



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

FERNANDO SILVEIRA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRICOLEUCÊMICAS
POR DIMENSÃO FRACTAL.**

Recife
2022

FERNANDO SILVEIRA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRICOLEUCÊMICAS
POR DIMENSÃO FRACTAL.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Thiago de Salazar e Fernandes

Recife
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Rocha, Fernando silveira .
Caracterização das células tricoleucêmicas por dimensão fractal / Fernando
silveira Rocha. - Recife, 2021.
84 : il., tab.

Orientador(a): Thiago de Salazar e Fernandes
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, , 2021.

1. Oncohematologia. 2. Análise Fractal. 3. Tricoleucemia. I. Fernandes,
Thiago de Salazar e. (Orientação). II. Título.

610 CDD (22.ed.)

FERNANDO SILVEIRA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRICOLEUCÊMICAS POR
DIMENSÃO FRACTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como pré-
requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr.
Instituição/ Departamento

Prof. Dr.
Instituição/ Departamento

Prof. Dr.
Instituição/ Departamento

Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus por mudar minha vida e acreditar em mim desde o ventre da minha mãe e que sonhou comigo esse momento. Falta pouco Deus. A Maria mãe de Deus, mãe e amiga a quem sempre nos momentos de desespero recorreremos. Dedico também aos meus familiares e amigos que sonharam comigo este momento e acreditaram que sou capaz de realizá-lo. Ao meu orientador e todos os professores que me fizeram um ser humano melhor a cada palavra dita em sala de aula.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me mudado a minha vida quando o encontrei. Agradeço por todos os obstáculos que o senhor coloca em meu caminho, pois quando chego ao topo da montanha, reconheço na paisagem o que ele queria me ensinar. Obrigado Deus pelos teus planos para minha vida, pois são sempre maiores que meus próprios sonhos e que eu possa cada vez mais te orgulhar como filho que você sempre sonhou. A Maria mãe de Deus, mãe e amiga a quem sempre nos momentos de desespero recorremos.

Agradeço à minha avó Gertrudes Melo por todo apoio, me ensinando a ser quem hoje eu sou, me auxiliando nos momentos em que eu mais precisei de sua ajuda. Agradeço ao meu pai Fernando Rocha que apesar de todas as dificuldades de distância me fortaleceu com seu amor e carinho. Agradeço a minha mãe Karla e a minha tia Karina e meu tio Hugo que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador Prof. Thiago de Salazar e Fernandes que, além de abrir meus olhos para o mundo fractal, foi o primeiro professor a me dar oportunidades na universidade, mesmo em tempos difíceis, acreditou que eu poderia fazer e apresentar algo maior e por isso sempre serei grato. Também queria agradecer ao Prof. Marcos André, por ter cedido todas as lâminas para o trabalho com as quais não seria possível realizar. Agradeço ao Prof. Jacinto Costa, Prof. Paulo Euzébio e ao Julliano Maux por todo suporte e amparo com as ferramentas necessárias para formação e desenvolvimento desse trabalho e por todos os conselhos, paciência com a qual guiaram o meu aprendizado. Também quero agradecer aos componentes da banca por terem aceitado avaliar o meu trabalho.

Aos meus colegas de curso (Emyliana, Vitória, Saulo, Lícia, Mary) com quem convivi intensamente durante os últimos anos, pelo companheirismo e pela troca de experiências que me permitiram crescer não só como pessoa, mas também como formando. Sou grato a minha namorada Nathália Evellin que nunca me recusou amor, apoio e incentivo nos momentos mais difíceis. Muito obrigado por compartilhar os inúmeros momentos de ansiedade e estresse. Sem você ao meu lado esse trabalho não seria concluído.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, seu Deus, estará com você por onde você andar”. Josué 1:9

ROCHA, Fernando Silveira. **Caracterização das células tricoleucêmicas por dimensão fractal**. 2022. 84. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

As leucemias são um grupo de doenças malignas do sangue, sem etiologia bem esclarecida, causadas pela proliferação anormal dos leucócitos ao nível dos órgãos hematopoiéticos com repercussão no sangue periférico, apresentando modificações qualitativas e quantitativas características. Dentro do centro produtor de células sanguíneas (medula óssea), uma célula imatura denominada de blastos, sofre uma ou mais mutações genéticas que a transformam em uma célula cancerosa, não funcionando adequadamente, multiplicando-se mais rápido com certa perda natural da capacidade de morrer. A tricoleucemia ou leucemia de células cabeludas (HCL) é uma doença linfoproliferativa crônica de curso indolente do qual apresenta uma tríade diagnóstica de pancitopenia, esplenomegalia e clones de linfócito B circulantes com projeções vilosas citoplasmáticas características. Atualmente, o diagnóstico é realizado por meio de um analista através de análises morfológicas, análise de mielograma, hemograma completo, esfregaço de sangue periférico, reações citotóxicas, perfil imunofenotípico, estudos citogenéticos (cariótipo), entre outras análises que possuem custo alto. No entanto, diagnósticos através dos métodos computacionais morfométricos ainda pouco utilizados, são mais rápidos e com menor custo e podem ser aliados na identificação destas alterações celulares possibilitando um diagnóstico mais precoce, com menores taxas de erro, para um melhor sucesso do tratamento do paciente. Diante disso, o objetivo do presente trabalho será estabelecer, através de um método de quantificação, as irregularidades de contorno de células leucêmicas (tricoleucemia), com base na sua geometria fractal, comparado ao contorno normal, como potencial ferramenta complementar no diagnóstico diferencial deste tipo de leucemia. Para tanto, foram selecionadas 150 imagens de linfócitos tricoleucêmicos provenientes da leucemia de células pilosas (HCL) e 150 imagens de linfócitos normais, no aumento de 40X em um microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Tóquio, Japão), realizando a captura das imagens de um banco de lâminas hematológicas, a fim de observar e quantificar variações citoplasmáticas características dos tricoleucócitos, através do método de quantificação morfométrica por geometria fractal. Foi realizado manualmente o contorno das células sob a ferramenta retângulo ou círculo, e em seguida, as imagens serão colocadas em escala de cinza, binarizadas para dar destaque ao contorno da membrana plasmática, com o auxílio do programa "ImageJ". Ainda no programa foi calculado a dimensão fractal (DF) da membrana plasmática dos linfócitos leucêmicos e linfócitos normais pelo método de "Box-counting", tendo valores obtidos comparados, observando as variações e irregularidades de membrana apresentada pelas células leucêmicas em comparação as saudáveis. Para análise dos dados serão utilizados testes estatísticos. Com base nas medições de dimensão fractal de linfócitos normais e tricoleucêmicos, obteve-se valores numéricos de dimensões que permitam caracterizar este tipo de leucemia, servindo como método auxiliar ou complementar ao diagnóstico.

Palavras-chave: Oncohematologia. Tricoleucemia. Análise Fractal.

ROCHA, Fernando Silveira. **Characterization of hairy cell leukemia by fractal dimension**. 2022. 84. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

Leukemias are a group of malignant blood diseases, with no clear etiology, caused by abnormal proliferation of leukocytes at the level of hematopoietic organs with repercussions in peripheral blood, presenting characteristic qualitative and quantitative changes. Inside the blood cell production center (bone marrow), an immature cell called blasts undergoes one or more genetic mutations that transform it into a cancerous cell, not functioning properly, multiplying faster with a certain loss of natural ability to die. Hairy cell leukemia or hairy cell leukemia (HCL) is a chronic lymphoproliferative disease with an indolent course, which presents a diagnostic triad of pancytopenia, splenomegaly and circulating B lymphocyte clones with characteristic villous cytoplasmic projections. Currently, the diagnosis is performed by an analyst through morphological analysis, myelogram analysis, complete blood count, peripheral blood smear, cytochemical reactions, immunophenotypic profile, cytogenetic studies (karyotype), among other analyzes that have a high cost. However, diagnoses through morphometric computational methods, which are still little used, are faster and less expensive and can be allied in the identification of these cellular alterations, allowing an earlier diagnosis, with lower error rates, for a better success of the patient's treatment. In view of this, the objective of the present work will be to establish, through a quantification method, the contour irregularities of leukemic cells (tricholeukemia), based on their fractal geometry, compared to the normal contour, as a potential complementary tool in the differential diagnosis of this type. of leukemia. For this purpose, 150 images of tricholeukemic lymphocytes from hairy cell leukemia (HCL) and 150 images of normal lymphocytes were selected at 40X magnification in an optical microscope (Nikon Eclipse E200, Tokyo, Japan), capturing the images from a bank of hematological slides, in order to observe and quantify characteristic cytoplasmic variations of tricholeukocytes, through the morphometric quantification method by fractal geometry. The contour of the cells was manually performed under the rectangle or circle tool, and then the images will be placed in grayscale, binarized to highlight the contour of the plasma membrane, with the aid of the "ImageJ" program. Still in the program, the fractal dimension (DF) of the plasma membrane of leukemic lymphocytes and normal lymphocytes was calculated by the "Box-counting" method, with the values obtained compared, observing the variations and irregularities of the membrane presented by the leukemic cells in comparison with the healthy ones. Statistical tests will be used for data analysis. Based on measurements of the fractal dimension of normal and tricholeukemic lymphocytes, numerical values of dimensions were obtained that allow characterizing this type of leukemia, serving as an auxiliary or complementary method to the diagnosis.

Key words: Oncohematology. Hairy cell leukemia. Fractal Analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Dois tubos de hematócrito com sangue: o da esquerda (antes da centrifugação) e o da direita (depois da centrifugação).....	16
Figura 2 - Hemácias e plaquetas (SETA) em um esfregaço sanguíneo. Giemsa.....	20
Figura 3 - Neutrófilo. Giemsa.....	23
Figura 4 - Eosinófilo. Giemsa.	24
Figura 5 - Basófilo. Giemsa.	26
Figura 6 - Monócito. Giemsa	27
Figura 7 - Linfócito. Giemsa.....	28
Figura 8 - Hematopoiese: processo de formação dos elementos figurados do sangue.	38
Figura 9 - Linfócitos tricoleucêmicos.	47
Figura 10 - Modelo simplificado da linha de costa (curva de Koch).....	55
Figura 11 - Movimento browniano de partículas.....	55
Figura 12 - Sobreposição da malha quadrada à imagem sob ilustração do método box-counting para estimar a dimensão fractal.....	59
Figura 13 - Representação esquemática do modelo de “glóbulo fractal” da cromatina celular.....	61
Figura 14 - A) Imagem de microscópio eletrônico de um linfócito humano, afetado por leucemia de células pilosas. B) Representação em preto/branco de (A) com um limite de nível de cinza definido. C) Imagem após a remoção de pequenos interferentes. D) Delimitação do contorno celular.	62
Figura 15 - Alterações na espessura cortical (eixo horizontal) e índice de girificação (eixo vertical) do cérebro afetam a dimensão fractal (indicada pelo número abaixo do corte) das fitas corticais.....	63
Figura 16 - Fotomicrografias de linfócitos tricoleucêmicos e a sequência de delimitação do contorno celular irregular aplicando o <i>box-counting</i> no ImageJ.	68
Figura 17 - Box-Plot dos grupos de linfócitos normais e tricoleucêmicos. * $p < 0.001$ em relação aos leucócitos normais de acordo com o teste de Mann-Whitney.....	70
Figura 18 - Variações de DF para amostras de linfócitos normais e tricoleucêmicos.	71
Figura 19 - Distribuição de ordem crescente de dimensões fractais de linfócitos normais e tricoleucêmicos.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes inorgânicos do plasma humano.....	18
Tabela 2 - Componentes orgânicos do plasma humano.....	18
Tabela 3 - Contagens de Células Sanguíneas Normais.	19
Tabela 4 - Classificação das leucemias linfoides crônicas, segundo a linhagem celular de origem.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Células apresentadoras de antígenos.
CLP	Progenitor linfoide.
CMP	Progenitor mieloide comum.
CTH	Células-tronco hematopoiéticas.
CFU	Unidades formadoras de colônia.
CFU-G	Unidades formadoras de colônias-granulocíticas.
CFU-GM	Unidades formadoras de colônia granulocítica/monocítica.
CCR2	Receptores de quimiocina.
DF	Dimensão fractal.
ECP	Proteínas catiônicas eosinofílica.
ECF	Fatores quimiotáticos de eosinófilos
EDN	Neurotoxina derivada de eosinófilos.
EPO	Eritropoietina.
EPX	Peroxidase eosinofílica.
FcεRI	Receptores de alta afinidade pela imunoglobulina E.
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócito.
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago.
HSC	Célula-tronco hematopoiética comum.
iC3b	Fragmentos C3b inativados.
IL	Interleucina.
LT-HSC	Células-tronco hematopoiéticas de longo prazo.
LGL	Grande linfócito granular.
LMC	Leucemia mieloide crônica.
LMA	Leucemia mieloide aguda.
IG	Imunoglobulinas.
MBP	Proteína básica principal.
M-CSF	Fator estimulador de colônia de monócito ou macrófago.
MO	Medula óssea.
NK	Natural Killer.
PRRs	Receptor de reconhecimento de padrões moleculares.
ST-HSC	Células-tronco hematopoiéticas de curto prazo.
T-LGL	Linfócitos T maduros.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	Elementos do sangue e Hematopoese.....	15
2.1.1	Sangue.....	15
2.1.2	Componentes sanguíneos.....	19
2.1.3	Estrutura funcional da medula óssea	28
2.1.4	Hematopoese	35
2.2	Leucemias.....	39
2.2.1	Neoplasias linfoproliferativas.....	42
2.2.2	Leucemia de células pilosas ou Hairy cell leucemia.....	45
2.2.3	Diagnóstico da leucemia de células pilosas	49
2.3	Dimensão fractal	53
2.3.1	Método de delimitação de box-counting.	57
2.3.2	Diagnóstico complementar através da dimensão fractal.....	59
3	OBJETIVOS	66
3.1	Objetivo Geral.....	66
3.2	Objetivos Específicos	66
4	METODOLOGIA	67 FIG
4.1	Tipo de estudo.....	67
4.2	Local do estudo.....	67
4.3	Seleção das Imagens	67
4.4	Processamento de imagens.....	68
4.5	Método de Box-Counting (Dimensão Fractal)	68
4.6	Análise estatística	69

5	RESULTADOS.....	70
5.1	Análise de Dimensão Fractal do contorno citoplasmático dos linfócitos tricoleucêmicos	70
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda causa de morte no mundo com grande impacto na saúde pública sendo uma das grandes barreiras para o aumento da expectativa de vida em todos os países, apresentando-se como reflexo tanto o envelhecimento, crescimento da população quanto das mudanças na prevalência e distribuição dos principais fatores de risco para o câncer (SUNG, H., 2021). Segundo o INCA a incidência e a mortalidade por câncer vêm aumentando devido a fatores como envelhecimento, crescimento populacional e prevalência de fatores de risco de câncer, em particular, eventos associados ao desenvolvimento socioeconômico (MORAES et al., 2017). Dos dez cânceres mais comumente encontrados na população que figuram entre os principais em ocorrência, incidência e óbito mundial tem-se as leucemias em nona colocação com estimativa de diagnóstico, segundo dados do GLOBOCAN em 2020 de 474.519 casos novos de leucemias para ambos os sexos e em todas as idades correspondendo a 311 594 mortes no corrente ano (SUNG, H., 2021). Os fatos estatísticos do câncer proposto pelo NIH (*National Cancer Institute*) baseadas na população dos EUA, sobre leucemia no ano de 2022 ajustadas por idade e apoiadas em casos e mortes mostraram uma taxa de novos casos de leucemia de 60.650 representando uma porcentagem de todos os novos casos de câncer de 3,2% com taxa de mortalidade estimadas em 24.000 mortes, sendo representativo de 3,9% de todas as mortes por câncer, figurando como a sétima principal causa de morte nos EUA (SUNG, H., 2021).

As leucemias são um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas que surgem da proliferação disfuncional de leucócitos em desenvolvimento (LORENZI, Therezinha, 2006). De origem, normalmente, desconhecida, essas variedades de condições neoplásicas atingem substancialmente todas as faixas etárias sendo caracterizada pelo acúmulo e infiltração de células imaturas ou proliferação evidente de células maduras, tipificando-se por aspecto heterogêneo, apresentando ampla diversidade de aspectos clínicos e biológicos com consequências fisiológicas graves, podendo levar o indivíduo à morte (ABREU, et. al., 2021). O microambiente da medula óssea (MMO) é o local primário para a hematopoiese no qual ocorre a regeneração e renovação das células hematopoiéticas em regiões especializadas (KUEK et al., 2021) sendo dentro desse ambiente interno onde ocorre fornecimento

de fatores críticos para sustentação fisiológica das células-tronco hematopoiéticas (HSCs), bem como, a formação das células que se comprometem com determinada linhagem sanguínea. Na observação de cortes histológicos de medula óssea de pacientes em determinadas leucemias, principalmente, de aspecto agudo, observa-se um acúmulo de células imaturas (blastos) anormais por parada ou dificuldade no processo de maturação que vão substituindo as células precursoras formadoras dos elementos sanguíneos normais prejudicando a hematopoiese normal, reduzindo a produção de hemácias, leucócitos e plaquetas. Outras vezes, há uma proliferação exacerbada dos granulócitos, mas no sangue e medula óssea encontram-se células maduras, ocorrendo em circulação incomuns formas blásticas (ZAGO, MA., 2013).

Entre os tumores do sistema linfático e hematopoiético de maior incidência tem-se as leucemias proliferativas das linhagens linfóide ou leucemias linfoproliferativas que correspondem a grupo heterogêneo de neoplasias malignas das células linfocitárias decorrendo de proliferação e acúmulo de células linfóides maduras (periféricas) que além de infiltrarem órgãos linfóides como gânglios linfáticos e baço, também estão presentes na medula óssea e sangue periférico (ZAGO, MA., 2013). Compreendem, principalmente, as leucemias linfocíticas e os linfomas, resultantes de alterações no sistema imunológico, em geral por combinação de fatores determinantes da própria doença e/ou do tratamento antineoplásico, dentre eles os Linfomas Hodgkin (LH) e Linfomas Não Hodgkin (LNH) (BARBOSA et al., 2015).

Doenças malignas linfoproliferativas apresentam início fundador, segundo a teoria monoclonal, a partir da proliferação neoplásica de uma única célula linfocitária após sofrer acentuada modificação no seu modo de crescimento e reprodução, resultando em um clone anômalo (JAMRA, Michel, 1983). Dentre as doenças linfoproliferativas crônicas temos a leucemia de células cabeludas (HCL ou tricoleucemia) que corresponde a 2% de todas as leucemias linfóides do adulto, sendo mais comum em homens (5:1) com idade média de 55 anos (BRITO JUNIOR et al., 2011). Trata-se de uma proliferação linfóide maligna incomum de evolução crônica caracterizada por insuficiência progressiva da medula óssea devido à infiltração maligna de linfócitos B com projeções citoplasmáticas em fios de cabelo, que dão nome à doença (SECIOSO et al., 2009). Através de estudos imunofenotípicos sabe-se que as células “cabeludas” neoplásicas são linfócitos do

tipo B monoclonais presas em um estágio tardio de diferenciação com padrão de imunofenótipo típico apresentando em quase sua totalidade a presença da mutação somática BRAF V600E, a qual leva ao aumento da expressão de genes envolvidos com sobrevivência e proliferação celular (DIAS et al., 2020).

Apesar da metodologia de diagnóstico para leucemia de células pilosas ser rápida e precisa baseada no padrão de morfologia característica das células periféricas, do exame morfológico da medula óssea, com evidências confirmatórias fornecidas padrão imunofenotípico e coloração citoquímica, as células típicas da leucemia de células cabeludas (HCL) apresentam estrutura complexa com irregularidades de borda texturizado com projeções circunferências semelhantes a cabelos (SECIOSO et al, 2009) que podem ser mensuradas com métodos que consigam fazer uma medição de componentes complexos e irregulares por análise de imagem digital, servindo de ferramenta complementar útil no diagnóstico rápido da HCL.

Além disso, embora ocorra uma rápida quantificação automatizada das células sanguíneas, o reconhecimento e contagem de glóbulos brancos imaturos ou alterados ainda depende de exame microscópicos de esfregaço de sangue e de um observador experiente e por mais especializada que seja a parte humana do processo, falsos-negativos e falsos-positivos são situações muito comuns requerendo novas verificações dos exames (TIMBÓ et al., 2009). Diante disso, para caracterização das células tricoleucêmicas pode-se utilizar nova abordagem matemática que permite avaliar e descrever estruturas morfológicas com propriedades qualitativas complexas, como fenômenos fisiológicos e tumorais não lineares em organismos vivos, indo na contramão da análise da geometria euclidiana estabelecida, sendo adequada para descrever corpos geométricos ideais e acontecimentos lineares.

A geometria fractal é um ramo da matemática apropriado na descrição de fenômenos naturais e vivos complexos (A. LOSA, 2016), permitindo estudo de objetos da vida real e do mundo natural com contornos irregulares, que não seguem leis matemáticas de funções contínuas. Oriunda de uma base de leis bem definidas e princípios coerentes, a geometria fractal possibilita a quantificação e descrição dessas formas naturais irregulares complexas, formas vivas, tecidos biológicos e padrões organizados de características morfológicas cujas dimensões são dadas por

valores não inteiros (A. LOSA, 2016). No início dos anos 80 o matemático Benoit Mandelbrot apresentou a primeira definição de fractal, baseada no latim, cujo verbo “frangere” significa “criar fragmentos irregulares” e “fragmentar”, nomeando-os para classificar certos objetos que não possuíam dimensão inteira, podendo apresentar dimensão fracionada (BARBOSA, R., 2002) com propriedades de autossemelhança, complexidade infinita e dimensão fractal (ASSIS et al., 2008).

Ao longo da trajetória dos fractais pode-se constatar que os elementos biológicos exibem padrões estatísticos auto-similares e propriedades fractais dentro de um domínio de escala definido, permanecendo constante dentro dessa janela de escala (A. LOSA, 2016). Sabendo disso, a aplicação da geometria fractal à biologia celular tem sido muito utilizada como ferramenta em estudos histopatológicos e no diagnóstico de neoplasias, estudos de progressão da carcinogênese, incluindo leucemias, através de análise de imagens de tumores, sugerindo que tumores cancerosos têm dimensão fractal superior à dos tecidos normais (SEDIVY et al., 1999). Em vista disso, imagens de células leucêmicas humanas podem ser caracterizadas por meio de medidas quantitativas das propriedades de superfície da membrana celular apresentando valores de dimensão fractal significativamente diferentes daqueles encontrados em células circulantes saudáveis (A. LOSA, 2016).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ELEMENTOS DO SANGUE E HEMATOPOESE

2.1.1 SANGUE

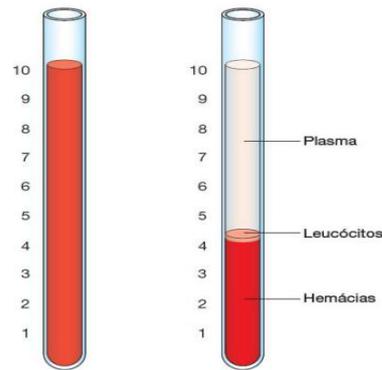
O sangue é um tecido fluido formado por frações celulares (glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas) que circulam em suspensão no meio líquido através dos vasos sanguíneos do sistema circulatório. É constituído por duas porções, o plasma – parte líquida – que representa 55% do volume de sangue, enquanto a sua porção celular representa os 45% restantes. Sendo assim, um indivíduo normal apresenta hematócrito, isto é, a percentagem do volume total de sangue correspondente as células vermelhas do sangue de 45% (ZAGO, MA, 2013).

Dentro da normalidade, pode ocorrer pequenas variações na quantidade das células sanguíneas, sendo muito explícitas em algumas hemopatias. O sangue apresenta-se como principal meio condutor do organismo, intermediando o traslado leucocitário na rápida concentração dessas células por diapedese nos tecidos lesionados ou invadidos por microrganismo para desempenhar suas funções de defesa, no transporte de oxigênio (O₂) e gás carbônico (CO₂) ligado a hemoglobina dos eritrócitos, no carregamento de hormônios e mensageiros químicos importantes na integração da resposta entre órgãos distantes, na condução de excretas metabólicas para os respectivos órgãos excretores, etc. (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017).

O sangue é coletado por punção venosa, com tratamento em anticoagulante como, por exemplo, heparina, e colocado em processo de centrifugação para segmentação de várias camadas refletindo sua heterogeneidade. A consequência da segmentação promovida pela centrifugação, em tubos padronizados, chama-se hematócrito, que possibilita estimar o volume de sangue ocupado pelas hemácias em referência ao sangue total (VERRASTRO, 2006).

O hematócrito apresenta duas porções do sangue bem definidas (Fig. 1). O plasma no sobrenadante, translucido e amarelo, enquanto, os elementos figurados do sangue sedimentam em duas camadas facilmente distinguíveis a olho nu: a inferior, de cor vermelha, formada pelos eritrócitos correspondente a 35 a 50% do volume total do sangue e uma camada superior, de cor acinzentada, contendo os leucócitos que correspondem a 1% do volume de sangue e ainda uma fina camada, não distinguível a olho nu que compõe a fração plaquetária sanguínea (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017).

Figura 1- Dois tubos de hematócrito com sangue: o da esquerda (antes da centrifugação) e o da direita (depois da centrifugação).



Fonte: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J (2017)

O plasma sanguíneo é um líquido de composição complexa constituído de 92% de água, com 8% formado de proteínas, nutrientes, sais, resíduos e gases dissolvidos, cujo volume varia em função do sexo, peso e altura do indivíduo (LORENZI, Therezinha, 2006). A Tabela 1 e 2 representam a composição do plasma que garante a manutenção do pH sanguíneo, equilíbrio osmótico e manutenção da sua viscosidade característica tendo em valores de sangue total em torno 2 a 25 vezes a viscosidade da água.

Na composição do plasma sanguíneo as proteínas têm papel particularmente dos mais importantes, correspondendo a 7% do total dos componentes (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017). Representam uma mistura de mais de 100 tipos diferentes de proteínas tendo a albumina, proteína sintetizada no fígado, a principal proteína dos fluídos extravasculares, como umas das mais importantes por contribuir intensamente para a manutenção da pressão osmótica coloidal (LORENZI, Therezinha, 2006), e por se ligar a determinadas substâncias em circulação e promover transporte e armazenamento de ligantes, tais como hormônios e determinados fármacos.

Ainda dentre as proteínas significativas no plasma incluem-se as imunoglobulinas (anticorpos) que representam a defesa ativa do corpo contra patógenos e os fatores de coagulação que são essenciais para formação do coágulo sanguíneo e controle de hemorragias. A composição normal do plasma, junto com a medida da massa eritrocitária circulante (hematócrito) asseguram ao sangue a manutenção da sua viscosidade característica assegurando valores normais de fluxo sanguíneo e são importantes na promoção de uma condição excelente para trocas gasosas a nível de tecidos (LORENZI, Therezinha, 2006). O plasma sanguíneo,

ainda, impede o colapso ou obstrução dos vasos e ajuda na manutenção da pressão arterial e circulação ao longo de todo corpo, facilitando a aproximação dos eritrócitos, que circulam, assim, mais ou menos justapostos em posição mais central, possibilitando um fluxo constante através dos vasos (LORENZI, Therezinha, 2006).

Tabela 1 - Componentes inorgânicos do plasma humano.

Componentes	Quantidade Média/Litro
Água	945,0 g
Bicarbonatos	24,9 mEq
Cloretos	102,7 mEq
Fósforo Total	112,0 mEq
Fósforo inorgânico	33,6 mEq
Potássio	4,2 mEq
Sódio	141,2 mEq
Cálcio	5,0 mEq

Fonte: LORENZI (2006)

Tabela 2 - Componentes orgânicos do plasma humano.

Componentes	Quantidade Média (g/l)
Proteínas Totais	75,0(g/l)
Albumina	46,2(g/l)
Fibrinogênio	3,0 (g/l)
Globulinas	26,6 (g/l)
α-globulinas	6,8 (g/l)
β-globulinas	8,2 (g/l)
γ-globulinas	11,6 (g/l)
Lipídeos Totais	5,1 (g/l)

Fonte: LORENZI (2006)

A fração celular sanguínea que representa 45% de um volume determinado

de sangue é constituída de três diferentes linhagens celulares: glóbulos vermelhos, eritrócitos ou hemácias; glóbulos brancos ou leucócitos e plaquetas ou trombóticos (LORENZI, Therezinha, 2006). Dentre as células em circulação apenas os leucócitos apresentam-se completos (com citoplasma e núcleo), pois as hemácias perdem o núcleo antes de entrar em circulação e as plaquetas são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos presentes na medula óssea (ZAGO, MA, 2013). A composição celular sanguínea representada na Tabela 3 desempenha papel essencial, por exemplo, transporte de oxigênio tissular, função imunológica de defesa contra agentes externos, e na composição do sistema de coagulação sanguínea trabalhando na prevenção de hemorragias.

Tabela 3 - Contagens de Células Sanguíneas Normais.

	Número médio por mm ³	Faixa normal
Hemácias	♀ 3.900.000 - 5.000.000 /mm ³ ♂ 4.300.000 - 5.700.000 /mm ³	4.2 a 5.9 milhões/ μ L
Leucócitos	7.400	4.500–11.000/mm ³
Neutrófilos	4.400	40–60%
Eosinófilos	200	1–4%
Basófilos	40	<1%
Linfócitos	2.500	20–40%
Monócitos	300	2–8%

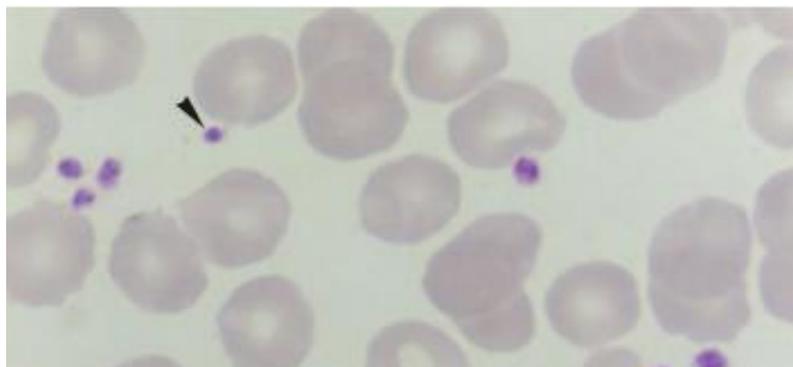
Fonte: Adaptada do ABBAS (2019)

2.1.2 COMPONENTES SANGUÍNEOS

As hemácias, são a unidade morfológica da série vermelha e a maior população de células do sangue circulante, tendo em números, nos homens, de 4,5 a 6,5 milhões por μ L e de 3,9 a 5,6 milhões por μ L em mulheres (ZAGO, MA, 2013). São células originadas da medula óssea pela proliferação e maturação dos eritroblastos, fenômeno conhecido como eritropoiese, indicando um processo

finamente regulado, que ocorre para manter constante a massa eritrocitária do organismo, tendo envolvido fatores de crescimento, sendo a eritropoietina (EPO) o principal (ZAGO, MA, 2013). Em sangue periférico, os eritrócitos apresentam forma final anucleada como células circulares com coloração central mais leve, em aspecto de disco bicôncavo com 7 a 8 μm de diâmetro (Fig. 2) mantida por proteínas estruturais do citoesqueleto, como, por exemplo, espectrinas, anquirina, actina, proteína 4.1 e banda 3 (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017) que permitem o aumento da superfície para as trocas gasosas e passagem dos eritrócitos por estreitos capilares, logo após, o eritroblasto ortocromático, seu precursor, passar pelo processo de enucleação, isto é, expulsão nuclear, tendo uma vida média de 120 dias (MONTANARI, Tatiana, 2006). Células remanescentes do processo de enucleação, chamadas de reticulócitos ou eritrócitos imaturos recém-saídos da medula óssea, apresentam parte de polirribossomos, mitocôndrias e aparelho de Golgi e grande quantidade de RNA em seu citoplasma, garantindo, assim, a capacidade de formação de proteínas (ZAGO, MA, 2013). Em consequência do amadurecimento dos reticulócitos e consumo do seu conteúdo de RNA citoplasmático, ocorre a transformação dessas células imaturas em hemácias maduras que não possuem mais a capacidade de síntese de hemoglobinas. As hemácias maduras apresentam como principais funções o transporte de oxigênio a partir dos pulmões para diversos tecidos do corpo, mantendo o aporte de oxigênio tissular adequado, assim como, o transporte de gás carbônico provenientes do metabolismo dos tecidos para os pulmões (ZAGO, MA, 2013).

Figura 2 - Hemácias e plaquetas (SETA) em um esfregaço sanguíneo. Giemsa.



Fonte: MONTANARI (2010)

Os glóbulos brancos ou leucócitos são um grupo dos mais heterogêneo das células sanguíneas. São as células encarregadas da defesa do organismo contra infecções, porém, cada subtipo leucocitário apresenta funções distintas e específicas entre si, compondo a estrutura do sistema imunológico (ZAGO, MA, 2013). Dois tecidos linfoides primários são responsáveis pela produção e amadurecimento das células brancas: a medula e o timo e apesar de possuírem um precursor hematopoiético comum, uma célula tronco pluripotente e autorrenovável na medula óssea chamada célula-tronco hematopoiética comum (HSC), cada subtipo apresenta intermediários distintos e diferentes fatores de crescimento (ZAGO, MA, 2013). Os leucócitos podem ser classificados em duas distintas categorias: leucócitos que contêm granulações abundantes no citoplasma (granulócitos) ou leucócitos que são desprovidos de granulações citoplasmáticas (agranulócitos) (LORENZI, Therezinha, 2006).

Os leucócitos (glóbulos brancos) podem ser classificados, ainda, em dois grandes grupos: os fagócitos e os linfócitos. No grupo dos fagócitos integram as células do sistema imune inato, isto é, células que fazem parte de um mecanismo de defesa sempre presente, imediato, prontos para combater microrganismos e outros agentes agressores, de dispensável exposição prévia a microrganismos, fortalecendo a defesa inicial (ABBAS A.K., LICHTMAN A.H, 2019). Dentro desse grupo, incluindo os neutrófilos, macrófagos (derivados dos monócitos), células natural killer e outras células que atravessam os vasos em direção aos tecidos e promovem a eliminação de microrganismos invasores, além de se livrarem de células danificadas do hospedeiro e iniciar o processo de reparo tecidual (ABBAS A.K., LICHTMAN A.H, 2019). O segundo grupo composto pelos linfócitos ocorre mediação da resposta imune adaptativa, no qual expressam receptores capazes de reconhecer uma gama variada de números de antígenos. Nesse grupo, encontram-se duas principais populações de células que mediam diferentes tipos de resposta imunes adaptativas: os linfócitos B e linfócitos T (MONTANARI, Tatiana, 2010).

Os granulócitos neutrofílicos ou, simplesmente, neutrófilos, assim intitulados por sua coloração neutra frente a coloração hematológica de Romanovski são a população mais abundante de leucócitos circulantes, ocorrendo síntese de mais de 1×10^{11} neutrófilos por dia sendo o principal tipo celular nas reações inflamatórias agudas, especializados em fagocitar partículas que invadem o organismo (Abbas

A.K., Lichtman A.H., 2007). Como representado na Fig. 3 são células com aspecto esférico com diâmetros entre 10 e 14 μm com núcleos formados por dois a cinco lóbulos conectados entre si por finas pontes de cromatina (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017). Em seu citoplasma apresentam quatro tipos diferentes de grânulos: grânulos azurófilos ou primários, grânulos específicos ou secundários, grânulos terciários ou de gelatinase, e vesículas secretoras (ZAGO, MA, 2013). A maior parte são os grânulos secundários ou específicos repletos de enzimas, como lisozimas, lactoferrinas, colagenases (gelatinase) e elastases que não se coram intensamente em colorações ácidas ou básicas, diferenciando os neutrófilos dos demais leucócitos circulantes (basófilos e eosinófilos) (Abbas A.K., Lichtman A.H., 2007).

Os grânulos primários ou azurófilos, maiores e mais elétron-densos são possuidores de enzimas como, por exemplo, mieloperoxidase, 5'-nucleotidase, β -glicosidase, β -galactosidase, colagenase e substâncias de toxicidade direta aos microrganismos (antimicrobianas), incluindo bactérias, fungos e vírus envelopados chamadas defensinas e, também, as catelicidinas (Abbas A.K., Lichtman A.H., 2007). Granulações atípicas ou vacuolização podem aparecer no citoplasma dos neutrófilos devido a diversas condições patológicas, envolvendo infecções bacterianas e inflamações sistêmicas como nas septicemias (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017). A função primordial desempenhada pelos neutrófilos é o processo englobamento de partículas estranhas (p.ex., bactérias, fungos) de pequenas dimensões por extensão de pseudópodes denominado fagocitose, especialmente, aqueles que já passaram por processo de opsonização com imunoglobulinas (IgG) reconhecidas por receptores de membrana Fc que vão se ligar à porção Fc da IgG ativando uma cascata de fosforilação de tirosina quinases responsáveis, por fim, pela secreção de grânulos citoplasmáticos ou foram opsonizadas por fragmentos C3b inativados (iC3b) do sistema complemento sendo reconhecidos por receptores da família das integrinas $\beta 2$ (Mac-1), resultando na ativação do sistema complemento e na intensificação da fagocitose desses microrganismos pelos neutrófilos (SILVA, 2015). Além disso, em vista da sua grande quantidade de grânulos citoplasmático, acaba por desempenhar função antimicrobiana na derrocada de patógenos extracelulares (ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., 2007).

Figura 3 - Neutrófilo. Giemsa.

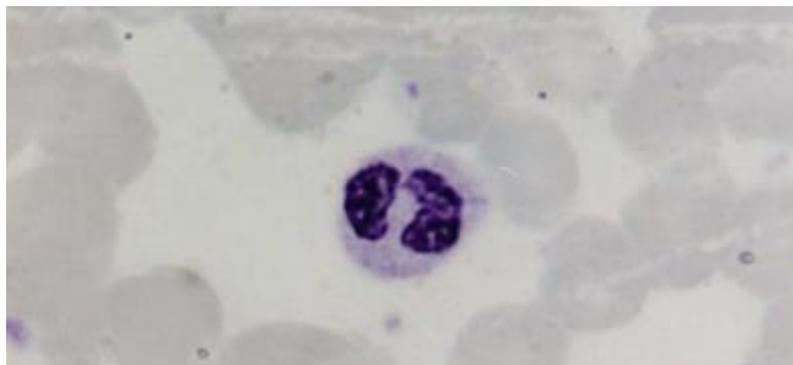


Fonte: MONTANARI (2010)

Os eosinófilos, são definidos granulócitos com aproximadamente o mesmo tamanho dos neutrófilos ou ligeiramente maiores, com um número menos representativo do que os neutrófilos, constituindo apenas 1 a 3% do total dos leucócitos (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017). São caracterizados por apresentar núcleo de cromatina densa bilobulada, citoplasma abundante com numerosas granulações ovoides alaranjadas (granulações acidófilas) (Fig.4) ricas em peroxidase, arilsulfatase, fosfatase ácida e fosfolipase que se coram em eosina, um corante ácido utilizado nas colorações de Romanovski (ZAGO, MA., 2013). Os principais componentes dos grânulos eosinofílicos são as proteínas catiônicas eosinofílica (ECP), proteína básica principal (MBP), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) e a peroxidase eosinofílica (EPX) (WELLER; SPENCER, 2017). Ao microscópio eletrônico consegue-se observar uma região mais eletrodensa chamada de *internum*, formada pela proteína básica principal, de função antibacteriana e antiparasitária, rica no aminoácido arginina que confere eosinofilia aos grânulos, enquanto a região que circunda é formada por uma matriz menos eletrodensa, o *externum* que contém fosfatase ácida β -glicuronidase, colagenase, fosfolipase, arilsulfatase, histaminase, peroxidase eosinofílica e as ribonucleases proteína catiônica eosinofílica e neurotoxina derivada de eosinófilos (MONTANARI, Tatiana, 2010). As proteínas catiônicas eosinofílicas (ECP) presentes nos grânulos eosinofílicos são ribonucleases que apresentam atividade citotóxica contra parasitas, bactérias e alguns vírus promovendo o surgimento de poros membranares nas células-alvo, indução do processo de degranulação em mastócitos e basófilos e

modulação negativa da resposta linfocitária (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017). Os eosinófilos têm origem na medula óssea a partir de precursores mielóides, passando por estágios de maturação semelhante aos dos neutrófilos, maturados por importantes interleucinas como GM-CSF, interleucina-3 (IL-3) e a interleucina-5 (IL-5), importante na maturação do eosinófilo a partir dos precursores mielóides (Abbas A.K., Lichtman A.H., 2007). Após o processo de maturação, os eosinófilos circulam no sangue brevemente (meia-vida de 3 a 8 horas), de onde podem ser recrutados para os tecidos no contexto de inflamação, atraídos pela histamina produzida, principalmente, pelos basófilos e mastócitos e quando lá promovem a degranulação nessas células liberando mediadores inflamatórios (citocinas) (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017). Além de encontrados no sangue periférico, alguns podem se fazer presente nos revestimentos de mucosa respiratória, gastrointestinal e geniturinária e seu número pode aumentar por meio do recrutamento tecidual a partir do sangue (Abbas A.K., Lichtman A.H., 2007). Estão presentes, principalmente, em sangue periférico desempenhando ação contra metazoários helmínticos, na mediação de processos inflamatórios associados à alergia, fagocitose e destruição de complexos antígeno-anticorpo, regulação da imunidade local e, recentemente, foi observado participação na remoção dos produtos de degradação da fibrina (PDF) na fase final do processo de hemostasia-coagulação-fibrinólise (ZAGO, MA., 2013).

Figura 4 - Eosinófilo. Giemsa.

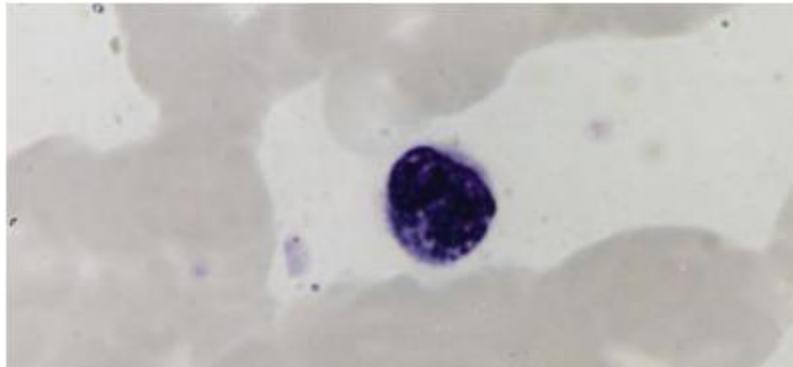


Fonte: MONTANARI (2010)

Dos granulócitos sanguíneos, os basófilos, constituem menos de 2% dos leucócitos (meia vida de 1 a 2 dias), apresentam similaridades estruturais e funcionais com células derivadas da medula óssea produtoras de vários mediadores

inflamatórios, presente nos epitélios da pele e das mucosas, que não circulam no sangue, chamadas de mastócitos (ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., 2007). Os basófilos apresentam-se com núcleo volumoso, aspecto retorcido e irregular, normalmente, em forma de letra S com presença de grânulos citoplasmáticos eletrodensos grosseiros e maiores do que os dos outros granulócitos (Fig. 5) encobrendo o núcleo e se corando em corantes básicos, como o azul de toluidina ou azul de alcian (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017). Os basófilos são capazes de formar mediadores inflamatórios sintetizados também nos mastócitos, como, por exemplo, histamina, heparina e fatores quimiotáticos para eosinófilos e neutrófilos, além de possuírem receptores de IgE na membrana plasmática (ZAGO, MA., 2013), desempenhando, assim, um papel essencial nos primórdios das reações inflamatórias agudas degranulando e possibilitando vasodilatação fundamental para a evolução do mecanismo inflamatório. A membrana plasmática dos basófilos, assim como, a dos mastócitos são dotadas de receptores de alta afinidade pela imunoglobulina E (FcεRI) que podem sofrer ligação cruzada com um antígeno, anticorpos anti-IgE (anti-IgE) ou outros mediadores, resultando no processo de desgranulação ou exocitose dos grânulos liberando mediadores como histamina (vasodilatador), heparina (anticoagulante), fatores quimiotáticos de eosinófilos (ECF), fatores quimiotáticos de neutrófilos e leucotrienos promovendo com reação de hipersensibilidade anafilática ou imediata mediada pelo IgE (MARONE et al., 2020). Um dos principais mediadores pré-formados, presentes nos grânulos dos basófilos é histamina, amina vasoativa promotora de resposta de contração da musculatura lisa brônquica e gastrointestinal, imunomodulação da resposta dos linfócitos T e da liberação de produtos linfocitários não anticorpos (linfocinas), aumento da expressão de receptores do complemento nos eosinófilos etc. (ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., 2007). Apesar de serem um dos tipos de leucócitos menos encontrados na circulação sanguínea, em resposta a sinais inflamatórios é notado um aumento significativo do seu número na medula óssea podendo ser mobilizados para o sangue e alguns órgãos essenciais como baço, fígado e pulmões (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017).

Figura 5 - Basófilo. Giemsa.

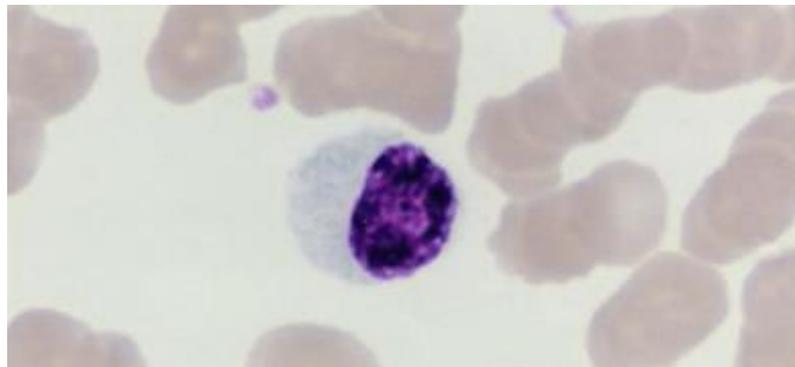


Fonte: MONTANARI (2010)

Os monócitos se apresentam como as maiores células circulantes entre os leucócitos observados no esfregaço sanguíneo, tendo entre 12 e 15 μm de diâmetro (ZAGO et al, 2001). Essas células variam bastante na sua forma (Fig. 6), com baixa relação núcleo/citoplasma, apresentam núcleo grande, de aspecto ovoide, em forma de rim ou ferradura, geralmente, excêntrico, com nucléolos não se apontando visíveis em colorações usuais e a cromatina apresentando coloração delicada (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017). O citoplasma dos monócitos é abundante, irregular, de coloração cinza ou azul-claro acinzentada finamente granular contém grânulos azurófilos (lisossomos), vacúolos fagocíticos e filamentos de citoesqueleto (ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., 2007). Os monócitos são integrantes do sistema de fagócitos mononucleares de origem na medula óssea através células precursoras comprometidas medulares vinculados a diferenciação em fagócitos mononucleares, coordenadas pelo fator estimulador de colônia de monócito ou macrófago (M-CSF), tendo o mais imaturo precursor chamado monoblasto (ZAGO et al, 2001). Quando amadurecem, os monócitos entram na circulação tendo um tempo de meia vida curto (8,4 horas) e durante processos inflamatórios podem migrar para os tecidos onde maturam-se em macrófagos tissulares (histiócitos) de morfologia e fisiologia semelhante aos monócitos. Os monócitos apresentam diferentes subpopulações identificadas pela heterogeneidade de marcadores da superfície celular e por suas determinadas funções (ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., 2007). Os mais numerosos são os chamados monócitos clássicos ou inflamatórios devido a serem recrutados para os sítios de infecção ou de lesão tecidual atuando na produção de mediadores inflamatórios. Já os monócitos

chamados de não clássicos, constituem uma minoria dos monócitos na circulação sanguínea, identificados pela alta expressão de CD16, ausente nos monócitos inflamatórios, e por baixos níveis de CD14. Após processo infeccioso ou de lesões, são recrutados para os sítios teciduais possuindo importância no processo de reparo (ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., 2007). Em diferentes tecidos os monócitos apresentam função fagocítica, respondendo com aumento do metabolismo oxidativo, consumo de oxigênio, produção de peróxido de hidrogênio e superóxidos, estímulo de shunt de pentoses, além de produção de lisozimas (ZAGO et al, 2001).

Figura 6 - Monócito. Giemsa

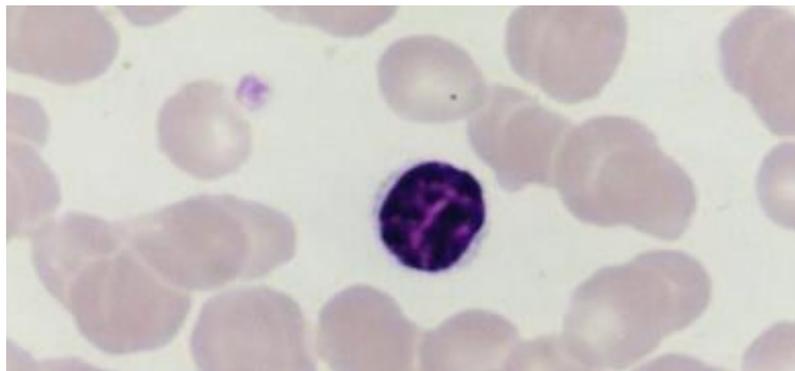


Fonte: MONTANARI (2010)

Os linfócitos são células sanguíneas imunológicas que auxiliam os fagócitos na defesa do organismo contra infecções e invasões estranhas apresentando especificidade antigênica e memória imunológica (HOFFBRAND, A. V, 2008). Essas células apresentam tamanho pequeno (6 a 10 μm) (Fig.7), forma regular e arredondada, de elevada relação núcleo/citoplasma com núcleo regular e esférico, de tonalidade azul-arroxeadada ocupando cerca de 90% da área da célula (ZAGO et al, 2001). No sangue ainda pode ocorrer um subgrupo de linfócitos maiores (até 20 μm), de porcentagem pequena, com citoplasma mais abundante em granulações azurófilas chamadas de grande linfócito granular (LGL) que compreendem os linfócitos NK (Natural Killer) e linfócitos T maduros (T-LGL) (ZAGO et al, 2001). O linfócito maduro apresenta núcleo esférico, com cromatina se dispondo em grumos grosseiros, de modo que o núcleo aparece escuro nos preparados de rotina, sem nucléolo visível, enquanto o citoplasma é bastante escasso e, devido aos ribossomos livres, apresenta discreta basofilia (azul-claro) apresentando-se sobre

forma de anel ao redor do núcleo quase que completamente sem grânulos citoplasmáticos, daí serem chamados de agranulócitos, no entanto, podem conter grânulos azurófilos, que não são exclusivos dos linfócitos, pois aparecem também nos monócitos e granulócitos (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017). Fisiologicamente, os linfócitos são as únicas células do corpo que expressam receptores antigênicos específicos para determinado antígeno diferente e, devido a isso, incluem três diferentes subpopulações celulares de linfócitos: linfócitos T, linfócitos B e os linfócitos NK (VERRASTRO, T. 2006). Os linfócitos T, que surgem a partir de células precursoras na medula óssea e amadurecem no timo, são encarregados das funções relacionadas a imunidade celular sendo uma resposta imune inicial ou primária, isto é, a primeira resposta à presença de um antígeno, enquanto o linfócito B, derivados da medula óssea, diferenciam-se em plasmócitos e sintetizam imunoglobulinas (anticorpos) participando da imunidade adaptativa de base humoral (MONTANARI, T., 2010). Já o grupo das células natural killer (NK) é representado por células com funções citotóxicas conferindo defesa inicial contra patógenos infecciosos, reconhecimento de células do hospedeiro estressadas e lesadas, auxiliando em sua eliminação e influenciando na natureza da resposta imune adaptativa subsequente (ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., 2007).

Figura 7 - Linfócito. Giemsa.



Fonte: MONTANARI (2010)

2.1.3 ESTRUTURA FUNCIONAL DA MEDULA ÓSSEA

O processo de formação das células do sangue (hematopoiese ou hemopoese) é um sistema complexo coordenado de fenômenos de origem,

multiplicação e maturação de células precursoras das células sanguíneas. O controle de proliferação, multiplicação e maturação celular é feito através de uma complexa interação molecular com células do microambiente da medula óssea (ANJOS; ALVARES-SILVA; BORELLI, 2000). A medula óssea se situa na porção interna das peças ósseas sendo constituída por componentes celulares mieloides, representados por células-tronco hematopoiéticas e células sanguíneas em vários estágios de maturação, se apresentando como o sítio de geração de células sanguíneas, o principal local pós-natal de formação de elementos sanguíneos, gerando aproximadamente 10 bilhões de leucócitos, 200 bilhões de glóbulos vermelhos e 400 bilhões de plaquetas diariamente durante toda a vida (SILVA et al., 2021).

Encontrada no canal medular dos ossos longos e em cavidades dos ossos esponjosos, constitui um microambiente adequado (“nicho”) de autorrenovação e formação de células precursoras indiferenciadas. Esse nicho apresenta-se favorável por ser composto de um estroma complexo, integrando uma rede de tecido conjuntivo, uma multiplicidade de tipos celulares, incluindo fibroblastos, macrófagos, adipócitos-like, células musculares lisas, células reticulares e endoteliais e uma rede integrada microvascular (ANJOS; ALVARES-SILVA; BORELLI, 2000). Alterações significativas no estroma medular e nos seus componentes, como mudanças na afinidade ou na quantidade de moléculas de adesão das células estromais ou precursores hematopoiéticos, podem causar variações na multiplicação e diferenciação das linhagens hematopoiéticas, alterando a composição citológica da medula óssea (VERRASTRO, Therezinha, 2010). A medula óssea produtora de células sanguíneas é chamada de medula vermelha sendo encontrada no adulto, principalmente, no esterno, vértebras, ossos ilíacos e costelas onde abrigam espaços que contêm uma rede de sinusoides cheios de sangue revestidos de células endoteliais no qual fora desses sinusoides há um aglomerado de precursores de células sanguíneas em vários estágios de maturação que posteriormente migram pela membrana basal dos sinusoides para entrar na circulação vascular (ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., 2007).

A medula óssea apresenta-se como um compartimento de origem das interações entre sistemas celulares distintos, formando um microambiente que propicia a hematopoiese (BYDLOWSKI et al., 2009). O microambiente medular é

proporcionado por uma matriz extracelular adequada, composta de diversas proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos, produzidas pelas células estromais, mantendo a estrutura tridimensional do compartimento medular dando suporte através de fibras colágenos (tipo I, III, IV, V e VI), fibronectinas (fator natural de aderência celular), laminina (crescimento embrionário), vitronectina (adesão celular, migração, proliferação e diferenciação), hemonectina (assegurar células em maturação) e sulfato de heparina e sulfato de condroitina (ZAGO et al, 2001). Esse compartimento medular é composto de três sistemas celulares: hematopoiético, epitelial e estromal (DEANS; MOSELEY, 2000). Estende-se como estroma o agrupamento de células estromais como fibroblastos, células reticulares, células endoteliais, adipócitos e osteoblastos, além de outros tipos celulares como macrófagos e a associada matriz extracelular formada pelas células estromais e várias proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos (ANJOS; ALVARES-SILVA; BORELLI, 2000).

O espaço medular é composto de complexos seios sinusoides, formados por uma camada contínua de células endoteliais, uma camada descontínua de células reticulares e composição adiposa adjacentes aos sinusoides participando da regulação da hematopoiese (ZAGO et al, 2001). A hemocitopoese ocorre nos espaços entre capilares e células reticulares, passando por processos de regulação por citocinas estimuladoras e inibitórias, contatos intercelulares e proteínas da matriz extracelular existentes no estroma (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017). As células endoteliais da medula óssea são capazes de manter a proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas secretando citocinas como G-CSF, GM-CSF, M-CSF, ligante do kit, interleucina 6 (IL-6) e ligante do FLK-2, além de possibilitar interações com células hematopoiéticas via moléculas de adesão (ZAGO et al, 2001). Esse modelo de composição estromal é determinado por células-tronco mesenquimais residentes na medula óssea que mantêm certo grau de auto-renovação, e dão origem a células que podem se diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo e em tecidos estromais (DA SILVA MEIRELLES, 2003).

Progenitores hematopoiéticos interagem com essas moléculas da matriz, através de receptores de superfície para macromoléculas e se ligam a sítios específicos do estroma, via moléculas de adesão, incluindo integrinas $\beta 1$, $\beta 2$ e selectinas, contribuindo para sua proliferação e diferenciação por fixar

temporariamente formando nichos (“microrregiões”), nas quais predomina o mesmo tipo de linhagem celular em diferentes estágio de maturação, podendo facilitar o desenvolvimento de linhagens sanguíneas específicas e favorecer a sobrevivência de células-tronco ou a quiescência celular (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017). Logo, entende-se que a manutenção das células na medula óssea é dada por uma interação entre as células e as moléculas de adesão, presente, também, nas células hematopoiéticas, que compõem a matriz extracelular e nas células estromais. Tais moléculas de adesão são essenciais na marcação fenotípica dos precursores hematopoiéticos, através de citometria de fluxo, é possível notar presença ou ausência dessas células no sangue ou na medula óssea, alterações fenotípicas, grau de maturidade etc.

Componente essencial para um nicho medular favorável para adesão, modulação e crescimento celular são as células do estroma ou células estromais, integrantes fundamentais no estabelecimento de contatos heterotópicos entre células, produção de combinações de citocinas, fatores de crescimento e moléculas extracelulares (HOMBAUER; MINGUELL, 2000). As células do estroma incluem fibroblastos, macrófagos, osteoblastos, osteoclastos, células endoteliais, adipócitos e mastócitos (raros) formando o tecido de sustentação da medula hematopoiética, possibilitando a secreção de componentes importantes para formação da matriz extracelular como colágeno, glicoproteínas (fibronectinas e trombospondias) e glicosaminoglicanos (ácido hialurônico e derivados de condroitínicos) e fatores de crescimento para desenvolvimento das células tronco hematopoiéticas (HOFFBRAND, A. V, 2008). As células do estroma produzem fatores solúveis de importante atuação nas células hematopoiéticas medulares dando suporte mecânico as mesmas e garantindo contato físico entre as células possibilitando uma melhor qualidade das células hematopoiéticas produzidas (BREEMS et al., 1998).

Devido ao microambiente favorável encontrado na medula óssea, assim como, também, encontrado durante a vida fetal (baço e no fígado), é que a medula compreende precursores hematopoiéticos importantes, as chamadas células-tronco ou stem cells (VERRASTRO, Therezinha, 2010). O microambiente da medula óssea define o destino das células-tronco hematopoiéticas (SILVA et al., 2021). As células-tronco são células de origem embrionária, que possuem características bem distintas de outros tipos celulares: são indiferenciadas e não especializadas, possuem

habilidade de proliferação e auto-renovação indefinida e capacidade de diferenciação a determinadas linhagens celulares especializadas quando submetidas a condições fisiológicas ou experimentais (SILVA JUNIOR; ODONGO; DULLEY, 2009). A maior parte dessas células progenitoras se apresenta em quiescência, na fase G0 do ciclo celular, possuindo capacidade de realizar divisões assimétricas dando origem, na mesma divisão, a uma nova célula tronco, mantendo o pool de células constante ao longo de toda a vida, e uma célula comprometida com determinada linhagem (SILVA et al., 2021).

Dentre as CT encontradas no microambiente medular observa-se dois grupos distintos: as células-tronco mesenquimais (mesenchymal stem cell - MSC) e as células tronco hematopoiéticas (hematopoietic stem cells - HSC) (VERRASTRO, Therezinha, 2010). As células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana (hMSC), também conhecidas como células estromais da medula óssea, são uma rara subpopulação de células-tronco da medula óssea, compondo < 0,01% das células mononucleadas medulares (FREITAS DE SOUZA et al., 2010). Clonogênicas, multipotentes, são críticas na origem das células estromais, isto é, células com capacidade de diferenciar-se em células mesenquimais ou células estromais medulares, que quando submetidas a diferentes estímulos são capazes de diferenciação em várias linhagens de células, de origem mesodérmica e não mesodérmica, provendo ao microambiente medular suporte do processo de diferenciação de células-tronco hematopoiéticas e da hematopoiese (BYDLOWSKI et al., 2009). As MSCs não são células exclusivas da medula óssea, podendo ser encontradas em todos os órgãos do corpo compondo os tecidos mesenquimais em adultos (tecido adiposo, pele, trabéculas ósseas, periósteo, cartilagem articular, músculos esqueléticos etc.) e no feto (líquido amniótico, placenta, fígado, baço, timo e pulmão), fornecendo suporte estrutural e regulação da passagem de células através dos tecidos (BYDLOWSKI et al., 2009).

As MSCs possuem propriedades de divisão importantes para manutenção do microambiente medular, sofrendo divisão celular assimétrica, isto é, divisão em duas células irmãs diferentes entre si (YAMASHITA; IWAMA, 2022). Uma célula-irmã mantém a multipotência da célula que a originou (célula-mãe), ou seja, permanece como célula-tronco num processo denominado de auto-renovação e a outra célula-irmã apresentando capacidade mais restrita de diferenciação, diferenciando-se em

um tipo celular necessário, podendo ser tripotente (três tipos celulares), isto é possuindo habilidade de células clonais expandidas em três linhagem celulares distintas como, por exemplo, osteoblastos, condrócitos e adipócitos ou bipotente (dois tipos celulares), apresentando importantes diferenças na expressão gênica (BYDLOWSKI et al., 2009). Devido a característica de divisão e proliferação das células-tronco mesenquimais de maneira a promover a manutenção e renovação de tecidos mesenquimais em adultos, além da sua não expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHCII) é que muitos estudos objetivam utilizar as MSCs de forma terapêutica como células alogênicas ou células universais, capazes de atuar no interior de qualquer hospedeiro não ativando o sistema imunológico, servindo na restauração de tecidos (FREITAS DE SOUZA et al., 2010).

As primeiras células-tronco adultas identificadas com caráter de pluripotencialidade foram as células-tronco hematopoiéticas (CTH), células primitivas multipotentes com capacidade de autorenovação e diferenciação em células especializadas dos tecidos sanguíneos e células do sistema imune (DA SILVA JUNIOR; ODONGO; DULLEY, 2009), possibilitando diferenciação em células progenitoras de todas as linhagens hematológicas (eritroides, mieloides e linfoides) e a reconstrução da população sanguínea, no longo prazo e de forma completa, com capacidade de autorrenovação com determinado prazo (YAMASHITA; IWAMA, 2022). Essas células-tronco, além de possuírem atividade na produção de progenitores das diferentes linhagens hematopoiéticas, também são capazes, através de divisão assimétrica, de produzir células-filhas que preservam as suas características, possibilitando a automanutenção do pool de células indiferenciadas. As CTHs residem predominantemente na medula óssea, mas podem ser encontradas em vários órgãos ou tecidos como no sangue periférico e no sangue de cordão umbilical (LEE; HONG, 2020). Dentro do nicho da medula óssea, onde é regulado o comportamento dessas células, o destino das células-tronco hematopoiética é decidido por reguladores intrínsecos e extrínsecos pró-quiescência, pró-renovação ou pró-diferenciação, assim como, células de suporte que fornecem citocinas que controlam a função das células-tronco hematopoiéticas (SILVA et al., 2021).

As CTHs em adultos também podem aparecer fora dos domínios medulares, desempenhando a função hematopoiética, promovendo a atividade de hematopoiese extramedular, relatado em adultos no periósteo, baço, fígado, coração, rim, glândulas suprarrenais, tecido adiposo e em vários tipos de câncer (SILVA et al., 2021). As CTHs podem ser classificadas em duas subpopulações: células-tronco hematopoiéticas de longo prazo (LT-HSC - Long Term Hematopoetic Stem Cell) e as células-tronco hematopoiéticas de curto prazo (ST-HSC - Short Term Hematopoetic Stem Cell) (ZAGO et al, 2001). As LT-HSC são uma população de células quiescentes, geralmente em fase Go do ciclo celular, que residem na medula óssea, as quais se proliferam ao longo da vida do organismo, podendo se renovar em longo prazo, sofrendo poucos ciclos de divisões celulares, sendo responsáveis pela manutenção do pool hematopoiético imaturo e indiferenciado (ZAGO et al, 2001). As LT-HSC passam por divisões assimétricas formando células-filhas diferentes, uma LT-HSC e a outra sendo ST-HSC. As ST-HSC, por sua vez, são células também quiescentes, porém apresentam maior potencial de proliferação e comprometimento com diversas linhagens de células sanguíneas, gerando progenitores multipotentes, que vão dar origem a progenitores comuns das linhagens mieloides e linfóide (ZAGO et al, 2001). As ST-HSC, também conhecidas como unidades formadoras de colônias (CFU), são capazes de formar uma ou mais linhagens hematopoiéticas, sendo, por exemplo, apenas granulócitos como as unidades formadoras de colônias-granulocítica (CFU-G) ou produzindo granulócitos e monócitos como as unidades formadoras de colônia granulocítica/monocítica (CFU-GM) ou as produtoras de um único tipo de células diferenciadas (CFU-E, BFU-E, CFU-G, CFU-M, CFU-MK) etc. (ZAGO et al, 2001).

Tais células podem ser classificadas de acordo com sua origem ou sua capacidade de diferenciação em: totipotentes, pluripotentes e multipotentes (DA SILVA JUNIOR; ODONGO; DULLEY, 2009). As células totipotentes são um grupo de células capazes de gerar qualquer tipo de célula ou tecido do organismo, isto é, além de se diferenciar em células dos três folhetos embrionários, forma tecidos extraembrionários, correspondendo as células do embrião recém-formado (DA SILVA JUNIOR; ODONGO; DULLEY, 2009). O processo de divisão das células totipotentes acarreta a formação das células pluripotentes, mais especializadas que dão a todas as células do sangue, originando células-filhas com potencial menor, as

progenitoras multipotentes, presentes no indivíduo adulto, responsáveis pela formação das células precursoras (blastos), sendo as células do qual as características morfológicas diferenciais das linhagens aparecem pela primeira vez e que produzem grande quantidade de células diferenciadas maduras (3×10^9 hemácias e $0,85 \times 10^9$ granulócitos/kg/dia) na medula óssea humana saudável. (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017). As células precursoras são capazes de originar colônias de células de diferentes linhagens (multilinhagem), mas após divisão, restringem-se a uma única linhagem (unilinhagem), ocorrendo segundo ordem específica, separando as linhagens mieloide e linfoide, posteriormente, linhagem granulocítica, monocítica e a eritroide-megacariocítica (ZAGO et al, 2001).

2.1.4 HEMATOPOESE

A hematopoiese é o processo de formação contínua de componentes celulares do sangue ao longo da vida para renovação do pool celular sanguíneo atendendo as requisições diárias de células e para responder ao aumento da demanda celular em caso de lesão ou infecções (HOGGATT; PELUS, 2013). A produção de células do sistema hematopoiético atende uma demanda incrível de suprimento, pois trilhões de células devem ser produzidas todos os dias, tendo, por exemplo, em um homem adulto de 70 kg, aproximadamente, formação de 200 bilhões/dia de eritrócitos (glóbulos vermelhos) e 70 bilhões/dia de leucócitos neutrofílicos (OGAWA, 1994). A manutenção do pool de células hematopoiéticas do adulto é proporcionada por uma pequena quantidade de células-tronco hematopoiéticas (HSC), aproximadamente, 0,1% das células nucleadas da medula óssea (ZAGO et al, 2001) que são capazes de auto-renovação, evento divisional que resulta na formação de duas HSCs para manter o suprimento celular das progenitoras e são capazes de diferenciação multipotente em todas as linhagens hematológicas maduras, ou seja, capazes de formar eritrócitos, plaquetas, linfócitos, monócitos/macrófagos e granulócitos (HOGGATT; PELUS, 2013).

As HSCs auto-renováveis residentes da medula óssea como um grupo de células em pequenas quantidades, representam o topo da hierarquia celular dos estágios de células progenitoras e medida que se diferenciam, dão origem a um grupo de intermediários de células progenitoras que passam por restrição para

assumir a identidade de uma célula sanguínea madura (DOULATOV et al., 2012). O conjunto de eventos envolvidos na formação de diversos tipos de células do sangue a partir de células-tronco são denominados de hematopoiese, incluindo: automanutenção do pool de CTHs, geração e manutenção do pool de células comprometidas com uma linhagem hematológica (precursoras) e proliferação e diferenciação de células precursoras em células diferenciadas que migram para a corrente sanguínea (ZAGO et al, 2001). As primeiras células sanguíneas do ser humano surgem no período embrionário, em fase chamada de hematopoiese primitiva, com trinta dias após a formação do embrião, quando as CTHs estão localizadas nas ilhotas sanguíneas do saco vitelínico extraembrionário, antes mesmo do primeiro batimento cardíaco, com objetivo primário de produzir glóbulos vermelhos que podem facilitar a oxigenação do tecido à medida que o embrião passa por um rápido crescimento (JAGANNATHAN-BOGDAN; ZON, 2013).

A capacidade de formação de todas as linhagens sanguíneas promovendo o processo de hematopoiese e autorrenovação das CTHs chamada de fase definitiva ou adulta que acontece na quarta semana de gestação quando o nicho hematopoiético passa a ocupar a mesoderme, na região intraembrionária da Aorta-Gônadas-Mesonefro (AGM) e na placenta (RIEGER; SCHROEDER, 2012). Apesar das células embrionárias adultas e seus derivados serem formados a partir células-tronco hematopoiéticas, existe no embrião um nicho celular transitório de células primitivas que surgem antes das primeiras CTH advindas do saco vitelínico extraembrionário e da placenta que possuem características e funções específicas no embrião como, por exemplo, as hemácias primitivas que circulam como células grandes e nucleadas expressando formas fetais de hemoglobinas (PALIS, 2014). Ao longo do desenvolvimento a função hematopoiética migra para placenta, fígado, baço, e, definitivamente, para medula óssea a partir da 10^o ou 11^o semana embrionária tornando-se o local de maior atividade hematopoiética após a 24^o semana de gestação (VERRASTRO, Therezinha, 2010). Outros órgãos que estão em desenvolvimento como timo e linfonodos, também contribuem para a formação de células sanguíneas, especialmente na produção de linfócitos (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017).

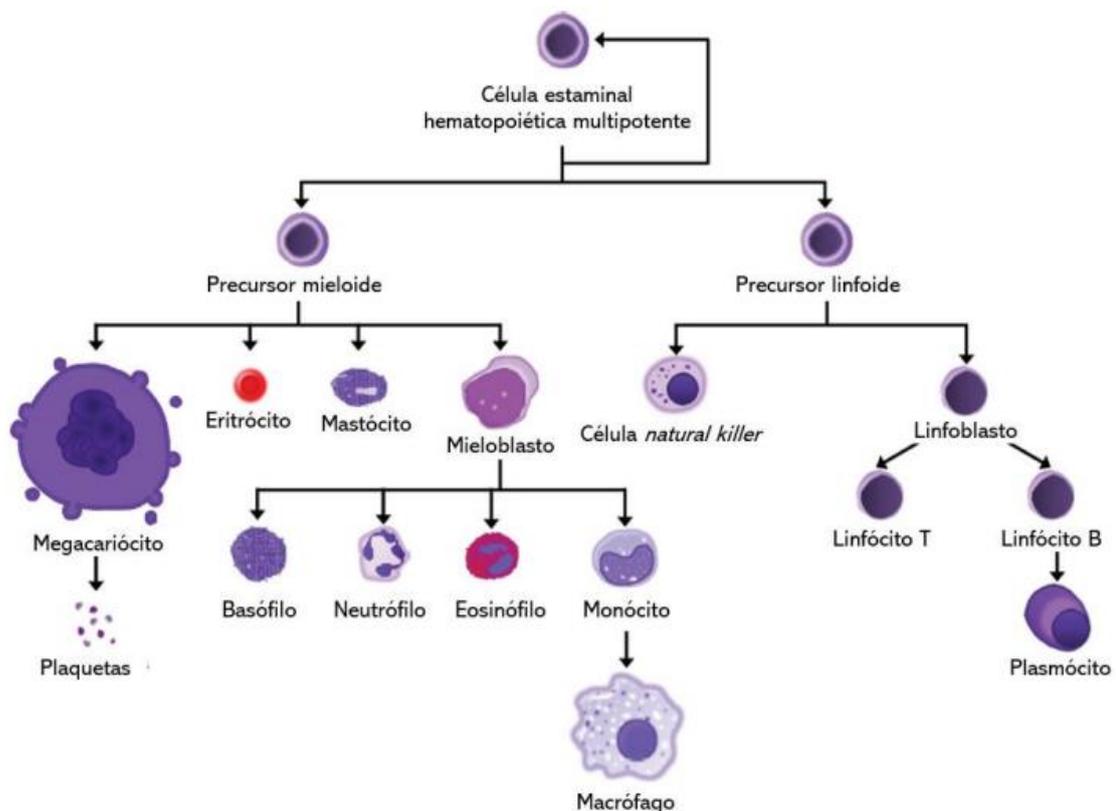
Essa função, após o nascimento, é exercida pela medula óssea, sendo o sítio hematopoiético mais importante durante a infância e a fase adulta sendo a única

fonte de novas células sanguíneas, exceto em casos de expansão do tecido hematopoiético em regiões extramedulares (ZAGO et al, 2001). Nos primeiros anos de vida, a atividade hematopoiética pode ser observada em todos os ossos e em toda a medula óssea, com extrema celularidade (porcentagem de tecido hematopoiético), variando de 60 a 100%, diminuindo com o progredir da idade e com o tipo de osso observado (ZAGO et al, 2001). Próximo da puberdade ocorre uma substituição progressiva da medula hematopoiética ativa por tecido gorduroso, isto é, por células gordurosas (adipócitos) em razão de uma diminuição importante do tecido hematopoiético, assim como, aumento da cavidade óssea devido a perda da substância óssea de modo que a medula hematopoiética do adulto fique restrita às epífises dos ossos longos, além de ossos chatos como crânio, vértebras, costelas e esterno (ZAGO et al, 2001). Em muitas doenças, por exemplo, nas anemias hemolíticas, a medula óssea gordurosa ou amarela possui capacidade de reversão para o processo hematopoiético, além disso, órgãos antes hematopoiéticos como fígado e baço podem reassumir a função de hematopoiese, representando a chamada hematopoiese extramedular (HOFFBRAND, A. V, 2008).

O processo de hematopoiese (Fig. 8) tem início com as células tronco hematopoiéticas (HSC) que são pluripotentes, ou seja, conseguem diferenciar-se em todos os tipos de células sanguíneas e, também, possuem habilidade de se multiplicar constantemente para manter seus números na medula óssea (HOFFBRAND, A. V, 2008). Fatores estimulantes para diferenciação das células pluripotentes fazem com que essas células passem por diferenciação formando células filhas com potencialidade menor chamadas de progenitoras multipotentes (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017), tanto células linfoides multipotentes como células mieloides multipotentes que se diferenciam para formar as unidades formadoras de colônia (CFU) para um determinado tipo celular que passarão a ser estimuladas por fatores específicos e vão diferenciar-se nas linhagens granulares, plaquetárias, eritrocitárias, linfoides e outras (VERRASTRO, Therezinha, 2010). As células progenitoras multipotentes possuem as características da célula de origem, com capacidade de autorrenovação que será perdida ao longo da sua diferenciação com ganho de características específicas dos tipos de células sanguíneas maduras (MANSSON et al., 2009). O estímulo e a inibição da hematopoiese depende de um microambiente medular adequado fornecido pelas células do estroma que secretam

fatores de crescimento hemocitopoéticos que regulam a proliferação, diferenciação e a apoptose de células imaturas, assim como atividade funcional de células maduras (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2017.) A hematopoiese envolve ciclos de proliferação e diferenciação, ambos envolvendo ativação de genes que precisam de estimulação através de fatores solúveis como, por exemplo, as citocinas para indução do processo de transcrição gênica (MOTICKA, 2016). Os agentes influenciadores da hematopoiese são os fatores estimuladores de colônias (CSF, do inglês Colony Stimulating Factor) que podem atuar nas células progenitoras ou possuírem atuação mais restrita como o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF, do inglês Granulocyte-Colony Stimulating Factor), além de, interleucinas, eritropoietina e trombopoietina, dentre outros (GARTNER; HIATT, 2012).

Figura 8 - Hematopoiese: processo de formação dos elementos figurados do sangue.



Fonte: Adaptado de NOBILI; LIONETTI; NERI (2016)

2.2 LEUCEMIAS

O termo leucemia advém das palavras gregas “*leukos*”, que significa branco, e “*haima*” que significa sangue, fazendo alusão a um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas altamente categorizadas de acordo com sua morfologia, imunofenótipo, anormalidades citogenéticas e moleculares que surgem da proliferação disfuncional de leucócitos (glóbulos brancos) em desenvolvimento (CHENNAMADHAVUNI; LYENGAR; SHIMANOVSKY, 2022). Nas estimativas do American Cancer Society (ACS) para o ano de 2022, estima-se que 60.650 novos casos de leucemia serão diagnosticados nos EUA com aumento da taxa de incidência em crianças e adolescentes por cerca de 1% ao ano e estável entre adultos de 20 anos ou mais, embora as tendências variem para cada subtipo (SUNG et al., 2021). A taxa de mortalidade estimada pelo mesmo instituto mostra que 24.000 mil pessoas morrerão da doença, apesar de haver um decréscimo na taxa de mortalidade entre 2010 e 2019 em cerca de 2% por ano em adultos e em ritmo de declínio maior entre crianças e adolescentes, muito devido ao sucesso que o tratamento obteve ao longo dos anos.

O maior índice de incidência de leucemia no mundo para ambos os sexos é encontrado em países que apresentam altos níveis de desenvolvimento humano com fatores de risco importantes como tabagismo, contato com benzeno na indústria química, exposição a formaldeídos, doenças hereditárias, história familiar, radiação ionizante e em alguns casos classes de medicamentos utilizados na quimioterapia (SUNG et al., 2021). No Brasil, de acordo com dados do INCA, dos dez cânceres mais frequentes na população brasileira, as leucemias aparecem na nona colocação com número de novos casos esperados para cada ano do triênio 2020-2022 de 5.920 casos em homens e de 4.890 em mulheres correspondendo a um risco estimado de 5,67 casos novos a cada 100 mil homens e 4,56 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2020).

Pacientes com leucemia, clinicamente, se enquadram em quatro grandes categorias de acordo com a velocidade de crescimento celular e tipo de célula do sangue que deu origem à doença, seguindo o espectro de leucemias agudas ou crônicas e mieloide ou linfoide (WHITELEY et al., 2021). Na atualidade tem-se doze tipos de leucemias que estão classificadas baseadas nesses dois critérios, à rapidez

da proliferação celular e qual a célula originadora da doença (WHITELEY et al., 2021). No critério de velocidade de crescimento, são classificadas como leucemias agudas, quando as células sanguíneas não completam o seu processo maturativo levando a uma proliferação de células imaturas e disfuncionais do sangue (células embrionárias ou blastos) que se acumulam na medula e no sangue periférico (excedendo 20% no esfregaço sanguíneo ou na medula óssea), substituindo gradativamente as células normais, se espalhando pelo sangue, aumentando, assim, a concentração de glóbulos brancos, ocorrendo rápida progressão da doença com um quadro clínico grave de evolução rápida (WEINBERG, 2008). Por esse critério, também, tem-se as leucemias crônicas com multiplicação desordenada dos glóbulos brancos, com altas taxas de proliferação de células maduras, possuindo menos de 20% de blastos, com instalação mais lenta, insidiosa e progressiva, de agravamento tardio que são encontradas em grande número na medula óssea e no sangue periférico, não exibindo deficiência de elementos celulares no diagnóstico (SOARES et al., 2012), sendo descoberta, geralmente, durante exames rotineiros de sangue periférico, pois o paciente não apresenta queixas ou apenas relata manifestações inespecíficas (ZAGO et al, 2001). No entanto, as leucemias crônicas podem apresentar uma fase denominada acelerada/blástica sendo uma transformação da leucemia crônica em uma fase aguda com grau significativo maior de blastos (ARBBER et al., 2016).

As leucemias agudas apresentam como característica forte clonalidade com formação de células neoplásicas muito indiferenciadas, jovens com perdas nos estímulos proliferativos e/ou maturativos (LORENZI, Therezinha, 2006). Esses blastos em excesso por sofrer expansão e proliferação clonal na medula óssea podem passar para corrente sanguínea e sistema linfático, sendo capaz de percorrer também outros órgãos como os pulmões, pele, cérebro, a medula espinhal e outras partes do corpo promovendo um quadro de infiltração leucocitária (ZAGO, MA., 2013). No sangue periférico nesse tipo de leucemia é caracterizado por mais de 20% de blastos com aumento de celularidade da medula óssea repleta de blastos e número variável de células granulocíticas, precursores eritroides ou monocíticas (CHENNAMADHAVUNI; LYENGAR; SHIMANOVSKY, 2022). Enquanto nas leucemias crônicas há uma proliferação exacerbada dos granulócitos, mas no sangue e medula óssea encontram-se células maduras, ocorrendo incomuns formas

blásticas em circulação se multiplicando mais lentamente, podendo funcionar normalmente por um período, não produzindo de início sintomas podendo passar despercebidas ou não diagnosticadas por anos (ZAGO, MA., 2013).

No critério de tipo celular as leucemias podem ser classificadas em mieloides ou linfoides, dependendo da origem celular hematopoiética (ABREU et al., 2021). As leucemias mieloides caracterizam-se pela proliferação predominante de células mieloides podendo ser células que dão origem às granulócitos, eritrócitos e plaquetas, enquanto as leucemias linfoides são originárias da linhagem linfóide do sangue, nas células que formam os linfócitos T e B (ALMEIDA, 2015). Um progenitor linfóide (CLP) gera linfócitos B, T e células NK (natural Killer), enquanto, células-tronco mieloides ou progenitor mielóide comum (CMP) origina de células vermelhas do sangue (eritrócitos) a maioria das células brancas (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, mastócitos e células dendríticas) e as células que dão origem às plaquetas, denominadas megacariócitos (ABREU et al., 2021). Embora, ocorram vários subtipos de leucemias, as mais predominantes em incidência e prevalência são as leucemias mielóide aguda (LMA) e leucemia mielóide crônica (LMC), envolvendo a cadeia mielóide e as leucemias linfoblásticas agudas (LLA) e as leucemias linfocíticas crônica (LLC) envolvendo a cadeia linfóide (CHENNAMADHAVUNI; LYENGAR; SHIMANOVSKY, 2022).

As leucemias ocorrem devido a transformação maligna de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes, aquelas responsáveis por dar origem a precursores mielóide e linfóides, mas essa transformação pode ocorrer nas células-tronco mais comprometidas com determinada linhagem celular com certa limitação na capacidade de auto-renovação (CHENNAMADHAVUNI; LYENGAR; SHIMANOVSKY, 2022). Uma célula-tronco hematopoiética pode se tornar uma célula-tronco comprometida com o braço mielóide e formar três tipos de células sanguíneas maduras como glóbulos vermelhos que transportam oxigênio e outras substâncias para todos os tecidos do corpo, granulócitos que são glóbulos brancos que ajudam a combater infecções e doenças e plaquetas que formam coágulos sanguíneos para parar sangramentos. Sendo assim, precursores mieloides são os progenitores de eritrócitos, leucócitos, polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos e plaquetas (MOTICKA, 2016). Ainda, as células tronco podem se comprometer com o braço linfóide que migram para os órgãos linfóides

(ex. linfonodos, baço e timo) para completar o processo maturativo e torna-se uma célula linfoblástica formando linfócitos de fenótipo B, T e células natural killer (NK) (ZAGO, MA., 2013). Na observação de cortes histológicos de medula óssea de pacientes em determinadas leucemias, principalmente, de aspecto agudo, observa-se um acúmulo de células imaturas (blastos) anormais, pouco diferenciadas por parada ou dificuldade no processo de maturação que vão substituindo as células precursoras formadoras dos elementos sanguíneos normais prejudicando a hematopoiese normal, reduzindo a produção de hemácias, leucócitos e plaquetas (ZAGO, MA., 2013).

2.2.1 NEOPLASIAS LINFOPROLIFERATIVAS

Neoplasias linfoproliferativas são um grupo de doenças que apresentam atributos clínicos e morfológicos variáveis caracterizados pela produção descontrolada de linfócitos que causam linfocitose monoclonal, linfadenopatia e infiltração da medula óssea (JUSTIZ VAILLANT; STANG, 2022). Os linfócitos sanguíneos são particularmente susceptíveis a mutações, uma vez que promovem a regulação de genes tanto na diferenciação em órgãos linfoides centrais, como no timo e medula, quanto após a ativação por antígeno, podendo levar ao desenvolvimento de doenças como vários distúrbios imunomediados: artrite reumatóide recém-diagnosticada, síndrome de Felty, aplasia pura de células vermelhas, esclerose múltipla, doença crônica do enxerto contra o hospedeiro e leucemia linfocítica granular grande de células T (T-LGL), entre outros. (LUNDGREN et al., 2021) Sendo assim, erros ocasionais nos processos de hiper mutação somática e mudança de classe, geração de translocações nos genes das imunoglobulinas, mutações no gene supressor tumoral P53, anormalidades citogenéticas são a marca de muitas neoplasias clonais linfoides (ZAGO, MA., 2013).

Levando, também, em consideração a patogênese molecular das neoplasias linfoides, estudos citogenéticos mostram que algumas das principais doenças proliferativas de linfócitos apresentam anormalidades citogenéticas correlacionadas com tipos histológicos e com imunofenótipos específicos, por exemplo, como ocorre na translocação t (14;18), frequentemente, encontrada em linfomas foliculares (RABKIN et al., 2008), t(8;14), t(8;2) e t(8;22) associada ao linfoma não Hodgkin de

células B (linfoma de Burkitt) (DE FALCO et al., 2015), translocação t(12;21) é a mutação mais frequentemente identificada na Leucemia Linfoblástica Aguda (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013). Ainda no campo da patogênese, defeitos genéticos culminados com a presença de imunodeficiências formam um ambiente propício para o desenvolvimento de neoplasias, isto é, imunodeficiência seja adquirida, secundária a drogas ou vírus, aumenta a susceptibilidade para as doenças linfoproliferativas (MAFFEIS et al., 2019).

Doenças linfoproliferativas malignas partem de linfócitos das linhagens T, B ou NK que podem estar em diferentes fases de maturação podendo originar-se de precursores linfoides primitivos, ou seja, estágios mais iniciais de maturação como observados em leucemias linfoproliferativas agudas ou podem derivar de linfócitos mais diferenciados como no caso das leucemias linfoides crônicas e o mieloma múltiplo (ZAGO, MA., 2013). Nesse tipo de neoplasia, principalmente, observa-se dois subgrupos de linfócitos: células T e B que se regeneram incontroladamente devido a derrocada dos mecanismos fisiológicos de controle da proliferação ocasionando, por consequência, um aumento desenfreado e autônomo de células imunes ocasionando linfocitose e linfadenopatia, além de possíveis envolvimento de locais extranodais, por exemplo, na medula óssea (JUSTIZ VAILLANT; STANG, 2022).

As neoplasias linfoproliferativas podem apresentar-se em locais específicos como nos linfonodos ou apresentar infiltrados leucêmicos na medula óssea ou em outros órgãos. Diante dessas observações, clínicos e patologistas dividiram as doenças linfoproliferativas em linfomas, gamopatias monoclonais e leucemias (MOTICKA, 2016). Os linfomas são neoplasias malignas primárias de tecido linfoide caracterizados pela proliferação atípica e clonais de populações de linfócitos que apresentam similaridades morfológicas, imunológicas e funcionais com as células normais correspondentes (BOGLIOLO, L., 2011). Normalmente esses clones linfocitários acumulam-se nos linfonodos e podem aparecer em sangue periférico (fase leucêmica) ou, ainda, infiltrar outros órgãos externos ao tecido linfoide. As gamopatias monoclonais são neoplasias de linfócitos B secretores de imunoglobulinas apresentando excesso dessas em seu plasma, geralmente, sendo homogênea produção em relação ao seu isotipo, sugerindo ser derivada de um único clone de linfócitos transformados (MOTICKA, 2016). Como as células

responsáveis pela secreção dos isotipos de imunoglobulinas se diferenciam em plasmócitos esse tipo de câncer também é caracterizado pela sua presença. As leucemias de aspecto linfoproliferativo são neoplasias malignas de linfócitos B, T ou NK originadas da medula óssea que apresentam transformados malignos de linfócitos que circulam no sangue periférico e vasos linfáticos e residem em muitos outros órgãos (BOGLIOLO, L., 2011).

As leucemias linfoproliferativas podem ser divididas de acordo com o quadro clínico apresentado entre: agudas ou crônicas (ZAGO, MA., 2013). As linfoproliferativas agudas, também chamadas de leucemias linfoides agudas (LLA) apresentam grande quantidade de células imaturas ou blastos linfoides em sangue periférico e as linfoproliferativas crônicas exibindo evolução clínica mais lenta, com menor comprometimento ao estado geral do paciente, com aspecto mais tumoral, evidenciado pela hepatoesplenomegalia ou adenomegalia (VERRASTRO, 2006). As linfoproliferativas agudas são caracterizadas pela proliferação descontrolada de linfócitos anormais e imaturos, isto é, uma malignidade de blastos linfoides ou linfoblastos B ou T que mantém sua capacidade de multiplicação, mas não completam o processo maturativo até as formas mais maduras e normais do sangue periférico ou da medula óssea, levando a uma substituição de elementos da medula óssea e outros órgãos linfoides, resultando no padrão característico da doença (PUCKETT; CHAN, 2022). Em outras palavras, as células leucêmicas das linhagens linfóide deixam de responder a ação controladora dos fatores estimuladores e inibidores da hematopoese normal, se tornando independentes, permanecendo “cristalizados” numa fase de maturação que varia de um caso para outro (VERRASTRO, 2006). Esse acúmulo excessivo de linfoblastos na medula acaba por levar a uma supressão medular da hematopoese normal, resultando em quadros de anemia, neutropenia e plaquetopenia, além de, provocar hepatomegalia, linfadenopatia e possível comprometimento de meninges e gônadas (ZAGO, MA., 2013).

As linfoproliferativas crônicas são um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas tendo em comum a origem a partir de células linfoides maduras (periféricas), apresentando uma linfocitose crônica persistente que além de infiltrarem órgãos linfoides, como gânglios linfáticos e baço, se fazem presentes também na medula óssea e no sangue periférico (ZAGO, MA., 2013). Esse grupo é

apresenta subtipos distintos tomando como critério diagnóstico considerando as características de morfologia celular, imunofenótipo, análise citogenética e alterações moleculares (HOFFBRAND, A. V, 2008). A classificação das leucemias linfoides crônicas, segue o critério da linhagem celular de origem podendo ter origem nas: Células B ou células T ou NK. As leucemias linfoides crônicas com origem nas células B, T e NK estão representadas na Tabela 4:

Tabela 4 - Classificação das leucemias linfoides crônicas, segundo a linhagem celular de origem.

CÉLULAS B	CÉLULAS T ou NK
Leucemia linfocítica crônica	Leucemia prolinfocítica
Leucemia prolinfocítica	Variante de células pequenas
Tricoleucemia (clássica ou variante)	Doença linfoproliferativa de linfócitos granulares
Linfoma da zona marginal esplênico	Síndrome de Sézary
Linfoma da zona marginal nodal	
Linfomas foliculares	Leucemia-linfoma de células T do adulto
Linfoma linfoplasmocítico	Linfomas T- periféricos
Linfoma de células do manto	Outros
Outros	

Fonte: ZAGO (2013)

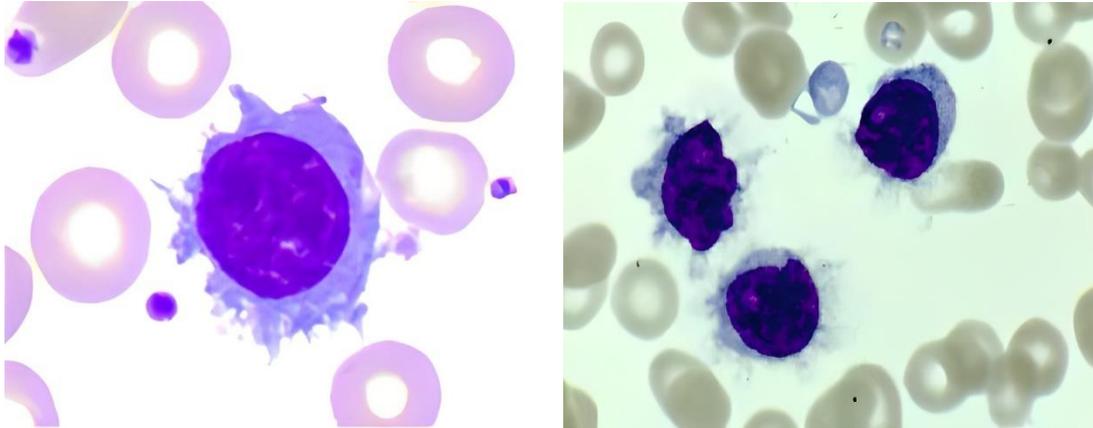
2.2.2 LEUCEMIA DE CÉLULAS PILOSAS OU HAIRY CELL LEUCEMIA.

A leucemia de células pilosas (HCL) é uma malignidade linfoproliferativa crônica rara indolente de células B, caracterizada insuficiência progressiva da medula óssea devido à infiltração maligna de linfócitos B com “projeções superficiais semelhantes à pelos” provocando complicações infecciosas frequentes (BOHN et al., 2021). Com reconhecimento pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2016, apresenta-se quatro a cinco vezes mais frequente em homens do que em mulheres, com idade mediana ao diagnóstico de 52 anos, sendo responsáveis por 2% de todas as leucemias, ocorrendo nos EUA, aproximadamente, 1.000 mil novos casos

relatados a cada ano (TROUSSARD; CORNET, 2017) e uma taxa de incidência global padronizada por idade de 0,5 por 100.000 mil homens e 0,1 por 100.000 mil mulheres (PAILLASSA; TROUSSARD, 2020). O histórico da doença permeia os estudos de malignidades hematopoiéticas que apresentavam características de pancitopenia e esplenomegalia realizado em 1923 por Ewald que cunhou o termo “reticuloendoteliose leucêmica” para descrever um distúrbio hematológico caracterizado por esplenomegalia, pancitopenia e células monocíticas circulantes, sendo, posteriormente, reconhecida como uma leucemia monocítica aguda (ANDRITSOS; GREVER, 2015).

Segundo Fagundes, Xavier e Sales (2013) a doença foi descrita com uma entidade clínica-patológica individualizada em 1958 por Bouroncle, na qual a célula pilosa típica foi descrita pela primeira vez, sendo o início para estudos detalhados da evolução clínica e achados hematológicos, assim como, elucidação dos sinais e sintomas de apresentação mais comum relacionados a citopenias. Nesses estudos da época as células malignas foram isoladas e observou-se que essas células exibiam pseudópodes salientes do citoplasma, o que resultou em uma borda serrilhada, sendo agora reconhecidas como “células pilosas” (Fig. 9), caracterizando a célula maligna subjacente à doença que mais tarde seria denominada de leucemia de células pilosas (ANDRITSOS; GREVER, 2015). Atualmente, de acordo com a classificação de neoplasias hematológicas da Organização Mundial de Saúde (OMS) a leucemia de célula pilosas é classificada como um linfoma não-Hodgkin indolente que geralmente apresenta tríade diagnóstica bem definida de pancitopenia, esplenomegalia e células circulantes com projeções vilosas citoplasmáticas características (FANTA; SAVEN, 2008).

Figura 9 - Linfócitos tricoleucêmicos.



Fonte: Autor (2022)

Embora a causa da doença não seja totalmente elucidada, acredita-se que a origem da célula maligna seja nos linfócitos B de memória que apresentam mutações somáticas, indicando parada de maturação e expansão clonal em estágios de maturação pós-centro germinativo (célula B de memória) que se infiltram no sistema reticuloendotelial do paciente e interfere na função normal da medula óssea, resultando em pancitopenia (ZAGO, MA., 2013). Estudos mostram que certas mutações importantes podem ocorrer em estágios de diferenciação anteriores, incluindo as células-tronco hematopoiéticas (HSC) ou progenitores linfoides de células B (BOHN et al., 2021). A etiologia da doença passa pelo proto-oncogene B-raf (gene BRAF) com a mutação BRAF-V600E, acontecendo no gene BRAF composto por 18 éxons, com a mutação ocorrendo no éxon 15 na posição 1799, na qual a timina e a adenina são trocadas, fazendo a substituição do aminoácido valina (V) pelo glutamato (E) no códon 600 (V600E) da proteína BRAF, resultando na ativação constitutiva da via de sinalização RAF-MEK-ERK oncogênica, obtendo, como consequência, resistência apoptose e degeneração maligna das células B (PAILLASSA; TROUSSARD, 2020), sendo uma mutação ausente em outras neoplasias malignas de células linfáticas, exceto, em alguns casos de leucemia linfocítica crônica (LLC) e mieloma múltiplo, mas se fazendo presente nos clones de células ciliadas de um paciente com HCL (DIETRICH; ANDRULIS; ZENZ, 2015).

A mutação BRAF-V600E é considerada um marcador molecular importante da doença, um evento definidor de HCL, representando uma nova possibilidade de diagnóstico e de opção para o direcionamento terapêutico de BRAF, utilizando

inibidores de BRAF (vemurafenibe e dabrafenibe) como opção terapêutica, apesar da ausência da mutação BRAF-V600E ser relatada em até 10% a 20% dos pacientes com HCL, podendo constituir um subgrupo de pacientes com HCL com prognóstico ruim (TROUSSARD; CORNET, 2017). Muito embora a mutação BRAF-V600E seja um marcador molecular essencial para HCL, outras alterações são fundamentais no desenvolvimento da doença. Dentre elas é de importância citar a supressão da ciclina D1, inativação recorrente do inibidor do ciclo celular CDKN1B/p27, desativação da KLF2 (fator de transcrição que controla a diferenciação das populações de células B), mutação ativadoras do gene da proteína quinase 1 (MAP2K1), entre outras. Além disso, em um novo subgrupo de HCL com prognóstico ruim tem-se observado em 90% dos pacientes com a mutação no gene da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina (IGHV), possuindo rearranjo IGHV 4-34, representando um subgrupo de pacientes com maior carga de doença no diagnóstico (TROUSSARD; CORNET, 2017). Além de fatores moleculares, a HCL está associada com distúrbios imunológicos sistêmicos, incluindo esclerodermia, polimiosite, poliarterite nodosa, eritema maculoapapular e pioderma gangrenoso, além de anormalidades incomuns como anticorpos adquiridos antifator VIII, paraproteinemia e mastocitose sistêmica (ZAGO, MA., 2013).

A HCL apresenta como sua principal propriedade o acúmulo de linfócitos B monoclonais com projeções citoplasmáticas características em sua superfície, encontradas, principalmente, em sangue periférico, medula óssea e baço (GARZALEDEZMA et al., 2016). As células pilosas típicas são células grandes, com 1,5 a 2 vezes o tamanho de um linfócito maduro, com núcleo redondo e citoplasma abundante que se dispõe em franja em pontos limitados ou em todo contorno celular, assumindo forma de “pelos finos” caracterizando a morfologia das células e dando o nome da doença (DIETRICH; ANDRULIS; ZENZ, 2015). Esses clones leucêmicos apresentam superexpressão de vários componentes do citoesqueleto, como actinas, fosfoproteínas intracelulares, bem como membros da família Rho envolvidas na reorganização ativa do citoesqueleto, além de, apresentar certa morfologia e atividade fagocitária (BOHN et al., 2021).

Imunofenotipicamente, as células leucêmicas demonstram padrões de células B monoclonais presas em um estágio tardio de diferenciação, apresentando forte expressão de imunoglobulinas de superfície restrita a cadeia leve, juntamente com

marcadores de células B (CD20 e CD22) e com um imunofenótipo típico (ou seja, CD103+, CD25+, CD11c+, CD123+ (BOHN et al., 2021)). O excesso de células leucemias acaba por infiltrar-se na medula óssea resultando no quadro pancitopênico característico. Além disso, as células pilosas expressam grande produção de fibronectina no microambiente da medula óssea, através do controle autocrino dado pela produção de bFGF (basic Fibroblast Groth Factor) promovendo a fibrose reticulínica característica da doença (ZAGO, MA., 2013), implicando na dificuldade de se obter amostras de aspirado da medula óssea que frequentemente é seco (“dry tap”) (DA CUNHA JÚNIOR et al., 2005). As suas características clínicas resultam da infiltração da medula óssea pelos clones leucêmicos, observando-se, clinicamente, sintomas relacionados à anemia, manifestações hemorrágicas e às infecções bacterianas (GALINDO et al., 2016).

Em pacientes com HCL é comum observar fraqueza, secundariamente à anemia, com, aproximadamente, um terço dos pacientes exibindo sangramentos provocado pela trombocitopenia evidente e, ainda, apresentando febre baixa e infecções (bacterianas, fúngicas) secundárias a neutropenia. Decorrente da esplenomegalia apresentada, os pacientes podem manifestar desconfortos abdominais, em outros casos podem exibir perda de peso, febre e sudorese noturna semelhante a outras doenças linfoproliferativas, além de apresentar, na maioria dos casos, uma volumosa esplenomegalia decorrente da infiltração difusa da polpa vermelha por células mononucleares e hipertrofia de macrófagos esplênicos, uma hepatomegalia com alterações discretas de função hepática, encontrada em 20% dos casos e uma linfadenomegalia, encontrada apenas em 10% dos casos com linfonodos periféricos não maiores que 2cm de diâmetro (ZAGO, MA., 2013).

2.2.3 DIAGNÓSTICO DA LEUCEMIA DE CÉLULAS PILOSAS

O paciente acometido com HCL apresenta frequentemente fadiga (80%) e esplenomegalia (80-90%) com 15-40% dos pacientes apresentando febre, infecções sudorese noturna, perda de peso, dor abdominal superior esquerda por esplenomegalia, hepatomegalia e sangramento e hematomas de trombocitopenia, tendo em 15-30% dos casos apresentando distúrbios autoimunes (KREITMAN; ARONS, 2022). O diagnóstico preciso de HCL é essencial e depende da morfologia

característica das células em sangue periférico, padrão imunofenotípico, exame da morfologia da medula óssea, incluindo deposição de reticulina e coloração citoquímica (FANTA; SAVEN, 2008). Na investigação inicial para pacientes com suspeita de leucemia de células pilosas as recomendações para diagnóstico e avaliação inicial são de fazer o hemograma completo com revisão de esfregaço de sangue periférico, análise imunofenotípica por citometria de fluxo, aspiração e biópsia de medula óssea, além da história completa e exame físico e possíveis estudos de imagem opcionais (GREVER et al., 2017). Na prática diária o hemograma completo com uma revisão cuidadosa dos esfregaços de sangue periférico com contagem diferencial de glóbulos brancos com identificação das células leucêmicas são os primeiros passos para identificação de células pilosas tendo uma monocitopenia como manifestação relativamente sensível e específica de HCL (KREITMAN; ARONS, 2022).

As células da leucemia de células pilosas apresentam tamanho médio maior do que um linfócito maduro com citoplasma azul pálido moderadamente abundante, núcleos de aspecto reniforme, cromatina aberta, excêntrico ou centralmente situados, nucléolos ausentes e uma borda citoplasmática serrilhada (GREVER et al., 2017). Ultraestruturalmente, as células pilosas apresentam projeções citoplasmáticas semelhantes a cabelo, daí seu nome e uma organela distinta chamada de complexo ribossomo-lamela, além de, apresentar expressão citoquímica brilhante isoenzima 5 da fosfatase ácida que confere resistência ao tratamento com o ácido tartárico, isto é, expressam fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) que é quase exclusiva de HCL, sendo útil a avaliação citoquímica apresentada para diagnóstico (SUMMERS; JAFFE, 2011). Dentre os exames laboratoriais realizados no paciente a contagem de células em sangue periférico mostra pancitopenia evidente com diminuição da contagem das três linhagens sanguíneas, neutropenia e monocitopenia frequentes, porém 20% casos podem apresentar valores elevados de células brancas no sangue, além disso, uma anemia grave do tipo normocrômica e normocítica em cerca de 35% dos casos, com trombocitopenia evidente em mais de 80% dos pacientes (ZAGO, MA., 2013).

Além disso, uma biópsia de medula óssea e um aspirado são importantes para entender a extensão da infiltração da medula. O padrão mais comum observado no aspirado de medula óssea é em geral um padrão “seco” (dry

tap) ou hipocelular com predomínio de células leucêmicas (ZAGO, MA., 2013), nem sempre sendo exitoso devido a fibrose extensa que impede a capacidade de obter-se um aspirado celular significativo. Nestes casos, a biópsia da medula óssea é essencial para o diagnóstico. A biópsia de medula óssea (BMO) apresenta-se hipercelular e com infiltrado intersticial difuso e confocal de células mononucleares leucêmicas apresentando citoplasma abundante conferindo uma aparência bem espaçada às células linfoides, em comparação com outras neoplasias linfoides e bordas citoplasmáticas bem preservadas resultando em uma aparência de “ovo frito”, com produção e excreção de fibronectina que resulta na deposição pericelular de fibronectina, observada essencialmente todos os casos de HCL que também pode contribuir para a aparência amplamente espaçada das células linfoides (SUMMERS; JAFFE, 2011), embora a BMO possa apresentar-se hipocelular com infiltrados intersticiais (REGO; SANTOS, 2009).

A extensão do envolvimento de células leucêmicas na medula óssea é frequentemente avaliada nas colorações imuno-histoquímicas de biópsia de medula óssea que incluem CD20 (também presente em células B normais), antígenos específicos de HCL como o DBA44 (CD72), anexina-1 (Anxa1) e a mutação BRAF V600E usando VE1 Mab (KREITMAN; ARONS, 2022) que possibilitam obter uma avaliação do grau de infiltração da medula óssea por células leucêmicas, além de ajudar a estabelecer diagnóstico.

É recomendado que todos os pacientes com HCL sejam avaliados para mutação BRAF V600E usando ensaio molecular sensível que pode detectar poucas células leucêmicas presentes em sangue periférico ou em aspirados de medula óssea diluídos em sangue, utilizando técnicas altamente sensíveis como reação em cadeia da polimerase alelo-específica ou sequenciamento de próxima geração como preferência (GREVER et al., 2017). O método mais sensível e específico para diagnóstico da HCL é a imunofenotipagem por citometria de fluxo de aspirado de sangue ou de medula óssea que deve mostrar positividade brilhante para CD11c, CD22 e CD20 (KREITMAN; ARONS, 2022).

É um forte instrumento no diagnóstico do HCL, identificando as células pilosas em 92% dos casos, com padrão fenotípico de células B maduras com expressão de antígenos de células pan-B, como por exemplo, forte expressão de imunoglobulina de superfície, forte coexpressão de CD20, CD22 e CD11c e expressão de CD103,

CD25, CD123, T-bet, anexina A1, DBA44 (CD72), FMC7 e ciclina D1 (geralmente fraca) (ZAGO, MA., 2013), ou seja, a caracterização imunofenotípica das células leucêmicas do sangue periférico apresenta restrição de cadeia leve de populações de células B com imunofenótipo característico de célula que coexpressam CD19+, CD20+, CD11c +, CD25+, CCD103+, CD123+, confirmando o diagnóstico de HCL (GREVER et al., 2017). As células leucêmicas da HCL não expressam CD5, CD10 ou CD23, fazendo diagnóstico diferencial com outras doenças linfoproliferativas de células B, como por exemplo, as na leucemia linfocítica crônica (LLC) que apresenta padrão imunofenotípico CD5+, CD11c -, CD22 +/-, CD 103 -, CD25 variável, FMC7 +/-, entre outros (ZAGO, MA., 2013).

Na determinação diagnóstica diferencial histopatológica e clínica da HCL inclui-se a variante de leucemia de células pilosas (HCL-v). Uma entidade clínico-patológica com características intermediárias entre a HCL clássica e a leucemia prolinfocítica B, correspondendo a 0,4% das neoplasias linfoides crônicas e 10% de todos os casos de HCL (ZAGO, MA., 2013). A HCL-v, segundo a Organização Mundial de Saúde (2008), foi classificada como entidade provisória por apresentar características clínicas e patológicas que diferem da leucemia de células pilosas na sua forma clássica por apresentar variações morfológicas e imunofenotípicas e resistência ao tratamento convencional com resposta reduzida ou até ineficaz em alguns casos a análogos de nucleosídeos (RUDOLF-OLIVEIRA et al., 2015). A variante de leucemia de células pilosas (HCL-v) em contraste da HCL-c é mais agressiva, com elevada contagem de glóbulos brancos, apresentando sobrevida mais curta e má respostas ao tratamento com análogos de purinas requerendo combinações dos análogos de purinas e rituximab (KREITMAN; ARONS, 2022).

As manifestações iniciais desse tipo de variante tricoleucêmica são de desconforto ou distensão abdominal, geralmente conectados aos processos de organomegalia (esplenomegalia, hepatomegalia) e manifestações derivadas de citopenias como anemiam, sangramento e/ou infecções, por isso, o diagnóstico da variante da leucemia de células pilosas é comum observar anemia e/ou trombocitopenias e leucocitose, enquanto pancitopenia, granulocitopenia e monocitopenia são mais comuns na leucemia de células pilosas clássica (RUDOLF-OLIVEIRA et al., 2015). Imunofenotipicamente, as células da HCL-v expressam antígenos de células B como CD19, CD20 e CD22, porém perdem alguns

marcadores característicos da HCL-c, como o CD25, assim como, o CD103 que pode estar ausente e o CD123 que é negativo na forma variante (KREITMAN; ARONS, 2022). Além disso, as células HCL-v não apresentam reatividade à anexina A1 e são fracamente positivas ou negativas para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), além de serem negativas para a mutação BRAFV600E (KREITMAN, 2019). O diagnóstico diferencial é feito incluindo linfoma de zona marginal esplênica, linfoma difuso de polpa vermelha esplênica (SRPL), HCL-c, linfoma de células do manto e leucemia prolinfocítica de células B (B-PLL) (SUMMERS; JAFFE, 2011).

2.3 DIMENSÃO FRACTAL

Os objetos que observamos no nosso dia a dia apresentam diversas formas geométricas isoladas ou combinadas, mas nem sempre se apresentam em formatos ideais e regulares. Para as formas regulares a geometria desenvolveu uma série de classificações para conseguirmos estudar os seus diferentes formatos, porém, apesar dos esforços, o mundo não apresenta a regularidade que a geometria clássica alcança, sendo considerada como um desvio padrão do método geométrico clássico. Para resolver os padrões matemáticos da natureza e seus fenômenos no mundo, por muito tempo se utilizou a Geometria Euclidiana, criada por Euclides de Alexandria por volta do ano 300 a.c., utilizando para descrever as formas de objetos um número de coordenadas necessárias como, por exemplo, uma coordenada (comprimento) descreve uma linha, duas coordenadas (comprimento e largura) representam um plano e três coordenadas (comprimento, largura e altura) descrevem um volume de definido objeto, além de determinar dimensão zero para um ponto que não tem partes, isto é, não tem grandeza alguma (ASSIS et al., 2008).

Embora a geometria euclidiana apresente respostas para fenômenos regulares na qual os objetos são relacionados ao espaço que estão inseridos, acaba por provocar resultados incompletos ou até inadequados em certas situações, especificamente, nas formas encontradas na natureza. Utilizando a geometria euclidiana nota-se espaços definidos por uma dimensão topológica (D_t) e outra dimensão (D) que são coincidentes ($D=D_t$), representada sempre por um número inteiro, variando entre 0 e ∞ , enquanto objetos com certa complexidade e contornos

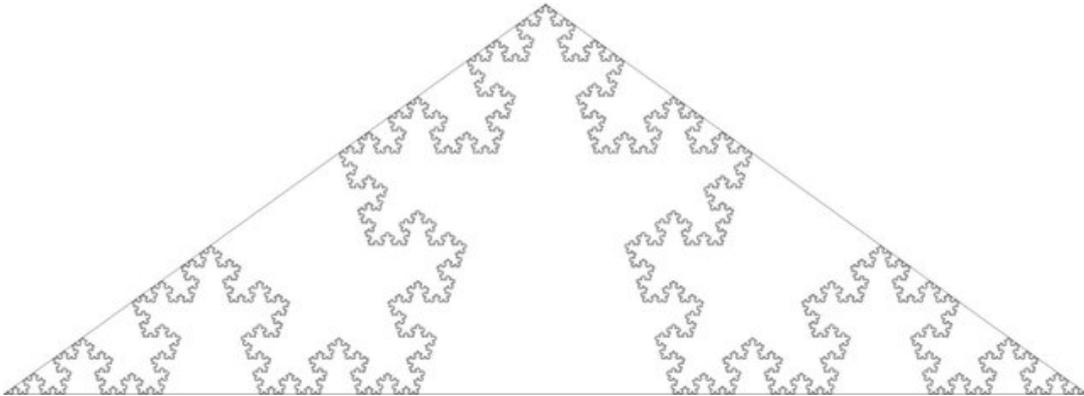
irregulares como os fractais são caracterizados por uma dimensão fractal, isto é, uma dimensão fracionada (D) que só pode ser representada na forma de fração, delineando o espaço em função de outra dimensão D_t na qual seguem a regra de $D > D_t$, podendo ser traduzida com números inteiros e também números fracionados (DA COSTA RODRIGUES, 2016). Os padrões observados na natureza exibem irregularidades e complexidades diferentes que não podem ser descritas ou determinadas pela geometria euclidiana, devido a isso, se fez necessário a criação de uma “geometria alternativa” para fornecer métodos na análise de objetos com complexidade importante e descrever fenômenos ditos como “monstros matemáticos”, com é o caso, por exemplo, das curvas que para a geometria euclidiana possuem dimensão um preenchem o espaço de um quadrado que possui dimensão dois (NUNES, 2006).

O matemático polonês naturalizado americano Benoit Mandelbrot, criador do método que melhor representa as formas da natureza sintetizou essa irregularidade natural no seu livro *Geometry of the nature* de 1975, ponto de partida para a Geometria Fractal. Para o professor “As nuvens não são esferas, montanhas não são cones, as costas não são círculos e casca não é suave, nem relâmpago viaja em linha reta.” (MANDELBROT, 1977), logo essas formas não podem ser perfeitamente descritas pela geometria euclidiana por apresentar maior complexidade e irregularidades de forma. Por essa razão, essa nova maneira de olhar para o ambiente e suas formas têm sido muitas das vezes chamada da “geometria da natureza” (HEYMANS et al., 2000). Benoit Mandelbrot descobriu novas estruturas geométricas que são adequadas para descrever conjuntos irregulares de pontos, curvas e superfícies do mundo natural, determinando a elas o nome de “fractais”, propondo uma ramificação do estudo matemático das formas com a combinação de informações geométricas, probabilísticas e estatísticas.

Portanto, a geometria fractal é o estudo das propriedades e comportamentos dos fractais, oferecendo um método para analisar e descrever objetos e formas naturais, contrapondo-se com as limitações da geometria clássica, possuindo aspecto interdisciplinar na sua aplicação com outras ciências, como por exemplo, a biologia (lei do crescimento), classificação de lâminas histopatológicas, neurociência, entre outras (DE PAULA; DE SOUZA, 2017). O nome fractal proposto por Benoit Mandelbrot, em 1975, considerado o pai da Geometria fractal, é baseado no latim,

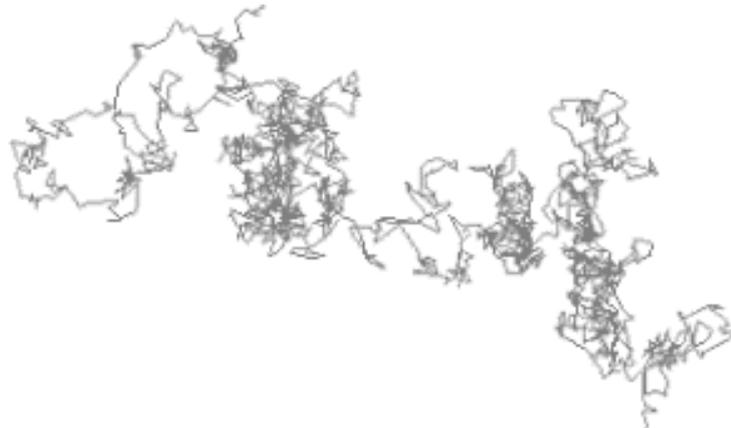
do adjetivo “*fractus*” cujo verbo “*frangere*” significa quebrar, criar fragmentos (ASSIS et al., 2008). Grandes exemplos desse comportamento geométrico estão na aproximação da geometria fractal de uma linha costeira representadas em mapa em uma dada escala (Fig. 10), assim como, o movimento browniano típico de partículas suspensas num fluido aparentemente imóveis apresentam movimentos com interrupções momentâneas num padrão aparentemente caótico quando se aumenta a escala de observação (Fig. 11) (DA COSTA RODRIGUES, 2016).

Figura 10 - Modelo simplificado da linha de costa (curva de Koch).



Fonte: BAIRD (2014)

Figura 11 - Movimento browniano de partículas.



Fonte: Autor (2022)

Um objeto pode ser considerado como um fractal se possuir três características: Autossemelhança, complexidade infinita e a dimensão fractal (DE PAULA; DE SOUZA, 2017). A propriedade da autossemelhança é identificada em fractais quando ampliamos ou diminuimos sua escala de observação e devido a

esse processo as partes ampliadas ou reduzidas se assemelham com a figura no seu estado normal, isto é, um fractal é um padrão geométrico em que cada pequena parte da estrutura se assemelha com o todo. Na natureza encontramos um tipo de autossimilaridade aproximada, já que não conseguimos observar muitas escalas de ampliação nos objetos naturais, enquanto em padrões matemáticos não encontrados na natureza encontra-se uma autossimilaridade exata (DA SILVA DAGA, 2017).

Os fractais que apresentam autossimilaridade exata de mesma intensidade em todas as direções são denominados de fractais determinísticos, enquanto os fractais que não apresentam variância de forma uniforme em todas as direções do espaço ao modificar a escala de observação são chamados de auto-afins, tendo como exemplo nas ciências naturais, as células tumorais pertencentes a graus de evolução do câncer, isto é, na transição de um tumor benigno para maligno (ASSIS et al., 2008). Os verdadeiros fractais matemáticos ou fractais reais que não aparecem na natureza, exibem um grau mais alto de preenchimento de espaço porque exibem autossimilaridade exata ou estatística em padrões estruturais quando examinados em escalas infinitamente pequenas (BOSE et al., 2015). Outra característica dos fractais se refere a complexidade infinita explicada pelo fato de que cada vez que o objeto fractal for dividido em pedaços menores ou aumentar a imagem, vão se formar novas partes idênticas ao fractal original, isto quer dizer que o processo de geração de uma figura como sendo um fractal é recursivo (ASSIS et al., 2008). Por fim, tem-se a dimensão fractal que representa o grau de ocupação da estrutura fractal no espaço que a contém, descrevendo uma forma, padrão ou processo que é auto-semelhante em uma variedade de escalas de espaço e tempo, podendo ser calculada dividindo o objeto em peças igualmente auto-semelhantes observando a mudança na escala de uma peça em relação a toda a estrutura através da fórmula:

$$FD = \frac{\log(Nr)}{\log(r)}$$

Onde N_r = número de peças divididas (auto-similares) em uma dada escala e r = fator de escala (ZIUKEKELIS et al., 2022).

Essa dimensão fractal pode ser definida pelo método de contagem de caixas,

no qual, a partir do uso de quadrantes que cobrem a imagem do objeto são contabilizados o número de caixas que cobrem pelo menos um pixel da imagem ($N(r)$), conforme descrito em Xavier et al. (2018). Esse procedimento será repetido várias vezes com caixas de tamanho diferente, resultando em um gráfico duplo log de $N(r)$ em função de R lados das caixas). Através do declive da reta no gráfico de duplo log é que se obtém a dimensão fractal da estrutura que se correlaciona ao grau de ocupação do espaço com as diferenças escalas dimensionais que se é analisado, permitindo observar os níveis de regularidade e inferir densidade daquele objeto ou imagem entre diferentes escalas espaciais (DA COSTA RODRIGUES, 2016).

2.3.1 MÉTODO DE DELIMITAÇÃO DE BOX-COUTING.

Para as ciências médicas as ferramentas da geometria euclidiana representavam um obstáculo no estudo de certos padrões naturais já que eles obedecem, em sua grande maioria, a sistemas de alta complexidade em suas estruturas, formando arranjos ou elementos irregulares, interligados, sobrepostos, em que o caos geométrico prepondera (JAMACARU, 2010). Os fractais foram colocados na discussão matemática das formas naturais no início dos anos 70 por Benoit Mandelbrot, para classificar certos objetos aos quais não é possível atribuir dimensão euclidiana (inteira), havendo a necessidade de introdução de dimensão fracionada, isto é, objetos que não apresentam bidimensionalidade nem tridimensionalidade plena, gerados da iteração infinita de um processo matemático perfeitamente especificado, apresentando uma dimensão intermediária entre várias formas, finais ou transitórias (SANT'ANA, 2015).

Esses fractais são o ponto de partida para um novo ramo na matemática, muita das vezes chamado de "matemática da natureza" por explicar as formas naturais que apresentam contornos que não podem ser explicadas nos moldes da matemática convencional. Uma das características dos objetos fractais é a sua dimensão fractal (D_f) que quantifica o grau de irregularidade ou de fragmentação de um conjunto geométrico, de uma figura ou de um objeto natural em todas as escalas podendo assumir valores fracionados que dependem da natureza do conjunto ou objetivo, tomando como relação $1 < D < 2$ para uma curva, $2 < D < 3$ para superfície e

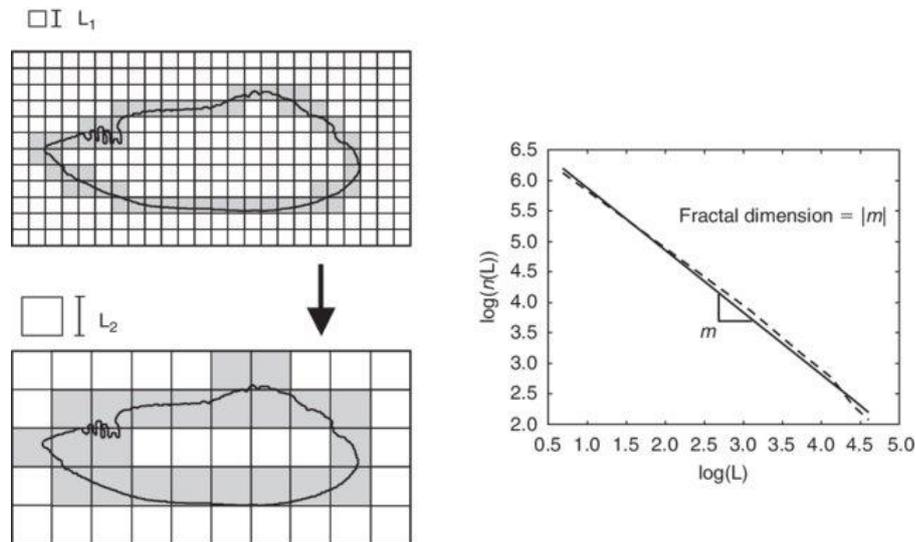
$3 < D < 4$ para um volume, dependendo da irregularidade da curva, da superfície e do volume (ANTONIAZZI, 2007).

Várias formulações permitem a sua determinação, tanto para objetos fractais quanto para figuras da geometria euclidiana e dentre elas tem-se o *Box Counting* como uma das metodologias mais utilizadas, devido a sua facilidade de aplicação. O método de *Box Counting* é utilizado, principalmente, para caracterizar fractais naturais que não são bem determinados pela geometria clássica podendo servir como ferramenta para obter valores sobre detecção de tumores, cistos, neoplasias, segmentação de imagens, detecção de bordas análise de dados, entre outras coisas (ANTONIAZZI, 2007). O método de *Box Counting*, em linhas gerais, consiste em cobrir a imagem com uma grade de quadrados (caixas) conforme ilustrado na Fig. 12 e contar quantos quadrados contêm a forma analisada, isto é, quantas caixas sobrepõe o objeto ou imagem de interesse, depois disso, aumenta-se ou diminui-se progressivamente o tamanho dos quadrados e repete-se a contagem, assim, obtém-se uma série de dados como número de quadrados e suas dimensões podendo ser relacionada através da fórmula da dimensão fractal (DF) expressa por:

$$DF = \lim_{r \rightarrow 0} \left(\frac{\log Nr}{\log \left(\frac{1}{r} \right)} \right)$$

Onde (N) é o número de caixas necessárias para cobrir a imagem em cada redução progressiva do lado caixa (r), obtendo a dimensão fractal do objeto ou figura com a inclinação da linha de regressão gerada pelo gráfico logaritmo de quantidade de caixas em função do logaritmo do tamanho das caixas (XAVIER et al., 2018). A cada etapa a malha é acurada, diminuindo o tamanho das caixas e aumentando a quantidade de caixas que cobrem a figura ou objeto, obtendo o valor da dimensão fractal estabelecendo uma relação entre o número de caixas necessárias para cobrir a imagem à medida que a malha é otimizada (Fig.12). A dimensão fractal (D) é calculada pela inclinação da reta (slope) obtida pela regressão linear a partir do gráfico de dispersão de log N em função de log 1/L, tendo o coeficiente angular da reta dado pela tangente do ângulo formado entre a reta e o eixo X. (JAMACARU, 2010).

Figura 12 - Sobreposição da malha quadrada à imagem sob ilustração do método *box-counting* para estimar a dimensão fractal.



Fonte: PIERA (2005)

2.3.2 DIAGNÓSTICO COMPLEMENTAR ATRAVÉS DA DIMENSÃO FRACTAL.

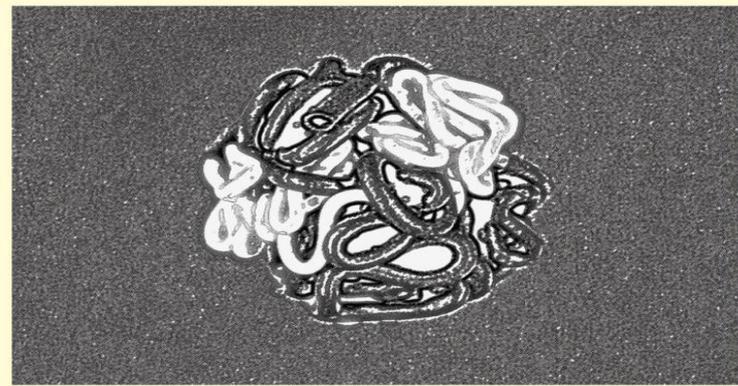
O sistema em iteração orientada por um atrator que produz fragmentos que apresentam autossimilaridade entre si denominado de fractais ocorre normalmente na natureza, alguns são curvas sobre superfícies, outros coleções de partículas na ocupação de espaço (tridimensionais), outros assumem formas tão complexas que não podem ser simplesmente determinadas por formulações matemáticas clássicas, requerendo a aplicação de uma geometria fracionada. A análise da complexidade dos objetos naturais, incluindo um conjunto de sistemas biológicos que exibem padrões autossimilares com propriedades de escala levou a formação de estudos dos fractais da vida, o novo campo da fractômica, auxiliando novos estudos no campo da genômica, proteômica e metabolômica (DI IEVA et al., 2015).

As entidades fractais encontradas na natureza assumem, principalmente, quatro propriedades fundamentais: irregularidade de forma, autossimilaridade de suas estruturas, dimensão não inteira ou fracionária e dimensionamento, isto é, suas propriedades medidas dependem da escala em que são medidas (DI IEVA et al., 2014). Desde que a geometria fractal passou a ser reconhecida como uma ferramenta de utilização na mensuração de padrões naturais, a área médica tem-se utilizado de suas ferramentas na caracterização, diagnóstico, prognóstico e

avaliação do sucesso terapêutico frente algumas patologias, além de contribuir com as ciências morfológicas, na análise quantitativa de dados histológicos e na determinação estrutural celular, servindo como base para estimar perfis celulares, padrões de ramificação do processo celular e na descrição de propriedades de interfaces de tecidos (DI IEVA et al., 2014)

Nas ciências médicas, a geometria fractal como medida matemática da irregularidade e complexidade de uma forma tem sido aplicada como base de ferramentas nas mais diversas áreas do conhecimento médico, por exemplo, na caracterização da carcinogênese e progressão tumoral, com um aumento da dimensão fractal (DF) em lesões intraepiteliais do colo do útero e do ânus, carcinomas de células escamosas orais ou adenocarcinomas do pâncreas, além de atuar como fator prognóstico em carcinomas de células escamosas da cavidade oral e laringe, melanomas e mielomas múltiplos, tendo o aumento do DF da cromatina celular um mal prognóstico para essas neoplasias (METZE, 2013). Esse importante uso da DF tem sido muito utilizado desde 1989 quando Takahashi sugeriu usar a DF como estimativa para a condensação da cromatina, lançando para o mundo o uso da teoria fractal da cromatina celular aplicada no estudo morfológico do núcleo de células malignas (METZE, 2013). A arquitetura do DNA apresenta-se como um sistema auto-organizado, principalmente, na região de heterocromatina, apresentando sequências genômicas fractais espalhadas densamente pelos cromossomos com certa probabilidade de contato intracromossômico que influencia nas funções da rede regulatória gênica, na dinâmica entre os genes e seus fatores de transcrição, dando origem ao conceito de “glóbulo fractal” (Fig. 13), isto é, uma conformação de polímeros sem nós, densamente compacta com diâmetro de cerca de 1 μm e um DF próximo a 3 que permite o empacotamento maximamente denso, sendo formado por nucleotídeos com vantagem de um desdobramento fácil e rápido sem auto-cruzamentos ou emaranhados (METZE; ADAM; FLORINDO, 2019).

Figura 13 - Representação esquemática do modelo de “glóbulo fractal” da cromatina celular.



Fonte: METZE (2013)

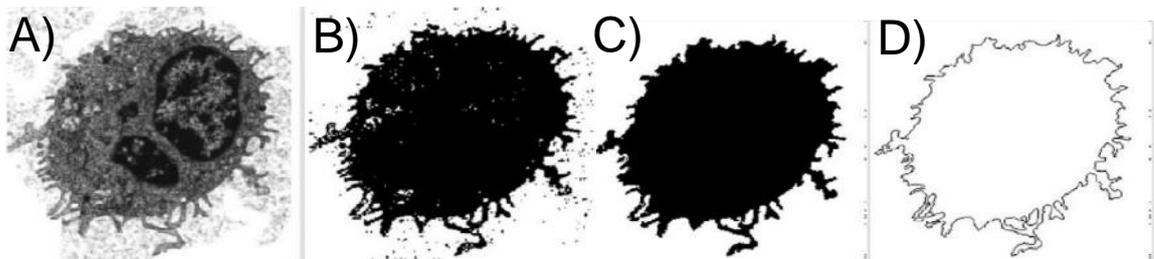
Sabendo da característica fractal da cromatina nuclear várias investigações tomaram forma utilizando-se de preparações histológicas ou citológicas de rotina, demonstrando que as células provenientes de tecidos neoplásicos apresentam maior DF em comparação com tecidos normais, por exemplo, em doenças hematológicas como observado nas células de leucemia comparadas com linfócitos normais do sangue periférico (MASHIAH et al., 2008). Nessas leucemias, os mecanismos genéticos e epigenéticos leva a remodelação da cromatina que pode ser medida objetivamente pela análise computacional da textura da cromatina nuclear em preparações citológicas, no qual o remodelamento da cromatina de acordo com as características da textura nuclear das células neoplásicas está correlacionado com alterações genéticas e epigenéticas nas leucemias agudas (DE MELLO et al., 2012).

Análises por dimensão fractal de células isoladas de sangue humano com leucemia T-linfoide aguda revelou membranas perinucleares com contornos mais suaves, exibindo valores de dimensão fractal (FD: 1,10-1,11), significativamente menores do que os valores encontrados nas membranas perinucleares de células sanguíneas circulantes normais, sendo assim, observou-se que células leucêmicas linfoides T fortemente proliferativas possuem membrana plasmática caracterizada por um valor de DF baixo. Nos casos de leucemia linfoblástica aguda B as membranas periplasmáticas apresentaram acentuada grossura da superfície nuclear com valores de DF atingindo até 1,24, tendo esse aumento da DF refletido em mudanças significativas no padrão de metilação do DNA, sendo considerado um

fator de mau prognóstico para esses pacientes (A. LOSA, 2016).

Muitas células cancerígenas em neoplasias hematológicas apresentam alterações significativas, incluindo, modificações de superfície na estrutura de membrana celular (Fig. 14), permitindo identificar essas alterações por determinação morfométrica computacional, isto é, por análise de imagem digital, por exemplo, na neoplasia de células pilosas ou tricoleucemia, sendo uma neoplasia linfoproliferativa crônica que produz quantidades variáveis de células neoplásicas circulantes caracterizadas por sua membrana citoplasmática morfologicamente alteradas carregando consideráveis projeções de superfície (pseudópodes) diferindo de linfócitos saudáveis circulantes, apresentando padrões de distribuição de dimensão fractal diferentes entre linfócitos normais e linfócitos tricoleucêmicos (TIMBÓ et al., 2009).

Figura 14- A) Imagem de microscópio eletrônico de um linfócito humano, afetado por leucemia de células pilosas. B) Representação em preto/branco de (A) com um limite de nível de cinza definido. C) Imagem após a remoção de pequenos interferentes. D) Delimitação do contorno celular.



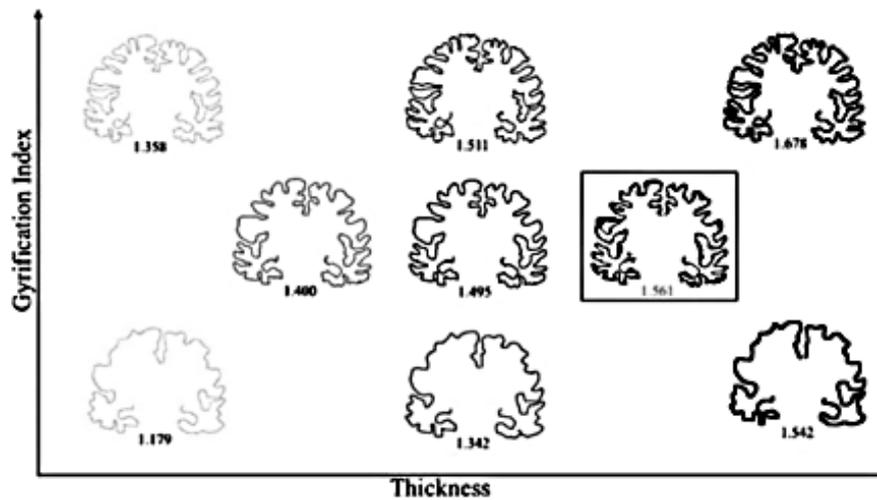
Fonte: Adaptada TIMBÓ (2009)

Ainda, a determinação fractal está presente nos estudos de doenças inflamatórias crônicas e neurodegenerativas do sistema nervoso central como, por exemplo, na esclerose múltipla, servindo de biomarcador de prognóstico para apoiar o processo de tomada de decisão e melhor emprego de conduta terapêutica para determinado paciente (ROURA et al., 2021). O cérebro apresenta importantes propriedades fractais de dimensão fractal e lacunaridade próprias, isto é, quanto maior a dimensão fractal e menor a lacunaridade, mas complexo e saudável é o

cérebro (ROURA et al., 2021), portanto, analisar a sua geometria fractal pode fornecer informações essenciais sobre anormalidades devido a danos cerebrais e associar esse dano a deficiências correspondentes. A dimensão fractal do cérebro, cortical e substância cinzenta profunda e a lacunaridade de todos o cérebro apresenta-se alteração significativa em indivíduos com esclerose múltipla em comparação a pacientes controle, além de, notar-se em uma avaliação longitudinal de alguns anos uma diminuição significativa na dimensão do fractal do cérebro e um aumento da lacunaridade, identificando pacientes em risco de aumentar sua incapacidade neuronal nos próximos anos (ROURA et al., 2021).

De forma geral as análises dos fractais tem sido proposto como um potencial marcador substituto do grau de dano cerebral em diversas alterações psiquiátricas e neurológicas devido a sua sensibilidade em detectar alterações cerebrais (Fig. 15), sendo aplicada a imagens macroscópicas (anatômicas) e microscópicas (histológicas), bem como, em imagens radiográficas de alta resolução para quantificar a complexidade do desenvolvimento do córtex cerebral humano, observar alterações que ocorrem no cérebro de paciente que apresentam epilepsia, esquizofrenia, acidente vascular cerebral, esclerose múltipla e degeneração celular (DI IEVA et al., 2014). Nesse contexto, por exemplo, podemos observar que a DF da substância branca cerebral a partir de exames de ressonância magnética do cérebro, é significativamente menor em pacientes mais velhos quando comparados a pacientes adultos jovens, além disso, ocorre maior distinção fractal entre pacientes controle normais e pacientes com doença de Alzheimer (DA), além de poder detectar em crianças com transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, anormalidades de complexidade usando a dimensão de informação fractal, entre outras coisas (DI IEVA et al., 2014).

Figura 15- Alterações na espessura cortical (eixo horizontal) e índice de girificação (eixo vertical) do cérebro afetam a dimensão fractal (indicada pelo número abaixo do corte) das fitas corticais.



Fonte: DI IEVA (2014)

A aplicação da análise fractal tem aumentado e sido útil não apenas em estudos descritivos de fenômenos patológicos ou da terapêutica em medicina, mas também vem servindo como instrumento de prognóstico em diferentes situações clínicas simuladas laboratorialmente (METZE, 2013). Apesar do crescimento exponencial da aplicação de métodos morfométricos fractais sobre as alterações histomorfológicas encontradas em neoplasias hematológicas, como na HCL, boa parte dos diagnósticos ainda é feita por exame microscópicos de esfregaços de sangue periférico corados analisando a morfologia característica dos linfócitos tricoleucêmicos por um observador experiente, além de, um padrão imunofenotípico, aspiração e biópsia de medula óssea (GREVER et al., 2017).

Apesar do exame microscópico detalhado de esfregaço de sangue periférico devidamente corado ser indispensável na avaliação de paciente com doenças hematológicas e não hematológicas, a identificação das células tricoleucêmicas e sua atipicidade usando o exame citomorfológico de esfregaço sanguíneo nem sempre é fácil. Na identificação dos mais prevalentes tipos de leucemias, por mais especializada que seja a parte humana, estudos apontam uma taxa de erro de 30 a 40% no exame padrão com base na experiência do hematologista (DINČIĆ et al., 2021), exigindo a tarefa de checar e recheckar os resultados dos exames. Embora a avaliação manual das características histológicas seja uma técnica poderosa para prever o risco de determinada doença hematológica, ela requer conhecimento

especializado por um profissional da área nesse tipo de diagnóstico e pode ser muito trabalhosa, cara e demorada (DINČIĆ et al., 2021). A integração da pesquisa de características histológicas por um biomarcador digital automatizado na inspeção celular e na caracterização de padrões celulares pode ser uma ferramenta valiosa na evolução do diagnóstico e prognóstico das doenças hematológicas. Métodos computacionais utilizando como ferramenta a dimensão fractal podem auxiliar os técnicos nas rotinas laboratoriais, agregando valor aos diagnósticos já conhecidos e realizados na rotina, agilizando o processo de identificação de células com DNA alterado, verificando maior número de células e realizando diversas análises de células de um mesmo paciente, aumentando o nível de confiança do resultado apresentado (TIMBÓ et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um método morfométrico computacional para auxiliar o especialista na identificação de tricoleucemia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capturar imagens de leucócitos normais e tricoleucêmicos.

Calcular a dimensão fractal do contorno de leucócitos normais e tricoleucêmicos.

Comparar as dimensões fractais do contorno de leucócitos normais e tricoleucêmicos.

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO

O estudo envolve a análise computacional de imagens digitalizadas do contorno das membranas de linfócitos, tanto de células maduras típicas quanto de células leucêmicas.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Laboratório de Biofísica Celular e Molecular da UFPE em parceria com o Laboratório de Hematologia do Laboratório Central do Centro de Biociências da UFPE.

4.3 SELEÇÃO DAS IMAGENS

As lâminas hematológicas foram obtidas do banco de lâminas hematológicas de aulas práticas do Laboratório de Hematologia do Laboratório Central do Centro de Biociências da UFPE, e as fotomicrografias foram adquiridas no Laboratório de Biofísica Celular e Molecular da UFPE, agrupadas da seguinte maneira:

1- Foram selecionadas 150 imagens aleatórias de células típicas de lâminas aleatórias de aulas práticas coradas com May-Grünwald-Giemsa. Para seleção dos linfócitos foi tomado a escolha por linfócitos pequenos, com citoplasma escasso, ocasionalmente com pequenos grânulos azurófilos, núcleo uniforme e cromatina condensada

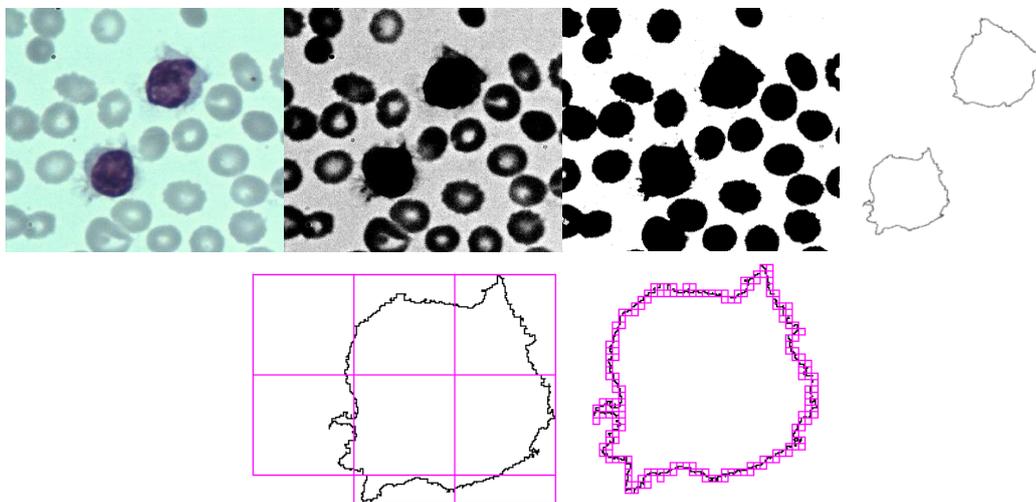
2- Foram selecionadas 150 imagens aleatórias de células atípicas (tricoleucêmicas) de lâminas aleatórias de aulas práticas coradas com May-Grünwald-Giemsa.

As micrografias dos linfócitos normais e tricoleucêmicos foram capturadas por um sistema Kontron Zeiss KS-300 (formato bmp; resolução espacial de 0,1 $\mu\text{m}/\text{pixel}$; abertura numérica de 1,25 com aumento de 20X correspondente a uma resolução de 0,468 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ e salvas para análise fractal.

4.4 PROCESSAMENTO DE IMAGENS

Os linfócitos tricoleucêmicos e linfócitos circulantes normais foram analisados e as imagens das bordas citoplasmáticas irregulares com projeções foram capturadas, conforme a Figura 16 a seguir. As imagens obtidas foram transferidas para o software ImageJ ® no qual foram convertidas para escala de cinza (8 bits) e logo após sofreram binarização em preto e branco. Para evidenciar o contorno utilizou-se a ferramenta OUTLINE (contorno) para remoção de pixels internos dos objetos binarizados. Para determinação da dimensão fractal (DF) do contorno das imagens dos linfócitos típicos e tricoleucêmicos foi utilizado o Plugin “FracLac” do software ImageJ para análise de imagem digital através do método de contagem de caixas (box-counting).

Figura 16 - Fotomicrografias de linfócitos tricoleucêmicos e a sequência de delimitação do contorno celular irregular aplicando o *box-counting* no ImageJ.



Fonte: Autor (2022).

4.5 MÉTODO DE BOX-COUNTING (DIMENSÃO FRACTAL)

A dimensão fractal será calculada para caracterizar a complexidade da estrutura das membranas citoplasmáticas em células leucêmicas, observando as suas modificações em comparação com as células normais, visando caracterizar

essas células leucêmicas por análise computacional. O cálculo da dimensão fractal será determinado pelo método de contagem por caixas (“box-counting”) com o auxílio do programa ImageJ ® (versão 1,38 para Windows) disponível para download gratuito (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/fraclac/fraclac.html>), utilizando o plugin FracLac. A dimensão fractal no método de contagem por caixas é obtida cobrindo-se o objeto fractal com $N(r)$ caixas que contenham pelo menos um ponto do objeto fractal.

Repete-se o procedimento com caixas de diferentes tamanhos e traça-se um gráfico duplo log de $N(r)$ em função de r (lado das caixas). A inclinação desse gráfico com o sinal invertido é a dimensão de contagem por caixas que pode ser definida, formalmente, através da seguinte expressão:

$$DB = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} [\log N_{\epsilon} / \log \epsilon]$$

Onde $N(\epsilon)$ é o número mínimo de cubos elementares para cobrir a imagem digitalizada e ϵ é a dimensão linear do cubo elementar (NUSSENZVEIG, 1999; TIMBÓ, 2009).

Em suma, o método consiste na divisão da área em uma sequência de redução do tamanho dos lados das caixas (L), e contagem do número de caixas (N) correspondentes que contém ao menos 1 pixel de estrutura. Assim sendo, utiliza-se caixas de diferentes tamanhos para cobrir o objeto resulta em diferentes estimativas para N , quanto menor for o comprimento das caixas maior será o número delas e maiores detalhes da estrutura observada serão levados em consideração, porque haverá um melhor mapeamento da estrutura.

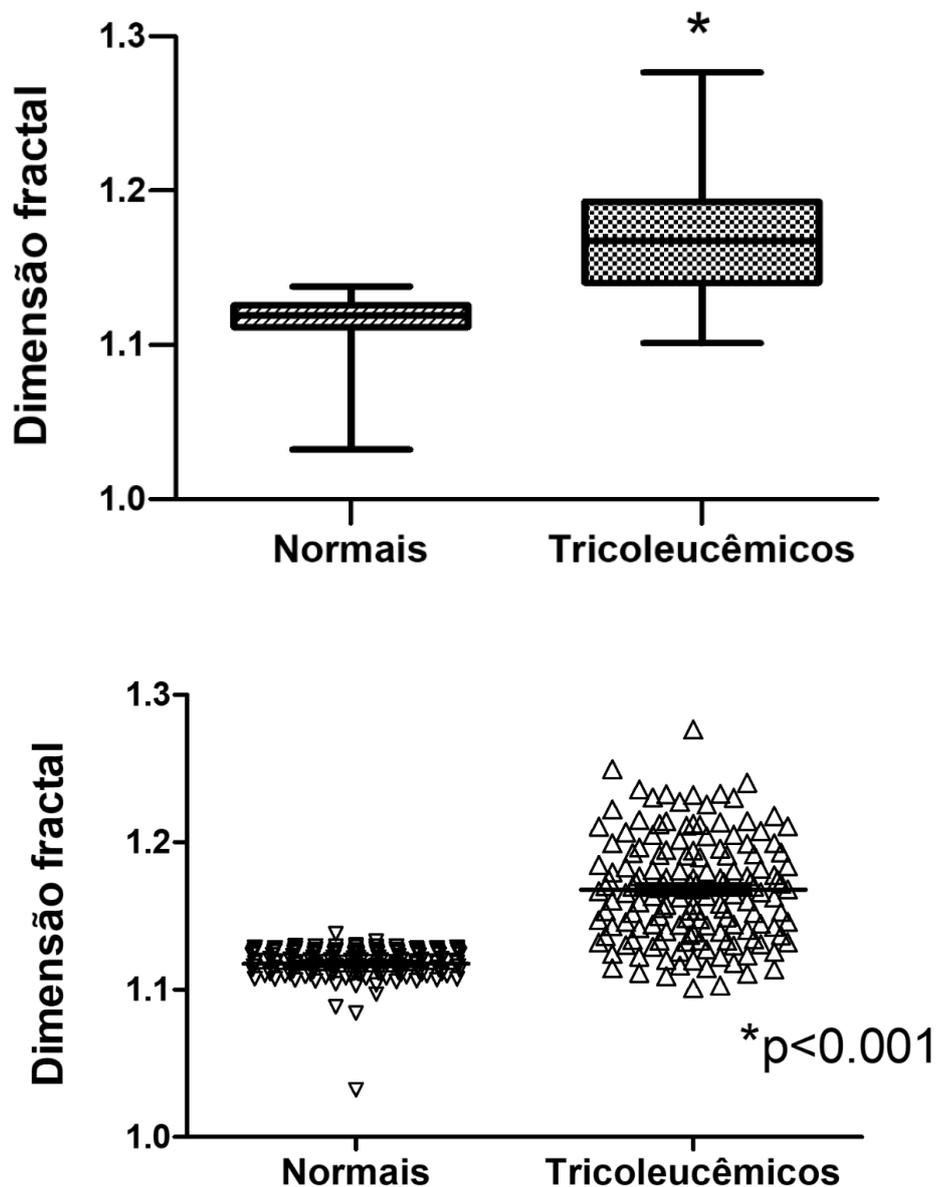
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi feita análise estatística do tipo descritiva para obtenção dos valores de média, mediana e desvio padrão de cada grupo do estudo, de acordo com o teste de normalidade D’Agostino-Pearson $p > 0,05$ indicando que as amostras não têm distribuição normal. O teste de comparação entre os grupos foi Mann-Whitney. O programa BioEstat 5.0 foi empregado na análise estatística dos dados. Foi adotado um nível de significante de 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DE DIMENSÃO FRACTAL DO CONTORNO CITOPLASMÁTICO DOS LINFÓCITOS TRICOLEUCÊMICOS

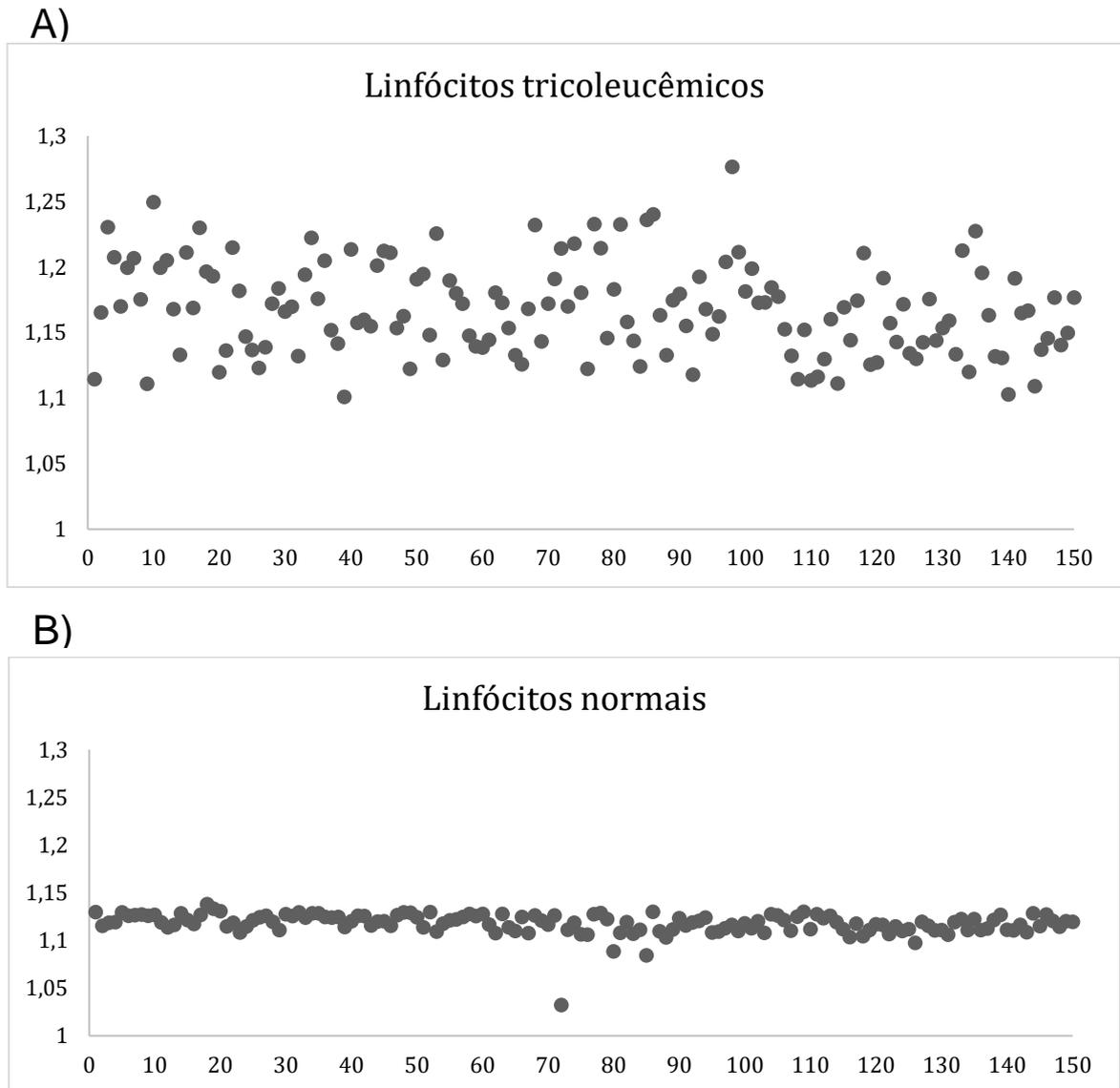
Figura 17 - Box-Plot dos grupos de linfócitos normais e tricoleucêmicos. * $p < 0.001$ em relação aos leucócitos normais de acordo com o teste de Mann-Whitney.



Observando as figuras acima, é possível verificar que as DFs dos linfócitos normais variaram de 1.0322 a 1.1378 (mediana de 1.1189 ± 0.1056), enquanto para as 150 células tricoleucêmicas variaram de 1.1011 a 1.2766 (mediana de 1.1675 ± 0.1755)., houve diferença significativa entre os grupos dos linfócitos normais e o

grupo das células tricoleucêmicas do banco de dados hematológicos, com $p < 0,001$.

Figura 18 - Variações de DF para amostras de linfócitos normais e tricoleucêmicos.

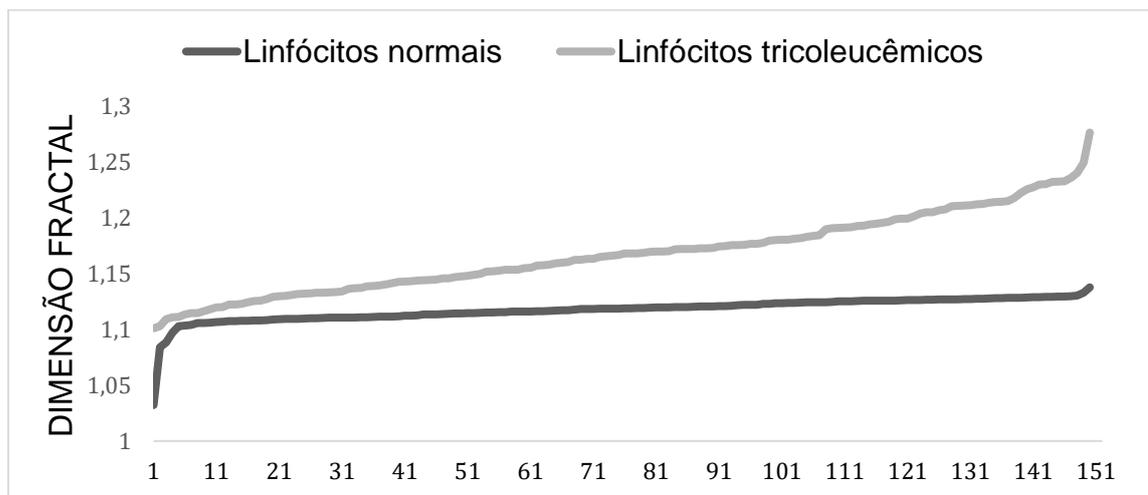


Na figura 18 é possível verificar a distribuição das células normais (A) e das células tricoleucêmicas (B). No eixo X é possível verificar???, enquanto no eixo Y é possível verificar as DFs.

Percebe-se visualmente um aumento de dispersão entre células tricoleucêmicas comparadas com linfócitos normais, o que indica que as células tricoleucêmicas apresentam uma maior variabilidade de seu contorno citoplasmático, comparado com as células normais que apresentam maior uniformidade. Em outras

palavras, a fração de células tricoleucêmicas possuem tendência de dimensão fractal crescente, enquanto a fração celular normal tende a estabilizar-se num valor de dimensão fractal de 1,1.

Figura 19 - Distribuição de ordem crescente de dimensões fractais de linfócitos normais e tricoleucêmicos.



Na Figura 19 verifica-se que houve um aumento da variância de FDs de células neoplásicas tricoleucêmicas em comparação com os linfócitos normais.

6 DISCUSSÃO

A leucemia de células pilosas (HCL) é uma malignidade crônica de células B associada à pancitopenia, esplenomegalia e ao acúmulo de linfócitos B monoclonais com “projeções de superfície semelhantes a cabelos” (BOHN et al., 2021). É reconhecível a não-linearidade e complexidade desse tipo leucêmico (LOSA, 2015) e a capacidade imprevisível da relação genótipo-fenótipo levando a busca de novas ferramentas pelas quais a caracterização das células leucêmicas possa ser alcançada, aprofundando nossa compreensão desse processo e auxiliando no diagnóstico e tratamento.

O aumento da DF na membrana citoplasmáticas das células tricoleucêmicas é uma evidência de que esses clones leucêmicos apresentam alterações de forma com superexpressão de vários componentes envolvidos na reorganização ativa do citoesqueleto, além de, também apresentar certa morfologia e atividade fagocitária (BOHN et al., 2021), caracterizando sua superfície de membrana com um perfil altamente convoluto (LOSA, 2015). As mutações genéticas que provocam o acúmulo leucêmico em sangue periférico levam à modificação da topologia física da arquitetura da membrana plasmática, direcionando a uma maior heterogeneidade de valores de DF observados no presente estudo.

Mashiah (2008) constatou que células hematológicas apresentavam DFs correspondentes à sua entidade clínica, apresentando diferença global altamente significativa nas DFs entre vários tipos de malignidades hematológicas, por isso, se é válido a caracterização das células tricoleucêmicas por DF do presente estudo. Ainda, as células hematológicas possuem dimensões fractais que se correlacionam com suas propriedades biológicas, isto é, a DF aumenta à medida que a doença é mais agressiva, mostrando que a medida da DF parece ser um método sensível para avaliar o fenótipo das células hematológicas e definir um grupo clínico.

Buscando ampliar os horizontes dos estudos fractais em doenças hematológicas Bauer e Mackenzie (2001) observaram que as células tricoleucêmicas caracterizadas por uma membrana com numerosas microvilosidades e saliências, consistentemente renderam uma alta dimensão fractal, nomeadamente $Dq = 1,33 \pm 0,03$. Ficou comprovado que a irregularidade da superfície pode ser quantificada em termos da DF porque os contornos das células manifestaram a

propriedade de autossimilaridade estatística. Em concordância com estudos anteriores Losa (2015) ao analisar os contornos de membrana apresentados pelas células tricoleucêmicas constatou uma elevação significativa na DF com $D = 1,32 \pm 0,04$ (1 SD) caracterizados elementos circulantes de leucemia de células pilosas, um perfil altamente convoluto da superfície da membrana.

Quando o efeito biológico investigado é a forma da membrana citoplasmáticas que passam a exibir projeções irregulares devido é a transformação neoplásica, como na leucemia de células pilosas, pode-se observar que as dimensões fractais de fato aumentam, semelhante aos resultados obtidos no presente estudo comparativo entre grupos. Portanto, nessa pesquisa também sugere que há alterações de heterogeneidade de acordo com os resultados de dimensão fractal demonstrados.

Na compreensão da DF da população de células B com numerosas projeções citoplasmáticas apresentavam distribuição uniforme ou mais dispersa, podendo servir para caracterização desse tipo de célula, Bauer e Mackenzie (2001) encontraram que a dimensão fractal do contorno das células tricoleucêmicas apresentam uma distribuição mais heterogênea, não seguindo valores lineares, enquanto a distribuição dos linfócitos normais é bem mais homogênea com valores mais próximos e menos dispersos, seguindo uma distribuição normal. Assim, nossos achados são consistentes com relatos anteriores. As mutações genéticas de ganho de função (ex. BRAF-V600E) alteram a complexidade topológica físico global celular, principalmente, da membrana citoplasmática, mas não em totalidade das células, fazendo com que elas apresentem valores de dimensão dispersos e isso pode ser mensurável por ferramentas computacionais, como as aqui empregadas.

O presente estudo demonstra que a organização da membrana celular das células humanas exibe dinâmica não linear e características fractais quantificáveis por geometria fractal (MASHIAH et al., 2008). Nesse contexto, entende-se que diante dos resultados obtidos, é possível a caracterização das células tricoleucêmicas por métodos computacionais para auxiliar ao diagnóstico tradicional, ajudando a diminuir a margem de erros diagnósticos recorrentes em leucemias (VISWANATHAN, 2015) sendo útil, principalmente, porque o “tempo” é um fator crucial para o planejamento terapêutico dos pacientes.

7 CONCLUSÃO

O cálculo da dimensão fractal (DF) do contorno de membrana citoplasmática dos linfócitos sanguíneos mostrou ser um método promissor na caracterização de células com alterações de forma e arranjo, a exemplo da Leucemia de células cabeludas ou tricoleucemia utilizada como modelo no presente estudo. Com isso, a possibilidade de novas aplicações emerge a partir destes resultados, tal como o uso deste método como um auxiliar na caracterização das células tricoleucêmicas, podendo ser mais uma alternativa para identificação de células neoplásicas e na possibilidade futura de um diagnóstico mais precoce.

REFERÊNCIAS

- Abbas A.K., Lichtman A.H. **Imunologia Básica** – 2ª edição – Ed Elsevier. Rio de Janeiro. 2007.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2019**. Atlanta: American Cancer Society, 2019.
- A. LOSA, G. From normal to leukemic cells featured by a fractal scaling-free analysis. **Fractal geometry and nonlinear analysis in medicine and biology**, v. 2, n. 3, 2016.
- 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. 2391–2405, 2016.
- ABREU, G. M.; DE SOUSA, S. C.; GOMES, E. V. Leucemia Linfóide e Mieloide: Uma breve revisão narrativa / Lymphoid and Myeloid Leukemia: A brief narrative review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 8, p. 80666–80681, 2021.
- ALMEIDA, V. L. DE et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- ALMEIDA, G. M. **Dificuldades na padronização de metodologias in vitro (ensaio cometa e teste do micronúcleo) no estudo da carcinogênese de leucemias e linfomas**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.
- AMARAL, D.; PUGGINA, B. **UM PANORAMA GERAL SOBRE AS LEUCEMIAS A GENERAL OVERVIEW OF LEUKEMIA**. Disponível em: <https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/hematologia/serie_branca/leucemias_linfomas_mieloma/leucemias/72.pdf>. Acesso em: 30 set. 2022.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2019**. Atlanta: American Cancer Society, 2019.
- ASSIS, T. A. DE et al. Geometria fractal: propriedades e características de fractais ideais. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 30, n. 2, p. 2304.1-2304.10, 2008.
- ANJOS, A. R. DOS; ALVARES-SILVA, M.; BORELLI, P. Matriz Extracelular e Leucemia. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 22, n. 3, p. 404–412, 2000.
- ANDRITSOS, L. A.; GREVER, M. R. Historical overview of hairy cell leukemia. **Best practice & research. Clinical haematology**, v. 28, n. 4, p. 166–174, 2015.

ANTONIAZZI, R. L. **Aplicação do método Box Counting para a estimativa da dimensão fractal de figuras planas digitalizadas**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

BARBOSA, S. F. DA C. et al. Aspectos epidemiológicos dos casos de leucemia e linfomas em jovens e adultos atendidos em hospital de referência para câncer em Belém, Estado do Pará, Amazônia, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 3, p. 43–50, set. 2015.

BAUER, W.; MACKENZIE, C. D. Cancer Detection on a Cell-by-Cell Basis Using a Fractal Dimension Analysis. **Heavy Ion Physics**, v. 14, p. 43–50, 2001.

BARBOSA, Ruy Madsen. **Descobrendo a Geometria Fractal para a sala de aula**. Belo Horizonte: Autêntica, 2002.

Barker RL, Loegering DA, Ten RM, Hamann KJ, Pease LR, Gleich GJ. Eosinophil cationic protein cDNA. Comparison with other toxic cationic proteins and ribonucleases. **J Immunol**. 1989 Aug 1;143(3):952-5. PMID: 2745977.

BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G. **Patologia**. 8ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

BOHN, J.-P. et al. A biologia da leucemia de células pilosas clássica. **Revista Internacional de Ciências Moleculares**, v. 22, n. 15, pág. 7780, 2021.

BRITO JUNIOR, L. C. DE; BARBOSA, S. R.; FRANCÊS, L. T. M. Relato de caso de leucemia de células pilosas. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, v. 47, n. 6, p. 603–606, 2011.

BIANCIARDI, G. Welcome to the inaugural issue of Fractal Geometry and Nonlinear Analysis in Medicine and Biology (FGNAMB). We invite your participation. **Fractal geometry and nonlinear analysis in medicine and biology**, v. 1, n. 1, 2015.

BREEMS, D. A. et al. Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of CD34+ mobilized peripheral blood stem cells. **Blood**, v. 91, n. 1, p. 111–117, 1998.

BYDLOWSKI, S. P. et al. **Biological characteristics of mesenchymal stem cells**. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2009.

BOURONCLE, B. A.; WISEMAN, B. K.; DOAN, C. A. Leukemic reticuloendotheliosis. **Blood**, v. 13, n. 7, p. 609–630, 1958.

BOSE, P. et al. Fractal analysis of nuclear histology integrates tumor and stromal features into a single prognostic factor of the oral cancer microenvironment. **BMC cancer**, v. 15, n. 1, p. 409, 2015.

CHENNAMADHAVUNI, A.; LYENGAR, V.; SHIMANOVSKY, A. Leukemia. In: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

CORTES, J. E.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H. Chronic myelogenous leukemia: a review. **The American journal of medicine**, v. 100, n. 5, p. 555–570, 1996.

DA COSTA RODRIGUES, R. M. **A análise fractal como ferramenta de prognóstico para o sucesso implantar**. Porto: Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, 2016.

DA CUNHA JÚNIOR, A. D. et al. **Tricoleucemia: opções de tratamento, ênfase no regime ambulatorial**. Disponível em: <<https://www.sboc.org.br/sboc-site/revista-sboc/pdfs/6/artigo4.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2022.

DA SILVA MEIRELLES, L. **Caracterização de células-tronco mesenquimais de camundongos normais e do modelo murino de MPS I**. Porto Alegre: Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

DA SILVA JUNIOR, F. C.; ODONGO, F. C. A.; DULLEY, F. L. **Células-tronco hematopoéticas: Utilidades e perspectivas**. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, maio 2009.

DA SILVA DAGA, M. **Uma análise da Geometria Fractal**. Planaltina - DF: Faculdade UnB Planaltina, 2017.

DE ALMEIDA OLIVEIRA, N. C. **Avaliação das alterações na sinalização das Células Estromais Mesenquimais da Medula Óssea em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer, 2015.

DE FALCO, G. et al. Burkitt lymphoma beyond MYC translocation: N-MYC and DNA methyltransferases dysregulation. **BMC cancer**, v. 15, n. 1, p. 668, 2015.

DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Experimental hematology**, v. 28, n. 8, p. 875–884, 2000.

DE PAULA, C. E. S.; DE SOUZA, T. M. R. a abordagem da geometria fractal para o ensino médio. **C Q D - Revista Eletrônica Paulista de Matemática**, v. 10, p. 135–148, 2017.

DIAS, L. F. S. et al. Tricoleucemia e melanoma: Caso Raro com difícil manejo terapêutico no contexto DE pandemia pelo coronavírus. **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 42, p. 113–114, 2020.

DI IEVA, A. et al. Fractals in the neurosciences, part I: General principles and basic neurosciences. **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 20, n. 4, p. 403–417, 2014.

DI IEVA, A. et al. Fractals in the neurosciences, Part II: clinical applications and future perspectives: Clinical applications and future perspectives. **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 30–43, 2015.

DOULATOV, S. et al. Hematopoiesis: a human perspective. **Cell stem cell**, v. 10, n. 2, p. 120–136, 2012.

DE MELLO, M. R. B. et al. Molecular characteristics and chromatin texture features in acute promyelocytic leukemia. **Diagnostic pathology**, v. 7, n. 1, p. 75, 2012.

DINČIĆ, M. et al. Morphological, fractal, and textural features for the blood cell classification: the case of acute myeloid leukemia. **European biophysics journal: EBJ**, v. 50, n. 8, p. 1111–1127, 2021.

FAGUNDES, CC; XAVIER, FD e SALES, MM. **Citometria de fluxo aplicações no laboratório clínico e de pesquisa**. Tricoleucemia. São Paulo. Editora Atheneu-2013.

FANTA, P. T.; SAVEN, A. Hairy cell leukemia. **Cancer treatment and research**, v. 142, p. 193–209, 2008.

GALINDO, A. V. et al. Clinical-epidemiological profile, diagnostic criteria and treatment of patients with hairy cell leukemia in the State of Pernambuco: analysis of 50 consecutive cases in 12 years. **Medicina (Ribeirao Preto Online)**, v. 49, n. 5, p. 435–439, 2016.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Histologia Essencial**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2012.

GARZA-LEDEZMA, M. A. et al. Hairy cell leukemia, an uncommon B-cell lymphoid neoplasia. **Medicina universitaria**, v. 18, n. 70, p. 34–41, 2016.

GREVER, M. R. et al. Consensus guidelines for the diagnosis and management of patients with classic hairy cell leukemia. **Blood**, v. 129, n. 5, p. 553–560, 2017.

HOMBAUER, H.; MINGUELL, J. J. Selective interactions between epithelial tumour cells and bone marrow mesenchymal stem cells. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 7, p. 1290–1296, 2000

HOGGATT, J.; PELUS, L. M. Hematopoiesis. In: MALOY, S.; HUGHES, K. (Eds.). **Brenner's Encyclopedia of Genetics**. San Diego, CA: Elsevier, 2013. p. 418–421.

HEYMANS, O. et al. Is fractal geometry useful in medicine and biomedical sciences? **Medical hypotheses**, v. 54, n. 3, p. 360–366, 2000.

HOFFBRAND, A. Victor; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER). Leucemia - versão para Profissionais de Saúde. **Tipos de Leucemia**. Ministério da Saúde, 2018. Disponível: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia/profissional-de-saude>>. Acesso em: 4 de nov. 2022.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2020. Disponível em:

<<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acessado em: 12 de outubro. 2022.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943–1955, 2013.

JAMRA, Michel. **Leucócitos, Leucemias e Linfomas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.

JAGANNATHAN-BOGDAN, M.; ZON, L. I. Hematopoiesis. **Development (Cambridge, England)**, v. 140, n. 12, p. 2463–2467, 2013.

JAMACARU, V. F. **Análise fractal em imagens radiológicas digitalizadas de osso de rato com osteoporose induzida por corticoides**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 13ª edição. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan, 2017.

JUSTIZ VAILLANT, A. A.; STANG, C. M. **Lymphoproliferative Disorders**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

KREITMAN, R. J.; ARONS, E. Update on hairy cell leukemia. **Clinical advances in hematology & oncology: H&O**, v. 16, n. 3, p. 205–215, 2018.

KREITMAN, R. J. Hairy cell leukemia: present and future directions. **Leukemia & lymphoma**, v. 60, n. 12, p. 2869–2879, 2019.

KREITMAN, R. J.; ARONS, E. Diagnosis and treatment of hairy cell leukemia as the COVID-19 pandemic continues. **Blood reviews**, v. 51, n. 100888, p. 100888, 2022.

KIPPS, T. J. et al. Chronic lymphocytic leukaemia. **Nature reviews. Disease primers**, v. 3, p. 16096, 2017.

KUEK, V. et al. Therapeutic targeting of the leukaemia microenvironment. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 13, p. 6888, 2021.

LEE, J. Y.; HONG, S. H. Hematopoietic stem cells and their roles in tissue regeneration. **International Journal of Stem Cells**, v. 13, n. 1, 1 mar. 2020.

LORENZI, Therezinha. **Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica** (4ª Ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

LOSA, G. A.; BAUMANN, G.; NONNENMACHER, T. F. Fractal dimension of pericellular membranes in human lymphocytes and lymphoblastic leukemia cells. **Pathology, research and practice**, v. 188, n. 4–5, p. 680–686, 1992.

LOSA, G. A. Welcome to the inaugural issue of Fractal Geometry and Nonlinear Analysis in Medicine and Biology (FGNAMB). We invite your participation. **Fractal geometry and nonlinear analysis in medicine and biology**, v. 1, n. 1, 2015.

- LOSA, G. A. Fractal properties of pericellular membrane from lymphocytes and leukemic cells. In: **Fractals in Biology and Medicine**. Basel: Birkhäuser Basel, 1994. p. 190–200.
- LUNDGREN, S. et al. Somatic mutations in lymphocytes in patients with immune-mediated aplastic anemia. **Leukemia**, v. 35, n. 5, p. 1365–1379, 2021.
- MORAES, E. S. et al. Análise de indivíduos com leucemia: limitações do sistema de vigilância de câncer. **Ciencia & saude coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3321–3332, 2017.
- MANSSON, R. et al. The road to commitment: Lineage restriction events in hematopoiesis. In: **Molecular Basis of Hematopoiesis**. New York, NY: Springer New York, 2009. p. 23–46.
- MAFFEIS, M. et al. Primary immunodeficiencies and oncological risk: The experience of the children's hospital of Brescia. **Frontiers in pediatrics**, v. 7, p. 232, 2019.
- MANDELBROT, Benoit B. **The Fractal Geometry of Nature**. New York: W. H Freeman and Company, 1977.
- MASHIAH, A. et al. Lymphoma and leukemia cells possess fractal dimensions that correlate with their biological features. **Acta haematologica**, v. 119, n. 3, p. 142–150, 2008.
- MARONE, G. et al. Is there a role for basophils in cancer? **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 2103, 2020.
- METZE, K. Fractal dimension of chromatin: potential molecular diagnostic applications for cancer prognosis. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 13, n. 7, p. 719–735, 2013.
- METZE, K.; ADAM, R.; FLORINDO, J. B. The fractal dimension of chromatin - a potential molecular marker for carcinogenesis, tumor progression and prognosis. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 19, n. 4, p. 299–312, 2019.
- MOTICKA, E. J. Lymphoproliferative Diseases. In: MOTICKA, E. J. (Ed.). **A Historical Perspective on Evidence-Based Immunology**. Amsterdam: Elsevier, 2016. p. 309–316.
- MONTANARI, Tatiana. **Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas**. Porto Alegre: UFRGS, 2006. NETTER, F.H.
- NUNES, R. S. R. **Geometria Fractal e Aplicações**. Departamento de Matemática Pura: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2006.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. Tipos de câncer. **Câncer de pele (incluindo melanoma) - versão do paciente**. Bethesda: NCI, [20--]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/skin>. Acesso em: 9 set. 2022.
- NUSSENZVEIG, H.M. **Complexidade & Caos**. Rio de Janeiro: COPEA, p.280, 1999.

- NOBILI, L.; LIONETTI, M.; NERI, A. Long non-coding RNAs in normal and malignant hematopoiesis. **Oncotarget**, v. 7, n. 31, p. 50666–50681, 2016.
- NUNES, R. S. R. **Geometria Fractal e Aplicações**. Departamento de Matemática Pura: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2006.
- OGAWA, M. Hematopoiesis. **The journal of allergy and clinical immunology**, v. 94, n. 3 Pt 2, p. 645–650, 1994.
- PUI, C. H. Childhood leukemias. **The New England journal of medicine**, v. 332, n. 24, p. 1618–1630, 1995.
- PUCKETT, Y.; CHAN, O. Acute Lymphocytic Leukemia. In: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
- PAILLASSA, J.; TROUSSARD, X. Biology and treatment of hairy cell leukemia. **Current treatment options in oncology**, v. 21, n. 6, p. 44, 2020.
- PIERA, J. et al. Otolith shape feature extraction oriented to automatic classification with open distributed data. **Marine & freshwater research**, v. 56, n. 5, p. 805, 2005.
- PALIS, J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 3, 2014.
- PARRA, M., BAPTISTA, M. J., GENESCÀ, E., LLINÀS-ARIAS, P., & ESTELLER, M. (2020). Genetics and epigenetics of leukemia and lymphoma: from knowledge to applications, meeting report of the Josep Carreras Leukaemia Research Institute. **Hematological Oncology**, 38(4), 432–438.
- PUI, C. H. Childhood leukemias. **The New England journal of medicine**, v. 332, n. 24, p. 1618–1630, 1995.
- RABKIN, C. S. et al. t(14;18) Translocations and risk of follicular lymphoma. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, v. 2008, n. 39, p. 48–51, 2008.
- RIEGER, M. A.; SCHROEDER, T. Hematopoiesis. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 12, p. a008250–a008250, 2012.
- ROURA, E. et al. Cortical fractal dimension predicts disability worsening in Multiple Sclerosis patients. **NeuroImage. Clinical**, v. 30, n. 102653, p. 102653, 2021.
- RUDOLF-OLIVEIRA, R. C. M. et al. Hairy cell leukemia variant: the importance of differential diagnosis. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 37, n. 2, p. 132–135, 2015.
- REGO, E. M.; SANTOS, G. A. S. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 31, n. 5, p. 367–374, 2009.
- SALAM, L.; ABDEL-WAHAB, O. **Hairy cell leukemia: Update and current therapeutic approach**. **Current Opinion in Hematology** Lippincott Williams and Wilkins, 1 jul. 2015.

SALLUM, E. M. Fractais no ensino médio. **Revista do Professor de Matemática**, São Paulo, n. 57, p. 1-8, 2005.

SANT'ANA, A. C. **Aplicações médicas das abordagens complexas não lineares: a geometria fractal do EEG**. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, 2015.

SUMMERS, T. A.; JAFFE, E. S. Hairy cell leukemia diagnostic criteria and differential diagnosis. **Leukemia & lymphoma**, v. 52 Suppl 2, n. sup2, p. 6–10, 2011.

SECIOSO, P; CARDOSO, I; FRAZÃO, S; Leucemia de células pilosas. Relato de caso, **Rev. Bras Clin Med**, n7 p. 66 – 69, 2009.

SEDIVY, R. et al. Fractal analysis: an objective method for identifying atypical nuclei in dysplastic lesions of the cervix uteri. **Gynecologic oncology**, v. 75, n. 1, p. 78–83, 1999.

SOARES, F. A.; VASSALO, J.; PAES, R. P.; BORTOLHEIRO, T. C. Sistema Hemolinfotopoético. IN: Bogliolo, L.; Brasileiro Filho, 93 G. **Patologia**. 8a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 841- 894p.

SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v.71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SILVA, Í. C. **Neutrófilos: aspectos clássicos, plasticidade e novas funções imunorregulatórias**. Juiz de Fora: Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais, 2015.

SILVA, W. N. et al. Hematopoietic stem cell stretches and moves in its bone marrow niche. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 163, n. 103368, p. 103368, 2021.

SILVA JUNIOR, F. C. DA; ODONGO, F. C. A.; DULLEY, F. L. Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 31, p. 53–58, 2009.

SOUZA, C. F. DE et al. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 18, n. 3, p. 344–353, 2010.

SOARES, F. A.; VASSALO, J.; PAES, R. P.; BORTOLHEIRO, T. C. Sistema Hemolinfotopoético. IN: Bogliolo, L.; Brasileiro Filho, 93 G. **Patologia**. 8a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 841- 894p.

TIMBÓ, C. et al. Computational cancer cells identification by fractal dimension analysis. **Computer physics communications**, v. 180, n. 6, p. 850–853, 2009.

TROUSSARD, X.; CORNET, E. Hairy cell leukemia 2018: Update on diagnosis, risk-stratification, and treatment. **American journal of hematology**, v. 92, n. 12, p. 1382–1390, 2017.

- VERRASTRO, Therezinha, **Hematologia Hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica**. São Paulo: Atheneu, 2010.
- VISWANATHAN, P. Fuzzy C means detection of leukemia based on morphological contour segmentation. **Procedia computer science**, v. 58, p. 84–90, 2015.
- WEINBERG, R.A. **A biologia do câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 25-56p.
- WELLER, P. F.; SPENCER, L. A. Functions of tissue-resident eosinophils. **Nature reviews. Immunology**, v. 17, n. 12, p. 746–760, 2017.
- WHITELEY, A. E. et al. Leukaemia: a model metastatic disease. **Nature reviews. Cancer**, v. 21, n. 7, p. 461–475, 2021.
- Xavier, A. I. S. F., Cavalcanti, M. B., da Silva, E. B., de Jesus Amaral, A., & de Salazar, T. (2018). Fractal analysis of chromatin as a potential indicator of human exposures to ionizing radiation. **Scientia Plena**, 14(2)
- XAVIER, A. I. S. F. et al. Fractal analysis of chromatin as a potential indicator of human exposures to ionizing radiation. **Scientia plena**, v. 14, n. 2, 2018.
- YAMASHITA, M.; IWAMA, A. Aging and clonal behavior of hematopoietic stem cells. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 4, p. 1948, 2022.
- YAŞAR, F.; AKGÜNLÜ, F. The differences in panoramic mandibular indices and fractal dimension between patients with and without spinal osteoporosis. **Dento maxillo facial radiology**, v. 35, n. 1, p. 1–9, 2006.
- ZAGO, MA, FALCÃO, RP, PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2013.
- ZOCCAL, K. F. et al. TLR2, TLR4 and CD14 recognize venom-associated molecular patterns from *Tityus serrulatus* to induce macrophage-derived inflammatory mediators. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e88174, 2014.
- ZIUKELIS, E. T. et al. Fractal dimension of the brain in neurodegenerative disease and dementia: A systematic review. **Ageing research reviews**, v. 79, n. 101651, p. 101651, 2022.