



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CLEBERTON LEONEL DE FREITAS
BAUTISTA SEQUEIRA BLANCO**

**ANÁLISE CITOPATOLÓGICA DO LÍQUOR EM PACIENTES COM
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

ARACAJU

2018

CLEBERTON LEONEL DE FREITAS BAUTISTA SEQUEIRA BLANCO

**ANÁLISE CITOPATOLÓGICA DO LÍQUOR EM PACIENTES COM
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

**Monografia apresentada ao
Departamento de Medicina da
Universidade Federal de Sergipe como
pré-requisito obrigatório para a
obtenção de título de bacharel em
Medicina.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Cipolotti

ARACAJU

2018

CLEBERTON LEONEL DE FREITAS BAUTISTA SEQUEIRA BLANCO

**ANÁLISE CITOPATOLÓGICA DO LÍQUOR EM PACIENTES COM
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

**Monografia apresentada ao
Departamento de Medicina da
Universidade Federal de Sergipe como
pré-requisito obrigatório para a
obtenção de título de bacharel em
Medicina.**

Cleberton Leonel de F. B. S. Blanco
Graduando

Prof. Dra. Rosana Cipolotti
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradecer, primeiramente, a **Deus** por sua generosidade e grandiosidade. Sem Ele, sei que nada teria. À minha mãe **Jardielza**, mulher forte e corajosa a quem devo não só minha vida, mas minha educação. A meu pai **Leonel**, orientador e tutor na vida e na Medicina.

À todos de minha linda família, minha esposa **Irisdione** e meus filhos **Pedro Lucas e João Gabriel**, por toda a paciência e compreensão para aturar minhas ausências e defeitos. Tenho total ciência de que sem vocês, essa jornada não seria possível.

Aos meus grandes orientadores de curso que conseguem unificar educação e Medicina com maestria, a começar pelos homenageados por toda turma, nossa mestra maior Dra Stela Taqueda, exemplo de superação e dedicação. Sem esquecer de Dr. Roberto Robertti, pelos primeiros passos em cirurgia, de Dr. Hyder Aragão pelos momentos na UTI e na propedêutica, de Dr. José Augusto Silva no Cirurgia e Dr. José Augusto de Lima na Oftalmos.

À minha orientadora, Rosana Cipolotti, pelo exemplo de profissionalismo e humanidade que tanto faz diferença para os seus alunos e pacientes.

À Dra. Thalyta Porto Fraga, pelas orientações, parceria e humanidade em meu momento mais difícil do curso.

Aos meus colegas professores, pois acredito que não há como vencer na vida de outra forma que não seja pela educação. Pela paciência dos meus coordenadores Ivy, João e Rosângela. Peço desculpas pelos momentos de ausência, mas tenho certeza de que vocês sabem que me dedico ao trabalho em cada momento.

Aos meus queridos alunos, atuais e antigos. Realizo mais um trabalho como maneira de mostrar pelo exemplo que é possível sim realizar nossos sonhos, apesar de toda dificuldade. Quando acharem que é difícil ou impossível a realização de seus sonhos, pensem que sempre tem alguém que conseguiu com maior dificuldade que a de vocês.

Aos meus amigos. Não há como listar vocês pelos nomes, mas saibam que são igualmente importantes desde os momentos de distração aos de desabafo. Aos meus colegas de curso e de internato pelos momentos duros do curso e pelo apoio que demos uns aos outros em momentos de dificuldade. Desejo a todos nós toda sorte e felicidade em nossa profissão e especialidades.

A todas as pessoas que contribuíram, diretamente ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

Análise citopatológica do Líquor em pacientes com leucemia linfoblástica aguda.

Introdução: O Sistema Nervoso Central (SNC) é importante sítio de recaída em pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), apesar das crescentes taxas de cura nas últimas quatro décadas em pacientes jovens. A presença de blastos leucêmicos no Líquido Cefalorraquiano (LCR) apresenta implicação prognóstica e, portanto, define mudanças no protocolo terapêutico, razão pela qual requer acurácia diagnóstica. O surgimento de novas técnicas de identificação de blastos leucêmicos no LCR, como a citometria de fluxo e os métodos moleculares, que têm custo mais elevado e não estão uniformemente acessíveis para uso clínico, trouxe a necessidade de reavaliar-se o papel da citologia convencional como instrumento diagnóstico. **Objetivos:** Identificar a proporção de exames de LCR positivos para blastos em crianças e adolescentes com LLA, utilizando-se de técnica de citologia padronizada e com padronização de variáveis relacionadas ao processo que pudessem interferir no resultado. **Delineamento:** Estudo prospectivo, descritivo, não controlado, no qual foram examinadas amostras de LCR obtidas por punção lombar de pacientes com LLA que estavam iniciando o tratamento. As amostras de LCR foram encaminhadas ao laboratório logo após a coleta, sendo processadas e citocentrifugadas em citofunil em até no máximo quatro horas após a coleta. Quatro lâminas foram preparadas, coradas e analisadas por um patologista e um hematologista. **Resultados:** Foram avaliados 28 pacientes com LLA, havendo predomínio do sexo masculino (58,6%), imunofenótipo B (82,2%) e 78,5% foram estratificados como de alto risco para recaída. Dentre as 205 amostras de LCR avaliadas, 26 (12,6%) foram positivas para blastos e dentre os 28 pacientes, 11 (39,2%) obtiveram algum exame de LCR com infiltração neoplásica. Comparando-se os grupos com e sem infiltração de SNC, não se observou diferença estatisticamente significativa para as variáveis analisadas. **Conclusão:** Citologia convencional foi efetiva na identificação de infiltração de SNC por blastos leucêmicos, desde que haja vigilância dos fatores relacionados a coleta, processamento e análise do LCR que possam interferir na fidedignidade do resultado.

Descritores: Leucemia-Linfoma Linfoblástico de Células Precursoras. Líquido Cefalorraquidiano. Técnicas Citológicas. Citodiagnóstico.

ABSTRACT

Cytopathologic analyze of cerebrospinal fluid in patients with acute lymphoblastic leukemia.

Introduction: The Central Nervous System (CNS) is an important site of relapse in patients with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), despite increasing cure rates in the last four decades in young patients. The presence of leukemic blasts in the Cerebrospinal Fluid (CSF) presents prognostic implication and therefore defines changes in the therapeutic protocol, which is why it requires diagnostic accuracy. The emergence of new techniques for identifying CSF leukemia blasts, such as flow cytometry and molecular methods, which are more costly and not uniformly accessible for clinical use, have led to the need to reassess the role of conventional cytology as diagnostic tool. **Objectives:** To identify the proportion of CSF samples positive for blasts in children and adolescents with ALL, using a standardized cytology technique and with standardization of variables related to the process that could interfere with the result. **DESIGN:** Prospective, descriptive, uncontrolled study in which samples of CSF obtained by lumbar puncture of patients with ALL that were starting treatment were examined. CSF samples were sent to the laboratory shortly after collection, being processed and cytocentrifugated in cytofunyl in up to four hours after collection. Four slides were prepared, stained and analyzed by a pathologist and a hematologist. **RESULTS:** Twenty-eight patients with ALL were evaluated, with predominance of male (58.6%), immunophenotype B (82.2%) and 78.5% were stratified as high risk for relapse. Of the 205 CSF samples evaluated, 26 (12.6%) were positive for blasts and among 28 patients, 11 (39.2%) had CSF with neoplastic infiltration. Comparing the groups with and without CNS infiltration, no statistically significant difference was observed for the variables analyzed. **CONCLUSIONS:** Conventional cytology was effective in the identification of CNS infiltration by blasts, provided there is a vigilance of factors related to collection, processing and analysis of CSF that may interfere in the reliability of the result.

Key-words: Precusor Cell Lymphoblastic Leukemia-Lymphoma. Cerebrospinal fluid. Cytological Techniques. Cytodiagnosis.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1: Circulação do LCR no SNC.....	18
Figura 2: Linfócito maduro	21
Figura 3: Monócito.	22
Quadro 1: Características citológicas dos linfócitos.	23
Quadro 2: Classificação citomorfológica dos blastos pela French-American-British (FAB).....	24
Figura 4: Fluxo de LCR desde a coleta até o processamento e análise.	47
Figura 5: Organograma dos resultados de LCR	48
Figura 6: A. Linfoblastos em LCR. B. Linfoblastos em esfregaço do mielograma diagnóstico.....	48
Figura 7: Quantidade de amostras de LCR obtidas de cada paciente.....	49
Tabela 1: Características clínicas dos pacientes com LLA	49
Tabela 2: Dados comparativos entre pacientes com LCR positivo e LCR negativo	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BFM	Grupo Berlin-Frankfurt-Münster
Ca	Cálcio
COG	<i>Children's Oncology Group</i>
Cl	Cloro
DRM	Doença Residual Mínima
FAB	<i>French-American- British</i>
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância
K	Potássio
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
Mg	Magnésio
Na	Sódio
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
REAL	Revisão de Linfomas da Europa e América
SNC	Sistema Nervoso Central
SIM	Sistema de Informação de Mortalidade

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1 <i>Leucemia Linfoblástica Aguda</i>	12
1.1.1 Histórico	12
1.1.2 Definição, epidemiologia e classificação	13
1.1.3 Estratificação de risco, tratamento, recaída e sobrevida	16
1.2 <i>Líquido cefalorraquidiano</i>	17
1.2.1 Produção, circulação, absorção e características	17
1.2.2 Coleta e análise do líquido cefalorraquidiano	19
1.2.3 Citopatologia do líquido cefalorraquidiano	21
1.3 <i>LLA e líquido cefalorraquidiano</i>	25
OBJETIVOS	30
2.1 <i>Geral</i>	30
2.2 <i>Específico</i>	30
REFERÊNCIAS	31
REGRAS DA REVISTA	38
ARTIGO	42
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	58
APÊNDICE B –TERMO DE CONFIDENCIALIDADE.....	60
ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO	61

INTRODUÇÃO

Diante do cenário onde todos os exames de citologia de líquido cefalorraquidiano (LCR) dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda (LLA) do serviço de referência em Oncopediatria do SUS do estado Sergipe apresentavam resultados negativos ou inconclusivos para infiltração neoplásica, surgiu o questionamento a respeito da acurácia do exame diagnóstico.

Algumas vezes os pacientes apresentavam exames de imagem e sinais e/ou sintomas clínicos suspeitos de infiltração neoplásica em sistema nervoso central (SNC), e mesmo após coletas repetidas de LCR, os médicos assistentes não obtinham substrato diagnóstico que comprovasse a suspeita clínica. Assim, as medidas terapêuticas específicas para doença leucêmica em SNC eram adiadas ou acabavam não sendo realizadas, pois os pacientes evoluíam a óbito antes que a terapêutica pudesse finalmente ser realizada.

Além disso, apesar da LLA ser o câncer pediátrico mais comum no mundo e no Brasil, há escassez de trabalhos à respeito do tema no estado de Sergipe, principalmente no que se refere a aspectos relacionados ao diagnóstico, terapia e tratamento.

Sendo assim, com as melhorias mundiais em relação à cura e sobrevida dos pacientes com LLA, torna-se importante conhecer as peculiaridades locais referentes a LLA e principalmente investigar o porquê das inconclusões dos exames de citologia de LCR, já que se trata de exame com tecnologia acessível e que pode otimizar os resultados obtidos na terapêutica e no prognóstico dos pacientes.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda

1.1.1 Histórico

Em 1845, Rudolf Virchow, pai da patologia celular, descreveu uma doença com “aumento de corpúsculos incolores no sangue”, associada a esplenomegalia e linfonomegalia. Dois anos após, ele denominou a doença de “leucemia”. Após esse, vários outros relatos se seguiram e foram agrupados ao que ficou amplamente conhecido como leucemia aguda. Já na primeira metade do século XX, a morfologia, apresentação clínica e história natural da leucemia aguda estavam definidas. O desenvolvimento da imuno-histoquímica na década de 1970, inicialmente usando anticorpos policlonais, e em seguida monoclonais, posteriormente combinados com métodos de citometria de fluxo, revolucionaram o entendimento do sistema imune e a biologia do linfoma. Foram reconhecidas leucemias de células B e T, assim como ficou definida a célula de origem de várias leucemias e linfomas dentro do esquema de diferenciação de células B e T (KAMPEN, 2012).

Na década de 1970, foi lançada a classificação *French-American-British* (FAB) baseada na morfologia dos blastos e nas reações enzimático-citoquímicas. A classificação da Revisão de Linfomas da Europa e América (REAL) do Grupo Internacional de Estudo do Linfoma, publicada em 1994, dividiu as neoplasias hematológicas baseando-se em características morfológicas, imunofenotípicas, genéticas e clínicas. Em conformidade a linha de classificação da REAL, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou em 2001 o *Pathology and Genetics: Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissue* (JAFPE et al., 2001). Em 2008, a OMS lançou: *Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (SWERDLOW et al., 2008).

Mais recentemente (2017) hematopatologistas, hematologistas, oncologistas e geneticistas fizeram uma revisão da classificação da OMS edição de 2008, incorporando os novos dados clínicos, prognósticos, morfológicos, imunofenotípicos e genéticos que surgiram em 8 anos, principalmente na área de análise de

expressão gênica e sequenciamento de nova geração. As atualizações têm implicações significantes na prática clínica, com mudanças nas abordagens e condutas terapêuticas (ARBER et al., 2016; LEONARD; MARTIN; ROBOZ, 2017; SWERDLOW et al., 2017).

1.1.2 Definição, epidemiologia e classificação

As células pluripotentes da medula óssea se proliferam em duas principais linhagens: mieloide (granulócitos, eritrócitos, megacariócitos e monócitos) e linfoide (linfócitos B, T e NK). As leucemias são decorrentes de uma série de eventos mutacionais que ocorrem durante a hematopoiese e são definidas como câncer das células sanguíneas. Essas alterações podem ocorrer em qualquer etapa da hematopoiese, afetando células mais precursoras (leucemias agudas) ou células mais maduras (leucemias crônicas) (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015; ROSE-INMAN; KUEHL, 2014).

Quando se avalia o grupo das leucemias, obtém-se que ela é o câncer mais frequente em crianças com menos de 15 anos de idade, representando 25% dos cânceres desse grupo (PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2017). Oitenta por cento dos casos são de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), principalmente em crianças entre 1-4 anos de idade, e 17% de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) (METAYER et al., 2013). Os EUA apresentam em torno de 6000 casos novos diagnosticados com LLA todo ano (ROSE-INMAN; KUEHL, 2014). Coebergh *et al.* descrevem 44 casos de leucemia para cada 1 milhão de crianças, analisando-se o banco de dados de 19 países europeus (COEBERGH et al., 2006). Historicamente, países em desenvolvimento apresentam taxas de incidência menores do que os países desenvolvidos, com média anual de 16,5 casos de LLA para 1 milhão de pessoas. Uma das explicações para a diferença encontrada é a subnotificação de casos, pela falta de infraestrutura e organização dos bancos de dados dos países em desenvolvimento (LEHMANN; EL-HADDAD; BARR, 2016).

O Brasil, segundo Camargo *et al.*, apresenta 18-41% de casos de leucemia, seguidos de 13-24% de linfoma e 7-17% de tumores no sistema nervoso central (SNC). Foram analisados os bancos de dados de 14 estados brasileiros,

abrangendo em torno de 15% da população de crianças e adolescentes no Brasil. Eles descrevem uma média de incidência de 154,3 casos de câncer por 1 milhão de crianças (DE CAMARGO et al., 2010).

De Souza Reis *et al.* relatam, ainda no Brasil, uma incidência média anual de 53,3 casos de leucemia por 1 milhão de crianças (1-14 anos de idade), com uma variação de 24,8 a 76,8 casos por milhão. A LLA apresenta incidência média anual ajustada por idade de 35,2 casos por milhão, com uma variação de 12,8 a 69 casos para o gênero feminino e de 24,2 a 61,3 para o gênero masculino. A taxa de LLA descrita varia de 61- 87,5 % considerando-se os 16 bancos de dados analisados das cidades de: Belém, Manaus, Aracaju, Fortaleza, Recife, João Pessoa, Natal, Salvador, Cuiabá, Brasília, Goiânia, Belo Horizonte, São Paulo, Jaú, Curitiba e Porto Alegre. Entre todas as cidades analisadas, Aracaju apresentou a menor taxa de incidência anual de leucemia pediátrica, com 24,8 casos por milhão, sendo a subnotificação uma das justificativas referida no trabalho (DE SOUZA REIS et al., 2011).

Ainda nos estudos epidemiológicos, quando são avaliadas as características sócio-demográficas da LLA, percebe-se uma incidência pouco maior em homens do que em mulheres (COEBERGH et al., 2006; DORES et al., 2012). Nos EUA, no ano de 2000, descreveu-se uma incidência de LLA de 1,5 por 100.000 para homens, enquanto que para mulheres foi de 1,3 casos por 100.000 (REDAELLI et al., 2005). No Brasil, a incidência anual ajustada por idade também é maior no sexo masculino do que no feminino, chegando a uma relação M/F de 2,20 em Aracaju. Das 16 cidades analisadas, Jaú, Belém e Curitiba apresentaram número de casos maior no sexo feminino (DE SOUZA REIS et al., 2011). Analisando-se raça/etnia, hispânicos têm uma incidência maior de LLA, com 43 casos por milhão. Entre brancos e negros, os últimos apresentam menor incidência, com 15 e 9 casos por milhão, respectivamente (PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2017; REDAELLI et al., 2005).

As leucemias são classificadas com base na célula de origem, dentro de um esquema ontogenético, ou ainda com base na alteração genética mais frequente. Como dito, podem ser linfóides ou mielóides; agudas ou crônicas. Além disso, elas são também categorizadas de acordo com as linhagens celulares, podendo ser de células B, T ou bifenotípica. Segundo o Grupo Brasileiro de Tratamento da

Leucemia na Infância (GBTLI LLA- 99), as incidências de LLA-B e LLA-T no Brasil são em torno de 86% e 14%, respectivamente (BRANDALISE et al., 2010). Nos EUA os números são semelhantes, com 85% dos casos de LLA sendo de células com fenótipo B (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015). A diferenciação do tipo celular tem implicação clínica, com diferenças no tratamento (RAVINDRANATH, 2015).

A edição revisada do livro da OMS (2017) apresenta os seguintes subtipos de LLA (SWERDLOW et al., 2017):

1) Fenótipo B:

- a) Leucemia/linfoma linfoblástico-B, sem outras especificações;
- b) Leucemia/linfoma linfoblástico-B com anormalidades genéticas recorrentes:
 - i) Leucemia/linfoma linfoblástico-B com t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL;
 - ii) Leucemia/linfoma linfoblástico-B com rearranjo t(v;11q23.3); KMT2A;
 - iii) Leucemia/linfoma linfoblástico-B com t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1;
 - iv) Leucemia/linfoma linfoblástico-B com hiperdiploidia;
 - v) Leucemia/linfoma linfoblástico-B com hipoploidia;
 - vi) Leucemia/linfoma linfoblástico-B com t(5;14)(q31.1;q32.3); IL3-IGH;
 - vii) Leucemia/linfoma linfoblástico-B com t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1;
 - viii) Leucemia/linfoma linfoblástico-B com , BCR-ABL1–like (novo);
 - ix) Leucemia/linfoma linfoblástico- B com iAMP21 (novo).

2) Fenótipo T:

- a) Leucemia/linfoma linfoblástico de precursores de células T iniciais.

Comparando-se as últimas classificações da OMS com a mais recente, percebe-se a importância que a investigação molecular tem adquirido ao longo dos últimos anos. Houve a incorporação de novos critérios moleculares na classificação e diagnóstico da LLA, acarretando novas perspectivas terapêuticas, de monitoramento e de prognóstico (SWERDLOW et al., 2017).

1.1.3 Estratificação de risco, tratamento, recaída e sobrevida

Os grupos de ensaios clínicos, cooperativos e multicêntricos de vários países têm conseguido grande melhoria na condução e no tratamento da LLA nas últimas décadas, com demasiado aumento nas taxas de cura (COOPER; BROWN, 2015; METAYER et al., 2013; PUI; EVANS, 2013).

Aproximadamente 98% das crianças com LLA entram em remissão da doença e 85% dos pacientes com 1 a 18 anos de idade têm sobrevida livre de eventos (recaída, segunda neoplasia ou morte) nos primeiros 5 anos pós doença (PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2017). Entretanto, nota-se ainda uma heterogeneidade sócio-demográfica nos dados. O CONCORD-2, estudo feito utilizando informações de banco de dados de 67 países, descreve taxas de cura de 90% em países como Áustria, Canadá, Alemanha, Bélgica e Noruega. De acordo com esse mesmo trabalho, países como Indonésia e Mongólia apresentam taxas menores que 50% (ALLEMANI et al., 2015).

No Brasil, Ferman *et al.* pesquisaram no Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde os dados de mortalidade de crianças (0-14 anos) entre 1979-2008. Eles descrevem uma leve queda geral nos óbitos por leucemia no período (14,73 óbitos por milhão em 1979 e 13,83 óbitos por milhão em 2008), referindo diferenças regionais, com sul e sudeste brasileiro apresentando declínio, centro-oeste permanecendo estável, e norte e nordeste com aumento nas taxas de mortalidade no período (FERMAN et al., 2013).

No estado de Sergipe, Viana *et al.* descrevem que apesar da melhoria das taxas de cura de LLA nas últimas décadas, são identificadas diferenças em relação aos dados dos países desenvolvidos. A taxa de sobrevida global em cinco anos foi menor do que em países desenvolvidos e a taxa de mortalidade durante a fase de indução do tratamento (22,6%) foi maior quando comparada com a literatura (3% a 6%), sendo infecção a principal causa de óbito (VIANA et al., 2015).

Com a melhoria obtida nos últimos anos nas taxas de cura da LLA, o foco atual é tentar aumentar a sobrevida dos pacientes (RANTA et al., 2015). Esta última

está relacionada principalmente a recaída da doença e importante ferramenta utilizada para evitá-la é a estratificação do risco de falha do tratamento. O que se busca aqui é separar os pacientes que podem ter uma boa sobrevida com um tratamento mais modesto, daqueles que têm menor chance de resposta e, com isso, necessitariam de um tratamento mais agressivo (COOPER; BROWN, 2015). Os fatores prognósticos que são avaliados na estratificação levam em consideração, de modo geral: características do paciente e da clínica; características da leucemia; resposta inicial ao tratamento (PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2017).

Independentemente da categoria de risco, o tratamento da LLA apresenta as seguintes fases: indução da remissão, consolidação, intensificação, consolidação tardia e manutenção. O tipo de droga, dose e tempo variam de acordo com a categoria de risco e os protocolos utilizados na instituição. O GBTLI LLA- 2009 propõe para os pacientes com LLA-B derivada de baixo risco de recidiva, por exemplo, Vincristina + Dexametasona + Daunorrubicina + L-Asparaginase na fase de indução. Enquanto que no grupo de alto risco de recidiva, utiliza-se Prednisona, em vez de Dexametasona (CANCELA et al., 2017).

1.2 Líquido cefalorraquidiano

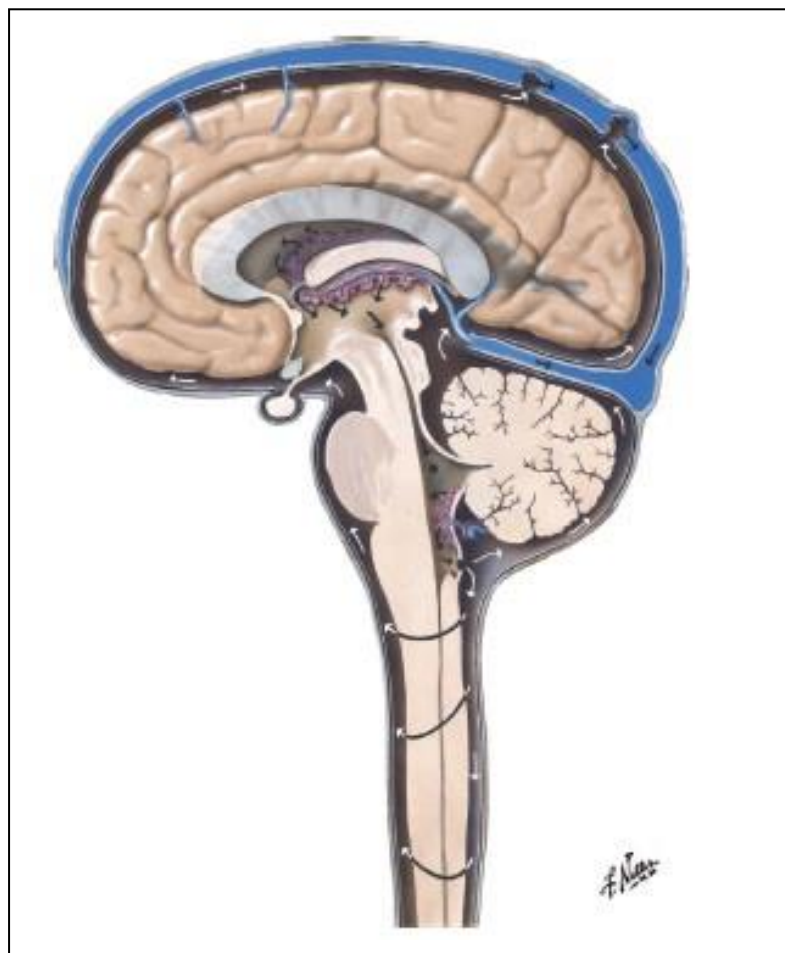
1.2.1 Produção, circulação, absorção e características

O líquido cefalorraquidiano ou líquor (LCR) é o fluido presente no espaço subaracnóide espinhal e cranial, e em ventrículos cerebrais. Os ventrículos cerebrais são revestidos pelo epêndima (uma camada de epitélio cuboidal ciliado), o qual se diferencia em algumas áreas em estruturas vilositárias complexas chamadas de plexo coroide (uma camada de epitélio cuboidal não ciliado). O LCR é produzido pelo plexo coroide presente nos ventrículos cerebrais através da filtração do plasma sanguíneo, tendo, entretanto, sua composição pouco diferente do plasma, com maior concentração de Na, Cl e Mg; e menor concentração de K e Ca. Além disso, há secreção pelo plexo coroide de vitaminas B1, B12, C, folato, β 2-microglobulina,

vasopressina e NO para o líquido (SAKKA; COLL; CHAZAL, 2011; SPECTOR et al., 2015).

A circulação do LCR é um fenômeno dinâmico, com sua regulação contribuindo para homeostase cerebral. A teoria clássica descreve que o LCR produzido pelo plexo coroide nos ventrículos cerebrais passa pelo forame interventricular para terceiro ventrículo, seguindo para o quarto ventrículo através do aqueduto cerebral e, por último, para o espaço subaracnóide via forame de Margendie (Figura 1). Seu fluxo segue o pulso sistólico e sua absorção ocorre nas granulações aracnoides dos seios venosos da dura mater (BRODBELT; STOODLEY, 2007; SAKKA; COLL; CHAZAL, 2011). Há muitas teorias e questionamentos a respeito desses conceitos tradicionais (CHIKLY; QUAGHEBEUR, 2013; OREŠKOVIĆ; RADOŠ; KLARICA, 2017).

Figura 1: Circulação do LCR no SNC.



Fonte: Adaptado de BRODBELT; STOODLEY, 2007.

O LCR fornece fluabilidade ao cérebro, reduzindo em cerca de 75% o peso do cérebro funcional, e ajuda a protegê-lo de traumas (BONADIO, 2014). Um adulto apresenta em torno de 150 mL de LCR, com produção diária de 400- 600 mL, e pressão normal de 8-15 mmHg e 20 mmHg, deitado e ereto, respectivamente (MACK; SQUIER; EASTMAN, 2009). Em crianças, entre 4-13 anos de idade, o volume varia de 65-150 mL, com uma pressão intracraniana de 3-4 mmHg em crianças com menos de 1 ano de idade. O volume retirado durante uma coleta de LCR (3-5 mL), geralmente é repostado em menos de hora (BONADIO, 2014; SAKKA; COLL; CHAZAL, 2011).

1.2.2 Coleta e análise do líquido cefalorraquidiano

O LCR é líquido translúcido e 20% do que é produzido flui para o espaço subaracnóideo da região espinhal. O método mais usual para sua coleta é a punção lombar, tendo sido descrita primeiramente em 1891. Ela é realizada comumente em decúbito lateral, com flexão de joelhos em direção à região torácica. Pode-se, alternativamente, fazer a coleta em posição sentada, tendo-se o cuidado de flexionar o tórax em direção aos joelhos. Em ambas as posições, deve-se identificar uma linha imaginária que une as cristas ilíacas pósterio-superiores, localizando o espaço entre L3-L4. Este último é local de preferência para a punção lombar, podendo ser utilizados também L2-L3 e L4-L5. Deve-se alongar os ligamentos da coluna e permitir a passagem da agulha entre os processos espinhosos das vértebras. Opcionalmente, pode-se usar a cisterna magna na base do cérebro para coleta de líquido (ALI; CIBAS, 2012; BONADIO, 2014).

Durante o procedimento utilizam-se anestésicos locais para diminuição da dor, podendo-se fazer sedação associada, principalmente em crianças. Além disso, são empregadas agulhas de 22-gauge para coleta em crianças. Objetiva-se, com isso, diminuir o risco de trauma, com perfuração de vasos sanguíneos do plexo venoso vertebral interno durante o percurso da agulha. No decorso da passagem da agulha as camadas transeccionadas são: pele, tecido subcutâneo, ligamento supraespinhoso, ligamento interespinhoso, ligamento amarelo, espaço epidural, dura e espaço subaracnoide (MAURIZI et al., 2014).

A realização de punção lombar tem indicações (meningite, hemorragia subaracnóide, processo desmielinizante, neoplasia, etc.) e contraindicações (aumento da pressão intracraniana, coagulopatias, infecções de pele, deformidades de coluna, etc.), sendo em crianças a principal indicação a investigação de processo infeccioso (meningite) (SHAIKH et al., 2014). Além disso, o procedimento de punção lombar pode gerar complicações, dentre elas: cefaleia, dor lombar, infecção na pele, punção lombar traumática, herniação cerebral, etc. Dentre as complicações, a mais comum é a punção lombar traumática, ocorrendo em 20% das crianças, podendo chegar a 30% em neonatos (GAJJAR et al., 2000; HOWARD et al., 2002).

Após a coleta, o LCR deve ser enviado imediatamente ao laboratório, preferencialmente sem meio de transporte. Se houver demora para o processamento, o LCR deve ser fixado em etanol 50% no mesmo volume de líquido da amostra. Geralmente, as características analisadas vão depender da indicação da coleta. Em casos de suspeita de meningite são avaliadas: celularidade, contagem de neutrófilos, dosagem de glicose, dosagem de proteína, pesquisa e cultura de microorganismos (BONADIO, 2014).

Tratando-se de pesquisa de células neoplásicas, o método mais comum no processamento é a citocentrifugação. Ela é utilizada na manipulação de materiais líquidos hipocelulares, com o depósito de células em uma pequena região da lâmina (em torno de 5 mm). Para isso, necessitam de lâmina, papel absorvente e citofunil, além da máquina de citocentrífuga. Huppmann *et al.* relatam que houve diferença na celularidade das lâminas após a mudança da marca do aparelho [ShandonCytospin 4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) para WescorCytopro Rotor AC-060 (Wescor, Logan, UT)] no Hospital Infantil da Filadélfia. Eles concluem que a detecção de células neoplásicas no LCR é instrumento-dependente, sendo as novas máquinas de citocentrífugas mais sensíveis que as anteriores (HUPPMANN et al., 2012).

Com relação aos métodos de coloração, a qualidade está diretamente relacionada às características tintoriais dos corantes, ao processamento da amostra e à fixação. Esses cuidados devem ser observados para se evitar artefatos e dificuldade de análise do material. Há muitas colorações que podem ser empregadas na citologia, como exemplos: Papanicolaou, Giemsa, Panótico, etc (ALI; CIBAS, 2012).

1.2.3 Citopatologia do líquido cefalorraquidiano

As primeiras descrições do LCR foram realizadas pelos egípcios, em torno de 1500 anos a.C., apesar do primeiro relato de punção lombar ter ocorrido somente no final do século 19. Antes disso, o diagnóstico de infecções em sistema nervoso central era baseado em sinais e sintomas clínicos ou realizado através de autópsias. A introdução do procedimento de punção lombar possibilitou o estudo do líquido cefalorraquidiano, com suas características bioquímicas e celulares (FREDERIKS; KOEHLER, 1997; TYLER, 2010).

A citologia do LCR possui características particulares que a distingue das outras efusões corporais (líquido pleural, líquido ascítico, etc.). Trata-se de líquido normalmente paucicelular, quase acelular, podendo ser visualizados linfócitos maduros (Figura 2) e monócitos (Figura 3). Raramente podem ser observadas células ependimárias, poucas hemácias e raros neutrófilos; e nunca podem ser achados macrófagos, eosinófilos ou plasmócitos. Em relação a quantidade de células, os adultos costumam apresentar menos de 5 células/mm³, enquanto neonatos apresentam menos de 10 células/mm³. Valores acima destes, geram suspeita de processos patológicos, sejam eles inflamatórios ou neoplásicos (ALI; CIBAS, 2012; BIGNER, 1992; RICHARD MAC DEMAY, 2011).

Figura 2: Linfócito maduro (núcleo pequeno, redondo, carioteca lisa, cromatina densa e grosseira, nucléolo não visível, e escasso citoplasma). Coloração Panótico. 1000x.

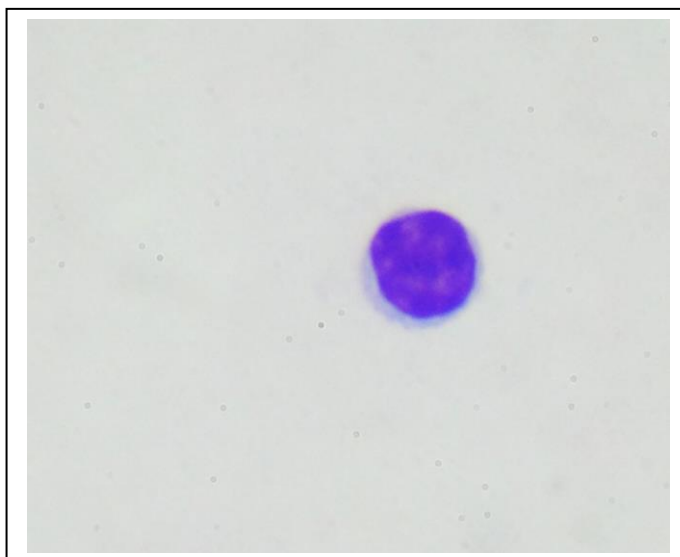
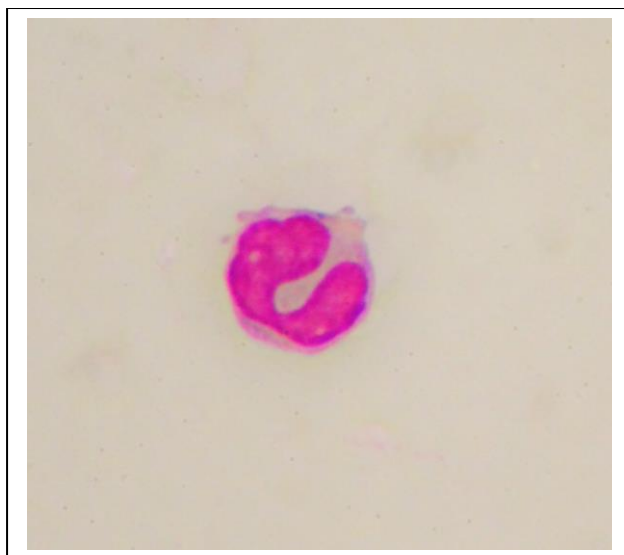


Figura 3: Monócito (núcleo em forma de feijão ou ferradura de cavalo, cromatina delicada, nucléolo inconspícuo). Coloração Panótico. 1000x.



Fonte: Própria.

Os processos inflamatórios podem ser agudos ou crônicos, e podem ser decorrentes de doenças vasculares, infecciosas, desmielinizantes ou traumas. Em todos esses, observa-se um aumento na celularidade líquórica e alteração em sua composição celular. Nas hemorragias são observadas hemácias, macrófagos com hemácias e macrófagos com hemossiderina, enquanto que no infarto são visualizados em fases mais iniciais polimorfonucleares e hemácias; e macrófagos com fragmentos de mielina mais tardiamente. Diferentemente, nas meningites são observados linfócitos em processos crônicos, e neutrófilos em processos agudos (WALTS, 1992)

As coletas de líquido geralmente são executadas com o objetivo de se investigar meningites, entretanto podem ser realizadas para o diagnóstico de neoplasias. Essas, frequentemente, são metastáticas, mas podem ser primárias de sistema nervoso central (glioblastoma, meduloblastoma, linfoma, etc.). Em se tratando de neoplasias secundárias em SNC, os cânceres que mais comumente metastatizam são carcinoma de mama, carcinoma de pulmão, melanoma e leucemias/linfomas. Os três primeiros costumam ser fáceis de diagnosticar; pois apresentam morfologia diferente das células normalmente presentes em LCR. No entanto, os linfomas/leucemias representam um desafio diagnóstico morfológico,

que já linfócitos maduros podem ser observados normalmente no líquido (MAC DEMAY, 2011; WICK et al., 2016).

As leucemias/linfomas são as neoplasias malignas secundárias mais comumente diagnosticadas em citologias de LCR e assim como as demais patologias descritas, causam aumento da celularidade líquórica. Entretanto, apesar de contribuir, o aumento celular isolado não permite o diagnóstico de infiltração neoplásica de SNC. Além disso, as neoplasias hematológicas linfoides apresentam uma dificuldade morfológica no que concerne em se diferenciar processos reativos linfoides dos neoplásicos. Objetivando-se a distinção, são avaliadas algumas características celulares, como: tamanho celular, regularidade da carioteca, aspecto da cromatina e presença de nucléolo (Quadro 1). Do mesmo modo, também pode-se comparar a morfologia da célula neoplásica do diagnóstico (mielograma, biópsia) com as observadas no LCR para se definir o diagnóstico (ALI; CIBAS, 2012; TYLER, 2010).

Quadro 1: Características citológicas dos linfócitos.

Linfócitos benignos e malignos		
	Benigno	Maligno
Citoplasma	Pouco	Muito
Carioteca	Lisa	Irregular
Cromatina	Fina	Grosseira
Nucléolo	Raro	Múltiplos
Fragmentação nuclear	Ausente	Presente

Fonte: PARVIN, 2011.

Dentro do grupo das leucemias/linfomas, a LLA apresentava uma classificação baseada em características citomorfológicas, denominada *French-American-British* (FAB). Apesar de estar em desuso no que se refere a diagnóstico, tratamento e prognóstico, essa categorização pode ajudar no estudo morfológico da célula observada (Quadro 2) (SWERDLOW et al., 2017).

Quadro 2: Classificação citomorfológica dos blastos pela French-American-British (FAB).

Citomorfologia de LLA (coloração de Romanowsky)	
L1	Blastos pequenos Núcleo redondo (raras fendas) Cromatina fina Núcleo inconspícuo Citoplasma pouco basofílico e escasso
L2	Blastos grandes Núcleo irregular Cromatina fina Núcleo proeminente Citoplasma abundante
L3	Cromatina densa Múltiplos nucléolos Citoplasma azul escuro Pequenos vacúolos citoplasmáticos

Fonte: CIBAS, 2012.

Vale ressaltar que além dos padrões de normalidade e os patológicos do LCR, podem ser observadas achados que são descritos como contaminantes: sangue periférico, medula óssea, cartilagem, *corpora amylacea*, elementos fúngicos, talco de luva, neurônios. O conhecimento dessas alterações pode evitar o falso diagnóstico de malignidade em SNC (WALTS, 1992).

Outro ponto de importante destaque é o entendimento que a citologia de LCR, assim como de outras efusões e punções aspirativas, necessita, muitas vezes, de correlação com dados clínicos, exames de imagem e informações sobre a coleta para acurácia diagnóstica. O diagnóstico vai além da avaliação isolada da morfologia da célula observada e é realizado na junção de todas as informações (ALI; CIBAS, 2012; MAC DEMAY, 2011).

1.3 LLA e líquido cefalorraquidiano

Antes dos anos 1950, não havia diferença entre LLA e LMA do ponto de vista terapêutico; todos os casos eram conduzidos como leucemia aguda, através de transfusão sanguínea, e os pacientes morriam em torno de 3 meses após o diagnóstico. Na década de 1960 começaram os primeiros tratamentos medicamentosos, inicialmente com monoterapia e depois com poliquimioterapia (PUI; EVANS, 2013; SIMONE, 2006). Nos últimos 30 anos houve uma preocupação com o aprimoramento do tratamento da LLA (tipo de droga, dose, duração) através dos grandes ensaios clínicos e multicêntricos pelo mundo, sendo que atualmente mais de 80% dos casos de LLA em crianças obtêm cura da doença (PUI; EVANS, 2006, 2013).

Além da melhoria curativa, a sobrevida em 5 anos dos pacientes com LLA também tem aumentado: de 54,1%, entre os anos de 1975-1977, para 85,1% entre 1999-2005 (HUPPMANN et al., 2012). Com os avanços obtidos, ganharam importância os fatores que influenciam na recaída da doença. Ela ocorre principalmente em sistema nervoso central e medula óssea, isoladas ou combinadas. Nos anos de 1970, a taxa de recaída em SNC era de 75% (EVANS; GILBERT; ZANDSTRA, 1970) e com a introdução de tratamento direcionado para doença em SNC (radioterapia e quimioterapia intratecal) ainda no início da década de 1970, os valores atuais são de 6% (PUI et al., 2014; RANTA et al., 2015).

Apesar da diminuição da taxa, a infiltração neoplásica de SNC ainda se destaca como recidiva neoplásica. Dessa maneira, os pacientes com LLA costumam ter seu tratamento baseado em estratificações de risco, tratando de forma heterogênea os pacientes que têm baixo ou alto risco de recaída. Os casos com

baixo risco recebem regimes terapêuticos diferentes dos pacientes com alto risco, sendo classificados ao diagnóstico e durante o tratamento, podendo ter o estadiamento modificado ao longo da terapia (PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2017).

Os primeiros sistemas de classificação de risco utilizavam características como idade e contagem leucocitária na categorização dos pacientes. Posteriormente, resposta terapêutica e características citogenéticas passaram a ser analisadas também. E, apesar de haver uniformidade no conceito da necessidade de se estratificar o paciente, nota-se heterogeneidade nos critérios utilizados pelos grupos de ensaios clínicos mundiais. Como exemplos: o *Children's Oncology Group* (COG) baseia-se em idade do paciente, leucócitos totais, imunofenótipo, alterações citogenéticas, presença de doença extramedular e paciente com síndrome de Down. Já o grupo Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) utiliza desde o ano 2000 somente resposta ao tratamento como critério na estratificação (PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2017).

No Brasil, segue-se o protocolo do GBTLI LLA- 2009 e segundo ele, os pacientes com LLA de células B são classificados como baixo e alto risco, considerando-se características clínicas, laboratoriais e citogenéticas na estratificação. Os critérios para baixo risco são: idade entre ≥ 1 e < 9 anos; < 50.000 glóbulos brancos/mm³; SNC livre de neoplasia; BCR-ABL negativo; ausência de rearranjo de MLL; ausência de hipoploidia; $< 1000/\text{mm}^3$ blastos em sangue periférico no oitavo dia de tratamento(D8); citologia da medula óssea e Doença Residual Mínima (DRM) $< 10^{-3}$ medida por citometria de fluxo no décimo quinto dia de tratamento (D15); ausência de blastos na citologia da medula óssea e DRM negativa medida por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) no trigésimo quinto dia de tratamento(D35). Aqueles que não preenchem esses critérios são classificados como alto risco. Os pacientes com LLA de células T, com presença de cromossomo Philadelphia (Ph⁺), lactentes e portadores de Síndrome de Down receberão tratamentos específicos.

Como o estadiamento e o monitoramento da LLA requerem a análise do líquido para avaliação de doença em SNC, toda vez que vai ser administrada a terapia intratecal faz-se a avaliação do LCR, segundo o protocolo do GBTLI-LLA 2009 (BRANDALISE et al., 2010; CANCELA et al., 2017), sendo a citologia

convencional com microscopia óptica o método padrão-ouro para pesquisa de células neoplásicas (GALATI; DI NOTO; DEL VECCHIO, 2013; PUI; THIEL, 2009).

Ainda de acordo com o GBTLI LLA-2009, leucemia em SNC é definida como: SNC-1 quando não há blastos; SNC-2 quando há blastos com <5 células/mm³; SNC-3 quando há blastos e > 5 células/mm³. Em casos de punção lombar traumática (TLP), deve-se considerar como sendo TLP⁺ (BRANDALISE et al., 2010; CANCELA et al., 2017). Esses critérios são baseados no consenso realizado em Roma em 1986, salientando-se que a escolha de 5 células não foi baseada em estudos; e sim, produto do consenso dos participantes (MASTRANGELO et al., 1986).

A grande celularidade blástica no líquido ao diagnóstico está associada a pior prognóstico. No entanto, há controvérsias a respeito de líquido com baixa celularidade e blastos presentes. Alguns referem que a presença de qualquer quantidade de blasto no LCR, assim como punção lombar traumática, estaria associada a maior risco de recaída da doença e pior prognóstico (GAJJAR et al., 2000; KO et al., 2014; MAHMOUD et al., 1993; SCRIDELI, 2012); enquanto outros não encontraram essa associação (BÜRGER et al., 2003; GILCHRIST et al., 1994; TUBERGEN et al., 1994).

Segundo DeAngelis e Cairncross, a citologia convencional é o “rigoroso, porém inalcançável padrão-ouro” (DEANGELIS; CAIRNCROSS, 2002). Além deles, muitos outros questionam a nomeação da citologia convencional como método *gold-standard*. Eles replicam que a citologia apresenta baixa sensibilidade e é operador dependente, e como forma de aumentar a acurácia no diagnóstico de doença em SNC, novas tecnologias têm sido relatadas, entre elas: citometria de fluxo e marcadores moleculares (GALATI; DI NOTO; DEL VECCHIO, 2013).

Em 2001, Subirá et al. analisaram 168 amostras de líquido de 31 pacientes com leucemia aguda, comparando citologia convencional e citometria de fluxo. Eles obtiveram alta concordância de resultado entre as duas metodologias e descreveram maior sensibilidade com a citometria de fluxo. No final, sugerem que os dois métodos devem ser usados concomitantemente nos pacientes com leucemia (SUBIRÁ et al., 2001). Bommer et al. também descrevem o uso simultâneo de citologia convencional e citometria de fluxo na análise de LCR de 127 pacientes com leucemia ou linfoma, com uma sensibilidade de 73% (citologia) e de 96%

(citometria); especificidade de 94% (citologia) e de 97% (citometria); valor preditivo positivo de 88% (citologia) e de 96% (citometria); e valor preditivo negativo de 76% (citologia) e 97% (citometria) (BOMMER et al., 2011). Corroborando esses trabalhos, vários outros sugerem o uso concomitante de citologia e citometria de fluxo no diagnóstico de doença em SNC como forma de aumentar a acurácia (ABELLAN et al., 2002; JAIME-PÉREZ et al., 2018; MARTÍNEZ-LAPERCHE et al., 2013; NUCKEL et al., 2006; RANTA et al., 2015; SCHINSTINE et al., 2006), incluindo mais recentemente (2017), Jaime-Pérez et al., os quais avaliaram as amostras de LCR de 77 pacientes com LLA, comparando contagem celular manual, automatizada, amostras de citocentrífuga e citometria de fluxo. Eles ratificaram os relatos anteriores descritos (JAIME-PÉREZ et al., 2017).

No Brasil, Cancela et al. fizeram imunofenotipagem com citometria de fluxo em 63 amostras de LCR e, assim como os trabalhos internacionais, sugerem o uso complementar desse método (CANCELA et al., 2017). Apesar dos pontos positivos descritos, a citometria de fluxo também tem limitações, pois não funciona bem em amostras com sangue, amostras pouco celulares ou com pouco volume. Além disso, também necessita de rápida análise à partir da coleta (BOMMER et al., 2011; CANCELA et al., 2017; CRESPO-SOLIS et al., 2012; NUCKEL et al., 2006). Ademais, salienta-se a não existência de recomendação do uso e interpretação dos resultados de LLA em LCR através da citometria de fluxo (CANCELA et al., 2017).

Outro método descrito é a Biologia molecular. Ela tem sido usada na Oncologia na pesquisa de doença residual microscópica, principalmente em neoplasias hematológicas. Utiliza-se, usualmente, amostra de medula óssea nessas pesquisas (DEANGELIS; CAIRNCROSS, 2002). Alguns trabalhos têm descrito a utilização de biologia molecular na pesquisa de células neoplásicas no LCR (CRESPO-SOLIS et al., 2012). Pine et al. referem que o PCR em tempo real (real time PCR) é uma excelente ferramenta para análise do status do SNC (PINE et al., 2005). Scrideli et al. sugerem que o uso de PCR na identificação de doença em SNC é método que deve ser considerado, apesar das limitações no trabalho deles com relação à quantidade de paciente e o curto seguimento. As perspectivas são otimistas, porém deve-se atentar para os altos custos dessas tecnologias, fator de considerável importância, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil (SCRIDELI et al., 2004).

Ainda em relação à pesquisa neoplásica em LCR, marcadores humorais como β 2-microglobulina, ferritina, L-selectina, cobre, entre outros, também foram dosados em LCR para diagnosticar leucemia em SNC. Entretanto, não há consenso a respeito do uso desses marcadores, não havendo uso rotineiro deles (CRESPO-SOLIS et al., 2012).

Em 2012, enquanto a maioria dos trabalhos referia as limitações do método descrito como padrão-ouro, Huppmann *et al.* descreveram uma diferença na quantidade de células detectadas no LCR após a mudança da marca da citocentrífuga. Relatam que a detecção é instrumento-dependente, sendo as novas máquinas mais sensíveis que as anteriores. Com isso, a análise citológica do líquido ganha novas possibilidades e boas perspectivas, já que se trata de método com menor custo, além de ser uma tecnologia mais disponível e acessível (HUPPMANN et al., 2012).

Dessa maneira, apesar dos avanços no tratamento, a infiltração neoplásica do SNC continua sendo importante causa de recaída da doença, com avaliação da neoplasia em LCR apresentando implicância prognóstica e necessitando de acurácia diagnóstica. As novas tecnologias utilizadas (citometria de fluxo e métodos moleculares) apresentam grande valor, porém a citologia convencional ainda sobrevive como método padrão-ouro, com a literatura sugerindo a citometria de fluxo e métodos moleculares como complementos. Além disso, os novos modelos de citocentrífugas, mais sensíveis, abrem novas possibilidades na utilização da citologia.

OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar a taxa de infiltração leucêmica em líquido cefalorraquidiano nos pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda.

2.2 Específico

Avaliar associação entre a ocorrência de infiltração leucêmica de líquido cefalorraquidiano e variáveis clínicas (idade, sexo, risco clínico, classificação imunofenotípica, protocolo utilizado, fase do tratamento).

REFERÊNCIAS

- ABELLAN, P. F. et al. Flow cytometry and the study of cerebrospinal fluid in leukaemic patients: additional facts. **British Journal of Haematology**, v. 116, n. 3, p. 725–725, mar. 2002.
- ALI, S. Z.; CIBAS, E. S. **Serous Cavity Fluid and Cerebrospinal Fluid Cytopathology**. Boston, MA: Springer US, 2012.
- ALLEMANI, C. et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). **The Lancet**, v. 385, n. 9972, p. 977–1010, mar. 2015.
- ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2406, 2016.
- BHOJWANI, D.; YANG, J. J.; PUI, C.-H. Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 1, p. 47–60, fev. 2015.
- BIGNER, S. H. Cerebrospinal fluid (CSF) cytology: current status and diagnostic applications. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 51, n. 3, p. 235–45, maio 1992.
- BOMMER, M. et al. Cerebrospinal fluid pleocytosis. **Cancer Cytopathology**, v. 119, n. 1, p. 20–26, 25 fev. 2011.
- BONADIO, W. Pediatric Lumbar Puncture and Cerebrospinal Fluid Analysis. **Journal of Emergency Medicine**, v. 46, n. 1, p. 141–150, 2014.
- BRANDALISE, S. R. et al. Benefits of the intermittent use of 6-mercaptopurine and methotrexate in maintenance treatment for low-risk acute lymphoblastic leukemia in children: Randomized trial from the Brazilian childhood cooperative group - Protocol ALL-99. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 11, p. 1911–1918, 2010.
- BRODBELT, A.; STOODLEY, M. CSF pathways: a review. **British Journal of Neurosurgery**, v. 21, n. 5, p. 510–520, 6 jan. 2007.
- BÜRGER, B. et al. Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 2, p. 184–8, 15 jan. 2003.
- CANCELA, C. S. P. et al. Incidence and risk factors for central nervous system relapse in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, n. 6, p. 436–441, 2012.
- CANCELA, C. S. P. et al. Immunophenotyping of the cerebrospinal fluid as a prognostic factor at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 34, n. 2, p. 53–65, 2017.

CHIKLY, B.; QUAGHEBEUR, J. Reassessing cerebrospinal fluid (CSF) hydrodynamics: A literature review presenting a novel hypothesis for CSF physiology. **Journal of Bodywork and Movement Therapies**, v. 17, n. 3, p. 344–354, jul. 2013.

COEBERGH, J. W. W. et al. Leukaemia incidence and survival in children and adolescents in Europe during 1978–1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 13, p. 2019–2036, set. 2006.

COOPER, S. L.; BROWN, P. A. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 1, p. 61–73, 2015.

CRESPO-SOLIS, E. et al. Diagnosis of Acute Leukemia in Cerebrospinal Fluid (CSF-Acute Leukemia). **Current Oncology Reports**, v. 14, n. 5, p. 369–378, 26 out. 2012.

DASS, J. et al. Higher rate of central nervous system involvement by flow cytometry than morphology in acute lymphoblastic leukemia. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 39, n. 5, p. 546–551, out. 2017.

DE CAMARGO, B. et al. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: First report of 14 population-based cancer registries. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 3, p. 715–720, 1 fev. 2010.

DE SOUZA REIS, R. et al. Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 56, n. 1, p. 58–64, jan. 2011.

DEANGELIS, L. M.; CAIRNCROSS, J. G. A better way to find tumor in the CSF? **Neurology**, v. 58, n. 3, p. 339–340, 12 fev. 2002.

DORES, G. M. et al. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. **Blood**, v. 119, n. 1, p. 34–43, 5 jan. 2012.

EVANS, A. E.; GILBERT, E. S.; ZANDSTRA, R. The increasing incidence of central nervous system leukemia in children. **Cancer**, v. 26, n. 2, p. 404–409, ago. 1970.

FERMAN, S. et al. Childhood cancer mortality trends in Brazil, 1979 – 2008. **Clinics**, v. 68, n. 2, p. 219–224, 28 fev. 2013.

FREDERIKS, J. A. M.; KOEHLER, P. J. The first lumbar puncture*. **Journal of the History of the Neurosciences**, v. 6, n. 2, p. 147–153, ago. 1997.

GAJJAR, A. et al. Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 96, n. 10, p. 3381–4, 15 nov. 2000.

GALATI, D.; DI NOTO, R.; DEL VECCHIO, L. Diagnostic strategies to investigate cerebrospinal fluid involvement in haematological malignancies. **Leukemia Research**, v. 37, n. 3, p. 231–237, mar. 2013.

GILCHRIST, G. S. et al. Low numbers of CSF blasts at diagnosis do not predict for the development of CNS leukemia in children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: a Childrens Cancer Group report. **Journal of Clinical Oncology**, v. 12, n. 12, p. 2594–2600, dez. 1994.

HASEGAWA, D. et al. The utility of performing the initial lumbar puncture on day 8 in remission induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: TCCSG L99-15 study. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 58, n. 1, p. 23–30, jan. 2012.

HOWARD, S. C. et al. Risk factors for traumatic and bloody lumbar puncture in children with acute lymphoblastic leukemia. **JAMA**, v. 288, n. 16, p. 2001–7, 2002.

HUPPMANN, A. R. et al. Detection of Leukemic Lymphoblasts in CSF Is Instrument-Dependent. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 137, n. 5, p. 795–799, 1 maio 2012.

JAFFE, E. S. et al. **Pathology and Genetics: Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissue**. 3. ed. Lyon: International Agency for research on Cancer Press, 2001.

JAIME-PÉREZ, J. C. et al. Comparison of conventional cytomorphology, flow cytometry immunophenotyping, and automated cell counting of CSF for detection of CNS involvement in acute lymphoblastic leukemia. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 40, n. 2, p. 169–174, abr. 2017.

JASTANIAH, W. et al. Identifying causes of variability in outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia treated in a resource-rich developing country. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 62, n. 6, p. 945–950, jun. 2015.

KAMPEN, K. R. The discovery and early understanding of leukemia. **Leukemia Research**, v. 36, n. 1, p. 6–13, jan. 2012.

KO, S. Y. et al. Morphologic detection of blast cells in the cerebrospinal fluid at diagnosis of adult acute lymphoblastic leukemia appears to be associated with adverse prognosis. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 36, n. 4, p. 451–458, ago. 2014.

LEHMANN, L.; EL-HADDAD, A.; BARR, R. D. Global Approach to Hematologic Malignancies. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 417–432, abr. 2016.

LEONARD, J. P.; MARTIN, P.; ROBOZ, G. J. Practical Implications of the 2016 Revision of the World Health Organization Classification of Lymphoid and Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 23, p. 2708–2715, 10 ago. 2017.

LIANG, Y. et al. A Practical Strategy of Monitoring Minimal Residue Disease and Intervention for Central Nervous System Relapse of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 35, n. 5, p. 388–393, jul. 2013.

MAC DEMAY, RICHARD. Cerebrospinal Fluid. In: **The Art & Science of Cytopathology**. 2. ed. Chicago: ASCP Press, 2011. p. 724–795.

MACK, J.; SQUIER, W.; EASTMAN, J. T. Anatomy and development of the meninges: implications for subdural collections and CSF circulation. **Pediatric Radiology**, v. 39, n. 3, p. 200–210, 23 mar. 2009.

MAHMOUD, H. H. et al. Low Leukocyte Counts with Blast Cells in Cerebrospinal Fluid of Children with Newly Diagnosed Acute Lymphoblastic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 5, p. 314–319, 29 jul. 1993.

MARTÍNEZ-LAPERCHE, C. et al. Detection of occult cerebrospinal fluid involvement during maintenance therapy identifies a group of children with acute lymphoblastic leukemia at high risk for relapse. **American Journal of Hematology**, v. 88, n. 5, p. 359–364, maio 2013.

MASTRANGELO, R. et al. Report and recommendations of the Rome workshop concerning poor-prognosis acute lymphoblastic leukemia in children: biologic bases for staging, stratification, and treatment. **Medical and pediatric oncology**, v. 14, n. 3, p. 191–4, 1986.

MAURIZI, P. et al. Safe lumbar puncture under analgo-sedation in children with acute lymphoblastic leukemia. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 1, p. 173–177, 7 fev. 2014.

METAYER, C. et al. The Childhood Leukemia International Consortium. **Cancer Epidemiology**, v. 37, n. 3, p. 336–347, jun. 2013.

NUCKEL, H. et al. Detection of malignant haematopoietic cells in the cerebrospinal fluid by conventional cytology and flow cytometry. **Clinical and Laboratory Haematology**, v. 28, n. 1, p. 22–29, fev. 2006.

OREŠKOVIĆ, D.; RADOŠ, M.; KLARICA, M. Role of choroid plexus in cerebrospinal fluid hydrodynamics. **Neuroscience**, v. 354, p. 69–87, jun. 2017.

PARVIN, GANJEI-AZAR; MERCE, JORDA; AWTAR, K. Cerebrospinal Fluid Cytology. In: **Effusion Cytology A Practical Guide to Cancer Diagnosis**. New York: Demos Medical, 2011. p. 129–142.

PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD. **Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65763/>>. Acesso em: 27 out. 2017.

PERSKE, C. et al. CSF cytology-the ongoing dilemma to distinguish neoplastic and inflammatory lymphocytes. **Diagnostic Cytopathology**, v. 39, n. 8, p. 621–626, ago. 2011.

PINE, S. R. et al. Detection of Central Nervous System Leukemia in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia by Real-Time Polymerase Chain Reaction. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 1, p. 127–132, fev. 2005.

PUI, C.-H.; EVANS, W. E. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 2, p. 166–178, 12 jan. 2006.

PUI, C.-H.; EVANS, W. E. A 50-Year Journey to Cure Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Seminars in Hematology**, v. 50, n. 3, p. 185–196, jul. 2013.

PUI, C. H. et al. Early intensification of intrathecal chemotherapy virtually eliminates central nervous system relapse in children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 92, n. 2, p. 411–5, 15 jul. 1998.

PUI, C. H. et al. A revised definition for cure of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 28, n. 12, p. 2336–2343, 30 dez. 2014.

PUI, C.; THIEL, E. Central Nervous System Disease in Hematologic Malignancies: Historical Perspective and Practical Applications. **Seminars in Oncology**, v. 36, p. S2–S16, ago. 2009.

RANTA, S. et al. Detection of central nervous system involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia by cytomorphology and flow cytometry of the cerebrospinal fluid. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 62, n. 6, p. 951–956, jun. 2015.

RAVINDRANATH, Y. Evolution of Modern Treatment of Childhood Acute Leukemia and Cancer. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 1, p. 1–10, fev. 2015.

REDAELLI, A. et al. A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). **European Journal of Cancer Care**, v. 14, n. 1, p. 53–62, mar. 2005.

RENSHAW, A. A. et al. Leukemia/lymphoma in cerebrospinal fluid: distinguishing between cases that performed well and poorly in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Non-gynecologic Cytology. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 130, n. 12, p. 1762–5, dez. 2006.

ROSE-INMAN, H.; KUEHL, D. Acute Leukemia. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 32, n. 3, p. 579–596, ago. 2014.

SAKKA, L.; COLL, G.; CHAZAL, J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. **European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases**, v. 128, n. 6, p. 309–316, dez. 2011.

SCHINSTINE, M. et al. Detection of malignant hematopoietic cells in cerebral spinal fluid previously diagnosed as atypical or suspicious. **Cancer**, v. 108, n. 3, p. 157–162, 28 abr. 2006.

SCRIDELI, C. A. et al. Molecular diagnosis of leukemic cerebrospinal fluid cells in children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 89, n. 8, p. 1013–5, ago. 2004.

SCRIDELI, C. A. Involvement of the cerebrospinal fluid cells in children with acute lymphoblastic leukemia: prognostic implications. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, n. 6, p. 408–409, 2012.

SHAIKH, F. et al. The risk of traumatic lumbar punctures in children with acute lymphoblastic leukaemia. **European Journal of Cancer**, v. 50, n. 8, p. 1482–1489, maio 2014.

SIMONE, J. V. History of the treatment of childhood ALL: A paradigm for cancer cure. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 19, n. 2, p. 353–359, jun. 2006.

SIRVENT, N. et al. Prognostic significance of the initial cerebro-spinal fluid (CSF) involvement of children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) treated without cranial irradiation: Results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Children . **European Journal of Cancer**, v. 47, n. 2, p. 239–247, jan. 2011.

SPECTOR, R. et al. A balanced view of choroid plexus structure and function: Focus on adult humans. **Experimental Neurology**, v. 267, p. 78–86, maio 2015.

SUBIRÁ, D. et al. Flow cytometry and the study of central nervous disease in patients with acute leukaemia. **British journal of haematology**, v. 112, n. 2, p. 381–4, fev. 2001.

SWERDLOW, S. H. et al. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4. ed. Lyon: International Agency for research on Cancer Press, 2008.

SWERDLOW, S. H. et al. **WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid tissues**. 4 revised ed. Lyon: International Agency for research on Cancer Press, 2017.

TUBERGEN, D. G. et al. Blasts in CSF with a normal cell count do not justify alteration of therapy for acute lymphoblastic leukemia in remission: a Childrens Cancer Group study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 12, n. 2, p. 273–278, fev. 1994.

TYLER, K. L. Chapter 28: a history of bacterial meningitis. **Handbook of clinical neurology**, v. 95, n. C, p. 417–33, 2010.

VIANA, S. S. et al. Secular trends and predictors of mortality in acute lymphoblastic leukemia for children of low socioeconomic level in Northeast Brazil. **Leukemia Research**, v. 39, n. 10, p. 1060–1065, 2015.

VORA, A. et al. Influence of Cranial Radiotherapy on Outcome in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With Contemporary Therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 9, p. 919–926, 20 mar. 2016.

WALTS, A. E. Cerebrospinal fluid cytology: selected issues. **Diagnostic cytopathology**, v. 8, n. 4, p. 394–408, 1992.

WICK, M. et al. Liquorzytologie. **Der Nervenarzt**, v. 87, n. 12, p. 1276–1281, 2016.

REGRAS DA REVISTA

Instructions for Authors

About the Archives

The Archives of Pathology & Laboratory Medicine (ARCHIVES) is the official journal of the College of American Pathologists, an organization whose mission is to represent the interests of patients, the public, and pathologists by fostering excellence in the practice of pathology worldwide.

The ARCHIVES publishes original, peer-reviewed articles for pathologists and clinical laboratory scientists. This information is intended to help laboratorians keep abreast of the ever-increasing knowledge base necessary to the successful practice of pathology and laboratory medicine. The journal actively pursues articles that focus on new and/or complex technologies/disciplines, such as molecular pathology, cytogenetics, HLA, cytometry, informatics, and the science of medical laboratory management.

The ARCHIVES is available full-text and images at www.archivesofpathology.org.

Submission of Manuscripts

Manuscripts are considered with the understanding that they have not been published previously in print or electronic format and are not under consideration by another publication or electronic medium. All manuscripts to be considered for publication in the ARCHIVES must be submitted to our online peer review system, AllenTrack, which is available at <http://archivesofpathology.allentrack.net>. This system allows authors to submit text and figures via the Internet. Helpful information about the submission process is available on the site. Authors may check on the status of their submissions at any time during the review process.

When first visiting the above site, authors will need to register. When registering, you will be asked to create a login name and password. If you forget your password, simply go to the AllenTrack Web page (listed above) and click on the Unknown/Forgotten Password? link. After entering either your AllenTrack login name or your name, you will receive an e-mail with a temporary password.

It is important to note that the instructions found on the AllenTrack site primarily refer to how to load submissions and specific information regarding figure requirements. Authors are strongly encouraged to review the Instructions for Authors shown below (available online at <http://www.archivesofpathology.org>) prior to submitting a manuscript to ensure their manuscripts are properly prepared and formatted. Submissions not prepared according to the Instructions for Authors will be returned to the authors for revision prior to the start of the review process.

Manuscript Files Needed

Prior to submitting a manuscript, submitting authors should collect electronic files for the article file, author cover letter, figures, and tables. Completed authorship forms also should be collected from all authors.

Cover Letter.—The information in the cover letter will not be supplied to reviewers. All author names, academic degree(s), and affiliations must be clearly listed. Specify who will serve as the corresponding author. If an author's affiliation has changed since the work was done, also list the new affiliation. The editorial office reserves the right to review the number of authors on all submissions. All coauthors should have contributed to the study and manuscript preparation and they should be thoroughly familiar with the substance of the final manuscript and be able to defend its conclusions (also see the authorship responsibility section of the accompanying authorship form).

Specify the address to which requests for reprints (if available) should be sent. If the manuscript was presented at a meeting, specify the complete name of the meeting (spell out association names), the city where it was held, and the exact date on which the paper was presented. Acknowledge financial support provided to the authors for the research presented in the manuscript.

If figures are being reprinted with the permission of a publisher, specify whether the permission letter(s) will be faxed or e-mailed to the ARCHIVES editorial office.

Figures.—Authors will load figure files directly into the AllenTrack system. Halftone and color images should be submitted at a minimum of 300 ppi, while line art should be submitted at 1200 ppi. Figure files can be submitted using TIFF, EPS, Word, and PowerPoint formats. Important Note: Do not submit photomicrographs as either Word or PowerPoint files. Digital color files must be submitted in CMYK mode. Label each figure in the lower left-hand corner; labels should not include the word "Figure."

Figures that are not submitted in accordance with these guidelines are subject to revision, at the discretion of the editorial office. The ARCHIVES does not charge authors to print color figures.

— Number illustrations according to the order in which they are cited in the text.

— Double-space legends on a separate page. Avoid legends that are excessively long; most legends should not exceed 40 words. Indicate magnification and stain used for photomicrographs.

— Acknowledge fully all illustrations and tables taken from other publications, and submit a copy of the permission letter to reprint from the copyright owner.

For information regarding the number of figures that may be submitted, see the instructions specific to each manuscript type beginning on the second page.

Tables.—Double-space on separate pages. Title all tables and number them in the order of their citation in the text. If a table must be continued, repeat the title on a second page, followed by "(cont.)." Abbreviations/acronyms used in a table must be defined in a footnote below the table.

Authorship Form.—All authors must complete and sign the copyright, authorship responsibility, and financial interest statements shown on the authorship form (last page of instructions). All author names must be clearly printed on the form, and each author's signature should appear next to his/her name. Manuscripts cannot be accepted until this completed form is submitted. Completed forms may be returned to the ARCHIVES editorial office via e-mail attachment, fax, or mail (see last page of instructions for e-mail address, fax number, and mailing address). Be sure to include the title of the manuscript and, if known, the manuscript number, at the top of the form. Note: Faxed forms must have legible names and signatures.

Manuscript Preparation

Review the following information concerning the preparation of the article file. Also see the following pages of these instructions for specific information related to Original Article, Review Article, Editorial, Letter to the Editor, and Resident Short Review submissions.

— Authors should make certain that all identifying information, such as author names and affiliations, does not appear on the title page, text pages, and figures. However, all manuscripts should still include a title page (see Title Page below).

— Manuscripts should be prepared in accordance with the American Medical Association (AMA) Manual of Style, 10th edition.

— Double-space throughout, including title page, abstract, text, acknowledgments, references, legends for illustrations, and tables. The right margin should be unjustified (ragged).

— The article file should not contain unnecessary formatting. Specifically, only use hard returns at the end of paragraphs and display lines; do not use an extra hard return between paragraphs; do not use tabs or extra space at the start of paragraphs or for list entries; do not indent runover lines in references; do not use different typefaces, page breaks, or headers; and turn off line spacing and hyphenation and justification.

— Start each section on a new page, numbered consecutively in the upper right-hand corner, beginning with the title page.

— Use conventional units of measurement throughout the manuscript, with conversion factors for Système International (SI) units expressed once in parentheses after the first mention of the conventional unit. Example: "The blood glucose concentration of 126 mg/dL (to convert to millimoles per liter, multiply by 0.0555) was used as a criterion for diagnosing diabetes." If several laboratory values are listed, conversion factors may be listed in a paragraph at the end of the Materials and Methods section. In tables and figures, conversion factors should be presented in the footnote or legend. Hematologic values should only be reported using conventional units.

— Use generic names of drugs, unless the specific trade name of a drug used is directly relevant to the discussion.

— Do not use abbreviations in the title or abstract, and limit their use in the text.

— When using acronyms, make certain the full name is spelled out on first use.

— Give sources (name of company and location) for all special reagents (eg, antibodies, enzymes, probes) and products.

— When referring to a percentage derived from a study sample, include with the percentage the numbers from which the percentage is derived. Example: "Of the 46 positive test results, 23 (50%) were from laboratory B." Any discrepancy in the sum of percentages in a tabulation (due to rounding of numbers, missing values, or multiple procedures) should be specifically explained in the manuscript.

Title Page (page 1 of manuscript).—List only the title and subtitle of the manuscript on this page. All author names, affiliations, financial support received, and related information should only be listed in the cover letter.

Abstract (page 2 of manuscript).—Providing a well-written abstract is critical to help guide researchers to articles. For reports of original data (Original Articles), submit a structured abstract of no more than 250 words under the headings of Context, Objective, Design, Results, and Conclusions. For review manuscripts, submit a structured abstract of no more than 250 words under the headings of Context, Objective, Data Sources, and Conclusions. For reports of the results of meta-analyses, submit a structured abstract of no more than 250 words under the headings of Context, Objective, Data Sources, Study Selection, Data Extraction, and Conclusions. Authors submitting manuscripts that report consensus statements should provide a structured abstract of no more than 250 words under the headings of Objective, Participants, Evidence, Consensus Process, and Conclusions. For Resident Short Review submissions, include an unstructured abstract of no more than 150 words.

For detailed information concerning what to include under each abstract heading, refer to the AMA Manual of Style.

— When writing abstracts, do not begin by repeating the manuscript's title. Do not list anything in the abstract that is not also in the manuscript. Do not cite references.

References.—Number references in the order they are mentioned in the text; do not alphabetize. In text, tables, and legends, identify references with superscript Arabic numerals. Submit a preprint for references cited as in press. In listing references, follow AMA style, abbreviating names of journals according to Index Medicus. Note: List all authors and/or editors up to 6; if more than 6, list the first 3 and then "et al." Provide the issue number in parentheses after the volume number. For online journals or articles published online ahead of print, provide the DOI number, if possible, rather than the URL. URLs used in references will not be made hyperlinks.

Examples:

1. Guler ML, Daniels JA, Abraham SC, Montgomery EA. Expression of melanoma antigens in epithelioid gastrointestinal stromal tumors: a potential diagnostic pitfall. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(8):1302–1306.

For a reference to a chapter in a book:

2. Glinioer D. Thyroid disease during pregnancy. In: Braverman LE, Utiger RE, eds. *Werner and Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. 8th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2000:1013–1027.

Authors are responsible for the accuracy of references.

Personal communications.—Personal communications should be listed at the appropriate location in the text; they should not be listed as a reference. Authors who name an individual as a source of information via a personal communication, whether it is through a conversation, an e-mail, a telephone conversation, a fax, or a letter, must include the full name and highest academic degrees of the individual. Also include the date of the communication, and state whether it was an oral or written communication. Authors who cite personal communications must obtain written permission from the named individual and must include a copy of the permission letter with a new manuscript. After loading manuscript files, submissions will be converted into a PDF file. It is important to note that the submitting author must approve the converted file before the submission process is complete.

Informed Consent.—If the manuscript reports the results of an experimental investigation of human subjects, state formally that consent was obtained from the subjects after the nature of procedure(s) had been fully explained. Include a signed statement of consent from the patient (or, if the patient is a minor, from both parents or the legal guardian) with all identifiable photographs. Consent forms must contain a specific statement that photographs and information related to a case may be published separately or together, and that the patient's name will not be disclosed.

Ethical Requirements.—For human or animal experimental investigations, specify in the Methods section of the manuscript what protocols were followed, eg, "Institutional guidelines regarding animal experimentation were followed." For those investigators who do not have formal ethics review committees (institutional or regional), the principles outlined in the Declaration of Helsinki¹ should be followed.

Journal Section-Specific Instructions

In addition to the following section-specific instructions, authors are reminded to review the previous pages of these instructions for information concerning required manuscript files and manuscript preparation.

Original Articles

Submissions to the Original Article section should consist of original research. The research discussed in Original Articles must receive institutional review board approval and this approval must be stated in the Materials and Methods section. Original Articles should generally not exceed 50 double-spaced text pages and have no more than 12 figures/tables. Submit a structured abstract of no more than 250 words under the headings of Context, Objective, Design, Results, and Conclusions.

Review Articles

Review Articles are considered on an invitation-only basis. Authors who wish to submit a review article should first send an e-mail to the ARCHIVES editorial office with a proposed topic. The ARCHIVES Editor in Chief will consider the topic with respect to current editorial priorities.

Review Articles should provide a comprehensive summary of the available information on a specific topic focusing on one or two significant developments and/or a new, novel interpretation of the subject. The topic will ultimately dictate the overall length of a Review Article. The maximum length for Review Articles should generally not exceed 50 double-spaced text pages, and there should be no more than 12 figures/tables. Review Articles should not have more than 8 authors. Submit a structured abstract of no more than 250 words under the headings of Context, Objective, Data Sources, and Conclusions.

Editorials

Editorials are considered on an invitation-only basis. Authors who wish to submit an editorial should first send an e-mail to the ARCHIVES editorial office with a proposed topic. The ARCHIVES Editor in Chief will consider the topic with respect to current editorial priorities. Editorials generally should not exceed 1000 words. An abstract is not required. Editorials must be prepared in the same manner as a manuscript as described above.

Letters to the Editor

Letters should be limited to 500 words or fewer and to no more than 5 pertinent references. An abstract is not required. Letters must be prepared in the same manner as a manuscript as described above.

Resident Short Reviews These short review articles address a very specific disease or issue that is relevant for clinical practice and provide an evidence-based, balanced, pathology-oriented review on a focused topic in anatomic or clinical pathology. The topic should be restricted to a single defined diagnostic entity or test; for example, fibrolamellar hepatocellular carcinoma rather than liver tumors; polymerase chain reaction diagnosis of tuberculosis rather than polymerase chain reaction diagnosis of all infections. More exhaustive reviews of broader topics should become regular Review Articles. Resident Short Review articles should include clinical features, gross pathology/histopathology/laboratory findings, ancillary studies, differential diagnosis, current treatment, and prognosis. No specific case report section should be included. An unstructured abstract of no more than 150 words that summarizes the objective, main points, and conclusions of the manuscript is required. The minimum length for Resident Short Review articles is 6 double-spaced manuscript pages (10 or 12-point font size) and the maximum length is 15 double-spaced text pages (excluding the title page). The maximum number of references is 30, and the maximum number of figures and/or tables is 8. Note: Each figure included in a figure composite counts toward the figure maximum (eg, a composite of 4 figures is considered 4 of the 8 figures allowed). **Authorship.**—Unless special conditions exist, there should be no more than 2 authors for Resident Short Review submissions. The first author should be a resident and the second author should be a faculty mentor. Resident Short Reviews will be subject to the same peer-review process as any manuscript submitted to the ARCHIVES.

Editing of Accepted Submissions

All accepted manuscripts will be copyedited according to AMA style, and returned with proofs to the corresponding author for approval. Authors will receive their page proofs via e-mail as portable document format (PDF) files. Proofs are sent within approximately 6 weeks from date of acceptance. The authors are responsible for

all statements made in their work, including any changes made by the copy editor and authorized by the corresponding author. Authors are strongly encouraged to review their page proofs.

Reprints

Forms for ordering reprints are included with the edited typescript and page proofs sent for approval. Reprints are shipped 2 to 3 weeks after publication.

All accepted manuscripts become the permanent property of the CAP and may not be published elsewhere without written permission from the CAP or the ARCHIVES editorial office.

Contact the editorial office (mailing and e-mail address shown below) for reprint permissions.

Archives of Pathology & Laboratory Medicine

College of American Pathologists

325 Waukegan Rd

Northfield, IL 60093-2750

Phone: 847-832-7400; Fax: 847-832-8400

E-mail: archivesofpathology@cap.org

Completed authorship forms may be mailed to this address.

Reference

1. World Medical Association. Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>. Accessed October 14, 2010. (rev. January 2015)

ARTIGO

Identificação de células blásticas em líquido cefalorraquidiano de crianças com Leucemia Linfoblástica Aguda: apresentação de um protocolo padronizado

Cleberton Leonel de Freitas Bautista Sequeira Blanco², Thalyta Porto Fraga¹, Marcelle Vieira Freire², Iverson Xavier Duarte³, Pollyanna Domeny Duarte³, Cristiano de Queiroz Mendonça¹, Rosana Cipolotti⁴

¹Universidade Federal de Sergipe, Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Aracaju/ SE;

²Universidade Federal de Sergipe, Aracaju/ SE;

³Laboratório Patológica, Aracaju/SE;

⁴Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Medicina, Aracaju/ SE.

RESUMO

Contexto: O Sistema Nervoso Central (SNC) é importante sítio de recaída em pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), apesar das crescentes taxas de cura em pacientes jovens. A presença de blastos no Líquido Cefalorraquidiano (LCR) apresenta implicação prognóstica e define mudanças no protocolo terapêutico, necessitando, assim, de acurácia diagnóstica. As novas técnicas diagnósticas (citometria de fluxo e métodos moleculares) têm custo mais elevado e são menos acessíveis, implicando na necessidade de reavaliar-se o papel da citologia como instrumento diagnóstico. **Objetivos:** Identificar a proporção de exames de LCR positivos para blastos em crianças e adolescentes com LLA, utilizando-se de técnica de citologia padronizada e com padronização de variáveis relacionadas ao processo que pudessem interferir no resultado. **Desenho:** Estudo prospectivo, descritivo, não controlado, no qual foram examinadas amostras de LCR obtidas por punção lombar de pacientes com LLA. As amostras de LCR foram encaminhadas ao laboratório logo após a coleta, sendo processadas e citocentrifugadas em citofunil. Quatro lâminas foram preparadas, coradas e analisadas por um patologista e um hematologista. **Resultados:** Foram avaliados 28 pacientes com LLA, havendo predomínio do sexo masculino (58,6%), imunofenótipo B (82,2%) e 78,5% foram estratificados como de alto risco para recaída. Dentre as 205 amostras de LCR, 26 (12,6%) foram positivas para blastos e dentre os 28 pacientes, 11 (39,2%) obtiveram algum exame de LCR com infiltração neoplásica. **Conclusão:** A citologia convencional foi efetiva na identificação de infiltração de SNC por blastos, desde que haja uma vigilância dos fatores relacionados a coleta, processamento e análise do LCR que possam interferir na fidedignidade do resultado.

CONTEXTO

Leucemias agudas são a categoria de câncer mais frequente em crianças com até 15 anos de idade, representando 25% dos cânceres infantis¹. A incidência média anual das leucemias no Brasil é de 53,3 casos por um milhão de crianças e adolescentes com até 15 anos incompletos, com variação, de acordo com a região geográfica, de 24,8 a 76,8 casos por milhão². Cerca de 17% das leucemias em crianças e adolescente são do tipo Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e 80% são de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), esta acometendo principalmente crianças entre um e quatro anos de idade³.

As taxas de cura de crianças e adolescentes com LLA melhoraram de forma expressiva nas últimas quatro décadas, principalmente nos países com alto nível socioeconômico. Nesses países, a sobrevida em cinco anos passou de 54,1% entre os anos de 1975 a 1977, para 85,1% entre 1999 a 2005⁴. Assim, atualmente, mais de 80% das crianças e adolescentes com LLA tratadas através de protocolos multicêntricos, em centros especializados de países com elevado nível sócioeconômico, apresentam sobrevida livre de doença semelhante à expectativa de vida da população geral^{3,5,6}. Para adultos o cenário é diferente, com taxas de cura inferiores a 40%⁷.

O avanço obtido nos resultados do tratamento da LLA em crianças e adolescentes tem relação com a identificação de fatores que influenciam nos desfechos desfavoráveis (óbito e recaída). Recaídas em LLA ocorrem principalmente em sistema nervoso central (SNC) e medula óssea (MO), isoladas ou combinadas. As taxas de recaída em SNC no início dos anos 1970 eram de 75%⁸. Com a introdução de tratamento direcionado para doença em SNC (radioterapia e quimioterapia intratecal) que ocorreu ainda na década de 1970, as taxas atuais de acometimento de SNC (isolado ou combinado) são de 6%^{9,10}.

As LLAs podem acometer células precursoras de linfócitos B ou T. No Brasil, o atual Protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia na Infância – 2009 (GBTLI LLA-2009) estratifica o risco de recaída dos pacientes com LLA de linfócitos B (LLA-B) em baixo ou alto considerando-se características clínicas, laboratoriais e citogenéticas. Os critérios para baixo risco são: idade ≥ 1 e < 9 anos; < 50.000 glóbulos brancos/mm³; SNC livre de infiltração leucêmica no diagnóstico; cariótipo

favorável (BCR-ABL negativo, ausência de rearranjo de MLL, ausência de hipoploidia); $<1000/\text{mm}^3$ blastos em sangue periférico no oitavo dia de tratamento (D8); MO em remissão, evidenciada por Doença Residual Mínima (DRM) $<10^{-3}$ medida por citometria de fluxo no décimo-quinto dia de tratamento (D15); MO em remissão, evidenciada por DRM negativa medida por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no trigésimo quinto dia de tratamento (D35). Todos esses critérios devem estar presentes para que o paciente seja classificado como de baixo risco para recaída. Os pacientes com LLA de linfócitos T (LLA-T), com presença de cromossomo Philadelphia (Ph^+), lactentes com idade <1 ano e os portadores de Síndrome de Down recebem tratamento segundo protocolos específicos para essas condições.

Ainda de acordo com o GBTLI LLA-2009, leucemia em SNC é definida como: SNC-1 quando não há blastos; SNC-2 quando há ≤ 5 blastos/ mm^3 ; SNC-3 quando há > 5 blastos/ mm^3 e TPL^+ nos casos de punção lombar traumática¹¹. Esses critérios são baseados em um documento produzido em Roma em 1986, no qual salienta-se que a escolha de cinco células como ponto de corte para SNC-2 não foi baseada em estudos e sim arbitrária, produto do consenso dos estudiosos participantes do evento¹².

Infiltração blástica maciça de SNC ao diagnóstico está associada a pior prognóstico¹³. No entanto, há controvérsias se há relação entre LCR com presença de pequena quantidade de células (SNC-2) e desfecho desfavorável. Alguns autores referem que a presença de qualquer quantidade de blastos no LCR e punção lombar traumática estão associados a maior risco de recaída da doença e pior prognóstico¹⁴⁻¹⁷, enquanto outras pesquisas não encontraram essa associação¹⁸⁻²⁰.

O método padrão-ouro para pesquisa de células neoplásicas no LCR é a citologia convencional com microscopia óptica²¹⁻²³. Entretanto, outros autores questionam a designação de padrão-ouro para a citologia convencional por considerarem que o método apresenta baixa sensibilidade e é operador-dependente. Como forma de aumentar a acurácia no diagnóstico de infiltração leucêmica em SNC novas técnicas têm sido relatadas, entre elas a citometria de fluxo e a identificação de marcadores moleculares²¹.

Em 2012, enquanto a maioria dos trabalhos ressaltava as limitações da citologia convencional, um estudo descreveu diferença na taxa de detecção de blastos em LCR após a mudança da marca da citocentrífuga e relatou que a detecção é instrumento-dependente, sendo as novas máquinas mais eficientes que as anteriores⁴. Com isso, a análise citológica do LCR readquiriu importância, pois é um método acessível e de custo menor do que a citometria de fluxo e os métodos moleculares^{24,25}.

O presente estudo teve por objetivo identificar a proporção de exames de LCR positivos para blastos em crianças e adolescentes portadores de LLA, utilizando-se de técnica de citologia padronizada e com controle de variáveis relacionadas ao processo que pudessem interferir no resultado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo prospectivo, descritivo, não controlado, em um serviço de referência para o atendimento de crianças e adolescentes com câncer. Trata-se de um serviço exclusivamente público, vinculado ao Sistema Único de Saúde brasileiro, e que funciona nas dependências de um hospital geral administrado pela Secretaria Estadual de Saúde de um estado da região nordeste do Brasil. É o único serviço público de oncologia pediátrica do estado e tem cerca de 25% de sua clientela residente em estados vizinhos.

Foram incluídos crianças e adolescentes ≤ 19 anos com diagnóstico de LLA entre janeiro de 2016 e junho de 2017 e que estavam iniciando o tratamento (D1) conforme o protocolo GBTLI LLA-2009^{11,26}. Resultados de hemogramas, mielogramas, dados pessoais e clínicos dos pacientes e informações sobre os desfechos foram obtidos dos prontuários.

As amostras de LCR eram colhidas quinzenalmente nas primeiras quatro semanas de tratamento (fase de indução da remissão), a cada quatro semanas nos seis meses seguintes (fases de consolidação e intensificação), e a cada oito semanas até o final do tratamento (fase de manutenção). A cada punção lombar, além da coleta de uma amostra de LCR, era administrada quimioterapia intratecal

tríplice constituída de metotrexate, citarabina e dexametasona. Os pacientes que apresentaram um exame com presença de blastos passavam a repetir o procedimento semanalmente até que dois exames viessem isentos de células blásticas, quando então o paciente retornava à frequência usual de coleta de LCR da etapa do tratamento na qual se encontrava.

As coletas foram realizadas por um médico oncopediatra com habilidade, treinamento e experiência em realização de punção lombar. O decúbito lateral foi a posição escolhida em todos os casos e foi utilizada sedação com midazolan (dose: 0,3 a 0,5 mg/kg) ou quetamina (dose: 1mg/kg) exceto nos casos em que o paciente não desejava a sedação. Foram empregadas agulhas descartáveis atraumáticas com mandril, com calibre de 22 gauge.

As amostras de LCR foram colhidas em tubo de plástico seco e foram encaminhadas imediatamente, sem meio de fixação e em frasco com vedação adequada, ao Laboratório Patologika®, sendo processadas em até quatro horas desde a coleta. A amostra foi homogeneizada no agitador Vortex por dois minutos. Após isso, acrescentou-se 200 microlitros (4 gotas) de albumina bovina 22% ao LCR, sendo misturados. Foi utilizado 0,5 mL da amostra para cada citofunil da citocentrífuga (Tharmac®), sendo preparados quatro citofunis, com lâminas e papel filtro, os quais foram processados por 10 minutos a 800 rpm. Os preparados citológicos foram corados pelas técnicas de Panótico® e Giemsa (colorações de Romanowsky). Foram utilizadas lâminas de vidro com carga positiva (Leica® BOND™ Plus Slides) (Figura 1).

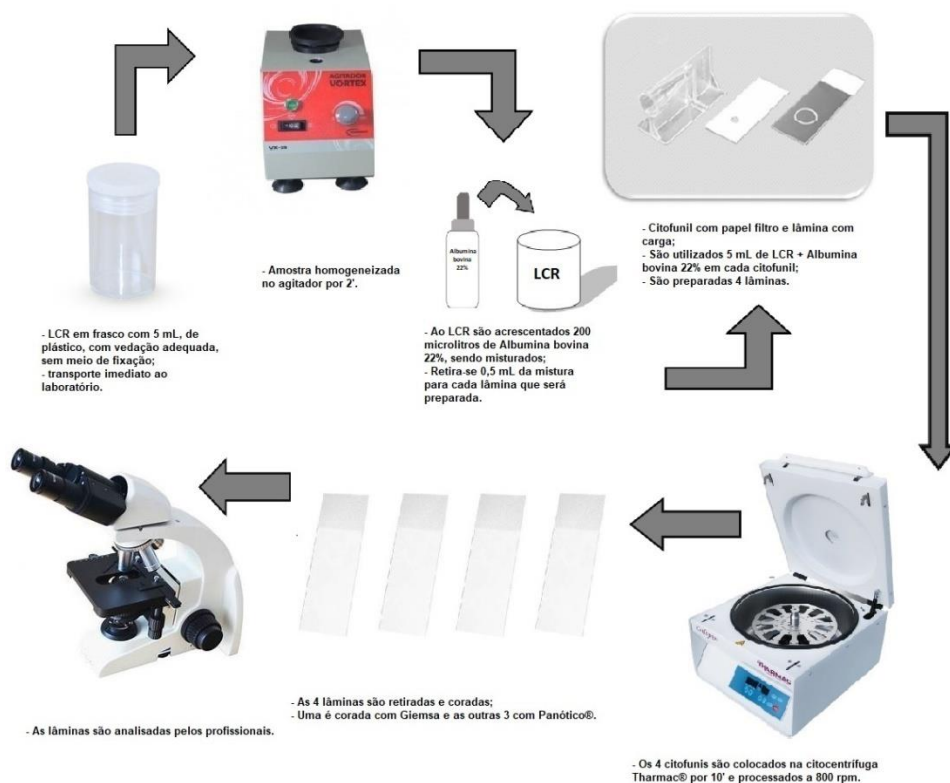


Figura 4: Fluxo do LCR desde a coleta até o processamento e análise.

A análise das lâminas foi realizada de forma independente por um único patologista (T.P.F.) e um único hematologista (P.D.D.). Os resultados foram expressos em: positivos para infiltração por blastos; negativos para infiltração por blastos; suspeitos para infiltração por blastos. Os casos com resultados suspeitos foram revistos por mais um patologista (I.X.D.) e reagrupados na categoria positivos ou negativos (Figura 2). Na avaliação, a caracterização morfológica do blasto foi comparada com a amostra inicial coletada da medula óssea (Figura 3), e dados de sangue periférico no momento da coleta (ausência ou presença de blasto em sangue periférico) foram considerados na definição diagnóstica. Não foi considerada a quantidade de células neoplásicas na amostra, pois na literatura há controvérsias em relação a esse critério, com alguns trabalhos referindo que qualquer quantidade de blastos no LCR já estaria associada a pior prognóstico, indicando tratamento mais agressivo nesses casos^{14,22,27}.

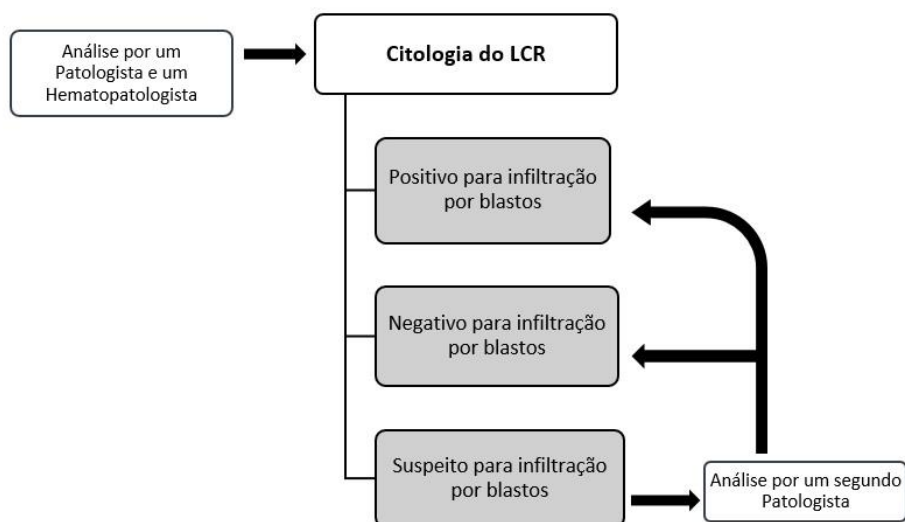


Figura 5: Organograma dos resultados de LCR.

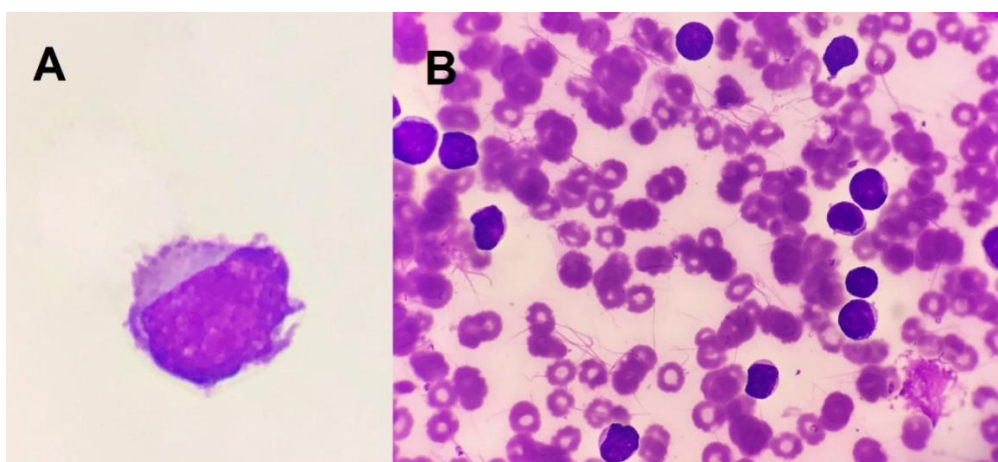


Figura 6: A. Linfoblasto em LCR. B. Linfoblastos em esfregaço do mielograma diagnóstico. (A e B, Panótico®, 1000x).

Os dados foram analisados pelo *software*Epi Info, com comparações entre grupos feitas através dos testes Qui quadrado ou exato de Fisher, e ANOVA/Teste t ou Mann-Whitney, conforme indicado. Foram consideradas estatisticamente significativas as variáveis que apresentaram diferenças superiores a 95% ($p < 0,05$).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Sergipe (CAAE 58097916.6.0000.5546) e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido do responsável pelo paciente.

RESULTADOS

Vinte e nove pacientes foram admitidos com diagnóstico de LLA ao longo dos 18 meses de coleta de LCR, com uma média de acompanhamento de 9,5 meses (0,5-21 meses). Um dos 29 pacientes foi a óbito antes da primeira coleta de LCR. Obteve-se um total de 205 amostras de LCR de 28 pacientes, com variação na quantidade de amostras por paciente (característica relacionada à fase do tratamento e óbito), conforme Figura 4. As características clínicas dos pacientes são mostradas na Tabela1.

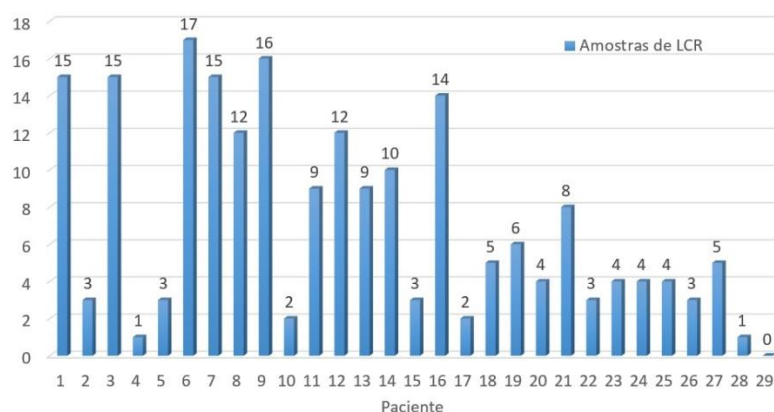


Figura 7: Quantidade de amostras de LCR obtidas de cada paciente.

Características		N	%
Sexo	M	16	57,1
	F	12	42,8
LLA*	T	4	14,8
	B	23	85,1
Leucócitos totais	<50.000	14	50,0
	≥50.000	14	50,0
Óbito		9	31,1
Óbito por infecção		6	66,6
LCR	Positivo	11	39,2
	Negativo	17	60,8
Grupo de Risco	Baixo	6	21,4
	Alto	22	78,5

*Um paciente foi a óbito, sem definição do imunofenótipo da LLA.

LLA: Leucemia linfoblástica aguda. LCR: Líquido cefalorraquidiano.

Na Tabela 2 apresentam-se os dados comparativos entre pacientes que tiveram algum exame de LCR positivo para blastos e os que tiveram todos os exames negativos.

Tabela 2. Dados comparativos entre pacientes com LCR positivo e LCR negativo.				
		LCR positivo	LCR negativo	P
Idade ao diagnóstico (média; dp) anos		8,9 (5,4)	9,1 (5,3)	0,8
Tempo desde o diagnóstico (média; dp) meses		11,2 (7,5)	8,9 (6,0)	0,3
Leucócitos ao diagnóstico (média)		52182,7	78562,0	0,9
Quantidade de LCR mL (média;dp)		0,75 (0,38)	0,72 (0,40)	0,7
SEXO	M	7	9	0,7
	F	4	8	
LLA*	T	1	3	1
	B	9	14	
Óbito	S	4	5	1
	N	7	12	
Óbito por infecção	S	3	3	0,8
	N	1	2	

* Um paciente foi a óbito, sem definição do imunofenótipo da LLA

DISCUSSÃO

Os recentes protocolos quimioterápicos para LLA em crianças e adolescentes representam inequívoco sucesso terapêutico, uma vez que em cerca de quatro décadas as taxas de cura passaram de próximas a zero para valores superiores a 80-90%. Entretanto, o SNC segue como sítio frequente de recaída e a identificação de infiltração de LCR por blastos leucêmicos exige mudanças no protocolo terapêutico¹⁰. Dentre os métodos diagnósticos disponíveis, a citologia convencional do LCR destaca-se por ser acessível e de baixo custo.

Estudo anterior identificou que pode haver incremento na sensibilidade do teste a partir da padronização da técnica empregada²⁸. Com esse conceito, o presente estudo coordenou variáveis técnicas, padronizou etapas e processos envolvidos na análise do LCR de pacientes pediátricos com LLA através de citologia convencional.

Vários fatores exercem influência na qualidade dos resultados da análise do LCR²⁸⁻³⁰. Fatores pré-analíticos se referem a sedação do paciente, experiência do médico que fez a coleta, quantidade de LCR, armazenamento, tempo até a análise e processamento da amostra. Estudo anterior observou que a realização do procedimento por médicos mais experientes, assim como o uso de sedação durante o procedimento, estariam associadas a menores chances de trauma durante a punção lombar, com diminuição de resultados falsos-positivos para infiltração blástica em SNC¹⁴. Outros estudos referem associações semelhantes³¹⁻³³. Ainda em relação às variáveis pré-analíticas, outros autores destacaram o papel da quantidade de LCR e do tempo até processamento e análise como fatores importantes e limitantes no resultado da avaliação citológica²⁴.

Costuma-se utilizar em preparações para citopatologia a coloração de Papanicolaou, a qual apresenta limitações na avaliação de células hematopoiéticas³⁰. Para essas células, alguns autores destacam a maior chance de diagnosticar-se célula neoplásica hematológica através de colorações baseadas no Romanowsky³⁰. Baseado nisso, o presente estudo utilizou somente colorações baseadas no Romanowsky.

O estudo incluiu 29 pacientes, sendo 57% do sexo masculino, semelhante à proporção de 52,4 % descrita previamente no Brasil²⁶. Estudo anterior realizado no mesmo serviço identificou 55,7% de meninos³⁴. A média de idade ao diagnóstico foi 8,9 anos, com 52% tendo entre ≥ 1 e < 9 anos de idade, abaixo dos 71% descrito na avaliação dos resultados do GBTLI-99²⁶.

Com relação ao imunofenótipo da LLA, quase 15% dos pacientes tinha leucemia aguda com imunofenótipo T. Segundo o GBTLI LLA- 99, as incidências de LLA-B e LLA-T no Brasil são em torno de 86% e 14%, respectivamente²⁶. Nos EUA os números são semelhantes, com 85% dos casos de LLA sendo de células com fenótipo B³⁵.

Nove pacientes (32%) foram a óbito durante a realização do estudo. Destes, seis óbitos (67%) foram causados por infecção. De modo semelhante, estudo anterior na mesma instituição descreveu que 22,6% dos pacientes foram a óbito durante a fase inicial do tratamento (fase de indução da remissão), com 64,6% de casos de óbito por infecção³⁴. Essas proporções são bem mais elevadas do que as descritas na literatura (6% de óbitos)³⁶ e possivelmente relacionam-se às condições socioeconômicas da população, assim como a deficiências estruturais³⁴.

Observou-se que 50% dos pacientes apresentaram mais de 50.000 leucócitos/mm³ ao diagnóstico. Estudo anterior identificou que menos de 30% apresentavam mais de 50.000 leucócitos/mm³³², semelhante aos dados do GBTLI LLA-99 (27%)²⁶. Esse dado demonstra maior frequência de pacientes com alta carga leucocitária neste estudo, fator já associado a pior prognóstico, além de elevar a chance de contaminação do SNC por linfoblastos do sangue periférico durante eventual punção lombar traumática¹⁴. Essa alta proporção de pacientes com leucometria elevada ao diagnóstico poderia ter relação com o grande número de pacientes classificados como alto risco de recaída na amostra estudada (78,5%) em relação aos dados da literatura (36-59%)^{9,10,26,32,36-38}.

Não se observou diferença estatisticamente significativa entre as variáveis idade, sexo, leucometria, proporção de óbitos, imunofenótipo e quantidade de LCR obtida para exame dos pacientes que tiveram algum exame de LCR com linfoblastos e os que não tiveram. Estudo recente também não descreve diferenças ao analisar idade, imunofenótipo e número de leucócitos entre os grupos²⁹. Entretanto, Hasegawa e colaboradores descreveram diferenças estatisticamente significativas com relação a idade (>10 anos) e leucometria (>100.000/L) no grupo com blastos em SNC³⁹.

O presente estudo obteve taxa de infiltração por blastos em LCR de 39,2% (11 dos 28 pacientes), bem acima dos dados da literatura (2,6-11%)²⁹. Em contrapartida, em 1998, Pui e colaboradores referiram que 39% (64 de 165) dos pacientes com LLA tinham linfoblastos em LCR. A principal justificativa relatada pelos autores para o achado foi a melhoria das citocentrífugas, rápido processamento da amostra e grande vigilância na procura de blastos em LCR²⁸. Essa justificativa pode ser aplicada aos achados do presente estudo, uma vez que

buscou-se eliminar fatores técnicos que pudessem comprometer a sensibilidade do método.

Outro estudo destaca que variações na regulação da rotação do motor têm influência na quantidade de células que se deposita na superfície da lâmina, o que impacta na chance de identificação de blastos no LCR e no diagnóstico de infiltração leucêmica em SNC⁴. Poucos trabalhos descrevem com detalhes as etapas de preparação da lâmina de citologia^{28,40}.

Os autores identificam como limitação do estudo o período relativamente curto de acompanhamento, decorrente da necessidade de inclusão somente de pacientes recém diagnosticados, em início de tratamento. Dessa forma não estão ainda disponíveis os dados de mortalidade, sobrevida e taxa de recidiva medular e em SNC da amostra estudada. Outra limitação é a ausência de grupo controle, não utilizado no presente estudo por questões éticas.

CONCLUSÃO

O presente trabalho foi efetivo em avaliar a infiltração de blastos em LCR através da citologia convencional, destacando que a padronização na coleta, processamento e análise do LCR mostram-se importantes no resultado final do exame. Assim, reforça a viabilidade da utilização da citologia convencional, pois se trata de método com menor custo e de mais fácil acesso.

REFERÊNCIAS

1. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65763/>. Published 2017. Accessed October 27, 2017.
2. de Souza Reis R, de Camargo B, de Oliveira Santos M, de Oliveira JM, Azevedo Silva F, Pombo-de-Oliveira MS. Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;56(1):58-64. doi:10.1002/pbc.22736
3. Metayer C, Milne E, Clavel J, et al. The Childhood Leukemia International Consortium. *Cancer Epidemiol*. 2013;37(3):336-347. doi:10.1016/j.canep.2012.12.011
4. Huppmann AR, Rheingold SR, Bailey LC, Helfrich M, Choi JK. Detection of Leukemic Lymphoblasts in CSF Is Instrument-Dependent. *Am J Clin Pathol*. 2012;137(5):795-799. doi:10.1309/AJC4H2FXQEZIL
5. Cooper SL, Brown PA. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62(1):61-73. doi:10.1016/j.pcl.2014.09.006
6. Pui C-H, Evans WE. A 50-Year Journey to Cure Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Semin Hematol*. 2013;50(3):185-196. doi:10.1053/j.seminhematol.2013.06.007
7. Pui C-H, Evans WE. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2006;354(2):166-178. doi:10.1056/NEJMra052603
8. Evans AE, Gilbert ES, Zandstra R. The increasing incidence of central nervous system leukemia in children. *Cancer*. 1970;26(2):404-409. doi:10.1002/1097-0142(197008)26:2<404::AID-CNCR2820260222>3.0.CO;2-I
9. Pui CH, Pei D, Campana D, et al. A revised definition for cure of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2014;28(12):2336-2343. doi:10.1038/leu.2014.142
10. Ranta S, Nilsson F, Harila-Saari A, et al. Detection of central nervous system involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia by cytomorphology and flow cytometry of the cerebrospinal fluid. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(6):951-956. doi:10.1002/pbc.25363
11. Cancela CSP, Murao M, Assumpção JG, et al. Immunophenotyping of the cerebrospinal fluid as a prognostic factor at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents. *Pediatr Hematol Oncol*. 2017;34(2):53-65. doi:10.1080/08880018.2017.1313920
12. Mastrangelo R, Poplack D, Bleyer A, Riccardi R, Sather H, D'Angio G. Report and recommendations of the Rome workshop concerning poor-prognosis acute lymphoblastic leukemia in children: biologic bases for staging, stratification, and treatment. *Med Pediatr Oncol*. 1986;14(3):191-194. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3528788>.
13. Vora A, Andreano A, Pui C-H, et al. Influence of Cranial Radiotherapy on Outcome in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With Contemporary Therapy. *J Clin Oncol*. 2016;34(9):919-926. doi:10.1200/JCO.2015.64.2850

14. Gajjar A, Harrison PL, Sandlund JT, et al. Traumatic lumbar puncture at diagnosis adversely affects outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;96(10):3381-3384. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11071631>.
15. Scrideli CA, Queiroz RP, Takayanagui OM, Bernardes JE, Melo E V, Tone LG. Molecular diagnosis of leukemic cerebrospinal fluid cells in children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2004;89(8):1013-1015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15339689>.
16. Mahmoud HH, Rivera GK, Hancock ML, et al. Low Leukocyte Counts with Blast Cells in Cerebrospinal Fluid of Children with Newly Diagnosed Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 1993;329(5):314-319. doi:10.1056/NEJM199307293290504
17. Ko SY, Chi HS, Jang S, Park C-J. Morphologic detection of blast cells in the cerebrospinal fluid at diagnosis of adult acute lymphoblastic leukemia appears to be associated with adverse prognosis. *Int J Lab Hematol*. 2014;36(4):451-458. doi:10.1111/ijlh.12166
18. Tubergen DG, Cullen JW, Boyett JM, et al. Blasts in CSF with a normal cell count do not justify alteration of therapy for acute lymphoblastic leukemia in remission: a Childrens Cancer Group study. *J Clin Oncol*. 1994;12(2):273-278. doi:10.1200/JCO.1994.12.2.273
19. Gilchrist GS, Tubergen DG, Sather HN, et al. Low numbers of CSF blasts at diagnosis do not predict for the development of CNS leukemia in children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: a Childrens Cancer Group report. *J Clin Oncol*. 1994;12(12):2594-2600. doi:10.1200/JCO.1994.12.12.2594
20. Bürger B, Zimmermann M, Mann G, et al. Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. *J Clin Oncol*. 2003;21(2):184-188. doi:10.1200/JCO.2003.04.096
21. Galati D, Di Noto R, Del Vecchio L. Diagnostic strategies to investigate cerebrospinal fluid involvement in haematological malignancies. *Leuk Res*. 2013;37(3):231-237. doi:10.1016/j.leukres.2012.11.016
22. Pui C, Thiel E. Central Nervous System Disease in Hematologic Malignancies: Historical Perspective and Practical Applications. *Semin Oncol*. 2009;36:S2-S16. doi:10.1053/j.seminoncol.2009.05.002
23. DeAngelis LM, Cairncross JG. A better way to find tumor in the CSF? *Neurology*. 2002;58(3):339-340. doi:10.1212/WNL.58.3.339
24. Crespo-Solis E, López-Karpovitch X, Higuera J, Vega-Ramos B. Diagnosis of Acute Leukemia in Cerebrospinal Fluid (CSF-Acute Leukemia). *Curr Oncol Rep*. 2012;14(5):369-378. doi:10.1007/s11912-012-0248-6
25. Perske C, Nagel I, Nagel H, Strik H. CSF cytology-the ongoing dilemma to distinguish neoplastic and inflammatory lymphocytes. Michael CW, ed. *Diagn Cytopathol*. 2011;39(8):621-626. doi:10.1002/dc.21510
26. Brandalise SR, Pinheiro VR, Aguiar SS, et al. Benefits of the intermittent use of 6-mercaptopurine and methotrexate in maintenance treatment for low-risk acute lymphoblastic leukemia in children: Randomized trial from the Brazilian

- childhood cooperative group - Protocol ALL-99. *J Clin Oncol*. 2010;28(11):1911-1918. doi:10.1200/JCO.2009.25.6115
27. Scrideli CA. Involvement of the cerebrospinal fluid cells in children with acute lymphoblastic leukemia: prognostic implications. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(6):408-409. doi:10.5581/1516-8484.20120101
 28. Pui CH, Mahmoud HH, Rivera GK, et al. Early intensification of intrathecal chemotherapy virtually eliminates central nervous system relapse in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1998;92(2):411-415. doi:006-4971/98/9202-0034\$3.00/0
 29. Dass J, Dayama A, Mishra PC, et al. Higher rate of central nervous system involvement by flow cytometry than morphology in acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2017;39(5):546-551. doi:10.1111/ijlh.12694
 30. Renshaw AA, Hughes JH, Wang E, et al. Leukemia/lymphoma in cerebrospinal fluid: distinguishing between cases that performed well and poorly in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Non-gynecologic Cytology. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130(12):1762-1765. doi:10.1043/1543-2165(2006)130[1762:LICFDB]2.0.CO;2
 31. Howard SC, Gajjar AJ, Cheng C, et al. Risk factors for traumatic and bloody lumbar puncture in children with acute lymphoblastic leukemia. *JAMA*. 2002;288(16):2001-2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12387652>.
 32. Cancela CSP, Murao M, Viana MB, Oliveira BM de. Incidence and risk factors for central nervous system relapse in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(6):436-441. doi:10.5581/1516-8484.20120109
 33. Maurizi P, Russo I, Rizzo D, et al. Safe lumbar puncture under analgo-sedation in children with acute lymphoblastic leukemia. *Int J Clin Oncol*. 2014;19(1):173-177. doi:10.1007/s10147-013-0521-1
 34. Viana SS, de Lima LMMR, do Nascimento JB, et al. Secular trends and predictors of mortality in acute lymphoblastic leukemia for children of low socioeconomic level in Northeast Brazil. *Leuk Res*. 2015;39(10):1060-1065. doi:10.1016/j.leukres.2015.07.007
 35. Bhojwani D, Yang JJ, Pui C-H. Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62(1):47-60. doi:10.1016/j.pcl.2014.09.004
 36. Jastaniah W, Elimam N, Abdalla K, et al. Identifying causes of variability in outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia treated in a resource-rich developing country. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(6):945-950. doi:10.1002/pbc.25374
 37. Sirvent N, Suci S, Rialland X, et al. Prognostic significance of the initial cerebro-spinal fluid (CSF) involvement of children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) treated without cranial irradiation: Results of European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Children . *Eur J Cancer*. 2011;47(2):239-247. doi:10.1016/j.ejca.2010.10.019
 38. Liang Y, Ca Q, Zhai Z-M, Wang N-L. A Practical Strategy of Monitoring Minimal Residue Disease and Intervention for Central Nervous System Relapse of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*.

- 2013;35(5):388-393. doi:10.1097/MPH.0b013e31829084eb
39. Hasegawa D, Manabe A, Ohara A, et al. The utility of performing the initial lumbar puncture on day 8 in remission induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: TCCSG L99-15 study. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;58(1):23-30. doi:10.1002/pbc.22965
40. Jaime-Pérez JC, Borrego-López MF, Jiménez-Castillo RA, et al. Comparison of conventional cytomorphology, flow cytometry immunophenotyping, and automated cell counting of CSF for detection of CNS involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2018;40(2):169-174. doi:10.1111/ijlh.12760

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: “Análise citopatológica do líquido em pacientes com leucemia linfoblástica aguda”

Pesquisadora: Thalyta Porto Fraga.

Telefone: (79) 99959-4231.

1. O que é esse estudo?

Esse estudo tem o objetivo de avaliar o líquido coletado da “espinha” (que é chamado de líquido) e do osso, e analisar as células ali presentes. Essa avaliação é para saber se existem no líquido as mesmas células que causam a leucemia. Se essas células estiverem no líquido também, teremos que fazer algumas mudanças no tratamento da leucemia.

2. Vou ter que fazer mais exame só para a pesquisa? / Meu filho terá que fazer mais exame só para a pesquisa?

Não. Você / Seu filho já teria que ser submetido a esses exames para conseguir tratar a doença e essas coletas são necessárias e realizadas durante o tratamento.

3. Posso desistir de participar da pesquisa a qualquer momento?

Sim.

4. Se desistir de participar da pesquisa, deixarei / meu filho deixará de receber o tratamento?

De forma alguma. O seu tratamento / O tratamento do seu filho está assegurado, mesmo que não queira participar da pesquisa.

5. Minha identificação / A identificação do meu filho será revelada?

Não. Utilizaremos um código com números que não permitirá a identificação do paciente a não ser pelo médico assistente.

Eu,

_____RG _____, depois de ter sido explicado sobre o estudo, concordo de livre e espontânea vontade em participar. Minha participação é voluntária, e posso me recusar a responder a qualquer pergunta feita, assim como ter direito de sair da pesquisa em qualquer momento, sem justificativa. Os resultados do estudo podem ser apresentados em trabalhos ou revistas da área de saúde, sem, contudo, divulgar meu nome e identidade.

Aracaju, _____ de _____ de 2016.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do responsável pela pesquisa

APÊNDICE B –TERMO DE CONFIDENCIALIDADE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Termo de Confidencialidade para a Direção do Laboratório Patologika®

I – Dados sobre a pesquisa científica

Título: Análise Citopatológica do Líquor em pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda

Pesquisador: Thalyta Porto Fraga

Orientador: Prof. PhD Rosana Cipolotti

II – Termo de Confidencialidade

Estamos realizando uma pesquisa que tem como objetivo determinar a taxa de infiltração leucêmica em líquido e os fatores a ela associados em pacientes com leucemia linfoblástica aguda. O estudo necessitará da estrutura física e arcará com as despesas financeiras necessárias para a execução do projeto de pesquisa. Os resultados do estudo serão importantes para identificar os fatores associados com os resultados na pesquisa de blastos no líquido cefalorraquidiano de pacientes com leucemia linfoblástica aguda. As informações obtidas serão confidenciais e utilizadas apenas com o propósito científico, conforme recomendada a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Os resultados serão publicados com garantia de anonimato dos sujeitos da pesquisa.

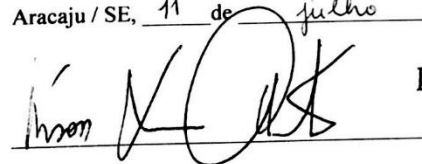
III – Informações dos nomes, endereços e telefones dos responsáveis pelo acompanhamento da pesquisa.

Thalyta Porto Fraga. Médica Patologista e Mestranda em Ciências da saúde. Universidade Federal de Sergipe. Núcleo de Pós Graduação em Ciências da saúde (NPGME) Rua Cláudio Batista, S/N- Bairro: Sanatório. Aracaju- SE. Telefones (079) 2105-1783(comercial) / (079)99594231.

IV – Consentimento

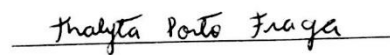
Declaro que após, convenientemente esclarecido pela pesquisadora, e, tendo entendido o que me foi explicado, consinto a utilização do meu laboratório para a referida pesquisa.

Aracaju / SE, 11 de julho de 2016.



Ivíson Xavier Duarte
Sócio - Proprietário
Laboratório Patologika

Assinatura da Direção do Laboratório Patologika®



Assinatura do Pesquisador

ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO

 																									
---> Please do not click the "Back" button. If you click the "Back" button, your data may be lost. You may click the "Home" link at any time to return to your Home Page. Home Detailed Status Information <table border="1"> <tr> <td>Manuscript #</td> <td>2018-0332-OA</td> </tr> <tr> <td>Current Revision #</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>Submission Date</td> <td>2018-06-15 07:05:54</td> </tr> <tr> <td>Current Stage</td> <td>Initial QC Started</td> </tr> <tr> <td>Title</td> <td>Blasts in cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia: presentation of an identification standardized protocol</td> </tr> <tr> <td>Running Title</td> <td>Blasts in cerebrospinal fluid</td> </tr> <tr> <td>Manuscript Type</td> <td>Original Article</td> </tr> <tr> <td>Special Section</td> <td>N/A</td> </tr> <tr> <td>Corresponding Author</td> <td>Miss thalyta fraga (Federal University of Sergipe)</td> </tr> <tr> <td>Contributing Authors</td> <td>Dr. Ivson Duarte , Mrs. Polyanna Duarte , Miss Marcelle Freire , Mr. Cleberton Blanco , Mr. Cristiano Mendonça , Prof. Rosana Cipolotti</td> </tr> <tr> <td>Abstract</td> <td> CONTEXT: The Central Nervous System (CNS) is an important site of relapse in patients with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), despite the increasing cure rates in young patients. The presence of blasts in the Cerebrospinal Fluid (CSF) presents prognostic implication and defines changes in the therapeutic protocol, necessitating, therefore, diagnostic accuracy. The new diagnostic techniques (flow cytometry and molecular methods) are more expensive and less accessible, implying to re-evaluate the role of cytology as a diagnostic tool. OBJECTIVE: To identify the proportion of CSF samples positive for blasts in children and adolescents with ALL, using a standardized cytology technique and with the standardization of variables related to the process that could interfere with the result. DESIGN: A prospective, descriptive, uncontrolled study in which samples of CSF obtained by lumbar puncture of patients with ALL were examined. CSF samples were sent to the laboratory shortly after collection, being processed and cytocentrifuged in cytofunyl. Four slides were prepared, stained and analyzed by a pathologist and a hematologist. RESULTS: Twenty-eight patients with ALL were evaluated, with predominance of male (58.6%), immunophenotype B (82.2%) and 78.5% were stratified as high risk for relapse. Of the 205 CSF samples, 26 (12.6%) were positive for blasts and among 28 patients, 11 (39.2%) had CSF examination with neoplastic infiltration. CONCLUSION: Conventional cytology was effective in identifying CNS infiltration by blasts, provided that factors related to collection, processing and analysis of CSF be controlled, which may interfere in the reliability of the result. </td> </tr> <tr> <td>Academic - Section Editor</td> <td>Not Assigned</td> </tr> </table>		Manuscript #	2018-0332-OA	Current Revision #	0	Submission Date	2018-06-15 07:05:54	Current Stage	Initial QC Started	Title	Blasts in cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia: presentation of an identification standardized protocol	Running Title	Blasts in cerebrospinal fluid	Manuscript Type	Original Article	Special Section	N/A	Corresponding Author	Miss thalyta fraga (Federal University of Sergipe)	Contributing Authors	Dr. Ivson Duarte , Mrs. Polyanna Duarte , Miss Marcelle Freire , Mr. Cleberton Blanco , Mr. Cristiano Mendonça , Prof. Rosana Cipolotti	Abstract	CONTEXT: The Central Nervous System (CNS) is an important site of relapse in patients with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), despite the increasing cure rates in young patients. The presence of blasts in the Cerebrospinal Fluid (CSF) presents prognostic implication and defines changes in the therapeutic protocol, necessitating, therefore, diagnostic accuracy. The new diagnostic techniques (flow cytometry and molecular methods) are more expensive and less accessible, implying to re-evaluate the role of cytology as a diagnostic tool. OBJECTIVE: To identify the proportion of CSF samples positive for blasts in children and adolescents with ALL, using a standardized cytology technique and with the standardization of variables related to the process that could interfere with the result. DESIGN: A prospective, descriptive, uncontrolled study in which samples of CSF obtained by lumbar puncture of patients with ALL were examined. CSF samples were sent to the laboratory shortly after collection, being processed and cytocentrifuged in cytofunyl. Four slides were prepared, stained and analyzed by a pathologist and a hematologist. RESULTS: Twenty-eight patients with ALL were evaluated, with predominance of male (58.6%), immunophenotype B (82.2%) and 78.5% were stratified as high risk for relapse. Of the 205 CSF samples, 26 (12.6%) were positive for blasts and among 28 patients, 11 (39.2%) had CSF examination with neoplastic infiltration. CONCLUSION: Conventional cytology was effective in identifying CNS infiltration by blasts, provided that factors related to collection, processing and analysis of CSF be controlled, which may interfere in the reliability of the result.	Academic - Section Editor	Not Assigned
Manuscript #	2018-0332-OA																								
Current Revision #	0																								
Submission Date	2018-06-15 07:05:54																								
Current Stage	Initial QC Started																								
Title	Blasts in cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia: presentation of an identification standardized protocol																								
Running Title	Blasts in cerebrospinal fluid																								
Manuscript Type	Original Article																								
Special Section	N/A																								
Corresponding Author	Miss thalyta fraga (Federal University of Sergipe)																								
Contributing Authors	Dr. Ivson Duarte , Mrs. Polyanna Duarte , Miss Marcelle Freire , Mr. Cleberton Blanco , Mr. Cristiano Mendonça , Prof. Rosana Cipolotti																								
Abstract	CONTEXT: The Central Nervous System (CNS) is an important site of relapse in patients with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), despite the increasing cure rates in young patients. The presence of blasts in the Cerebrospinal Fluid (CSF) presents prognostic implication and defines changes in the therapeutic protocol, necessitating, therefore, diagnostic accuracy. The new diagnostic techniques (flow cytometry and molecular methods) are more expensive and less accessible, implying to re-evaluate the role of cytology as a diagnostic tool. OBJECTIVE: To identify the proportion of CSF samples positive for blasts in children and adolescents with ALL, using a standardized cytology technique and with the standardization of variables related to the process that could interfere with the result. DESIGN: A prospective, descriptive, uncontrolled study in which samples of CSF obtained by lumbar puncture of patients with ALL were examined. CSF samples were sent to the laboratory shortly after collection, being processed and cytocentrifuged in cytofunyl. Four slides were prepared, stained and analyzed by a pathologist and a hematologist. RESULTS: Twenty-eight patients with ALL were evaluated, with predominance of male (58.6%), immunophenotype B (82.2%) and 78.5% were stratified as high risk for relapse. Of the 205 CSF samples, 26 (12.6%) were positive for blasts and among 28 patients, 11 (39.2%) had CSF examination with neoplastic infiltration. CONCLUSION: Conventional cytology was effective in identifying CNS infiltration by blasts, provided that factors related to collection, processing and analysis of CSF be controlled, which may interfere in the reliability of the result.																								
Academic - Section Editor	Not Assigned																								

Stage	Start Date
Initial QC Started	2018-06-21 08:01:13
Waiting for Author Approval of Converted Files	2018-06-21 07:58:20
File Conversion Complete	2018-06-21 07:58:20
Waiting for File Conversion	2018-06-21 07:56:49
Waiting for Files to be Sorted	2018-06-21 07:53:26
Manuscript Files Submitted	2018-06-21 07:53:26
Preliminary Manuscript Data Submitted	2018-06-21 07:51:02