paciente 15</b>	10,00	6,00	69,00	1,00	14,00
<b>Paciente 16</b>	42,00	10,00	27,00	0,00	21,00
<b>Paciente 17</b>	0,00	0,00	5,00	0,00	95,00
<b>Paciente 18</b>	14,00	0,00	51,00	0,00	35,00
<b>Paciente 19</b>	0,00	14,00	52,00	0,00	34,00
<b>Paciente 20</b>	12,00	10,00	56,00	2,00	20,00

**APÊNDICE F - Contagem diferencial com a média da contagem de 200 células do mielograma da medula óssea “do tubo” dos pacientes do grupo 2**

<b>Pacientes</b>	<b>S. Granulocítica (%)</b>	<b>S. Eritroide (%)</b>	<b>Linfócitos (%)</b>	<b>S. Monocítica (%)</b>	<b>P. Mieloides (%)</b>
<b>Paciente 21</b>	30,00	19,00	47,00	2,00	2,00
<b>Paciente 22</b>	34,00	49,00	16,00	1,00	0,00
<b>Paciente 23</b>	50,00	17,00	26,00	6,00	1,00
<b>Paciente 24</b>	65,00	0,00	30,00	4,00	1,00
<b>Paciente 25</b>	60,00	31,00	5,00	3,00	1,00
<b>Paciente 26</b>	43,00	18,00	33,00	3,00	3,00
<b>Paciente 27</b>	20,00	58,00	18,00	3,00	1,00
<b>Paciente 28</b>	38,00	35,00	21,00	4,00	2,00
<b>Paciente 29</b>	51,00	31,00	13,00	3,00	2,00
<b>Paciente 30</b>	31,00	32,00	33,00	3,00	1,00
<b>Paciente 31</b>	70,00	11,00	18,00	1,00	0,00
<b>Paciente 32</b>	42,00	27,00	25,00	5,00	1,00
<b>Paciente 33</b>	39,00	34,00	20,00	4,00	3,00
<b>Paciente 34</b>	54,00	21,00	20,00	3,00	2,00
<b>Paciente 35</b>	14,00	66,00	18,00	0,00	2,00
<b>Paciente 36</b>	72,00	16,00	9,00	3,00	0,00
<b>Paciente 37</b>	60,00	20,00	16,00	4,00	0,00
<b>Paciente 38</b>	51,00	30,00	16,00	3,00	0,00
<b>Paciente 39</b>	43,00	18,00	33,00	3,00	3,00
<b>Paciente 40</b>	35,50	31,50	25,50	6,00	1,50

**ANEXO G - Contagem diferencial da imunofenotipagem proveniente da medula óssea “do tubo” do grupo 1**

<b>Pacientes</b>	<b>S. Granulocítica (%)</b>	<b>S. Eritroide (%)</b>	<b>Linfócitos (%)</b>	<b>S. Monocítica (%)</b>	<b>Blastos</b>
<b>Paciente 01</b>	3,00	5,00	71,00	2,00	19,00
<b>Paciente 02</b>	5,00	2,00	18,00	1,00	74,00
<b>Paciente 03</b>	1,00	0,00	15,00	0,00	86%
<b>Paciente 04</b>	0,00	0,00	3,00	0,00	97,00
<b>Paciente 05</b>	21,00	16,00	36,00	6,00	21,00
<b>Paciente 06</b>	7,00	0,00	9,00	2,00	82,00
<b>Paciente 07</b>	5,00	9,00	12,00	1,00	73,00
<b>Paciente 08</b>	2,00	3,00	35,00	0,00	60,00
<b>Paciente 09</b>	26,00	6,00	20,00	0,00	48,00
<b>Paciente 10</b>	4,00	8,00	10,00	4,00	74,00
<b>Paciente 11</b>	18,00	5,00	5,00	0,00	72,00
<b>Paciente 12</b>	65,00	5,00	6,00	3,00	21,00
<b>Paciente 13</b>	5,00	22,00	15,00	2,00	56,00
<b>Paciente 14</b>	1,00	0,00	20,00	0,00	79,00
<b>Paciente 15</b>	7,00	8,00	71,00	0,00	14,00
<b>Paciente 16</b>	41,00	10,00	30,00	0,00	19,00
<b>Paciente 17</b>	0,00	0,00	2,00	0,00	98,00
<b>Paciente 18</b>	10,00	0,00	56,00	1,00	33,00
<b>Paciente 19</b>	0,00	5,00	61,00	0,00	34,00
<b>Paciente 20</b>	15,00	2,00	62,00	2,00	19,00

**APÊNDICE H - Contagem diferencial da imunofenotipagem proveniente da medula óssea  
“do tubo” do grupo 2**

<b>Pacientes</b>	<b>S. Granulocítica (%)</b>	<b>S. Eritroide (%)</b>	<b>Linfócitos (%)</b>	<b>S. Monocítica (%)</b>	<b>P. Mieloides (%)</b>
<b>Paciente 21</b>	36,50	12,00	48,00	2,00	1,50
<b>Paciente 22</b>	52,00	28,00	15,00	4,00	1,00
<b>Paciente 23</b>	55,00	20,00	20,00	4,50	0,50
<b>Paciente 24</b>	58,00	1,00	35,60	5,40	0,00
<b>Paciente 25</b>	59,00	30,00	6,50	3,00	1,50
<b>Paciente 26</b>	36,00	20,00	37,00	4,00	3,00
<b>Paciente 27</b>	40,00	30,00	25,00	4,00	1,00
<b>Paciente 28</b>	40,50	40,00	13,00	4,00	2,50
<b>Paciente 29</b>	57,00	21,00	15,00	5,00	2,00
<b>Paciente 30</b>	37,00	23,00	35,00	5,00	0,00
<b>Paciente 31</b>	69,00	10,00	16,00	3,00	2,00
<b>Paciente 32</b>	47,00	21,00	25,00	5,00	2,00
<b>Paciente 33</b>	52,00	22,00	17,00	5,00	4,00
<b>Paciente 34</b>	55,00	21,00	18,00	4,00	2,00
<b>Paciente 35</b>	32,00	35,00	25,00	4,00	4,00
<b>Paciente 36</b>	72,00	11,00	12,00	4,00	1,00
<b>Paciente 37</b>	59,00	17,00	18,00	4,00	2,00
<b>Paciente 38</b>	47,00	21,00	25,00	5,00	2,00
<b>Paciente 39</b>	36,00	20,00	37,00	4,00	3,00
<b>Paciente 40</b>	44,00	20,00	30,00	5,00	1,00