

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**ADRIANO MORAES DA SILVA**

**DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS AGUDAS ATRAVÉS DA  
ESPECTROSCOPIA RAMAN E ANÁLISE DISCRIMINANTE PELOS  
MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS**

**TESE DE DOUTORADO**

**DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

**São José dos Campos, Junho de 2018**

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**ADRIANO MORAES DA SILVA**

**DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS AGUDAS ATRAVÉS DA  
ESPECTROSCOPIA RAMAN E ANÁLISE DISCRIMINANTE PELOS  
MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS**

**TESE DE DOUTORADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Stricto Sensu em Engenharia Biomédica - Doutorado, da  
Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor em Engenharia  
Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Landulfo Silveira Júnior

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca UAM  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

586d Moraes da Silva, Adriano  
DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS AGUDAS ATRAVÉS  
DA ESPECTROSCOPIA RAMAN E ANÁLISE  
DISCRIMINANTE PELOS MÍNIMOS QUADRADOS  
PARCIAIS / Adriano Moraes da Silva. - 2018.  
95f. : il.; 30cm.

Orientador: Landulfo Silveira Júnior.  
Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade  
Anhembi Morumbi, São José Dos Campos, 2018.  
Bibliografia: f.149

1. Engenharias. 2. Espectroscopia Raman. 3. Diagnóstico.  
4. Leucemia aguda. 5. Mínimos quadrados parciais.

CDD 610.28

São José dos Campos, Junho de 2018

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**ADRIANO MORAES DA SILVA**

**DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS AGUDAS ATRAVÉS DA  
ESPECTROSCOPIA RAMAN E ANÁLISE DISCRIMINANTE PELOS  
MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica - Doutorado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica. Aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

**Prof. Dr. Landulfo Silveira Jr. (titular)**

Orientador

Doutorado em Ciências

Universidade Anhembi Morumbi

**Profa. Dra. Vivian C. C. Castilho Hyodo (titular)**

Universidade Paulista (UNIP)

**Prof. Dr. Pedro Luiz de Brito (titular)**

Grupo de Assistência à Criança com Câncer (GACC)

**Prof. Dr. Leandro Procópio Alves (titular)**

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dra. Lívia Helena M. da Silva Melo (titular)**

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (coordenação)**

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dra. Adriana Barrinha Moretti (suplente)**

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dra. Fernanda Malagutti Tomé (suplente)**

Universidade Paulista (UNIP)

**São José dos Campos, Junho de 2018**

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

**ADRIANO MORAES DA SILVA**

Possui graduação em Ciências Biológicas - Modalidade médica pela Universidade de Mogi das Cruzes (2000) e Mestrado em Engenharia Biomédica pela Universidade do Vale do Paraíba (2006). Atualmente é professor e coordenador na Associação Unificada Paulista de Ensino Renovado Objetivo e biomédico responsável pela hematologia do laboratório municipal de Jacareí.

## DEDICATÓRIA

Dedico esta obra.

Primeiramente a Deus, que me permitiu trilhar por caminhos tortuosos, mas que sempre esteve comigo, me dando força e motivação.

Aos meus pais que sempre acreditaram em mim, desde a graduação, sempre me dando apoio em tudo em que me propus a fazer.

Aos meus irmãos, minha sogra e meus cunhados, que me deram apoio e motivação e compreenderam minhas ausências em momentos em família.

À minha esposa Marcia, que de forma incondicional me apoiou, me estimulou, me animou e me fez seguir em frente nos momentos em que tive dúvidas sobre seguir ou não em frente

Aos meus amados filhos Pedro e Laura, que me viram ficar horas e horas escrevendo esta tese enquanto se distraíam com seus afazeres e suas brincadeiras, por não poder estar ali com eles naqueles momentos.

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por me iluminar e me permitir a conclusão deste trabalho.*

*Aos meus pais, Sebastião e Neuza (in memoriam), pelas vezes que fizeram da minha causa as suas causas e agora finalmente terão um filho doutor*

*Aos meus irmãos, minha cunhada e a minha Família Matsumura, que se alegraram com minhas conquistas e me apoiaram em minhas quedas.*

*A minha esposa Marcia por todo amor, paciência e compreensão. Minha gratidão e admiração serão eternas.*

*Aos meus filhos queridos Pedro e Laura que me acompanharam durante o desenvolvimento deste trabalho e compreenderam as inúmeras vezes em que me ausentei de suas atividades. Espero que um dia sintam orgulho do papai, que estudem muito e trilhem seus caminhos com muito sucesso.*

*Ao meu orientador, professor Dr. Landulfo Silveira Júnior. Agradeço a confiança, dedicação e ensinamentos em espectroscopia Raman. Você é uma inspiração para mim!*

*A todos os professores e funcionários da Pós-Graduação de Engenharia Biomédica da Universidade Anhembi Morumbi pela dedicação ao longo do curso.*

*Agradeço ainda àqueles que de forma direta ou indireta me ajudaram a chegar a conclusão desta obra, cujos nomes não foram aqui citados.*

### *Financiadores:*

*Landulfo Silveira Jr. agradece à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Concessão no. 2009/01788-5) pela aquisição do espectrômetro Raman e a CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico - Processo no. 306344/2017-3) pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa.*

*Adriano Moraes da Silva agradece à CAPES-PROSUP (Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares) pela bolsa de doutorado.*

*“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”*

*Albert Einstein*

## RESUMO

Leucemias agudas são doenças onco-hematológicas que comprometem a medula óssea, causando quadros clínicos graves, com alta mortalidade. Apresentam elevada incidência na população mundial, cujos tratamentos são iniciados a partir da definição diagnóstica. Atualmente, o diagnóstico das leucemias exige uma série de exames que envolvem análise da morfologia citológica, identificação de proteínas específicas das classes celulares e alterações cromossômicas e genéticas. São técnicas que necessitam de grandes volumes de amostras de sangue periférico e medular e ainda demandam tempo prolongado, preparos e reagentes especiais para serem executados. Este estudo teve como objetivo determinar as diferenças espectrais entre amostras de sangue total e plasma de sujeitos saudáveis e leucêmicos, relacionar estas diferenças com as alterações bioquímicas nestas amostras e realizar a análise discriminante das amostras ( $n = 38$  de sangue total e  $n = 40$  de plasma) utilizando a espectroscopia Raman e modelos de discriminação baseados em mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e análise de componentes principais (PCA-DA) para a discriminação dos espectros nos grupos saudável e leucêmico. Amostras de sangue e plasma obtidas de um laboratório de análises clínicas de um hospital de referência em doenças onco-hematológicas no Vale do Paraíba foram submetidas à espectroscopia Raman (espectrômetro dispersivo com 830 nm e 280 mW de excitação acoplado a um cabo de fibras ópticas Raman *probe*), com exposição total de 30 s para a coleta de cada espectro. A análise exploratória das amostras sanguíneas por PCA evidenciou componentes principais com picos específicos atribuídos à moléculas bioquímicas como aminoácidos, proteínas, carboidratos, lipídios e carotenoides. Os espectros de cada grupo amostral (saudável e leucêmico) foram modelados por PLS-DA e PCA-DA pelo método de validação cruzada *leave-one-out*, onde foram identificadas variáveis latentes e componentes principais com capacidade de classificar os espectros nos grupos saudável e leucêmico. Os modelos obtiveram sensibilidade de 91,9% (PLS-DA) e 83,9% (PCA-DA), especificidade de 100% (PLS-DA e PCA-DA) e acurácia global de 96,5% (PLS-DA) e 93% (PCA-DA) para os espectros de sangue total. No plasma, os modelos obtiveram sensibilidade de 95,7% (PLS-DA) e 11,6% (PCA-DA), especificidade de 98% (PLS-DA) e 100% (PCA-DA) e acurácia global de 97,1% (PLS-DA) e 64,1% (PCA-DA). O estudo demonstrou que o modelo utilizando PLS aplicado ao sangue total apresentou melhor desempenho quando comparado ao plasma, sendo igualmente superior ao modelo baseado na PCA em ambos os tipos de amostra. Os resultados demonstraram que a espectroscopia Raman é uma técnica com potencial para ser aplicada no diagnóstico de leucemias agudas de forma rápida, minimamente invasiva e não destrutiva às amostras.

**Palavras-chave:** espectroscopia Raman; diagnóstico; leucemia aguda; sangue; plasma; mínimos quadrados parciais; análise de componentes principais.

## ABSTRACT

Acute leukemias are onco-hematological diseases that compromise the bone marrow, causing serious clinical conditions, with high mortality. They have a high incidence in the world population, whose treatments are initiated from the diagnostic definition. Currently, the diagnosis of leukemias requires a series of tests that involve analysis of cytological morphology, identification of specific proteins of the cell classes, and chromosomal and genetic alterations. These techniques require a large quantity of peripheral and medullary blood samples and still require too much time, preparations and reagents to be executed. This study aimed to determine the spectral differences between whole blood and plasma samples of healthy and leukemic subjects, correlate these differences with the biochemical changes in these samples and perform the discriminant analysis of the samples ( $n = 38$  of whole blood and  $n = 40$  of plasma) using Raman spectroscopy and discrimination models based on partial least squares (PLS-DA) and principal component analysis (PCA-DA) to discriminate spectra in the healthy and leukemic groups. Blood and plasma samples obtained from a clinical laboratory of a reference hospital in onco-hematological diseases in Vale do Paraiba, SP, Brazil, were submitted to Raman spectroscopy (830 nm dispersive spectrometer and 280 mW excitation coupled to a Raman probe fiber optic cable), with a total exposure of 30 s for the collection of each spectrum. The exploratory analysis of the blood samples by PCA revealed principal components attributed to specific biochemical molecules such as amino acids, proteins, carbohydrates, lipids and carotenoids. The spectra of each sample group (healthy and leukemic) were modeled by PLS-DA and PCA-DA with the leave-one-out cross validation method, where latent variables and principal components were identified with the capacity to classify the spectra in the healthy and leukemic groups. The models obtained sensitivity of 91.9% (PLS-DA) and 83.9% (PCA-DA), specificity of 100% (PLS-DA and PCA-DA) and overall accuracy of 96.5% (PLS-DA) and 93% (PCA-DA) for the whole blood spectra. In the plasma, the models obtained sensitivity of 95.7% (PLS-DA) and 11.6% (PCA-DA), specificity of 98% (PLS-DA) and 100% (PCA-DA) and overall accuracy of 97.1% (PLS-DA) and 64.1% (PCA-DA). The study demonstrated that the PLS model applied to whole blood presented better performance when compared to plasma, being also superior to the PCA in both sample types. The results demonstrated that Raman spectroscopy is a technique with potential to be applied in the diagnosis of acute leukemias in whole blood samples in a fast, minimally invasive and non-destructive way.

**Keywords:** Raman spectroscopy; diagnosis; acute leukemia; blood; plasma; partial least squares; principal components analysis.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	18
<b>1.1 Objetivos gerais</b>	21
<b>1.2 Objetivos específicos</b>	21
<b>1.3 Hipóteses</b>	21
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	22
<b>2.1 A Medula Óssea e o Sangue</b>	22
<b>2.2 Leucemias agudas</b>	23
2.2.1 Epidemiologia das leucemias	25
2.2.2 Etiologia das leucemias	27
2.2.3 Formas clínicas	27
2.2.4 Classificação das leucemias	28
2.2.5 Fatores indutores das leucemias	32
2.2.6 Diagnóstico das leucemias	33
2.2.7 Leucemia linfóide aguda	35
2.2.7.1 Fatores prognósticos	35
2.2.7.2 Tratamento da LLA	37
2.2.8 Leucemia mielóide aguda	38
2.2.8.1 Fatores prognósticos	40
2.2.8.2 Tratamento da LMA	41
<b>2.3 Indução da Remissão para LMA e LLA</b>	43
<b>2.4 Espectroscopia Raman</b>	44
2.4.1 A espectroscopia Raman aplicada à área biológica	47
2.4.2 A espectroscopia Raman aplicada às leucemias	47
<b>2.5 Ferramentas estatísticas para análise espectral</b>	48
2.5.1 Análise de componentes principais (PCA): análise exploratória	49
2.5.2 Análise discriminante pelos mínimos quadrados parciais (PLS - partial least squares) e PCA	49
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	51
<b>3.1 Apreciação ética</b>	51
<b>3.2 Amostras de sangue total e plasma</b>	52
<b>3.3 Aquisição dos espectros Raman e pré-processamento</b>	53
<b>3.4. Análise exploratória e análise discriminante</b>	56
3.4.1 Análise exploratória baseada na PCA	56

3.4.2 Análise discriminante baseada em PLS e PCA	56
<b>4 RESULTADOS</b>	57
4.1 Espectros de sangue total e plasma	57
4.2 Análise exploratória por PCA e significância segundo aplicação do teste <i>t</i> de Student	60
4.3 Análise por PLS-DA e PCA-DA visando discriminação	62
<b>5 DISCUSSÃO</b>	66
5.1 Principais evidências espectrais no sangue total e plasma	66
5.2 Análise exploratória dos dados baseados na PCA	67
5.2.1 Sangue Total	67
5.2.2 Plasma	69
5.3 Análise Discriminante (PLS-DA e PCA-DA)	71
5.4 A espectroscopia Raman e as técnicas convencionais para diagnóstico de leucemias	72
5.5 Trabalhos futuros	73
<b>CONCLUSÃO</b>	75
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	76
<b>APÊNDICE A: Parecer Consubstanciado - CAAE</b>	94

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Imagens de blastos em leucemia mieloide aguda	24
Figura 2: Esquema do sistema hematopoiético normal (A) e leucemia mielóide aguda (B)	39
Figura 3: Tipos de espalhamento de luz: Espalhamento Rayleigh, Stokes e anti- Stokes	45
Figura 4: Diagrama de blocos simplificado mostrando o desenho do estudo	51
Figura 5: (A): diagrama esquemático do espectrômetro Raman dispersivo (modelo P-1) e (B) foto do aparelho Raman dispersivo	54
Figura 6: Espectro de plasma de um sujeito saudável demonstrando a remoção do <i>background</i> fluorescência por polinômio ajustado em toda a faixa espectral. A: espectro com <i>background</i> de fluorescência e B: espectro com a fluorescência removida.	55
Figura 7: Espectros Raman médios normalizados de sangue total de sujeitos normais e leucêmicos e espectro da diferença entre leucêmicos e saudáveis. O símbolo * representa os picos nos espectros dos sujeitos leucêmicos que são mais intensos que nos espectros dos saudáveis.	58
Figura 8: Espectros Raman médios normalizados de plasma de sujeitos normais e leucêmicos e espectro da diferença entre leucêmicos e saudáveis.	60
Figura 9: Gráficos dos Componentes Principais e Escores calculados para sangue total visando análise exploratória. Os asteriscos representam picos encontrados neste estudo e que não apresentam atribuição conhecida na literatura	61
Figura 10: Gráficos dos Componentes Principais e Escores calculados para plasma visando análise exploratória	62
Figura 11: Gráfico de contingência com as classificações por grupo Saudável e Leucêmico, através da análise discriminante, sendo A) PLS-DA (sangue total) e B) PCA-DA (sangue total)	64
Figura 12: Gráfico de contingência com as classificações por grupo Saudável e Leucêmico, através da análise discriminante, sendo A) PLS-DA (plasma); e B) PCA-DA (plasma).	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativas do número de casos novos de leucemias para 2018, em homens e mulheres, segundo localização primária, exceto pele.	25
Tabela 2. Estimativas do número de casos novos de leucemias para 2018, em homens e mulheres, por regiões.	26
Tabela 3. Estimativas para o ano de 2018 do número de casos novos de leucemias para cada 100 mil habitantes, por Estado da Federal e por sexo.	26
Tabela 4 - Classificação Franco-Americano-Britânica das leucemias linfóides agudas	29
Tabela 5 - Classificação Franco-Americano-Britânica das leucemias mielóides agudas	30
Tabela 6 - Classificação das leucemias agudas segundo a Organização Mundial de Saúde e sua frequência aproximada.	31
Tabela 7 - Classificação de risco baseada no cariótipo de pacientes com leucemia linfóide aguda.	37
Tabela 8 - Classificação das leucemias agudas segundo a Organização Mundial de Saúde e sua frequência aproximada de alterações citogenéticas.	39
Tabela 9 - Classificação de Prognóstico por SWOG e MRC	40
Tabela 10 - Tratamentos de Indução de Remissão para LMA e LLA, adaptado do Manual de Condutas em Doenças Onco-Hematológicas do Adulto	44
Tabela 11 - Quantidade de amostras de sangue total e plasmas doados, por grupo e quantidade de amostras analisadas neste estudo.	52
Tabela 12 - Número de amostras e número de espectros em cada grupo	57
Tabela 13 - Agrupamento bioquímico por posições dos picos dos espectros Raman, atribuição segundo a literatura e significância segundo valor de $p$ . calculado pelo teste $t$ de Student	58
Tabela 14. Matriz de contingência com os resultados de acertos, sensibilidade e especificidade do modelo de discriminação utilizando os espectros Raman das amostras sanguíneas	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRALE	Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia
BCA	Análise do Componente Bioquímico
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CARS	<i>Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy</i>
CCD	<i>Charge coupled device</i>
CD	Cluster of Differentiation
CITE	Centro de Inovação, Tecnologia e Educação
D1, D2...	Dia 1, Dia 2...
Del	Deleção de braço cromossômico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DRM	Doença Residual Mínima
EBV	Epstein Barr Vírus
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
ES	Escore
FAB	Franco-Americano-Britânico
Fen	Fenilalanina
FLT3	Fetal Liver Tyrosine Kinase
GMALL	<i>German Multicenter Acute Lymphoid Leukemia</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Vírus linfotrópico da célula humana
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IT	Intratecal
IV	Intravenoso
K <sub>3</sub> EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracéitico tripotássico
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LDA	<i>Linear Discriminant Analysis</i>
LDA	<i>Linear discriminant analysis</i>
LLA	Leucemia linfóide aguda
LLA-L1	Leucemia linfóide aguda - L1
LLA-L2	Leucemia linfóide aguda - L2
LLA-L3	Leucemia linfóide aguda - L3
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMA-M0	Leucemia mieloide aguda - M0
LMA-M1	Leucemia mieloide aguda - M1
LMA-M2	Leucemia mieloide aguda - M2
LMA-M3	Leucemia mieloide aguda - M3
LMA-M4	Leucemia mieloide aguda - M4
LMA-M5	Leucemia mieloide aguda - M5
LMA-M6	Leucemia mieloide aguda - M6
LMA-M7	Leucemia mieloide aguda - M7
LMC	Leucemia mieloide crônica
MCR	Medical Research Council
MO	Medula Óssea
MPO	Mieloperoxidase
MS	Ministério da Saúde
NPM1	Nucleofosmina
NS	Não significativo
OMS	Organização Mundial da Saúde

(P)	Picos que se referem apenas ao plasma
P	Braço cromossômico acima do centrômero
PC	Componente Principal
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCA-DA	<i>Principal Component Analysis - discriminant analysis</i>
PLS	<i>Partial Least Squares</i>
PLS-DA	<i>Partial Least Squares - discriminant analysis</i>
Q	Braço cromossômico abaixo do centrômero
Qt	Quimioterapia
RC	Remissão Completa
(S)	Picos que se referem apenas ao sangue total
SC	Subcutâneo
SERS	<i>Surface enhanced Raman spectroscopy</i>
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SLE	Sobrevida Livre de Eventos
SMD	Síndromes mielodisplásicas
SMP	Síndromes mieloproliferativas
T	Translocação entre cromossomos
TACTH	Transplante Autólogo de Células-Tronco Hematopoiéticas
TMO	Transplante de Medula Óssea
Trp	Triptofano;
Tyr	Tirosina
VO	Via Oral

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo o Dicionário Michaelis da Língua Portuguesa (2017) a hematologia (palavra com radical grego *haîma*: sangue e *lógos*: estudo) é uma especialidade médica que se dedica ao estudo da fisiologia do sangue, da medula e dos gânglios linfáticos e ao tratamento das enfermidades que lhe são específicas, bem como daquelas que atingem os demais órgãos hematopoiéticos. É também um setor dentro de um laboratório de análises clínicas responsável pela realização dos hemogramas, que compreendem o maior volume testes dentre os exames solicitados devido às informações qualitativas e quantitativas sobre as células sanguíneas que é capaz de fornecer, e que têm relações diretas com os estados fisiológico e patológico de um paciente (GROTTO, 2009). Mesmo com todo o avanço tecnológico que a hematologia clínica vem dispondo nos últimos tempos, o hemograma permanece como o ponto de partida para a triagem diagnóstica de vários distúrbios da homeostasia (FAILLACE; PRANKE, 2004; SOSSELA; ZOPPAS; WEBER, 2017). No entanto, toda informação oferecida pelo hemograma não é suficiente para diagnosticar algumas patologias hematológicas como as leucemias, linfomas e mielomas, entre outras neoplasias medulares e ganglionares, que exigem técnicas ouro com maior sensibilidade e especificidade, como as análises morfológicas, imunoquímicas e citogenéticas, as quais demandam tempo prolongado para a definição do diagnóstico e o início do tratamento (SILVA G et al., 2006; SOSSELA; ZOPPAS; WEBER, 2017). Essas doenças são chamadas de onco-hematológicas e sempre representam desafios aos clínicos, pois iniciam-se a partir de uma proliferação neoplásica ou acúmulo de células hematopoiéticas anormais intramedulares, podendo ou não alcançar o sangue periférico, infiltrando-se por outros órgãos e tecidos e dificultando assim o diagnóstico, pois em alguns casos (ainda que inicialmente) não causam sinais ou sintomas específicos de uma neoplasia hematológica (SILVA et al., 2006; HAMERSCHLAK, 2008).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) e a Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia (ABRALE) sub-classificam as leucemias agudas dentro da grande área da oncologia, e as definem como células hematopoiéticas primitivas, principalmente os glóbulos brancos, que sofrem transformações malignas e passam a ser produzidos de forma clonal e descontrolada mesmo sem demanda, com suas funções e morfologias geralmente alteradas e ainda com a sequência de maturação não escalonada, mantendo-

as imaturas, sendo assim conhecidas por blastos leucêmicos (ABRALE, 2017; INCA, 2018). A clonagem acelerada destes blastos leva a um aumento da população celular dentro da medula óssea, que resulta na infiltração de tecidos como fígado, baço e linfonodos (OLIVEIRA; MARCHIORI; SOUZA JUNIOR, 2004; PINO BLANCO et al., 2014).

Apesar de registros de queda da mortalidade por leucemias, estima-se que 1/3 dos pacientes apresenta recidivas de suas doenças e taxa de sobrevida geral de aproximadamente 35% em longo prazo. Esses dados motivam a busca por novos métodos e técnicas diagnósticas que possam reduzir o intervalo de tempo entre a hipótese e a conclusão diagnóstica, permitindo intervenções medicamentosas mais precoces em favor de melhores prognósticos para os pacientes. Neste contexto, a utilização de técnicas ópticas tem sido propostas, a exemplo da espectroscopia Raman que tem conquistado posição de destaque como uma possível ferramenta para o diagnóstico e monitoramento de pacientes acometidos por leucemias (SILVA; SILVEIRA; CALLERA, 2006; CHAN et al., 2008; BANKAPUR et al., 2010; GONZÁLES-SOLÍS et al., 2014; VANNA et al., 2014; LIMA et al., 2016).

A espectroscopia Raman é uma técnica óptica que permite a medição da energia vibracional de determinada molécula obtida após a troca de energia entre um fóton monocromático incidente e os estados vibracionais de uma molécula polarizável, sendo que a diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado caracteriza o espalhamento Raman (HANLON et al., 2000). É também uma ferramenta dentro da biofotônica que vem ampliando seu campo de atuação dentre as várias áreas de pesquisa e aplicação do laser no diagnóstico, uma vez que apresenta um elevado potencial de detalhamento dos níveis de energias vibracionais das amostras estudadas, visando obter informações sobre a composição biomolecular do material sob estudo e definindo-se como uma “impressão digital” molecular (CROW et al., 2004; STONE et al., 2004). Dentre uma infinidade de amostras e variáveis analisáveis no campo biomédico estão peptídeos, aminoácidos, proteínas, carboidratos, microrganismos e até mesmo tecidos como o sangue (WILKINSON, 1986; CAMPION, 2001; BANKAPUR et al., 2010; OLIVEIRA; GIANA; SILVEIRA, 2012).

A amplificação de sinais vibracionais para a caracterização de uma molécula em uma amostra biológica tem sido observado em alguns estudos que tiveram o objetivo de propor a espectroscopia Raman como uma ferramenta aplicável na área de diagnósticos

(SCHATZ; Van DUYNE, 2002; SEBALLOS et al., 2007; JUNG et al., 2013; MITCHELL et al., 2008; PODSTAWKA; NIAURA, 2009; HOBRO et al., 2010). Ademais, pesquisas vêm sendo desenvolvidas no sentido de se conhecer as condições ideais para a interação do laser com o tecido biológico (WEI et al., 2008), além da possibilidade de sua aplicação “*in vivo*” e “*in vitro*”, sugerindo estudos comparativos com os métodos convencionais para fins de diagnóstico e monitoramento de algumas patologias (NAUMANN et al., 1995; HANLON et al., 2000; MAQUELIN et al., 2000; MAQUELIN et al., 2003).

Considerando-se que as atuais técnicas reconhecidas como padrão ouro para o diagnóstico de leucemias agudas exigem o preparo de amostras, a utilização de reagentes e a demanda de tempo para a liberação de resultados, este estudo se propõe a aplicar a espectroscopia Raman em amostras sanguíneas de grupos de sujeitos leucêmicos e saudáveis, sob o ponto de vista hematológico, no intuito de estabelecer diferenças estatisticamente significativas entre seus espectros a partir da aplicação do teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ), correlacionar os principais picos Raman aos componentes bioquímicos presentes nas amostras através da análise de componentes principais, e elaborar um modelo de discriminação que possa classificar as amostras em grupos saudável e leucêmico utilizando a análise discriminante pelos mínimos quadrados parciais e análise de componentes principais, sugerindo a espectroscopia Raman como uma ferramenta eficiente para o diagnóstico de leucemias agudas.

## 1.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação da espectroscopia Raman para a definição de um padrão espectral de amostras de sangue de indivíduos saudáveis e leucêmicos, visando o diagnóstico das leucemias agudas.

## 1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Aplicar a espectroscopia Raman em amostras de sangue total e plasma isoladamente, para se obter diferenças espectrais entre saudáveis e leucêmicos;
- Aplicar o teste *t* de Student nos espectros médios amostras de sangue total e plasma de grupos de indivíduos saudáveis e leucêmicos para identificar os picos com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ );
- Correlacionar os principais picos espectrais das amostras com a composição química do sangue (total e plasma), conforme descrição da literatura;
- Desenvolver um modelo de classificação dos espectros das amostras provenientes de sujeitos saudáveis e leucêmicos por análise discriminante através dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e análise de componentes principais (PCA-DA).

## 1.3 Hipóteses

A hipótese que norteou esta pesquisa está baseada na obtenção e identificação de fatores bioquímicos que diferenciem amostras de sangue total e plasma de sujeitos saudáveis de amostras de sujeitos com leucemias agudas, sendo que a espectroscopia Raman vem demonstrando, pela revisão de literatura, possibilidade de identificar estas diferenças bioquímicas com significância estatística.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A medula óssea e o sangue

A medula óssea é descrita como um tecido de aspecto gelatinoso, composto por fibrilas conjuntivas delicadas, fibroblastos, vasos e fibras nervosas localizados no interior dos ossos, entre as trabéculas ósseas que formam os ossos ilíacos, esterno, costelas e partes das vértebras, mais especificamente no canal medular, onde se localizam as células tronco que darão origem às células hematopoiéticas. Nela ocorre a produção dos componentes celulares como hemácias (glóbulos vermelhos), leucócitos (glóbulos brancos) e trombócitos em meio a um líquido rico em metabólitos, sais e eletrólitos fundamentais para a formação do sangue (VERRASTRO; LORENZI; WENDEL NETO, 2005).

O sangue é definido como um tecido fluido que percorre o sistema circulatório, perfundindo órgãos e sistemas com suas múltiplas funções, sendo a principal o transporte de oxigênio dos pulmões através de artérias para os demais tecidos que estão com maior concentração de gás carbônico, onde realiza as trocas gasosas. A partir destas trocas, o sangue retorna aos pulmões por meio de veias, desta vez rico em gás carbônico, para realizar novas trocas gasosas e reiniciar o ciclo. Ainda na função de transportador, a porção líquida ou não figurada do sangue, chamada de plasma, contém componentes bioquímicos como eletrólitos, proteínas, hormônios, aminoácidos, lipídios. É também no plasma onde se encontram as imunoglobulinas, que são proteínas especializadas na função de imunidade do organismo contra diversos antígenos. Já na porção figurada encontram-se os elementos celulares: eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Cada grupo celular tem as suas funções características, sendo que os eritrócitos circulam em maior quantidade no sangue periférico, com cerca de 5 milhões de células por  $\text{mm}^3$ , e são os responsáveis pelo transporte da proteína hemoglobina, que realiza as trocas gasosas com os tecidos, os leucócitos são responsáveis pela ação imunológica, sendo considerada a primeira linha de defesa do organismo contra qualquer agente imunogênico e os trombócitos, também conhecidos como plaquetas, com função essencial no processo de coagulação sanguínea. Um adulto saudável possui cerca de 5 a 6 L de sangue, ou

aproximadamente 60 mL por kg de peso corporal (VERRASTRO; LORENZI; WENDEL NETO, 2005; GUYTON; HALL, 2017).

Os componentes celulares do sangue são lábeis e, portanto, são renovados de forma contínua, sendo a medula óssea responsável por esta renovação. Trata-se, portanto de um tecido com grande atividade na proliferação celular uma vez que os eritrócitos possuem vida média de 120 dias, os leucócitos possuem vida média de 12 h e as plaquetas possuem vida média de 7 dias (GUYTON; HALL, 2017).

## **2.2 Leucemias agudas**

Dá-se o nome de leucemia aguda ao conjunto heterogêneo de desordens clonais das células precursoras hematopoiéticas com caráter maligno, também definida como uma neoplasia de células progenitoras do tecido hematopoiético que apresentam importantes alterações morfológicas, moleculares e funcionais (HELMAN et al., 2011). Tais desordens resultam na perda da funcionalidade e também da diferenciação celular, levando a um acúmulo de células anormais e indiferenciadas conhecidas como blastos, vistos na Figura 1 (ESTEY; DOHNER, 2006; RIBAS, 2016), e assim a concentração das células maduras e normais na medula óssea torna-se insuficiente. O fato é conhecido por infiltração medular, comprometendo os setores das três linhagens de células: leucocitário, eritrocitário e plaquetário, levando à neutropenia, anemia e plaquetopenia, respectivamente, que resultam em queda da imunidade e predispõe às infecções e sangramentos, com quadros clínicos importantes e por vezes letais, podendo inclusive infiltrar outros órgãos ou tecidos, causando-lhes danos à anatomia e à fisiologia (ESTEY; DOHNER, 2006).

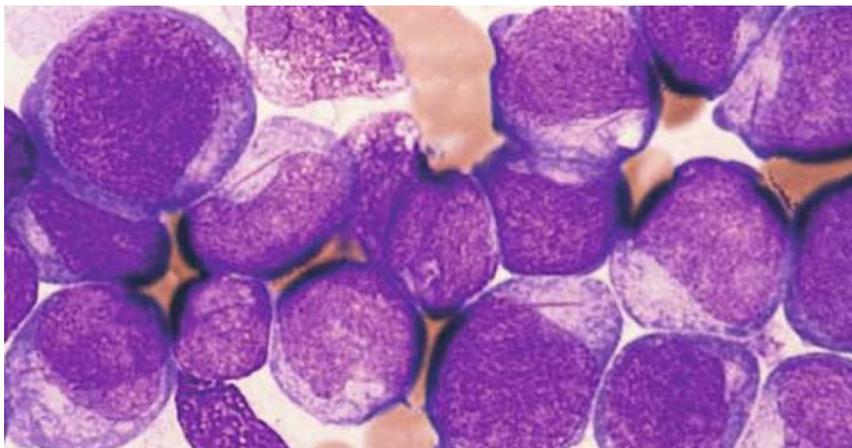


Figura 1 - Imagens de blastos em leucemia mieloide aguda

Fonte: RIBAS, 2016

Embora as leucemias agudas sejam consideradas doenças raras, seus efeitos à saúde são extremamente comprometedores e interferem também nas estatísticas de sobrevivência dos pacientes, sendo responsável pelo óbito em crianças e adultos com menos de 39 anos de idade (DESCHLER; LUBBERT, 2006).

As causas das leucemias agudas ainda não são claras, fato que tem dificultado a prevenção e tratamento, porém sabe-se que em alguns casos fatores genéticos podem estar envolvidos (HAMERSCHLAK, 2008; CASTRO G; BRAGA; YEHA, 2010). O fator genético tem sido considerado como fator de risco, pois quando um indivíduo desenvolve determinado câncer, outros membros da família tornam-se mais predispostos ao desenvolvimento da mesma doença. Contudo, os fatores não genéticos são variáveis entre o meio ambiente e o indivíduo os quais frequentemente podem sofrer mudanças (FENDER et al., 2008; SWERDLOW et al., 2016). Sobre os fatores não genéticos, os ligados aos fatores ambientais, citam-se a dieta, exercícios físicos e a exposição a certas substâncias presentes na vida cotidiana. Alguns desses fatores induzem a processos de modificações nas células saudáveis, levando a uma proliferação com características de neoplasias, tais como a relação entre o tabagismo e o câncer pulmonar (CHAUFFAILLE; BORRI; MARTINS, 2004; HAMERSCHLAK, 2008; SWERDLOW et al., 2016).

Quanto às leucemias, por se tratar de doenças de incidência mundial e com importante taxa de mortalidade, é crescente o interesse pela obtenção de informações quanto à prevenção, investigação diagnóstica, tratamento e monitoramento (CASTRO

M, VIEIRA; ASSUNÇÃO, 2004, OMS, 2018). Nesse sentido, a sociedade científica declara que ao se tratar de câncer é melhor preveni-lo, mas caso não seja possível, faz-se necessário detectá-lo precocemente para aumentar as possibilidades de tratamento. No entanto, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em países de renda média ou baixa, o diagnóstico geralmente se faz tardiamente e serviços paliativos não estão disponíveis à população (BRANCO, 2005; BRITO-SILVA et al., 2014; OMS, 2018).

### 2.2.1 Epidemiologia das leucemias

O câncer é a doença responsável pelo 2º maior número de mortes no mundo, alcançando a marca de 8,8 milhões de mortes por ano (OMS, 2018). As leucemias estão entre as 11 doenças oncológicas em incidência, sendo a 10ª em mortalidade, considerando-se suas apresentações nas formas Linfóide e Mieloide e ainda em suas atividades Agudas e Crônicas (GONZÁLES-SOLÍS et al 2014; OMS, 2018). No Brasil, estima-se que ocorram 10.800 novos casos no ano de 2018, sendo a 9ª doença oncológica mais frequente nos homens e a 10ª nas mulheres (INCA, 2018).

Segundo as Estimativas de Incidência de Câncer no Brasil para o ano de 2018, publicadas pelo INCA, as leucemias atingirão 5.940 homens e 4.860 mulheres, cujas distribuições estão dispostas nas Tabelas 1 a 3 (INCA, 2018).

Tabela 1 - Estimativas do número de casos novos de leucemias para 2018, em homens e mulheres, segundo localização primária, exceto pele

Doença	Homens	Mulheres	Total
Leucemia	5.940	4.860	10.800
Total de Neoplasias	324.580	310.300	634.880
Percentual	2,80%	2,40%	1,70%

Fonte: Instituto Nacional do Câncer, 2018

Tabela 2 - Estimativa do número de casos novos de leucemias para 2018, em homens e mulheres, e suas taxas de incidência, por regiões

Regiões	Casos de leucemias Homens (Absoluto)	Taxa de leucemias Homens (%)	Casos de leucemias Mulheres (Absoluto)	Taxa de leucemias Mulheres (%)
Norte	390	4,17	310	3,29
Nordeste	1.380	4,90	1.090	3,66
Centro-Oeste	390	4,88	320	3,93
Sudeste	2.500	5,79	2.160	4,86
Sul	1.280	8,67	980	6,50

Fonte: Instituto Nacional do Câncer, 2018

Tabela 3 - Estimativas para o ano de 2018 do número de casos novos de leucemias para cada 100 mil habitantes, por Estado da Federação e por sexo

Estados da Federação	Número de casos para cada 100.000 habitantes do sexo masculino	Número de casos para cada 100.000 habitantes do sexo feminino
Acre	5,46	3,59
Alagoas	3,30	3,61
Amapá	3,69	4,14
Amazonas	5,25	4,11
Bahia	4,34	3,09
Ceará	5,73	3,55
Distrito Federal	6,91	5,25
Espírito Santo	5,68	4,06
Goiás	5,82	4,10
Maranhão	4,45	3,24
Mato Grosso	3,74	4,47
Mato Grosso do Sul	5,19	4,48
Minas Gerais	5,03	4,21
Pará	3,85	3,81
Paraíba	4,54	4,35
Paraná	8,05	5,53
Pernambuco	4,60	3,24
Piauí	5,72	4,11
Rio de Janeiro	5,64	4,36
Rio Grande do Norte	6,80	3,79
Rio Grande do Sul	8,72	5,71
Rondônia	5,43	3,64
Roraima	7,19	2,02
Santa Catarina	8,30	5,41
São Paulo	5,85	4,64
Sergipe	4,31	3,52
Tocantins	4,56	4,09

Fonte: Instituto Nacional do Câncer, 2018

### 2.2.2 Etiologia das leucemias

O surgimento da leucemia aguda ainda não tem etiologia definida, mas alguns estudos relacionam o desenvolvimento da doença com alguns fatores indutores como a exposição prolongada à radiação ionizante, ao benzeno e algumas quimioterapias consideradas citotóxicas (ESTEY; DOHNER, 2006). Gestantes etilistas ou usuárias de drogas e algumas síndromes como Down, anemia de Fanconi e a neurofibromatose, também foram associadas à ocorrência de leucemias agudas em crianças (CHENG; SAKAMOTO, 2005), e ainda a neutropenia congênita também está ligada a um aumento da incidência de síndrome mielodisplásica e leucemia mieloide aguda (VARDIMAN, 2002).

A leucemia mieloide aguda (LMA) familiar é um tipo raro de leucemia herdada, a qual se transmite um cromossomo não sexual de maneira dominante. Certas condições genéticas podem aumentar o risco para LMA como em gêmeos idênticos, filhos de pessoas que tiveram ou têm LMA, possivelmente manifestarão a doença no primeiro ano de vida acometendo a um ou a ambos. No entanto, após o primeiro ano de vida, os gêmeos idênticos, filhos de pacientes com LMA, apresentarão apenas um pequeno aumento do risco de manifestar LMA quando comparados com a população em geral, sugerindo que os fatores ambientais são muito mais importantes que os fatores genéticos para a manifestação da LMA. Porém curiosamente, pode ocorrer o fato de apenas um gemelar de gêmeos idênticos vir a desenvolver leucemia, admitindo-se que a genética é idêntica e as exposições ambientais são similares ou até iguais (SILVA; SILVEIRA; CALLERA, 2006; HAMERSCHLAK, 2008).

### 2.2.3 Formas clínicas das leucemias

A medula óssea produz uma célula hematopoiética pluripotente chamada de célula-tronco, a qual dá origem às diferentes células sanguíneas ao se diferenciar de acordo com as duas linhagens: linfóide e mieloide. As leucemias são inicialmente classificadas, seguindo a nomenclatura destas linhagens, orientadas pelo acometimento celular, sendo portanto conhecidas as leucemias linfóide e mieloide, e ainda considerando-se o tempo de desenvolvimento para cada distúrbio, sendo as de

desenvolvimento rápido e mais agressivo, chamadas de leucemias agudas e aquelas que se desenvolvem mais lentamente e com menor agressividade aos pacientes, são chamadas de leucemias crônicas (BROWMAN; NEAME; SOAMBOONSRUP, 1986; INCA, 2018).

Embora tenham suas causas não esclarecidas, foram observadas algumas características que se mantêm para cada linhagem, como exemplo, a leucemia linfóide aguda (LLA) é mais prevalente em crianças, ao passo que a leucemia mieloide aguda (LMA) é mais comum em adultos e geralmente com células da linhagem granulocítica, podendo raramente acometer células eritróides e megacariocíticas (LOWENBERG; BURNETT, 2003; ESPARZA; SAKAMOTO, 2005). No entanto, podem apresentar semelhanças em seus quadros clínicos, tais como linfadenopatias, hepatomegalia, esplenomegalia e febre, ainda que a linfadenopatia seja mais evidente em LLA comparada à LMA, apresentam acumulações celulares sólidas extra-medulares como o cloroma. Devido ao comprometimento do setor megariocítico, ambas as formas clínicas de leucemias podem promover aos pacientes sinais como petéquias, epistaxe, equimoses e sangramento gengival e intestinal, sendo também comprometido o setor eritrocitário, com a ocorrência de anemia, astenia e fadiga (ESPARZA; SAKAMOTO, 2005; CHENG; SAKAMOTO, 2005).

#### 2.2.4 Classificação das leucemias

Atualmente existem dois sistemas de classificação para as leucemias, ficando a critério do hematologista a opção por um deles; no entanto, vale ressaltar que a classificação padronizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) tem sido mais amplamente utilizada (HAFERLACH et al., 2007).

O sistema de classificação mais antigo, chamado Franco-Americano-Britânico (FAB) faz a divisão das classes e sub-classes de leucemias agudas, avaliando características morfológicas e citoquímicas, no qual há como critério fundamental para se definir o diagnóstico a presença de mais de 30% de blastos em relação às células nucleadas da medula óssea (HAFERLACH et al., 2007; ZERBINI et al., 2011).

Pelo FAB, a LLA é classificada em 3 tipos, a saber: L1, L2 e L3. Epidemiologicamente, L1 é a classe mais comum em crianças, sendo a L2 a mais

comum em adultos e L3, chamada de linfoma de Burkitt, também de maior prevalência na infância. No entanto, no que se refere à aspectos clínicos e tratamento, não existem diferenças entre as classes. Para melhor visualização e organização, as classes de LLA e suas características morfológicas estão apresentadas na Tabela 4 (FARIAS; CASTRO, 2004; HAFERLACH et al., 2007).

Tabela 4 - Classificação Franco-Americano-Britânica (FAB) das leucemias linfóides agudas

Classificação	L1	L2	L3
Tamanho da célula	Pequenas (predominantemente)	Variável	Grandes (predominantemente)
Padrão de cromatina	Heterogêneo	Variável	Variável
Forma nuclear	Regular	Irregular com clivagem frequente	Irregular, geralmente ovalado
Nucléolo	Ausente ou pouco visível	Proeminentes e múltiplos	Proeminentes e múltiplos
Relação Núcleocitoplasmática	Elevada	Variável	Baixa
Basofilia de citoplasma	Fraca	Variável	Intensa
Vacuolização	Variável	Variável	Proeminente

Fonte: FARIAS; CASTRO, 2004

Para a LMA, doença que apresenta maior variedade citológica e clínica, o sistema de classificação FAB sub-classifica 8 subtipos, de M0 a M7 que são apresentadas na Tabela 5 (BENNETT et al., 1976; HAFERLACH et al., 2007; ZERBINI et al., 2011).

Tabela 5 - Classificação Franco-Americano-Britânica (FAB) das leucemias mielóides agudas

Sub-classes de LMA	Critérios para a diferenciação
M0 - LMA com diferenciação mínima	MPO+ por método imunológico ou ultra estrutural; CD13+ ou CD33+ ou CD11b+
M1 - LMA sem maturação	MPO+ em mais de 3% de blastos; blastos mais de 90% das células nucleadas da MO
M2 - LMA com maturação	Blastos entre 30 e 90% das células nucleadas da MO; componente monocítico <20%
M3 - Leucemia promielocítica aguda	Predomínio de promielócitos anormais
M4 - Leucemia mielomonocítica aguda	Blastos entre 30 e 90% das células nucleadas da MO; componente monocitário na MO entre 20 e 80%; >5000monócitos/mm <sup>3</sup> no SP
M5 - Leucemia monocítica aguda	Componente monocítico >80% das células não eritróides
M6 - Leucemia eritróide aguda	Eritroblastos >50% das células nucleadas da MO Blastos >20% das células não eritróides
M7 - Leucemia megacariocítica aguda	Megaloblastos >20% das células nucleadas da MO (por método imunológico ou ultra-estrutural)

Fonte: MARTINS; FALCÃO, 2000

A partir de 2001, vendo a necessidade de atualização e aperfeiçoamento das classificações das leucemias agudas, a OMS instituiu novos critérios de diferenciação das classes baseados em citogenética, morfologia e imunofenotipagem, tendo sido atualizada em 2008 (CHENG; SAKAMOTO, 2005; SWERDLOW et al., 2016). Desde então, passaria a ser considerado leucemia aguda o caso em que o paciente apresentasse pelo menos 20% de blastos e paciente que apresentasse anemia refratária com blastos em excesso, o qual no sistema FAB era classificado como síndrome mielodisplásica. A Tabela 6 mostra a classificação OMS, que além de fazer avaliação morfológica, utiliza-se também das técnicas citogenéticas, biomoleculares e imunofenotípicos para a classificação das leucemias e suas frequências aproximadas (CHENG; SAKAMOTO, 2005).

Tabela 6 - Classificação das leucemias agudas segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e sua frequência aproximada

Categoria	Frequência (%)
<b>Leucemias mieloides agudas</b>	
LMA com t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO)	5-12
LMA com inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH11)	10-12
Leucemia promielocítica aguda (LMA com t(15;17)(q22;q12),(PML/RARα)	5-8
LMA com alterações do 11q23	5-6
<b>LMA com displasia de múltiplas linhagens</b>	
Com síndrome mielodisplásica prévia	Variável
Sem síndrome mielodisplásica prévia	Variável
<b>LMA e síndrome mielodisplásica associada à quimioterapia</b>	
Associada a agentes alquilantes	Variável
Relacionada a inibidores da topoisomerase II	Variável
LMA sem outra categorização	
LMA minimamente diferenciada	5
LMA sem maturação	10
LMA com maturação	30-45
Leucemia promielocítica aguda sem rearranjo RARα	Variável
Leucemia mielomonocítica aguda	15-25
Leucemia monoblástica e monocítica aguda	3-6
Leucemia eritróide aguda	5-6
Leucemia megacariocítica aguda	3-5
Leucemia basofílica aguda	Rara
Pan-mielose aguda com mielofibrose	Rara
Sarcoma mielóide	Rara
<b>Leucemias linfóides agudas</b>	
Leucemia/ linfoma linfoblástico de precursor B	Variável
Leucemia/ linfoma linfoblástico de precursor T	Variável
Leucemia/ linfoma de Burkitt	Variável
<b>Leucemias agudas de linhagens ambíguas</b>	
Leucemia aguda bifenotípica	1-2
Leucemia aguda indiferenciada	Variável

Fonte: SWERDLOW et al., 2016

### 2.2.5 Fatores indutores das leucemias

Alguns vírus estão entre os fatores indutores para o desenvolvimento de leucemias, como o retrovírus C que podem ter ação direta na oncogênese, a exemplo do vírus Epstein-Barr (EBV), vírus linfotrópico da célula humana (HTLV) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (TAKATSUKI; MATSUOKA; YAMAGUCHI, 1996).

Quanto ao EBV, é clinicamente diferenciado dos demais vírus, quando ocorre a LMA *de novo* ou primária, pois se desenvolve sem outro fator de risco conhecidamente envolvido e a secundária ocorre após paciente ter sido exposto a agentes estimuladores da leucogênese. São quadros de LMA que surgem em pacientes predispostos, como portadores de síndromes mielodisplásicas (SMD), mieloproliferativas (SMP) e doenças hereditárias. Este tipo de leucemia é de pior prognóstico, onde são comuns algumas alterações citogenéticas (LOWENBERG; DOWNING; BURNETT, 1999; HEANEY; GOLDE, 1999).

Quando se relacionam componentes químicos às doenças leucemogênicas, o benzeno e o tolueno são exemplos clássicos e já foram descritos casos de LMA em trabalhadores expostos por tempo moderado à tais componentes, tendo o diesel também sido apontado e comprovado como causador da doença (CARVALHO; PEDROSA; SEBASTIÃO, 2011).

Até mesmo a quimioterapia pode ser responsável por alterações no genoma, causando mutações, deleções ou translocações que interferem na produção das células hematopoiéticas. Os alquilantes foram inicialmente relacionados à LMA iniciando com quadros mielodisplásicos, evoluindo para displasia dos três setores da medula. Na citogenética, as alterações mais comuns são: monossomia do cromossomo 7, deleção de uma parte do braço longo do cromossomo 7, trissomia do 8 ou deleção de parte do braço longo do 5 (BAHIA, et al., 2002). Mas posterior a eles, um subtipo de leucemia secundária foi descrito em pacientes que tiveram exposição a inibidores da topoisomerase II, tais como antracíclicos, actinomicina e epipodofilotoxinas. Neste caso, a LMA secundária foi caracterizada por existir um intervalo de tempo muito pequeno entre o tratamento e a doença, por vezes sem displasias celulares. Também são observados rearranjos no cromossomo 11 (translocação 9;11), translocação 8;21 (SILVA et al., 2006).

Na epidemiologia das leucemias, também foram descritas causas referentes à exposição à radiação ionizante. O fato passou a ter relevância após serem realizados estudos sobre os efeitos da bomba atômica lançada pelos Estados Unidos na Segunda Guerra Mundial atingindo o Japão. Os japoneses começaram a apresentar alterações no sistema hematopoiético, fato que também foi observado após o acidente radioativo de Chernobyl (OKUNO, 2009). Após a irradiação, a LMA se desenvolve por fases, iniciando por fase pré-leucêmica, seguida por aberrações cromossômicas, com baixa taxa de sucesso no tratamento assim como na sobrevida. Porém a leucemia mieloide crônica (LMC) aparece como a leucemia mais comum nos sobreviventes das bombas atômicas (BOLLMANN; del GIGLIO, 2011).

Embora fatores ambientais sejam descritos como influenciadores no desenvolvimento de leucemias, a hereditariedade apresenta um importante papel e algumas síndromes cromossômicas como Down e Klinefelter estão relacionadas à leucemias na infância. Algumas deficiências genéticas podem causar erros em enzimas de reparo no DNA, elevando as taxas de leucemias (HAMERSCHLAK, 2008). Na neurofibromatose os pacientes são mais predispostos a LMA e LMC, pois apresentam o gene NF1 (no braço longo do cromossomo 17) com função de supressão tumoral (HAMERSCHLAK, 2008).

O tabagismo tem estado entre os principais fatores indutores de neoplasias, incluindo a LMA, tendo efeitos agudos e crônicos, podendo resultar em óbito. São comuns quadros pré-leucêmicos e anomalias cromossômicas, refratários ao tratamento e com curta sobrevida em tabagistas (PINTO; PICHON-RIVIERE; BARDACH, 2015).

#### 2.2.6 Diagnóstico das leucemias

O diagnóstico das leucemias tem início a partir das análises qualitativa e quantitativa das células do sangue periférico através do hemograma, o qual pode evidenciar alterações sugestivas de desordens hematológicas, auxiliando o clínico a direcionar o diagnóstico através de exames maior sensibilidade e especificidade, como o mielograma e as análises citoquímicas realizadas tanto em esfregaço de sangue periférico como em sangue medular. Os hematologistas consideram ainda imprescindíveis os exames de imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular, os

quais permitem classificar de forma assertiva a doença e também definir a terapia adequada (BELSON; KINGSLEY; HOLMES, 2006, SOSSELA; ZOPPAS; WEBER, 2017).

O mielograma, que é obtido a partir da análise morfológica do aspirado medular, é capaz de diferenciar as leucemias em aproximadamente 80% dos casos (BROWMAN; NEAME; SOAMBOONSRUP, 1986). Na amostra medular, a diferenciação em blastos leucêmicos mieloides pode ser feito por exames citoquímicos como a mieloperoxidase e a esterase, porém não são colorações específicas. Frente a estas incertezas, na prática atual, os hematologistas têm solicitado em grande número a imunofenotipagem realizada por citometria de fluxo (SILVA et al., 2006, HELMAN et al., 2011). Este exame é capaz de discriminar as diferentes populações celulares tomando como parâmetros: tamanho, granulação e padrão de expressão de antígenos de superfície e citoplasmáticos, ao utilizar anticorpos específicos que os reconhecem em células hematopoiéticas normais e leucêmicas. O intuito deste teste é fazer uso de um painel de anticorpos específicos contra tais antígenos e de acordo com as suas interações, possibilitar fazer a diferenciação das linhagens acometidas em mielóide ou linfóide, sendo esta última marcada com agentes B ou T (MARTINS; FALCÃO, 2000). A imunofenotipagem é capaz ainda de identificar o estágio de maturação das células blásticas, refinando as classificações em sub-classes de LLA como pró-B, comum, pré-B ou B madura. O teste pode também classificar as leucemias agudas em bifenotípicas, aquelas que expressam marcadores específicos de duas linhagens simultaneamente (MARTINS; FALCÃO, 2000; ERRANTE; FRAZÃO; CONDINO NETO, 2013).

Quanto ao envolvimento de fatores genéticos nas leucemias, o exame citogenético da medula óssea possibilita a identificação de alterações cariotípicas clonais expressas nos blastos leucêmicos. Este exame tem tanta importância que a partir da interpretação de seus resultados, são feitos diagnósticos específicos de leucemias agudas e seus prognósticos (HELMAN et al., 2011, VELLOSO et al., 2011). Em alguns casos onde o exame citogenético apresentou um cariótipo normal, ainda é possível que exames de Biologia Molecular possam identificar mutações no genoma celular que justifiquem o desenvolvimento de leucemias, no entanto, apesar destas técnicas representarem um rol de exames conclusivos para o diagnóstico das leucemias, são exames de procedimentos técnicos complexos e de respostas demoradas para a obtenção dos resultados, o que

impacta diretamente no início do tratamento dos pacientes (ERRANTE; FRAZÃO; CONDINO NETO, 2013).

### 2.2.7 Leucemia linfóide aguda

A epidemiologia das leucemias mostra que a LLA é o câncer de maior prevalência na infância, representando cerca de 30% de todas as neoplasias em crianças menores de 15 anos, tendo pico máximo de incidência entre os 2 e 5 anos, sendo raro na adolescência, juventude e adultos, porém voltando a ter importantes números após os 60 anos de vida (BELSON; KINGSLEY; HOLMES, 2006; SALLAN, 2006; DANTAS et al., 2015).

#### 2.2.7.1 Fatores prognósticos

Para a LLA, a idade tem papel importante no prognóstico, uma vez que sobrevida global tem tendências decrescentes conforme a faixa etária vai avançando, alcançando margem entre 34% e 57% para pacientes com idades menores de 30 anos e entre 15% e 17%, em para pacientes com idades superiores a 50 anos de vida (HAMERSCHLAK et al., 2006; HAMERSCHLAK, 2008). Quanto à cura, a estimativa é de que 80% dos acometidos até 5 anos de idade possam evoluir para cura pós tratamento quimioterápico intensivo, enquanto o índice cai para próximo de 20% em adultos também tratados (ZANICHELLI; COLTURATO; AIRO SOBRINHO, 2010).

A contagem de leucócitos no momento do diagnóstico é também um fator de extrema importância para o prognóstico, sendo considerados de pior prognóstico quantidades acima de 30.000/mL e 100.000/mL, para imunofenótipos B e T, respectivamente (LEITE et al., 2007; DANTAS et al., 2015; GARDIN et al., 2007).

Na Alemanha, um grupo multicêntrico chamado *German Multicenter Acute Lymphoid Leukemia - GMALL Study Group* realizou um estudo de sobrevida global em 60 meses em pacientes diagnosticados como LLA com precursor B (LLA pré-B/superior a 30.000/mL no momento do diagnóstico) e as taxas de sobrevida foram entre 19% e

29%, tomando-se como base a leucometria como principal fator (GÖKBUGET et al., 2000; BIONDI, 2003).

Segundo o GMALL, para alguns subgrupos, o transplante de medula óssea (TMO) também conhecido por transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (TACTH) parece ser uma alternativa ao tratamento, em especial para aqueles que são de ruim prognóstico como no caso da LLA pró-B associada a t(4;11) e estão em primeira remissão completa (RC) (GÖKBUGET; HOELZER, 2009; ZANICHELLI; COLTURATO; AIRO SOBRINHO, 2010). Portanto, algumas alterações citogenéticas estão diretamente relacionadas aos prognósticos como nos casos de LLA comum e LLA pré-B, com t(9;22) e expressão do CD10, comum em adultos. Pacientes com t(9;22) e co-expressão CD13 e CD33 têm apresentado sobrevida menor que 10% após 5 anos de diagnóstico e tratamento quando tratados exclusivamente com quimioterapia, porém ao associar quimioterapia com mesilato de imatinibe, pacientes têm apresentado remissão completa e remissão molecular do gene BCR-ABL em aproximadamente 95% e 50% dos casos, respectivamente, além de reduzir de forma significativa as recidivas, dando condições de transplantes a estes pacientes com boas chances de sucesso ao procedimento. Porém o mesmo não ocorre com pacientes diagnosticados como LLA madura com alterações (8q24), para os quais a evolução do quadro é ruim (OTTMANN, 2005; HAFERLACH et al, 2007; THOMAS, 2007; GÖKBUGET; HOELZER, 2009).

Nas LLAs de linhagem T, são conhecidas as subclasses: precoce, tímica e madura, tendo a subclasse tímica melhor prognóstico do que as demais, com sobrevida livre de doença (SLD) próximo de 63% e mesmo assim, as 3 subclasses apresentam melhor prognóstico quando comparadas às LLAs de linhagens B, pois apresentam 80% de RC e SLD superior a 50% (GÖKBUGET; HOELZER, 2009).

Um estudo realizado pelo *Medical Research Council/Eastern Cooperative Oncology Group* (MCR/ECOG), com 1522 leucêmicos adultos, reforçou a importância da pesquisa citogenética ao diagnóstico para a definição prognóstica sem diferenciação dos resultados, ao considerar fatores variáveis como gênero, leucometria, faixa etária e imunofenotipagem, conforme a Tabela 7 (MOORMAN et al., 2007).

Tabela 7 - Classificação de risco baseada no cariótipo de pacientes com leucemia linfóide aguda

Estratificação de Risco	Cariótipo ao Diagnóstico
Alto risco	t(9;22), t(4;11)(q21;q23), t(8;14) (q24.1;q32), cariótipo complexo (definido cinco ou mais alterações cromossômicas), hipodiploidia - entre 30 e 39 cromossomos e triploidia - 60 a 78 cromossomos
Risco intermediário	Outras alterações
Baixo risco	del(9p) e hiperdiploidia (51 a 65 cromossomos)

Fonte: MOORMAN et al., 2007

### 2.2.7.2 Tratamento da LLA

Basicamente, o tratamento inicia-se com medicamentos indutores da remissão como citarabina, daunorrubicina e associações com corticoides, vincristina e L-asparaginase. Após esta fase, administração dos medicamentos por tempo prolongado pode promover intensa neutropenia e suas conseqüências como a imunodepressão e aplasia medular, sendo eletivo o uso de quimioterapia com menor grau de toxicidade à medula óssea (GÖKBUGET, HOELZER, 2009; CL. DAUNORRUBICINA, 2013; ARACYTIN, 2013). Estudos mostram que esta terapia pode levar a uma RC a cerca de 74% e 93%, com sobrevida global (SG) em 60 meses entre 30% e 48% em adultos e 85% em crianças entre um e nove anos, aproximadamente (CHESSELLS, 1998; ROWE, 2005; GÖKBUGET; HOELZER, 2009).

Os esquemas quimioterápicos de consolidação e manutenção seguem protocolos específicos no intuito de evitar recidivas, contudo a reindução tem mostrado melhora nas taxas de sobrevida que também têm se apresentado favoráveis quando os esquemas terapêuticos mantêm suas doses e periodicidades (PUI; EVANS, 2006; GÖKBUGET; HOELZER, 2009; CALLERA et al., 2013).

Deve-se ainda uma atenção especial à doença residual mínima (DRM), que seria um estágio onde a doença não está completamente ausente, mas como o próprio nome sugere, ainda mantém vestígios residuais de suas atividades, sendo apontadas pela presença de células ativas por técnicas moleculares e de citometria de fluxo, sendo portanto, motivo de preocupação entre os grupos de assistência (MORTUZA, 2002; BRAZIEL, 2003). Por isso as recidivas podem ser monitoradas ou previstas de forma

mais eficiente com a pesquisa de DRM, pois também é um indicador da resposta à quimioterapia durante a fase de consolidação, além de possibilitar a classificação de risco e as formas terapêuticas, em altas ou baixas doses, em períodos curtos ou mais prolongados (MORTUZA, 2002; GÖKBUGET; HOELZER, 2009).

#### 2.2.8 Leucemia mieloide aguda

A LMA é a leucemia mielóide mais comum em adultos, representando aproximadamente 80% das leucemias nesta fase da vida, com incidência de 3,8 casos/100.000 habitantes nos Estados Unidos, sendo 17,9 casos/100.000 habitantes em pessoas acima de 65 anos e mortalidade de 2/100.000 habitantes, com incidência aproximada de 20% em jovens com prevalência em homens (DESCHLER; LÜBBERT, 2006; LEYTO-CRUZ, 2018).

Trata-se de doença clonal com elevada agressividade, pois as células sofrem comprometimento na maturação e conseqüentemente na função, tendo proliferação acelerada, acumulando grande quantidade de células anormais dentro da medula óssea, reduzindo o espaço para as células saudáveis. Quando a concentração destas células anormais alcança um limiar dentro da medula óssea, são liberadas para a corrente sanguínea, porém ainda há a persistência das células progenitoras e da própria célula-tronco dentro do ambiente medular pois as mutações sofridas por elas fazem com que adquiram capacidade de auto-renovação, como se vê na Figura 2 (DOHNER et al., 2009).

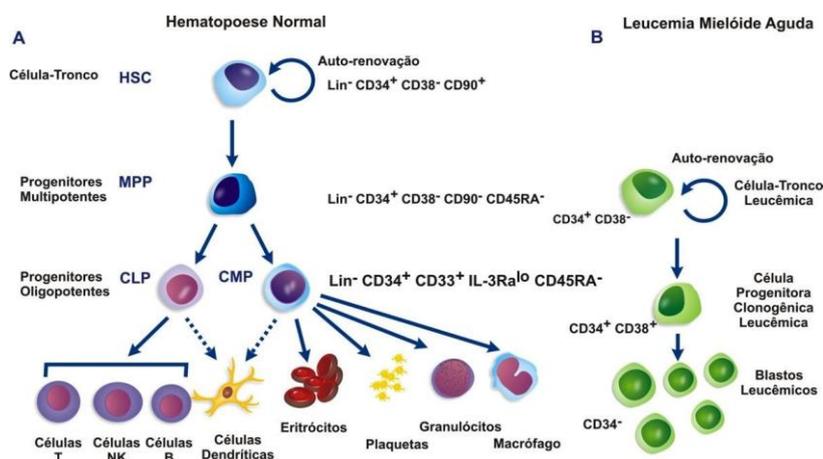


Figura 2 - Esquema do sistema hematopoiético normal (A) e Leucemia Mielóide Aguda (B) Fonte: GUIMARÃES, 2015

Dentre os novos critérios adotados pela OMS para a classificação das leucemias, está a quantificação de blastos que foi reduzida de 30 % na FAB para 20% na OMS tanto em sangue periférico quanto no aspirado medular, e suas sub-classificações são apresentadas na Tabela 8 (CALLERA et al., 2006; HAFERLACH et al., 2007; PLACKE et al., 2014).

Tabela 8 - Classificação das leucemias agudas segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e sua frequência aproximada de alterações citogenéticas

Leucemias	Alterações e Achados
LMA com anomalias genéticas	<p>Presença do rearranjo t(8;21)(q22;q22), resultando em proteína de fusão AML1-ETO</p> <p>Presença do rearranjo 11q23, envolvendo o gene MLL</p> <p>Leucemia promielocítica aguda com o rearranjo t(15;17)(q22;q12), resultando em fusão PML-RARA e variantes</p> <p>Presença de eosinófilos anormais no sangue medular com rearranjo inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22), resultando em fusão CBF-MYH11</p>
LMA com displasias em múltiplas linhagens celulares	<p>Por decorrência de síndrome mielodisplásica (SMD) ou doença mielodisplásica/mieloproliferativa (MDS/MPD)</p> <p>Não-decorrente de SMD ou MPD, porém, apresentando ao menos 50% de células displásicas em duas ou mais linhagens mielóides</p>
LMA e MDS em decorrência de terapias	<p>Com presença de agentes alquilantes/radiação</p> <p>Com presença de inibidores de Topoisomerase II</p>
Outras	Quando nenhuma das anteriores pode ser atribuída

Fonte: VARDIMAN, 2002

### 2.2.8.1 Fatores prognósticos

O cariótipo está intimamente relacionado ao prognóstico das leucemias, pois os achados como alterações citogenéticas são determinantes para a conduta terapêutica, especialmente na fase de consolidação (MRÓZEK; HEEREMA; BLOOMFIELD, 2004).

Alguns grupos de estudos e pesquisas como o *Southwest Oncology Group* (SWOG) e o *Medical Research Council* (MRC) classificaram os prognósticos dos pacientes com leucemias mieloides agudas, de acordo com os achados citogenéticos, sendo que para MRC são necessárias pelo menos 5 anormalidades em um cariótipo complexo, enquanto para o SWOG bastam 3 alterações, conforme são demonstrados na Tabela 9 (SLOVAK et al., 2000; MRÓZEK; HEEREMA; BLOOMFIELD, 2004).

Tabela 9 - Classificação de prognóstico por SWOG e MRC

Prognóstico	SWOG	MRC
Favorável	inv(16) / t(16;16) / del(16) t(15;17) com qualquer alteração associada t(8;21) na ausência de del(9q) ou complexo	inv(16) t(15;17), t(8;21) com ou cariótipo sem alterações associadas
Intermediário	+8, -Y, +6, del(12p), cariótipo normal	cariótipo normal, 11q23,+8, del(9q), del(7q), +21, +22 e outras alterações não incluídas nos outros dois grupos
Desfavorável	del(5q)/-5, del(7q) /-7, inv(3q), 11q, 20q, 21q, del(9q), t(6;9), t(9;22), cariótipo complexo	del(5q)/-5, -7, 3q, cariótipo complexo
Desconhecido	Todas as outras alterações	Categoria não reconhecida

Fonte: MRÓZEK; HEEREMA; BLOOMFIELD, 2004

Tais alterações citogenéticas referem às respostas terapêuticas nas fases de indução e pós-remissão, uma vez que a MRC destaca-se na remissão e SWOG na sobrevida pós-RC (SLOVAK et al., 2000). Alguns cariótipos específicos, associados à terapêutica alvo-molecular, como o uso do ácido transretinóico, têm melhorado a resposta e sobrevida em pacientes com LMA-M3 (MENG-ER et al., 1989; SANZ, 2006). Da mesma forma, o protocolo de citarabina em altas doses e com mais ciclos tem melhorado significativamente a sobrevida naqueles pacientes com t(8;21) ou

t(16;16)/inv(16), porém o mesmo não pôde ser confirmado em pacientes com prognósticos ruins (BYRD et al., 1999; MRÓZEK; HEEREMA; BLOOMFIELD, 2004;).

Atualmente dois importantes genes têm sido alvo de estudos e correlacionados aos prognósticos em LMA, pois a identificação da atividade ou inibição destes genes podem contribuir para a opção terapêutica de forma específica, uns deles é o *Fetal Liver Tyrosine Kinase* (FLT3), considerada a principal alteração molecular com relevância no prognóstico, pois é positiva em 28% a 34% dos pacientes com cariótipo normal e está associada menor tempo de RC, sobrevida livre de eventos (SLE) e sobrevida global (SG). Outro gene conhecido por nucleofosmina, fosfoproteína nucleolar B23 ou numatrina (NPM1) apresenta mutações mais frequentes em pacientes com cariótipo normal, entre 46% a 62% dos casos. Enquanto o FLT3 duplicado em tandem parece impedir a maturação das células hematopoiéticas, o NPM-1 favorece a atuação de ácidos retinóicos, de forma que a ausência de FLT3 e presença de NPM-1 na terapia pós-remissão, levam os pacientes a uma melhor evolução clínica (BIENZ, 2005; AVIVI; ROWE, 2005; ESTEY; DOHNER, 2006; MROZEK et al., 2007; PATEL et al., 2012).

#### 2.2.8.2 Tratamento da LMA

Apesar de suas causas ainda não serem totalmente conhecidas, os estudos mais recentes sobre a fisiopatologia desta doença vêm trazendo novas informações que convergem para alterações genéticas e moleculares, fatores estes imprescindíveis para a decisão diagnóstica, e conseqüentemente, a escolha da conduta terapêutica segundo os protocolos de tratamento para leucemias (VARDIMAN, 2002; PELLOSO et al., 2003; CALLERA et al., 2013).

No Brasil, o custo elevado para estruturar um centro diagnóstico genético e molecular e a escassez de mão de obra especializada e capaz de realizar as técnicas de maneira eficiente e segura, diminuem as chances de haver um conhecimento prognóstico dos diferentes casos de LMA e o início imediato de um tratamento direcionado (VARDIMAN, 2002; PELLOSO et al., 2003; RAVANDI, 2011; HELMAN et al., 2011).

Iniciar um tratamento baseado em suspeita clínica pode tornar o medicamento um gatilho para o desencadeamento de alterações genéticas que irão levar a uma leucemia de fato, daí a importância em haver, no mínimo, uma definição de que o caso em questão é realmente uma leucemia ou não. Foi o que ocorreu com uma paciente de 64 anos, diagnosticada inicialmente com síndrome de hipereosinofilia idiopática e vasculite, tratada com ciclofosfamida por 10 anos e nos últimos 3 anos, associada à azitioprina, totalizando 306 g e 236 g, respectivamente. Neste estudo de caso, ambas as medicações foram relacionadas ao desenvolvimento de uma LMA, sendo a azitioprina, considerada pelo autor a droga mais provável causadora da doença, pois ciclofosfamida havia sido descontinuada ao longo do tempo. Outros 40 casos envolvendo azitioprina e LMA foram descritos e alguns demonstraram a translocação do braço der(1;7)(q10;p10) (PARK et al., 2008).

Em 2013, um grupo de médicos onco-hematologistas da região do Vale do Paraíba, SP, coordenados pelo Dr. Fernando Callera, publicou um Manual de Condutas em Doenças Onco-Hematológicas do Adulto, elaborado após estudos realizados em seus próprios casos, tomando como base o Centro Oxford para Medicina Baseada em Evidências. Os protocolos para o tratamento das leucemias já estão bem estabelecidos, como se demonstrou neste Manual de Condutas, com protocolos para fases de indução da remissão, consolidação e manutenção, sendo que a indução da remissão é indicada para início o mais precocemente possível. No entanto, o tempo médio para o diagnóstico diferencial das leucemias, feito através das técnicas convencionais celulares, citogenéticas, imunoquímicas e imunofenotípicas, é realizado em aproximadamente 5 a 7 dias, e neste período o paciente é mantido apenas sob tratamento sintomático, permitindo que as células neoplásicas se proliferem livremente na medula óssea. Considerando o fato de que iniciar um tratamento de indução da remissão pode causar efeitos nocivos ao paciente, caso a suspeita de leucemia não se confirme, e considerando ainda, o quanto benéfico é iniciar a indução da remissão no menor tempo possível, os médicos do Grupo de Onco-Hematologia do Vale do Paraíba, baseados em suas próprias experiências, constataram que é possível iniciar o tratamento com medicamentos que apresentam eficácia contra os distúrbios medulares de ambas as linhagens celulares, linfóide e mieloide, uma vez confirmada a hipótese diagnóstica de leucemia (CALLERA et al., 2013).

### **2.3 Indução da remissão para LMA e LLA**

Inicialmente, faz-se necessário induzir a remissão da medula óssea, alcançando-se a RC, para que a medula possa voltar a produzir células saudáveis, as quais tiveram crescimento e maturação inibidos e foram substituídas pela intensa proliferação de células blásticas. Isto faz com que o paciente possa recuperar um nível mínimo de saúde que lhe dê condições de defesa, metabolismo geral e suporte para a segunda fase do tratamento, chamada de consolidação (HELMAN et al., 2011). Alguns protocolos terapêuticos aplicados com a finalidade de RC demonstram que a associação de diferentes medicamentos (poliquimioterapia) tem apresentado sucesso no seu objetivo (INCA, 2018). No entanto, em um primeiro momento, a administração associada de medicamentos que tenham ação sobre as linhagens mieloide e linfóide pode iniciar a terapia de indução de remissão, desde que o diagnóstico de leucemia aguda esteja estabelecido, enquanto se aguarda o diagnóstico diferencial para então associar mais drogas ativas e posteriormente avançar para os protocolos de consolidação e possivelmente manutenção.

A Tabela 10, adaptada do Manual de Conduas em Doenças Onco-Hematológicas do Adulto, demonstra de maneira simplificada as intervenções medicamentosas para os tratamentos de indução de remissão para LMA e LLA e algumas drogas ativas como citarabina e cloridrato de daunorrubicina que possuem ação sobre ambas as linhagens celulares (CALLERA et al., 2013).

Tabela 10 - Tratamentos de indução de remissão para LMA e LLA, adaptado do Manual de Condutas em Doenças Onco-Hematológicas do Adulto

	LMA	LLA
Não Promielocítica e Bifenotípica em pacientes $\leq$ 65 anos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Citarabina 100 a 200 mg/m<sup>2</sup> IV em 24h do D1 - 7</li> <li>- Idarrubicina 12mg/m<sup>2</sup> IV em 1h D1, D3 e D5 ou Daunorrubicina 50 a 90mg/m<sup>2</sup> D1 ao D3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ciclofosfamida 1200a, IV por 1 dia</li> <li>- Daunorrubicina, 45 mg/m<sup>2</sup> IV por 3 dias</li> <li>- Vincristina, IV 2 mg D1, D8, D15 e D22</li> <li>- Citarabina, 75 mg/m<sup>2</sup> SC, do D1 - D4</li> <li>- Prednisona, IV ou VO, 60 mg/m<sup>2</sup> por dia do D1 ao D21</li> <li>- L-Asparaginase, SC, 6000 U/m<sup>2</sup> D5, D8, D11, D15, D18, D22</li> </ul>
Não Promielocítica e Bifenotípica em pacientes $>$ 65 anos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Citarabina 100 a 200 mg/m<sup>2</sup> IV em 24 h do D1 ao D5 ou D1 ao D7 e Idarrubicina 12 mg/m<sup>2</sup> IV em 1h no D1 e D3 ou D1, D3 e D5 ou Daunorrubicina 45 a 60 mg/m<sup>2</sup> do D1 ao D2 ou D1 ao D3</li> <li>- Ciclos de Citarabina em baixas doses, 20 mg/m<sup>2</sup>, via SC, por 7 a 10 dias</li> <li>- Azacitidina 75 mg/m<sup>2</sup>, via SC do D1 ao D5 ou do D1 ao D7</li> <li>- Decitabina 20 mg/m<sup>2</sup> IV em 1h do D1 ao D5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Profilaxia do SNC - Irradiação craniana, 2400 cGy, D1 ao D12</li> <li>- Methotrexato, IT 15 mg, D1, D8, D15, D22, D29</li> <li>6-mercaptopurina, VO 60 mg/m<sup>2</sup> por dia, D1 ao D70</li> </ul>

Fonte: CALLERA et al., 2013

## 2.4 Espectroscopia Raman

O espalhamento Raman é um fenômeno resultante de uma distorção transitória dos elétrons em uma nuvem eletrônica molecular. Quando uma molécula é excitada pela interação com a radiação laser, ocorre distorção momentânea dos elétrons em suas camadas eletrônicas, chamado momento de dipolo da molécula induzido pelo laser, que é a polarização da molécula pelo campo elétrico da radiação incidente. No entanto, a excitação molecular alcança apenas níveis vibracionais virtuais, estando estes, inferiores às camadas eletrônicas (SALA, 2003, SMITH; DENT, 2013). No efeito Raman, portanto, a distorção da nuvem eletrônica depende do momento de dipolo induzido pelo

campo elétrico incidente e a polarizabilidade da nuvem eletrônica da molécula deve variar durante a vibração para que as moléculas sejam Raman ativas (SALA, 2003).

Considera-se espalhamento elástico ou Rayleigh quando a luz espalhada e a luz incidente possuem o mesmo comprimento de onda. Porém, dá-se o nome de espalhamento inelástico ou Raman quando uma proporção desta luz espalhada apresenta comprimento de onda diferente daquela que incidiu sobre a molécula, resultando em fótons de menor ou maior energia. Quando a energia do fóton espalhado é menor que a do fóton incidente, ocorre o espalhamento Stokes, e quando a energia do fóton espalhado é maior que a do incidente, ocorre o espalhamento anti-Stokes (SMITH; DENT, 2013;). Tais espalhamentos de luz são demonstrados num diagrama na Figura 3.

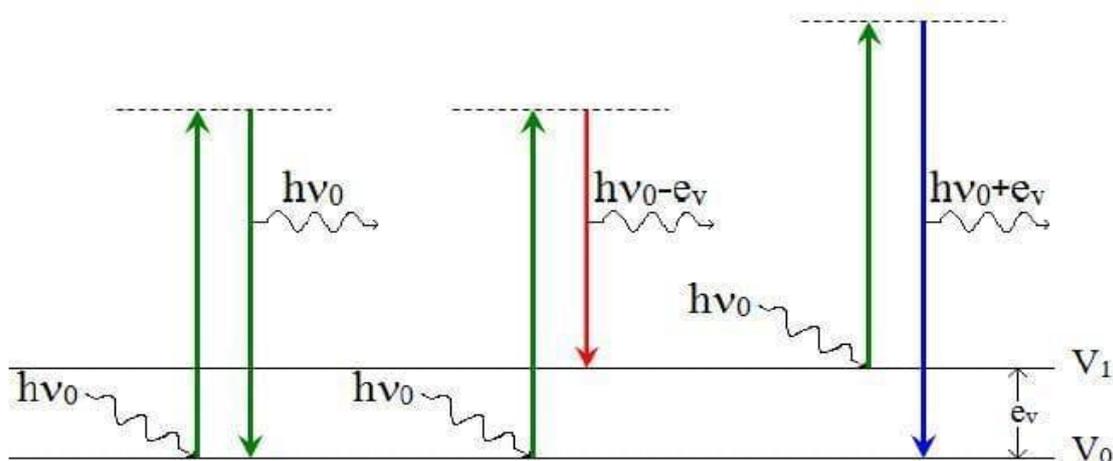


Figura 3 - Tipos de espalhamento de luz: espalhamento Rayleigh, stokes e anti-stokes  
Fonte: SALA, 2003

As moléculas podem interagir de formas diferentes à excitação, pois o espalhamento ocorre dependente do estado vibracional de suas ligações químicas e da polarizabilidade, que após o processamento dos sinais, geram um número de picos conhecidos por espectros Raman, onde linhas espectrais são obtidas em função das frequências vibracionais denominadas deslocamentos Raman (*Raman shifts*) que são expressas em  $\text{cm}^{-1}$  (FARIA; SANTOS, 1997).

Métodos que aplicam a espectroscopia têm ganhado visibilidade no campo das pesquisas, pois apresentam uma grande capacidade de fornecer informações detalhadas dos níveis de energia vibracional de diferentes materiais. Enquanto os espectros

eletrônicos como a fluorescência são conhecidos por fornecer bandas largas e desestruturadas, o espalhamento Raman, através da espectroscopia vibracional, oferece dados mais detalhados destas bandas de energia vibracional, sendo portanto mais precisos em relação às demais técnicas biofotônicas. As técnicas vibracionais como o Raman fornecem uma “impressão digital” das moléculas, devido à comprovada superioridade das informações apresentadas pelos níveis de energia vibracional ao compará-lo aos níveis de energia eletrônica (FARIA; SANTOS, 1997; HANLON et al., 2000).

Conquistas tecnológicas significativas vêm sendo obtidas no intuito de se desenvolver instrumentos que possam mostrar elevadas sensibilidade e especificidade associadas a uma maior praticidade na operação. Já há mais de 70 anos que a espectroscopia Raman vem sendo utilizada por cientistas das diversas áreas do conhecimento para a determinação de componentes moleculares de materiais diversos (SOUZA et al., 2003; MATTHÄUS et al., 2008).

Conhecendo-se as variações da espectroscopia Raman, tais como Raman ressonante, efeito intensificado por superfície (SERS), Raman inverso, micro-Raman e espalhamento Raman anti-Stokes coerente (CARS), o mundo científico passou a ter como foco o desenvolvimento de novos equipamentos que proporcionaram novas possibilidades de obtenção do sinal Raman, como os estudos de ligações químicas moleculares diversas, detalhamento de estruturas moleculares, e análises quantitativas de estruturas complexas (SALA, 2003).

#### 2.4.1 A espectroscopia Raman aplicada à área biológica

Desde o início de 1800, estudos vêm sendo realizados na região espectral do infravermelho, o que viria mais tarde permitir que cientistas viessem a pesquisar as alterações em tecidos e fluidos biológicos, sendo alvo de estudos a partir da interação da luz nos tecidos (JACKSON; SOWA; MANTSCH, 1997). A espectroscopia Raman passou a ser aplicada em amostras biológicas a partir dos anos 1980 com a introdução do laser de excitação em comprimentos de onda no infravermelho próximo (OZAKI et al., 1987). Foi então que as atenções se voltaram ao uso da técnica Raman com o objetivo de discriminação de tecidos biológicos, componentes bioquímicos, diagnóstico e

monitoramento de tumores malignos e identificação de grupos de bactérias patogênicas (SOUZA et al., 2003; JESS et al., 2007; OLIVEIRA; GIANA; SILVEIRA, 2012; JERMYN et al., 2016).

A técnica de espectroscopia Raman permite sua aplicação tanto “*in vitro*” quanto “*in vivo*” e ainda acumula vantagens sobre outras técnicas ópticas, ao ter como fóton de excitação laser com emissão no infravermelho próximo, permitindo maior detalhamento da amostra sob estudo ao atingir níveis vibracionais moleculares sem alcançar as camadas eletrônicas, onde pode ocorrer absorção de luz e consequente fluorescência. Assim os espectros, quando filtrados, resultam em gráficos com traçados típicos de bandas com picos característicos, usados para a interpretação dos níveis de energia vibracional das moléculas. Outras vantagens da espectroscopia Raman também são notórias, como a capacidade de analisar pequenas quantidades de amostras, de forma não destrutiva, sem necessidades de preparos especiais ou reagentes, gerando resultados rápidos, com alta sensibilidade e especificidade (HANLON et al., 2000; HUANG et al., 2004; JESS et al., 2007).

#### 2.4.2 A espectroscopia Raman aplicada ao diagnóstico de leucemias

Na área biológica, em especial na saúde, as buscas por novos conhecimentos são incessantes quando se referem às descobertas de novos patógenos e suas respectivas patogênias, tratamentos e seus diagnósticos, assim como em doenças clássicas com as leucemias e demais tipos de cânceres, todos com o objetivo comum de diagnosticar e tratar o mais precocemente possível. Portanto, o histórico da interação das áreas biológicas e exatas encontrou na espectroscopia Raman uma técnica robusta, de simples operação e grande eficácia para a obtenção de seus objetivos (LONDON et al., 1992; MAHADEVAN-JANSEN, 1996; CROW et al., 2004; HUANG et al., 2004).

Alguns autores já utilizaram da espectroscopia Raman para a análise quantitativa e qualitativa no sangue, como glóbulos e componentes bioquímicos (SOUZA et al., 2003; BANKAPUR et al., 2010; ATKINS et al., 2017). Em 2017, Azan et al. obtiveram sucesso ao demonstrar uma proteína envolvida na eletropermeabilização celular, através da microespectroscopia confocal Raman (AZAN et al., 2017).

A espectroscopia Raman, associada à métodos estatísticos como PCA e análise pelo componente bioquímico, também foi utilizada como técnica para identificação de estágios de células leucêmicas, tais como necrose e apoptose, e mostrou que as alterações espectrais obtidas das células em situações de sofrimento e morte podem ser monitorados por esta técnica, atuando como seguimento para o tratamento de leucemias (ONG; LIM; LIU, 2012).

Em busca da confirmação dos resultados obtidos pelas análises de amostras biológicas pela espectroscopia Raman, autores fizeram correlações entre esta técnica óptica e outras já consagradas como medições biométricas, comparando seus resultados modelados ferramentas matemáticas (EKLOUH-MOLINIER et al., 2015).

Nas análises laboratoriais, o sangue, na sua forma total, plasma ou soro, são as amostras mais comumente analisadas para a obtenção de concentrações de analitos que possam referir-se às condições fisiológicas e patológicas dos pacientes, e por este motivo, tem sido cada vez mais frequente a aplicação da espectroscopia Raman sobre estas amostras para obter-se por técnicas ópticas aquilo que universalmente é obtido por meios convencionais de exames bioquímicos (como a colorimetria e quimioluminescência), e também na hematologia em laboratórios de análises clínicas (BANKAPUR et al., 2010; BONIFACIO et al., 2014).

Neste contexto, estudos através da espectroscopia Raman sobre o sangue e seus componentes bioquímicos serviram de embasamento para outros autores que aplicaram seus conhecimentos no diagnóstico de leucemias (SILVA; SILVEIRA; CALLERA, 2006; GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014; VANNA et al., 2014; MANAGÒ et al., 2016) e também forneceram os subsídios necessários para a aplicação no trabalho aqui descrito.

## **2.5 Ferramentas estatísticas para análises espectrais**

Trata-se da aplicação de métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados amostrais, com o objetivo de extrair o máximo de informações para a melhor análise, a partir de uma observação indireta dos dados de uma amostra, utilizando de relações matemáticas para a dedução de um valor de uma variável.

Na área bioquímica, onde se objetiva a caracterização de um determinado componente ou amostra a partir de seus dados obtidos por um método quantitativo ou qualitativo, as análises estatísticas são conhecidas por quimiometria que podem ser aplicadas em processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, classificação de dados, calibração multivariada e modelagem de processos multivariados (FERREIRA et al., 1999).

### 2.5.1 Análise de componentes principais (PCA): análise exploratória

A PCA é usada no intuito de analisar dados de natureza multivariada. Trata-se de uma ferramenta estatística que permite transformar um conjunto de variáveis de uma base de dados em seus componentes principais baseados na variância dos dados no grupo. A PCA extrai as informações mais significativas (baseadas na variância) de um conjunto de dados original, gerando duas novas variáveis, denominadas de componentes principais (PCs) e escores (ESs), onde cada componente principal apresenta um “peso”, o escore, que indica a intensidade que cada componente principal possui no dado original (BODANESE et al., 2012). A maior variação espectral é armazenada no PC1, e a extração das variações segue sucessivamente até o componente de menor variância. A partir destas variáveis, são identificadas as semelhanças e diferenças nos grupos.

Na análise exploratória, busca-se identificar quais variáveis espectrais (componentes principais) apresentam diferenças significativas em seus escores, e associar esses componentes principais (diferenças espectrais) às diferenças das variáveis das amostras estudadas.

### 2.5.2 Análise discriminante pelos mínimos quadrados parciais (PLS - *partial least squares*) e PCA

A regressão por PLS é uma importante ferramenta estatística aplicada para o estabelecimento de modelos de relações lineares entre medidas multivariadas e objetiva prever as concentrações de uma matriz Y a partir dos dados multivariados de uma matriz X (GELADI; KOWALSKI, 1986). Com a aplicação da regressão dos mínimos

quadrados parciais obtém-se dados de variáveis latentes e preditores a partir dos dados originais de cada grupo conhecido, resultando na identificação das diferenças entre os grupos na análise discriminante destes grupos, sendo assim considerado um método supervisionado.

Na regressão PLS deve haver uma relação direta entre as variáveis conhecidas e aquelas que se deseja treinar, necessitando portanto de duas etapas: calibração e validação. Na etapa de calibração ocorre uma decomposição entre a matriz X (variáveis independentes) que resultará numa nova matriz de coordenadas, e a matriz dependente Y (amostras) a qual será modelada a partir dos dados da nova matriz de coordenadas. A partir da decomposição destas matrizes, um conjunto de dados é reduzido a fim de se obter as variáveis originais e os componentes principais, capazes de determinar o quanto uma variável original contribui para um determinado componente principal, conhecidos como variáveis latentes (GELADI; KOWALSKI, 1986).

Na etapa de validação, as variáveis latentes, obtidas da decomposição das matrizes durante a calibração, servirão de base para o modelamento das amostras a serem treinadas. Para a validação destes dados, pode-se utilizar da validação cruzada do tipo “deixa uma amostra de fora” (*leave-one-out*), indicada para pequenas amostras, onde uma amostra do conjunto de calibração é extraída e as demais amostras formam um novo modelo, então a amostra inicialmente extraída é inserida novamente ao conjunto de dados para se definir sua correlação com os demais dados, e assim calcular o erro de previsão. Para uma validação completa, todas as amostras devem ser excluídas, uma a uma, e posteriormente reinseridas para formação dos modelos de classificação.

A PCA pode ser aplicada como análise discriminante a partir dos escores dos componentes principais mais relevantes ao se aplicar um método estatístico para se obter um intervalo de confiança (valor de  $p$ ), ou seja, os componentes que possuem as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados e que podem ser utilizados como parâmetros de diagnóstico ou classificação. A partir dos escores, obtidos dos dados originais, aplica-se um algoritmo, que agrupa os dados em função das semelhanças ao mesmo tempo em que se separa os grupos com características que as diferenciam entre si (FERREIRA et al., 1999; NUNES et al., 2012).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O desenho do estudo é apresentado num diagrama de blocos simplificado na Figura 4, no qual se obtém uma macro-visão sobre todo o delineamento do projeto, tendo o seu curso iniciado pelas amostras sanguíneas submetidas à espectroscopia Raman, até o resultado final das análises estatísticas, as quais permitiram a identificação das diferenças na composição bioquímica das amostras estudadas e a discriminação dos grupos saudável e leucêmico.

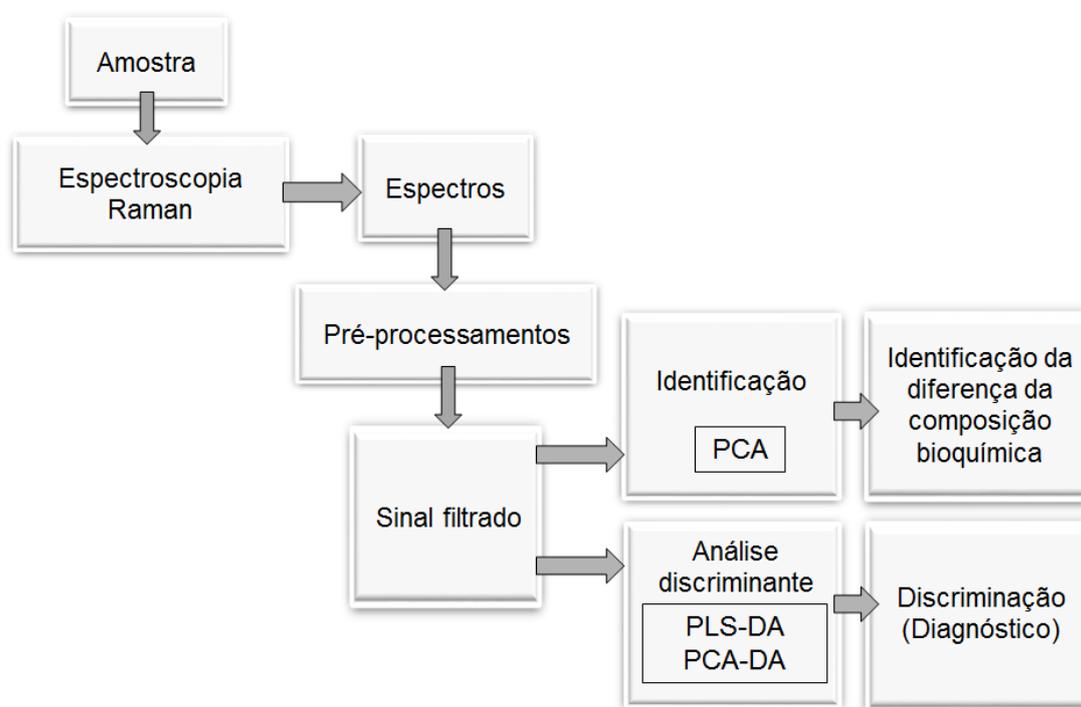


Figura 4 - Diagrama de blocos simplificado mostrando o desenho do estudo

#### 3.1 Apreciação ética

Para a execução deste trabalho de pesquisa, o projeto foi elaborado com atenção aos preceitos éticos e foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Paulista - UNIP, o qual emitiu parecer substanciado aprovando o projeto e o registrou sob o No. CAAE 67895617.5.0000.5512 (Apêndice A).

### 3.2 Amostras de sangue total e plasma

As amostras sanguíneas humanas foram obtidas no laboratório de análises clínicas de um hospital de São José dos Campos, hospital este de referência para doenças onco-hematológicas no Vale do Paraíba.

Como critérios de inclusão participaram deste estudo apenas as amostras sanguíneas de sujeitos conhecidamente saudáveis sob o ponto de vista hematológico e aqueles que foram diagnosticados com leucemias agudas previamente ao tratamento. As amostras sanguíneas de sujeitos que posteriormente foram diagnosticadas com outras doenças hematológicas não leucêmicas agudas foram excluídas.

A obtenção das amostras se deu por colheitas realizadas de veias periféricas, por metodologia de sistema fechado à vácuo - em tubos contendo anticoagulante K<sub>3</sub>EDTA 7,2 mg (Sarstedt, Nümbrecht, Renânia do Norte-Vestefália, Alemanha), e para a separação e obtenção dos plasmas sobrenadantes, estas amostras foram submetidas à centrifugação mecânica em 3500 RPM por 10 minutos (modelo Combate, Celm Ltda., São Paulo, SP, Brasil). No hospital cedente, as amostras foram avaliadas pelos métodos tradicionais de análises e foram identificadas como saudáveis e leucêmicas. Estas amostras foram acondicionadas em caixas térmicas (2 a 8 °C) de forma a evitar interferência da temperatura nas células e aos elementos bioquímicos, e estas amostras foram enviadas no mesmo dia ao Laboratório de Espectroscopia Raman do Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITE), associado à Universidade Anhembi Morumbi (UAM) no Parque Tecnológico de São José dos Campos para a realização dos ensaios.

Já no Laboratório de Espectroscopia Raman, as amostras foram então separadas em grupos nomeados de Grupo Saudável e Grupo Leucêmico, e suas quantidades estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Quantidade de amostras de sangue total e plasmas, obtidas para este estudo

Grupos	Quantidade de amostras obtidas
Sangue Saudável	25
Sangue Leucêmico	17
Plasma Saudável	25
Plasma Leucêmico	17

### 3.3 Aquisição dos espectros Raman e pré-processamento

Os espectros Raman foram obtidos das amostras de sangue total e plasma, amostras estas pipetadas em um porta-amostras de alumínio contendo furos de aproximadamente 80  $\mu\text{L}$ , sendo usada uma micropipeta monocal de volume variável (model P200, Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EUA). Os espectros foram obtidos em um espectrômetro Raman dispersivo no infravermelho próximo (modelo Dimension P1, Lambda Solutions Inc., MA, EUA), conforme diagrama esquemático e foto do equipamento apresentados na Figura 5. O espectrômetro utiliza laser de diodo em 830 nm como fonte de excitação, acoplado a uma sonda Raman por um cabo de fibras ópticas, obtendo-se 280 mW de potência laser na saída de excitação da sonda Raman. O espalhamento da amostra foi coletado pela sonda Raman e acoplado ao espectrômetro para dispersão. O espectrômetro possui grade de difração de 1.200 linhas/mm que promove a dispersão da luz espalhada na faixa espectral entre 400 e 1800  $\text{cm}^{-1}$ , e a direciona ao detector *back thinned, deep-depletion* CCD (*charge coupled device*) de 1340x100 pixels, refrigerada por Peltier a -75 °C, fornecendo resolução espectral de aproximadamente 4  $\text{cm}^{-1}$ . O tempo de exposição para a obtenção dos espectros foi de 3 s com 10 acumulações por espectro (tempo total de exposição de 30 s), e cada amostra foi analisada entre três e cinco repetições visando aumentar o número de espectros no modelo de diagnóstico.

Os espectros Raman coletados foram submetidos a uma etapa de pré-processamento para remoção da fluorescência e espalhamento de fundo (sinal de *background* Raman) por subtração de um polinômio de ordem 7 ajustado em toda a faixa espectral de 400 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Em seguida os *spikes* provenientes de raios cósmicos foram removidos manualmente e então os espectros foram normalizados pela área sob a curva (norma 1) (LASCH, 2012). O pré-processamento faz-se necessário para reduzir possíveis interferentes coletados durante a aquisição dos espectros, maximizando o sinal obtido para análise. A Figura 6 mostra um exemplo de um espectro de plasma com a remoção do sinal de fluorescência de fundo por subtração de um polinômio de ordem 7.

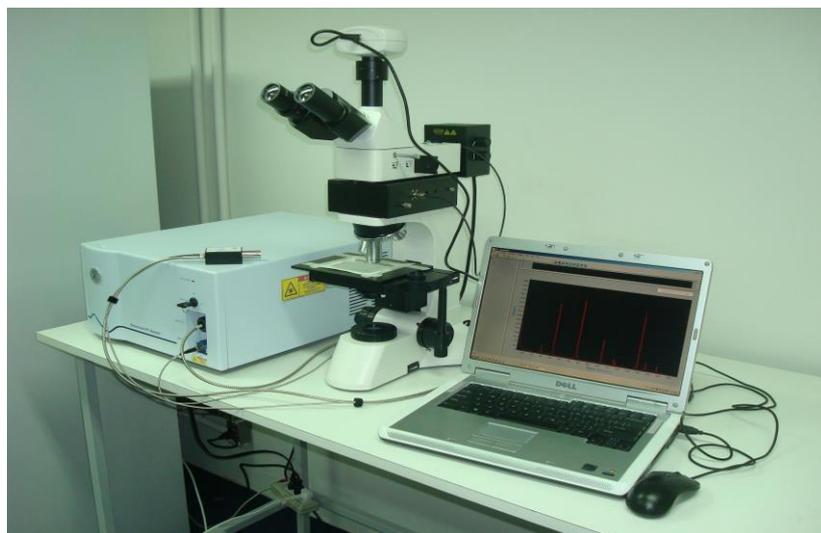
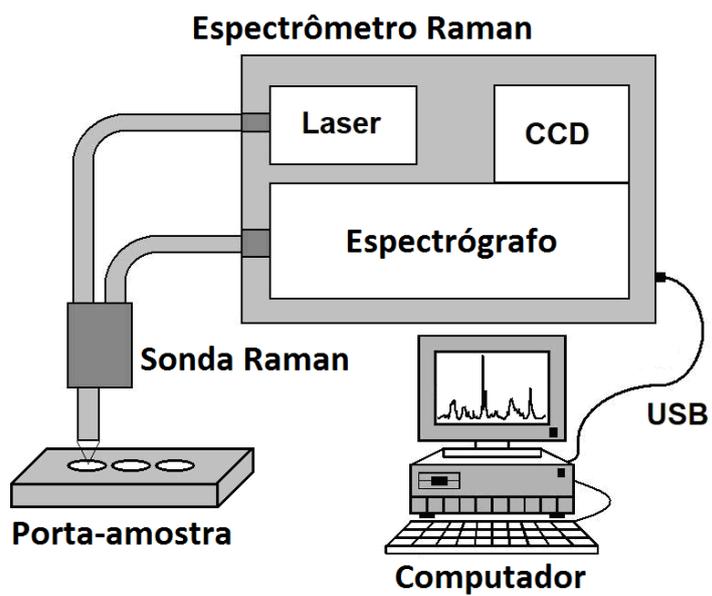


Figura 5 - A): diagrama esquemático do espectrômetro Raman dispersivo (modelo Dimension P-1). B) foto do aparelho Raman dispersivo

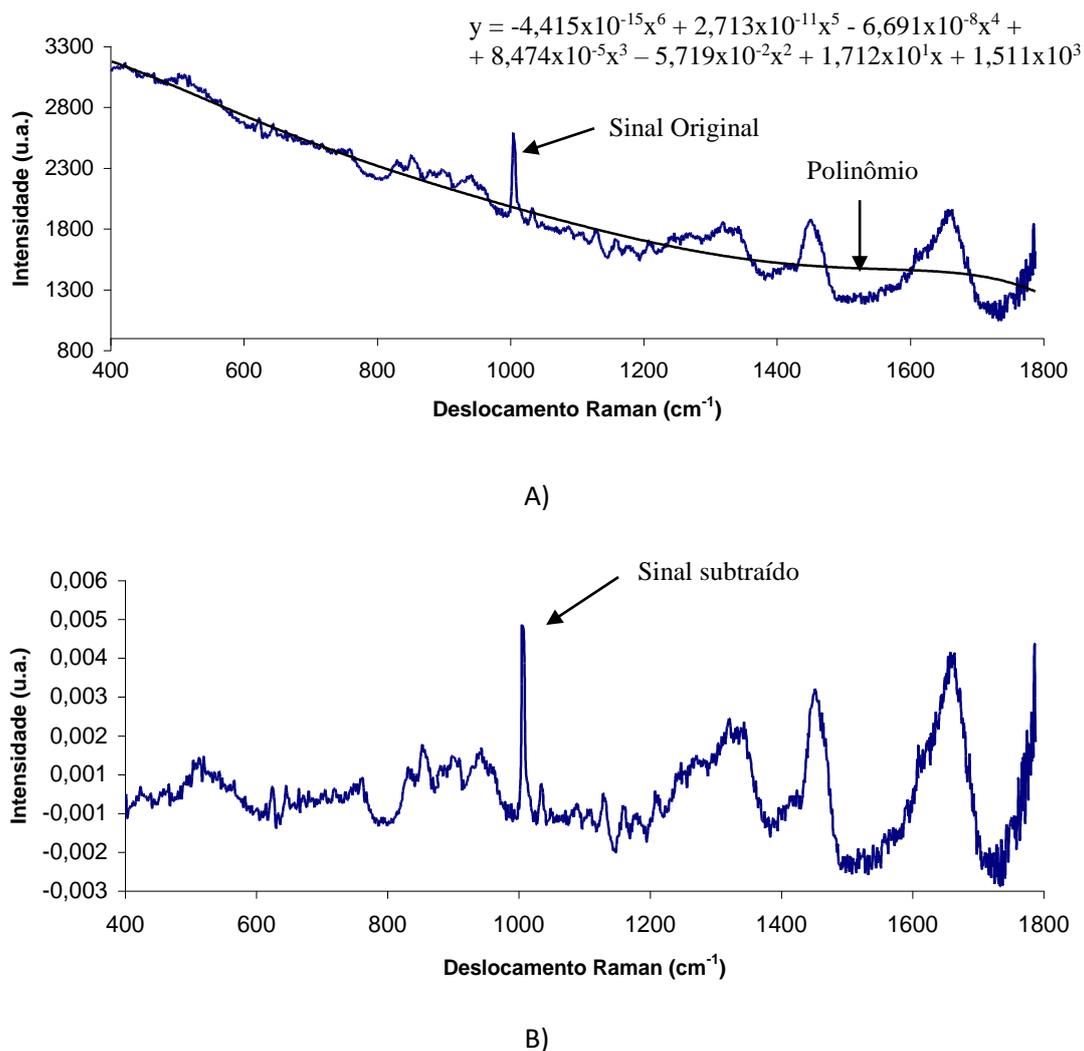


Figura 6 - Exemplo de um espectro Raman de plasma sanguíneo demonstrando a remoção de fluorescência de fundo por polinômio de ordem 7 ajustado em toda a faixa espectral. A): espectro com fluorescência de fundo e B): espectro com a fluorescência removida

Os espectros médios dos grupos saudáveis e leucêmicos de sangue total e plasma foram plotados em software Microsoft Excel com abscissas entre 400 e 1800  $\text{cm}^{-1}$ , indicando o deslocamento Raman, e suas diferenças foram observadas e seus picos mais evidentes foram marcados para posterior análise estatística. Para tanto, foi aplicado o teste  $t$  de Student com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) nos picos dos dados dos grupos leucêmico comparativamente ao saudável para determinar os picos com diferenças significativas e as relações com as diferenças na composição bioquímica entre os grupos, identificando as diferenças no perfil bioquímico dos dois grupos, tanto no sangue total quanto no plasma sanguíneo. O teste  $t$  aplica-se na aceitação ou rejeição da hipótese nula (igualdade na média entre duas populações) quando as amostras seguem distribuição normal, porém com variância desconhecida. Quando há diferenças

significativas entre os grupos amostrais ( $p < 0,05$ ), aceita-se a hipótese alternativa, sugerindo que as médias provêm de populações diferentes. Neste estudo em particular, como os espectros plotados apresentam intensidades positivas e negativas, considera-se que a hipótese alternativa possa apresentar média dos espectros menor que zero e média dos espectros maior que zero quando comparados entre si, por isso optou-se por aplicar a distribuição bicaudal do teste  $t$ . Assim pode-se fazer uso do teste  $t$  para a obtenção de conclusões baseadas em cálculos estatísticos, com alto grau de confiança (NEYMAN, 1937; RAJU et al, 2005).

### **3.4. Análise exploratória e análise discriminante**

#### **3.4.1 Análise exploratória baseada na PCA**

Na análise exploratória, buscou-se identificar quais variáveis espectrais (componentes principais) apresentaram diferenças em seus escores aplicando teste  $t$  com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), visando identificar quais componentes principais possuem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos saudável e leucêmico e associar esses componentes principais às diferenças bioquímicas entre os grupos utilizando para tal a literatura que atribui os picos vibracionais aos componentes bioquímicos do sangue. Utilizou-se do software Matlab versão 2007a (The Mathworks Inc., Natick, MA, EUA) para realizar a análise exploratória baseada na PCA.

#### **3.4.2 Análise discriminante baseada em PLS e PCA**

Para a discriminação ou diferenciação entre grupos saudável e leucêmico utilizou-se de técnicas de discriminação baseadas em PLS (PLS-DA) e em PCA (PCA-DA) a partir dos seus espectros normalizados, utilizando toda a faixa espectral (400 a  $1800\text{ cm}^{-1}$ ), nas amostras de sangue total e plasma.

A análise discriminante por PLS é uma ferramenta estatística que vem sendo aplicada na quimiometria para o desenvolvimento de modelos de discriminação

baseados em relações lineares entre medidas multivariadas (GELADI; KOWALSKI, 1986). Alguns autores já aplicaram PLS para classificação e categorização de alguns tipos de cânceres (NGUYEN; ROCKE, 2002; NGUYEN; ROCKE, 2002). A partir da aplicação da regressão de PLS, obtém-se dados de variáveis latentes e preditores a partir dos dados espectrais dos grupos a que pertencem, que resulta na identificação das diferenças nas amostras de sangue total e plasma entre os grupos saudável e leucêmico e no uso destas diferenças na análise discriminante destes grupos.

A PCA também foi aplicada como análise discriminante a partir dos escores dos componentes principais mais relevantes (teste  $t$ ,  $p < 0,05$ ), que possuíam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos saudável e leucêmico para sangue total e plasma. No intuito de reduzir a dimensão dos dados e ter melhor condição de identificar as reais diferenças entre os grupos, a PCA descartou os componentes principais com as menores variâncias, maximizando as informações mais relevantes (primeiros PCs) para serem utilizadas como parâmetros de diagnóstico ou classificação. Aos escores obtidos dos dados originais aplicou-se o algoritmo descrito por Nunes et al. (2012), que organizou os dados em grupos em função de suas semelhanças, mas também os separou em grupos em função das características que os diferenciam entre si (FERREIRA et al., 1999; NUNES et al., 2012).

Para o modelamento das classes de diagnóstico, utilizou-se o software Chemoface ([www.ufla.br/chemoface/](http://www.ufla.br/chemoface/)) que permite resolver problemas experimentais aplicando a metodologia de validação cruzada *leave-one-out*, tanto através da PLS-DA quanto da PCA-DA, definindo-se uma condição inicial de 10 variáveis latentes (PLS-DA) e 10 componentes principais (PCA-DA) (NUNES et al, 2012). Com os resultados obtidos da discriminação, foram criados uma tabela e um gráfico de contingência, confrontando a taxa de discriminação das amostras de sangue total e plasma através do modelo baseado no espectro Raman comparativamente aos testes diagnósticos convencionais dos pacientes.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Espectros de sangue total e plasma

Das 25 amostras de sangue total de sujeitos saudáveis obtidas para este estudo, quatro foram excluídas, assim como também foram excluídas duas amostras de plasma de sujeitos leucêmicos, pela presença de hemólise, o que poderia causar alterações na relação sinal-ruído dos espectros.

Foram coletados 312 espectros, dos quais 142 foram originados a partir de sangue total, sendo 80 classificados como grupo saudável e 62 como grupo leucêmico. Os outros 170 espectros são de origem plasmática, sendo que 101 foram agrupados como saudáveis e 69 leucêmicos, conforme Tabela 12, que apresenta um panorama geral do número de espectros coletados em cada um dos grupos, já que alguns espectros tiveram que ser excluídos devido à baixa relação sinal-ruído. Após o pré-processamento, o espectro médio de cada um dos grupos foi calculado.

Tabela 12 - Número de amostras e número de espectros em cada grupo

Grupos	Quantidade de amostras	Total de espectros coletados
Sangue Saudável	21	80
Sangue Leucêmico	17	62
Plasma Saudável	25	101
Plasma Leucêmico	15	69

A Figura 7 apresenta os espectros médios obtidos em amostras de sangue total dos grupos saudável e leucêmico e o espectro da diferença entre eles. O espectro médio de sangue do grupo saudável apresenta picos nas posições dos constituintes do sangue, componentes celulares (leucócitos, eritrócitos e plaquetas) e componentes não celulares (plasma).

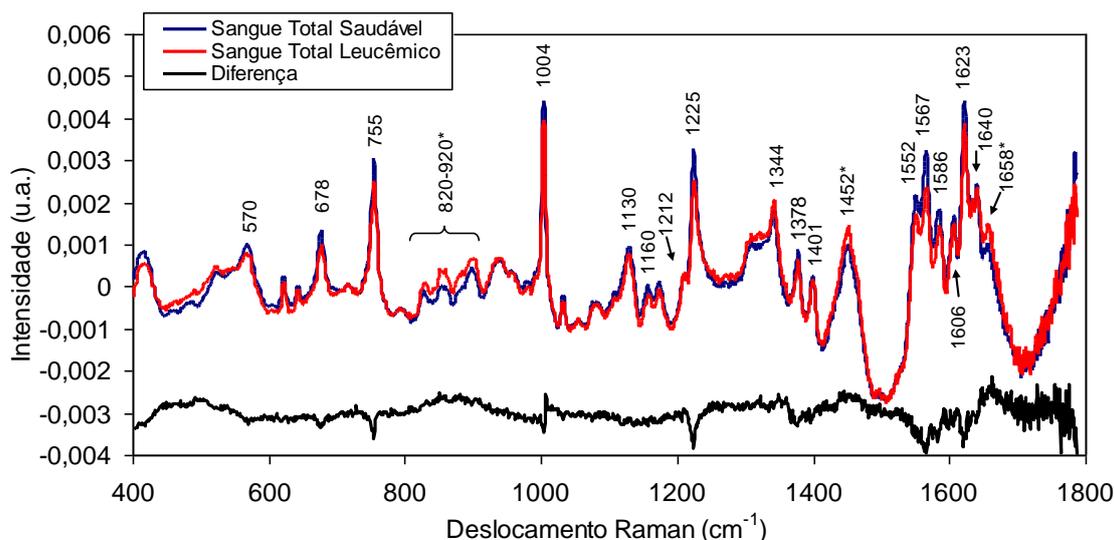


Figura 7 - Espectros Raman médios normalizados de sangue total de sujeitos normais e leucêmicos e espectro da diferença entre leucêmicos e saudáveis. O símbolo \* representa os picos nos espectros dos sujeitos leucêmicos que são mais intensos que nos espectros dos saudáveis

Na Figura 7 foram marcados os picos principais do sangue total dos grupos saudável e leucêmico, aos quais se aplicou o teste *t* de Student para identificação de diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), onde as maiores diferenças foram observadas nas bandas com picos em 570, 678, 755, faixa espectral entre 820-920, bandas com picos em 1004, 1130, 1160, 1212, 1225, 1344, 1378, 1401, 1452, 1552, 1567, 1586, 1606, 1623, 1640 e 1658  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto as bandas com picos em 1212, 1401 e 1640  $\text{cm}^{-1}$  não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (teste *t*,  $p > 0,05$ ). A Tabela 13 apresenta estes picos organizados por grupos bioquímicos, acompanhados de suas respectivas tentativas de atribuições, conforme descrita da literatura (FERNANDES et al., 2005; BANKAPUR et al., 2010; GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014; VANNA et al., 2014; SANTOS, 2014).

Tabela 13 - Agrupamento bioquímico por posições dos picos das bandas dos espectros Raman, atribuição segundo a literatura e significância segundo valor de *p* calculado pelo teste *t* de Student

Grupo bioquímico	Posição do pico ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição	Referências*	Valor de <i>p</i> (deste estudo)
Proteínas e aminoácidos	510(P)	Trp	A	< 0.01
	755(S)	Proteína, Trp	A; B; C	< 0.0001
	760(P)	Trp	A	NS

Grupo bioquímico	Posição do pico (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição	Referências*	Valor de <i>p</i> (deste estudo)
	820-920(S)	Tyr, Trp, Glutaciona	A; C	< 0.0001
	831 e 897(P)	Tyr, Trp, Glutaciona	A	NS
	1004(S)	Phe	A; B; C; D	< 0.001
	1004(P)	Phe	A; B; C; D	< 0.0001
	1130(S)	Proteína	A; D	< 0.01
	1132(P)	Proteína	A; D	NS
	1210(P)	Trp, Phe, Tyr, Amida III	A; C	< 0.01
	1212(S)	Trp, Phe, Tyr, Amida III	A; C	NS
	1225(S)	Proteína, Amida III	A	< 0.0001
	1269(P)	Proteína, Amida III	A; C; D	< 0.01
	1334(P)	Trp	A	< 0.001
	1344(P)	Proteína, Trp	A; B	< 0.001
	1401(S)	Glutaciona	A	NS
	1407(P)	Glutaciona	A	NS
	1448(P)	Proteína	B; D	< 0.01
	1452(S)	Proteína	A	NS
	1455(P)	Proteína	A	< 0.0001
	1552(S)	Trp, Amida II	A; B; C; E	< 0.01
	1586(S)	Proteína, Tyr	A; B	< 0.01
	1606(S)	Proteína, Tyr, Phe	A; B; C	< 0.001
	1623(S)	Tyr, Trp	A	< 0.0001
	1658(S)	Proteína, Amida I	A; B; C; D; E	< 0.0001
	1659(P)	Proteína, Amida I	A; C; D; E	NS
	1666(P)	Proteína, Amida I	C; E	NS
	1130(S)	Lipídios, Fosfolipídios	A; C; D	< 0.01
	1132(P)	Lipídios, Fosfolipídios	A; C; D	NS
	1225(S)	Lipídios	C	< 0.0001
	1269(P)	Lipídios, Fosfolipídios	C; D; E	< 0.01
	1334(S)	Fosfolipídios	A; C; E	< 0.01
	1344(S)	Fosfolipídios	A; C; E	< 0.001
Lipídios	1344(P)	Fosfolipídios	A,C; E	< 0.001
	1448(P)	Lipídios, Fosfolipídios	A; B; C; D, E	< 0.01
	1452(S)	Lipídios, Fosfolipídios	A; B; C; E	< 0.0001
	1455(P)	Lipídios, Fosfolipídios	B; C; E	< 0.0001
	1658(S)	Fosfolipídios	A; C, D	< 0.0001
	1659(P)	Fosfolipídios	A,C, D	NS
	1666(P)	Fosfolipídios	C	NS
Carboidratos	721(P)	Polissacarídios	A	< 0.0001
	1378(S)	Glucosamina	A; C	< 0.05
	1004(S)	β-caroteno	C; D	< 0.001
	1004(P)	β-caroteno	C; D	< 0.0001
Carotenoides	1160(S)	β-caroteno	A	< 0.01
	1160(P)	β-caroteno	A	< 0.001
	1525(S)	β-caroteno	A; C	NS

Abreviaturas: Phe: Fenilalanina; Tyr: Tirosina; Trp: Triptofano; (S): picos se referem apenas ao sangue total; (P): picos se referem apenas ao plasma. NS: Não significativo

\*Referências: A): GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014; B): VANNA et al., 2014; C): BANKAPUR et al., 2010; D): FERNANDES et al., 2005; E): SANTOS, 2014

A Figura 8 apresenta os espectros obtidos em amostras de plasma sanguíneo dos grupos saudável e leucêmico. O espectro médio do plasma saudável apresenta picos nas posições dos seus constituintes, principalmente proteínas (albumina, globulinas, aminoácidos), frações lipídicas, carboidratos (glicose), carotenoides e outros metabólitos. Nesta mesma Figura 8 foram marcados os principais picos do plasma dos grupos saudável e leucêmico, aos quais se aplicou o teste  $t$  para definição das diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ), sendo que as maiores diferenças foram observadas nas bandas com picos 510, 721, 760, 831, 897, 947, 1004, 1132, 1160, 1210, 1269, 1334, 1344, 1407, 1448, 1455, 1525, 1630, 1659 e 1666  $\text{cm}^{-1}$ , sendo que as respectivas tentativas de atribuições, organizados por grupos bioquímicos, conforme descrita da literatura estão apresentados na Tabela 13 (FERNANDES et al., 2005; BANKAPUR et al., 2010; GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014; VANNA et al., 2014; SANTOS, 2014).

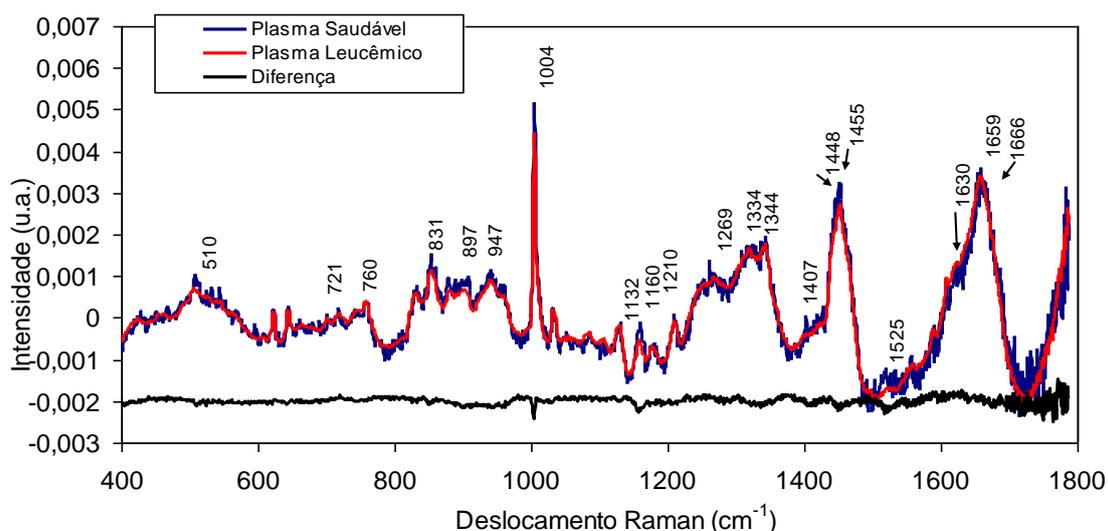


Figura 8 - Espectros Raman médios normalizados de plasma de sujeitos normais e leucêmicos e espectro da diferença entre leucêmicos e saudáveis

#### 4.2 Análise exploratória por PCA e significância segundo aplicação do teste $t$ de Student

A Figura 9 mostra a plotagem dos gráficos de Escores e Componentes Principais das amostras de sangue total, nos quais aplicou-se o teste  $t$  para identificação e diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

A Figura 10 mostra a plotagem dos gráficos dos componentes principais e escores das amostras de plasma, nos quais aplicou-se o teste  $t$  para identificação de diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

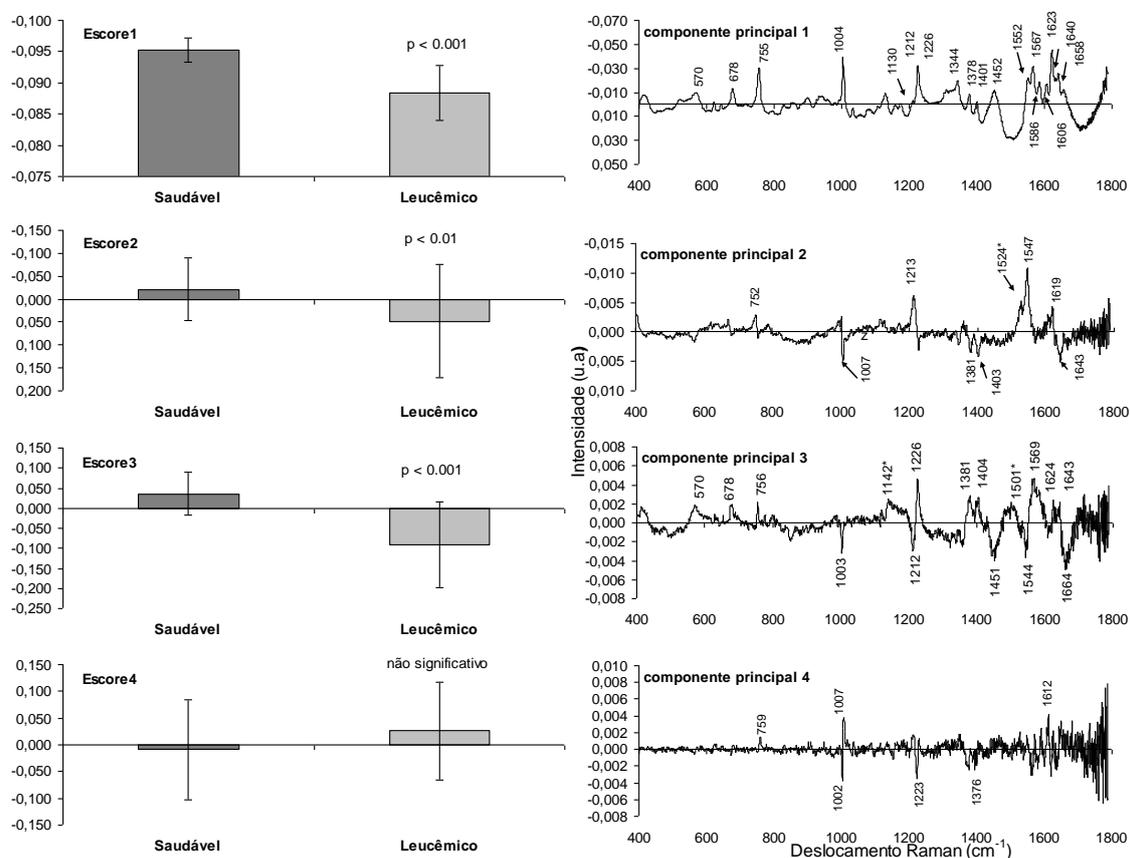


Figura 9 - Gráficos dos componentes principais e escores calculados para sangue total visando análise exploratória. Os asteriscos representam picos encontrados neste estudo e que não apresentam atribuição conhecida na literatura

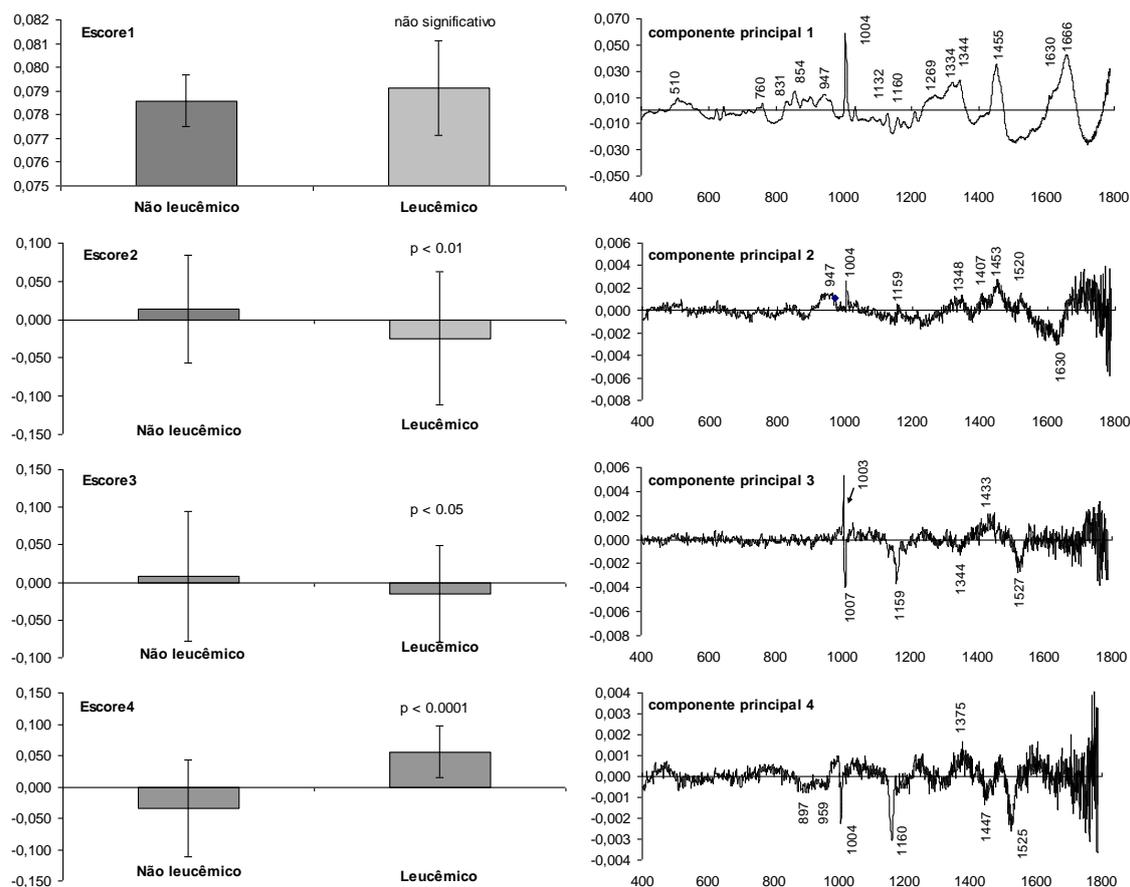


Figura 10 - Gráficos dos componentes principais e escores calculados para plasma visando análise exploratória

### 4.3 Análise por PLS-DA e PCA-DA visando discriminação

Para a discriminação ou diferenciação entre grupos saudável e leucêmico utilizou-se de técnicas de discriminação baseadas em PLS-DA e PCA-DA a partir dos seus espectros normalizados, onde toda a faixa espectral (400 a 1800 cm<sup>-1</sup>) foi considerada na análise das amostras de sangue total e plasma. O modelo de discriminação utilizou o método de validação cruzada *leave-one-out* (NUNES et al., 2012), definindo-se uma condição inicial de 10 variáveis latentes (modelo PLS-DA) e 10 componentes principais (modelo PCA-DA) para serem modelados, apresentando na Tabela 14 uma matriz de contingência com os resultados dos cálculos de sensibilidade, especificidade e acurácia global.

A partir do cruzamento dos espectros originais de sangue total e plasma de cada grupo amostral com os respectivos grupos a que pertencem, foi modelado pelo método

de validação *leave-one-out* definindo a que grupo cada amostra pertence, os quais foram tabulados e deram origem a uma matriz de contingência conforme apresentada na Tabela 14. Para o sangue total, utilizando o PLS-DA, a máxima acurácia ocorreu adotando-se as três primeiras variáveis latentes, com valor de 96,5% de sucesso e sensibilidade de 91,9%, enquanto que a acurácia utilizando a PCA-DA ocorreu adotando-se os quatro primeiros componentes principais, com valor de 93,0% de sucesso e sensibilidade de 83,9%. Ambas as formas de análise discriminante alcançaram especificidade de 100%, mostrando que os indivíduos saudáveis apresentaram perfil espectral padrão capaz de aloca-los no grupo saudável. Para o plasma, utilizando o PLS-DA, a máxima acurácia ocorreu utilizando as quatro primeiras variáveis latentes, com valor de 97,1% de sucesso e 95,7% de sensibilidade e 98,0% de especificidade, enquanto que a acurácia utilizando a PCA-DA ocorreu utilizando o primeiro componente principal, com valor de 64,1% de sucesso e 11,6% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Tabela 14 - Matriz de contingência com os resultados, sensibilidade, especificidade e acurácia global dos modelos de discriminação utilizando os espectros Raman das amostras sanguíneas

Diagnóstico por métodos convencionais	Diagnóstico Raman/PLS-DA		Diagnóstico Raman/PCA-DA	
	Sangue total			
	Saudável	Leucêmico	Saudável	Leucêmico
Sangue Total Saudável (n = 21 amostras)	80	00	80	00
Sangue Total Leucêmico (n = 17 amostras)	5	57	10	52
Sensibilidade	91,9%		83,9%	
Especificidade	100,0%		100,0%	
Acurácia global	96.5%		93.0%	
Diagnóstico por métodos convencionais	Diagnóstico Raman/PLS-DA		Diagnóstico Raman/PCA-DA	
	Plasma			
	Saudável	Leucêmico	Saudável	Leucêmico
Plasma Saudável (n = 25 amostras)	99	02	101	00
Plasma Leucêmico (n = 15 amostras)	03	66	61	08
Sensibilidade	95,7%		11,6%	
Especificidade	98,0%		100,0%	
Acurácia global	97.1%		64.1%	

A partir da matriz apresentada na Tabela 14, foram plotados 4 gráficos de contingência com os agrupamentos das classes resultantes da discriminação PLS-DA e PCA-DA para sangue total e plasma, respectivamente, obtidas pelo software Chemoface após a validação cruzada pelo método *leave-one-out*, os quais são apresentados nas Figuras 11 e 12.

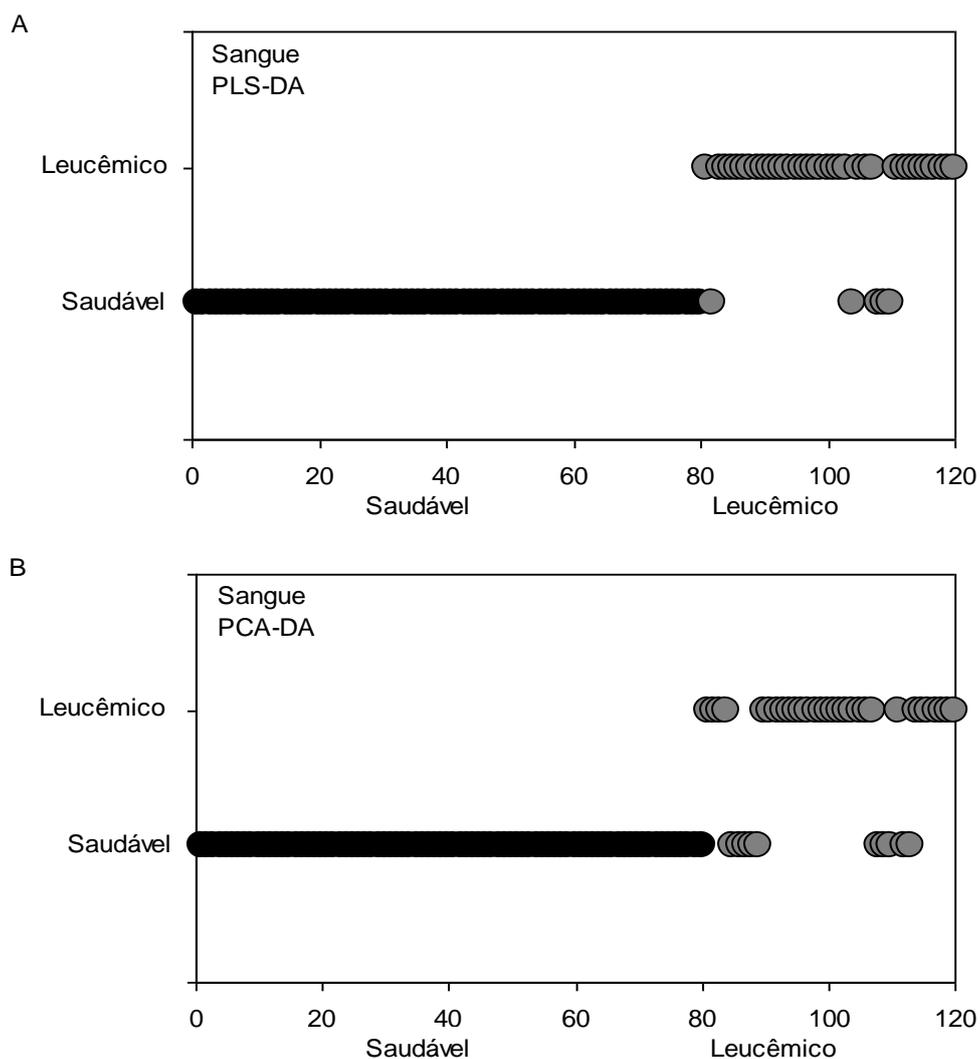


Figura 11 - Gráficos de contingência com as classificações por grupo Saudável e Leucêmico, através da análise discriminante, sendo A) PLS-DA (sangue total) e B) PCA-DA (sangue total)

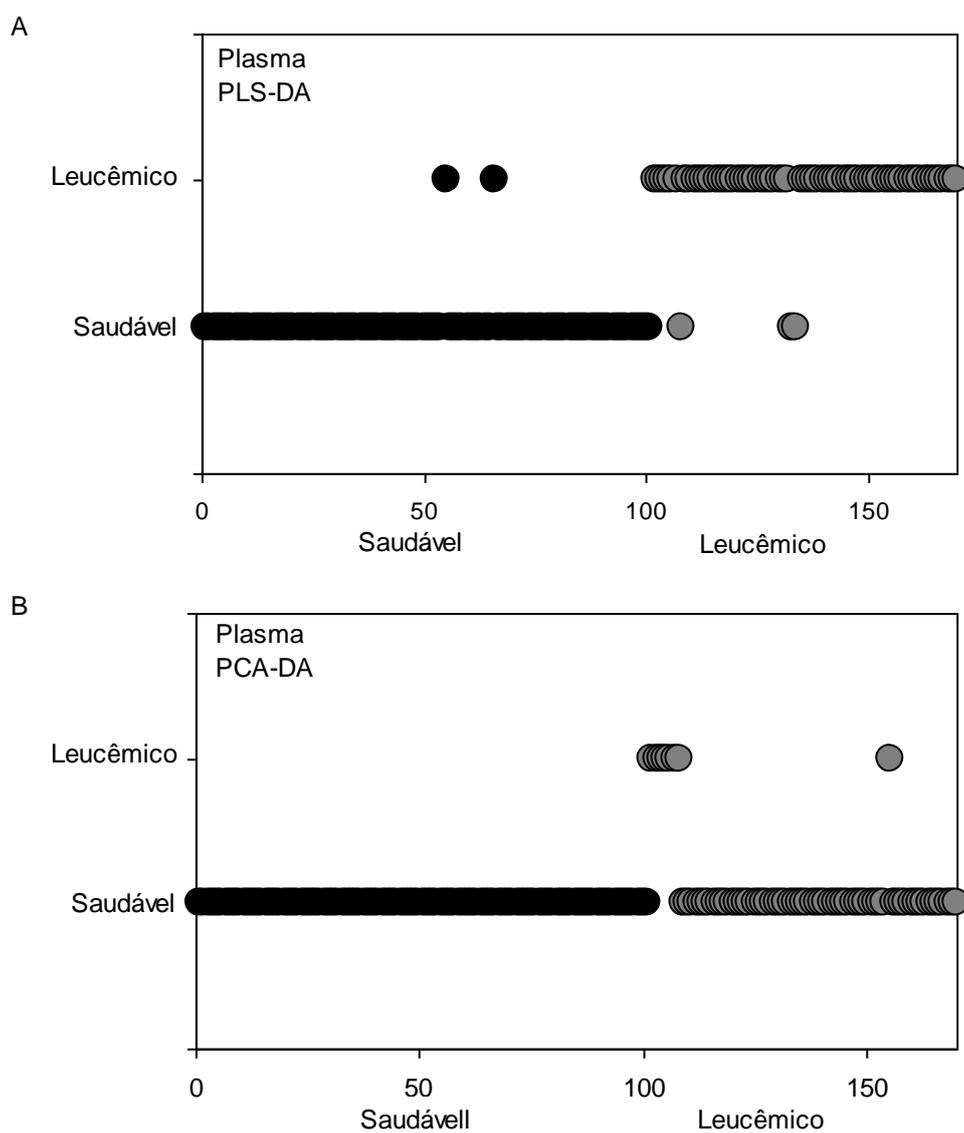


Figura 12 - Gráficos de contingência com as classificações por grupo Saudável e Leucêmico, através da análise discriminante, sendo A) PLS-DA (plasma) e B) PCA-DA (plasma)

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Principais evidências espectrais no sangue total e plasma

Alguns picos das bandas Raman das amostras de sangue total mostraram pequenas diferenças em intensidade e largura de banda entre leucêmico e saudável, que ocorrem devido a pequenas variações de intensidade e mudança na posição destas bandas (GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014), o que sugere pouca variação entre as amostras em seus componentes bioquímicos. Sobre os espectros médios dos grupos leucêmico e saudável aplicou-se o teste  $t$  ( $p < 0,05$ ) para definição das diferenças estatisticamente significativas entre si, conforme apresentados na Tabela 13, as maiores diferenças foram observadas nos picos em 570, 678, 755, faixa espectral entre 820-920, picos em 1004, 1130, 1160, 1212, 1225, 1344, 1378, 1401, 1452, 1552, 1567, 1586, 1606, 1623, 1640 e 1658  $\text{cm}^{-1}$ . Os picos em 1212, 1401 e 1640  $\text{cm}^{-1}$  não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (teste  $t$ ,  $p > 0,05$ ), o que sugere que não auxiliam na diferenciação entre os grupos leucêmico e saudável. Ainda na Figura 7, todos os picos marcados no espectro médio do grupo saudável apresentam-se mais intensos quando comparados ao grupo leucêmico, com exceção dos picos na faixa entre 820-920 e os picos em 1452 e 1658  $\text{cm}^{-1}$ , que apresentaram maior intensidade no grupo leucêmico e na mesma figura aparecem sinalizados com asteriscos.

Sobre os espectros médios dos grupos leucêmico e saudável das amostras de plasma, aplicou-se o teste  $t$  ( $p < 0,05$ ) para definição das diferenças estatisticamente significativas entre si conforme apresentados na Tabela 13, sendo que as maiores diferenças foram observadas nos picos em 510, 721, 760, 831, 897, 947, 1004, 1132, 1160, 1210, 1269, 1334, 1344, 1407, 1448, 1455, 1525, 1630, 1659 e 1666  $\text{cm}^{-1}$ . Devido à menor complexidade na composição do plasma quando comparado ao sangue total, a quantidade de picos com diferenças estatisticamente significativas é menor neste tipo de amostra, uma vez que neste material biológico estão ausentes componentes exclusivos do sangue total, tais como glóbulos brancos e vermelhos (ALDAMIZ-ECHEVARRIA; AGUIRRE-GARCIA, 2014).

Em consonância com este estudo, a técnica de espectroscopia Raman vem sendo aplicada por alguns autores (BANKAPUR et al., 2010; RODRIGUES; GALZERANI,

2012; GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014) em amostras sanguíneas (sangue total, plasma e soro) com o objetivo de identificar picos Raman para a atribuição de componentes bioquímicos, tais como proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídios, carotenoides e metabólitos característicos do sangue, e têm referenciado pesquisas no campo de diagnóstico e monitoramento de doenças (GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014; SANTOS, 2014).

## 5.2 Análise exploratória dos dados baseados na PCA

Na análise exploratória, a técnica PCA foi empregada a fim de identificar as variáveis espectrais que apresentavam diferenças entre os grupos, através dos componentes principais e escores, e sua interpretação consiste em identificar se os picos marcados nos componentes principais estão acima ou abaixo do marco “zero” e compará-los com seus respectivos escores (grupo saudável e leucêmico). Picos positivos com escores positivos, assim como picos negativos com escores negativos, revelam que tal molécula bioquímica apresenta alta concentração na amostra estudada, enquanto picos positivos com escores negativos e vice-versa demonstram que o componente bioquímico atribuído em tal posição do deslocamento Raman, se apresenta em baixa concentração.

### 5.2.1 Sangue total

A plotagem dos gráficos de componentes principais e escores das amostras de sangue total (Figura 9), apresentou o Componente Principal 1 com picos característicos de sangue total, sendo todos positivos em 570, 678, 725, 1004, 1130, 1212, 1226, 1344, 1378, 1401, 1452, 1552, 1567, 1586, 1606, 1623, 1640, 1658  $\text{cm}^{-1}$ , que tiveram suas tentativas de atribuições aos grupos bioquímicos das proteínas e aminoácidos (1004, 1130, 1212, 1226, 1344, 1401, 1452, 1567, 1586, 1606, 1623, 1658  $\text{cm}^{-1}$ ), carboidratos (725 e 1378  $\text{cm}^{-1}$ ), lipídios (11130, 1344, 1452 e 1658  $\text{cm}^{-1}$ ) e carotenóides (1004  $\text{cm}^{-1}$ ) (FERNANDES et al., 2005; BANKAPUR et al., 2010; GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014; VANNA et al., 2014; SANTOS, 2014), no entanto o grupo leucêmico possui menor intensidade deste componente principal (Escore 1) (teste  $t$ ,  $p < 0,001$ ), sugerindo que os

mesmos elementos bioquímicos são encontrados tanto no grupo saudável quanto no grupo leucêmico, porém no grupo leucêmico apresentam-se com menores concentrações.

O Componente Principal 2 apresentou picos com intensidades negativas no grupo leucêmico e positivas no grupo saudável, possuindo diferença estatisticamente significativa para o Escore 2 (teste  $t$ ,  $p < 0,01$ ). Este componente principal tem picos positivos em 752, 1213, 1524, 1547 e 1619  $\text{cm}^{-1}$  e negativos em 1007, 1381, 1401 e 1643  $\text{cm}^{-1}$ , e suas atribuições referem-se aos grupos bioquímicos das proteínas e aminoácidos (752, 1007, 1213, 1401, 1547 e 1619  $\text{cm}^{-1}$ ) e carboidratos (1381  $\text{cm}^{-1}$ ) (FERNANDES et al., 2005; BANKAPUR et al., 2010; GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014; VANNA et al., 2014; SANTOS, 2014). Os picos positivos sugerem a maior concentração de proteínas e aminoácidos para o grupo saudável, principalmente observando os picos em 752, 1213 e 1547  $\text{cm}^{-1}$ , que coincidem com os picos do sangue total, principalmente os eritrócitos (BANKAPUR et al., 2010).

O Componente Principal 3 apresenta picos com intensidades negativas no grupo leucêmico e positivas no grupo saudável, possuindo diferença estatisticamente significativa para o Escore 3 (teste  $t$ ,  $p < 0,001$ ). Este componente principal tem picos positivos em 570, 678, 756, 1142, 1226, 1381, 1404, 1501, 1569, 1624 e 1643  $\text{cm}^{-1}$  e negativos em 1003, 1212, 1451, 1544 e 1664  $\text{cm}^{-1}$ , e suas atribuições referem-se aos grupos bioquímicos das proteínas e aminoácidos (678, 756, 1003, 1212, 1226, 1404, 1451, 1544, 1624 e 1643  $\text{cm}^{-1}$ ), carboidratos (1381  $\text{cm}^{-1}$ ) e lipídios (1451 e 1664  $\text{cm}^{-1}$ ) (FERNANDES et al., 2005; BANKAPUR et al., 2010; GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014; VANNA et al., 2014; SANTOS, 2014). A análise do Escore 3 sugere que o grupo saudável possui maiores concentrações de proteínas (bandas de amida I e III e glutatona), aminoácidos (Trp e Tyr) e glucosamina, picos estes que podem ser atribuídos aos componentes bioquímicos do sangue total, enquanto o grupo leucêmico apresenta os picos negativos referentes a aminoácidos (Phe e Trp), a proteínas (bandas de amida II) e fosfolipídios celulares, picos que são indicativos de hiperplasticidade causada pelos blastos (glóbulos brancos) (BANKAPUR et al., 2010).

Apesar do Componente Principal 4 apresentar picos em posições referentes a proteínas e aminoácidos, o Escore 4 não apresentou significância entre saudável e leucêmico (teste  $t$ ,  $p > 0,05$ ). Portanto, os Componentes Principais 2 e 3 foram os que indicaram as maiores diferenças, principalmente maior concentração de células

vermelhas no sangue saudável e maior concentração de células brancas no leucêmico, provavelmente devido ao infiltrado leucêmico que costuma comprometer a proliferação dos glóbulos vermelhos, causando anemia, e dos glóbulos brancos, causando imunodeficiências (ESPARZA; SAKAMOTO, 2005; CHENG; SAKAMOTO, 2005; ESTEY; DOHNER, 2006).

Sabendo-se que a ativação do oncogene para leucemia altera o metabolismo celular, a produção elevada de blastos leucêmicos pode estar associada a um maior consumo de aminoácidos e proteínas que são constituintes celulares e participam de ações enzimáticas específicas, como a tirosina quinase, que tem função de fosforilação de substratos protéicos, como a mieloperoxidase, enzima presente em alguns tipos de leucemias mieloides agudas, e assim sendo, inibir a atividade da tirosina quinase tem sido considerada como ação terapêutica para reduzir a atividade de células neoplásicas (MARTINS; FALCÃO, 2000; LEVINE; GILLILAND, 2008; AVILA; ROMEIRO, 2010). Isto pode explicar o fato de que os Componentes Principais 2 e 3 apresentarem maiores concentrações de alguns aminoácidos no grupo saudável comparativamente ao leucêmico, especialmente Tyr e Trp. As concentrações de proteínas e glutatona (ligada aos eritrócitos) também encontram-se em menores quantidades no grupo leucêmico, fato que também foi constatado por Sanches et al. (2015), que realizou estudo comparando o perfil bioquímico entre pacientes leucêmicos e indivíduos saudáveis, demonstrando que dentre os pacientes por eles estudados, os saudáveis apresentavam concentração média de proteínas em 25% superior aos leucêmicos (SANCHES et al., 2015). O pico atribuído ao aminoácido fenilalanina apresentou-se destacado nos Componentes Principais 1, 2 e 3, ainda que em baixas quantidades, porém a literatura descreve que este aminoácido é um dos ativadores do gene BCR-ABL, oriundo do cromossomo Philadelphia, presente em uma classe de leucemia mielóide crônica, mas que também sido identificada em leucemias agudas mielóide e linfóide (COLLEONI et al., 1998; LEVINE; GILLILAND, 2008; SCHAFFEL; SIMÕES, 2008).

### 5.2.2 Plasma

A plotagem dos gráficos de Componentes Principais e Escores das amostras de plasma (Figura 10), mostrou o Componente Principal 1 com picos característicos de plasma, porém os grupos saudável e leucêmico não apresentaram diferenças

estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) no Escore 1; portanto tais picos não são relevantes para a diferenciação dos grupos estudados. O Componente Principal 2 apresenta picos com intensidades negativa em  $1630\text{ cm}^{-1}$  no grupo leucêmico, e positivas em  $947, 1004, 1159, 1348, 1407, 1453$  e  $1520\text{ cm}^{-1}$  no grupo saudável, possuindo diferença significativa ( $p < 0,01$ ) para o Escore 2. Estes picos têm atribuições referentes aos grupos bioquímicos das proteínas e aminoácidos ( $1348, 1407$  e  $1453\text{ cm}^{-1}$ ), lipídios ( $1348\text{ cm}^{-1}$ ) e carotenoides ( $1004, 1159$  e  $1520\text{ cm}^{-1}$ ) (FERNANDES et al., 2005; BANKAPUR et al., 2010; GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014; VANNA et al., 2014; SANTOS, 2014). A baixa intensidade do Escore 2 sugere que a diferença na concentração destes constituintes é pequena nos grupos, porém significativa ( $p < 0,01$ ), sendo que o grupo saudável possui maiores concentrações de proteínas, Trp, Phe, glutaciona, fosfolipídios (livres) e carotenoides do que o grupo leucêmico.

O Componente Principal 3 apresenta picos com intensidades negativas no grupo leucêmico e positivas no grupo saudável, possuindo diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para o Escore 3. Este componente tem picos positivos em  $1003$  e  $1433\text{ cm}^{-1}$  e negativos em  $1007, 1159, 1344$  e  $1527\text{ cm}^{-1}$ , e suas atribuições referem-se aos grupos bioquímicos das proteínas e aminoácidos ( $1007$  e  $1344\text{ cm}^{-1}$ ) e carotenoides ( $1003, 1159$  e  $1527\text{ cm}^{-1}$ ) (FERNANDES et al., 2005; BANKAPUR et al., 2010; GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014; SANTOS, 2014; ALDAMIZ-ECHEVARRIA; AGUIRRE-GARCIA, 2014), porém a baixa intensidade do Escore 3 sugere que os elementos bioquímicos destes picos não são úteis para a diferenciação entre os grupos saudável e leucêmico. O Componente Principal 4 apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) na intensidades do Escore 4, com picos intensos e negativos em  $897, 959, 1004, 1160, 1447$  e  $1525\text{ cm}^{-1}$ , referentes ao grupo das proteínas e aminoácidos ( $897, 959$  e  $1447\text{ cm}^{-1}$ ) e carotenoides ( $1004, 1160$  e  $1525\text{ cm}^{-1}$ ), sugerindo maior concentração destes componentes nos grupo saudável, e pico positivo em  $1375\text{ cm}^{-1}$ , atribuído à glucosamina, que se apresenta em baixa concentração no grupo saudável em relação ao grupo leucêmico.

Com relação aos picos de carotenoides, a análise exploratória por PCA evidenciou que os Componentes Principais 2 e 4 apresentaram picos deste componente bioquímico ( $1004, 1159/1160$  e  $1520/1525\text{ cm}^{-1}$ ) (FERNANDES et al., 2005; BANKAPUR et al., 2010; GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014), e os Escores 2 e 4 apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente), que indicam a presença destes componentes em maiores concentrações no grupo saudável

comparativamente ao leucêmico, sendo este resultado coincidente com o demonstrado por González-Solís et al. (2014) ao analisar espectros Raman de sangue em sujeitos leucêmicos. O fato dos carotenóides estarem em maior concentração nos indivíduos saudáveis, quando comparados aos leucêmicos deste estudo, se assemelha aos resultados de outros autores que demonstraram em suas publicações, que indivíduos saudáveis possuem elevada concentração de carotenoides no plasma, tendo sido atribuída ação anti-oncogênica a este componente bioquímico, como protetores contra neoplasias como as leucemias agudas (NAVES, 1998; GOMES, 2007). Outro estudo demonstrou ainda que a concentração de carotenoides aumentou em indivíduos leucêmicos em remissão (GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014).

### **5.3 Análise discriminante (PLS-DA e PCA-DA)**

As técnicas de discriminação baseadas em PLS e PCA vêm sendo utilizadas por alguns autores com relativo êxito como preditores para discriminação ou diferenciação entre tecidos saudáveis e doentes, especialmente na área oncológica (NGUYEN; ROCKE, 2002; HUANG et al., 2013).

Os cálculos de sensibilidade, especificidade e acurácia global (PARIKH et al., 2008) demonstraram valores bastante elevados e consistentes utilizando-se da análise discriminante por PLS tanto no sangue total quanto no plasma. Os resultados obtidos na classificação correta global (acurácia) para o sangue total e plasma foram próximos entre si, porém numa avaliação geral os resultados foram mais favoráveis no sangue total, definindo-o como a melhor amostra para a diferenciação entre os grupos saudável e leucêmico, com variáveis espectrais que permitiram obter um conjunto reduzido de preditores e com maior potencial de sucesso na classificação dos grupos. Na análise discriminante por PCA, os resultados obtidos no sangue total foram elevados, demonstrando que na presença das células sanguíneas os componentes principais tiveram relevância na identificação dos grupos, enquanto a baixa sensibilidade no plasma resultou em uma acurácia de 64,1%, fato que pode ser explicado pela própria composição do plasma, que apresenta menor complexidade em relação ao sangue total devido à ausência de células, e assim após a validação cruzada dos espectros Raman resultou em um número menor de componentes principais (PC1), que reduziram significativamente a capacidade de classificação dos grupos estudados, especialmente os

leucêmicos. Gonzáles-Solís et al. (2014), fizeram uso da espectroscopia Raman no soro para o monitoramento de pacientes com leucemias agudas sob tratamento quimioterápico, e através de ferramentas matemáticas como a PCA e análise discriminante linear (LDA - *linear discriminant analysis*), e identificaram com sucesso grupos amostrais pertencentes a indivíduos leucêmicos e saudáveis, com diferenças estatisticamente significativas que se assemelham aos resultados da pesquisa aqui apresentada GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014.

É notória a utilização de ferramentas matemáticas de análise multivariada com o objetivo de identificação e classificação de grupos amostrais nas mais diversas áreas do conhecimento (NGUYEN; ROCKE, 2002; BODANESE et al., 2012; GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014; HUANG et al., 2013). A análise por PCA tem como objetivo realizar a segregação de grupos a partir das variâncias que, maximizadas, dão sustentação à classificação das amostras, e tem se mostrado uma ferramenta importante quando a principal informação capaz de diferenciar os grupos amostrais é a variabilidade entre os grupos, pois esta deve ser maior do que a variabilidade intra-grupo. Através das medidas das distâncias entre as variáveis, como Euclidiana (linear) ou Mahalanobis, determina-se esta separação. No entanto, a PLS-DA se destaca sobre a PCA-DA, pois além das informações das diferenças entre os grupos, são também reconhecidas as variâncias obtidas dentro dos grupos, e estas variâncias são associadas aos grupos quando da montagem do modelo de regressão, e neste caso a PLS-DA apresenta melhor desempenho na classificação de amostras quando comparada à PCA-DA (BARKER; RAYENS, 2003).

#### **5.4 A espectroscopia Raman e as técnicas convencionais para diagnóstico de leucemias**

Comparada às técnicas atualmente disponíveis para o diagnóstico das leucemias agudas baseadas na citomorfologia, imunofenotipagem e citogenética (SAGRILLO et al., 2005; HAMERSCHLAK, 2008; ARBER et al., 2016), a espectroscopia Raman apresentou vantagens significativas ao estabelecer um padrão espectral de diferenciação baseada na diferença da composição química (carotenoides e aminoácidos) no plasma e celularidade (células vermelhas e brancas) e composição química (proteínas) no sangue total, entre indivíduos saudáveis e leucêmicos, a partir de pequeno volume de sangue

periférico, o que infere um caráter minimamente invasivo na obtenção da amostra a ser analisada. A espectroscopia Raman também apresentou vantagens em relação às demais técnicas ao não necessitar o uso de reagentes ou preparação especial da amostra, permitir uma análise espectral em tempo reduzido, e fazer uso de algoritmos matemáticos e estatísticos que podem levar a uma simplificação na análise e interpretação dos resultados, podendo ser inserido no rol de exames de triagem diagnóstica, uma vez que apresenta elevadas sensibilidade e especificidade possibilitando a exclusão da suspeita de leucemias. Isto permite que os médicos ampliem a investigação diagnóstica para outras doenças, definindo a condução terapêutica sobre seus pacientes de forma precoce, uma vez que o tempo entre diagnóstico e tratamento é fator crucial para um bom prognóstico.

O processamento de sinais Raman via técnica PLS permite resultados rápidos e precisos de discriminação, haja vista que já estão disponíveis softwares que facilitam o modelamento e a análise dos dados, tais como o utilizado nesta pesquisa (NUNES et al., 2012). A técnica também vem sendo aplicada na área diagnóstica, com a utilização de modelos Raman compactos que se assemelham os modelos *bed-side* com o objetivo de utilização em *point-of-care*, aplicados diretamente em amostras recém colhidas, uma vez que, dentre suas inúmeras vantagens, está o fato de não exigir preparações ou o uso de reagentes nas amostras e superior sensibilidade quando comparado à técnicas consagradas como a espectrofotometria e cromatografia (HUTCHINGS et al., 2008; OCEAN, 2018;). A técnica Raman institui uma nova tecnologia para novas formas de diagnóstico de doenças complexas como as neoplasias (MAHADEVAN-JANSEN, 1996) e apresenta grande potencial como técnica promissora para o diagnóstico de doenças relacionadas ao sangue humano (BANKAPUR et al., 2010; GONZÁLEZ-SOLÍS et al., 2014).

## 5.5 Trabalhos futuros

Devido ao conhecido poder de detalhamento observado neste estudo e em outros já publicados, nos quais se aplicou a espectroscopia Raman em amostras de sangue, é possível sugerir que no futuro, esta tecnologia seja instituída como ferramenta para a discriminação de linhagens celulares e componentes bioquímicos para a classificação de leucemias linfóide e mieloide e seus subtipos. Ademais, os avanços das empresas

fabricantes de espectrômetros para a captação da energia vibracional Raman têm permitido a confecção de equipamentos com dimensões cada vez menores e de fácil utilização, podendo futuramente ser portáteis e acessíveis à comunidade médica, contudo mantendo características importantes da espectroscopia Raman, como a simplicidade na operacionalidade e interpretação dos resultados, de forma rápida e minimamente invasiva para um diagnóstico seguro.

## CONCLUSÃO

A espectroscopia Raman foi aplicada às amostras de sangue total e plasma de sujeitos saudáveis e leucêmicos para obtenção de seus espectros, os quais tiveram seus principais picos correlacionados aos componentes bioquímicos (proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídios e carotenoides). Na análise exploratória por PCA dos espectros do sangue total, aplicou-se o teste *t* de Student que identificou os componentes principais 2 e 3 com diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) em picos atribuídos à proteínas, aminoácidos e carboidratos, que se mostraram com maior intensidade no grupo saudável, enquanto o grupo leucêmico, particularmente no Componente Principal 3, apresentou maior intensidade de fosfolipídios constituintes da membrana das células, que geralmente se encontram em grande quantidade em leucemias agudas. No plasma, a PCA identificou as maiores diferenças nos Componentes Principais 2 e 4, ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente), onde o grupo saudável apresentou picos que indicam maior intensidade de proteínas, aminoácidos, fosfolipídios livres e carotenoides.

No modelo de classificação utilizando PLS aplicado ao sangue total, este tipo de amostra mostrou superioridade nos resultados em relação ao plasma, ao adotar as três primeiras variáveis latentes para a classificação dos grupos leucêmico e saudável, com especificidade de 100% e acurácia global de 96,5%, apresentando também melhores resultados na classificação dos grupos quando comparado à discriminação por PCA em ambos os tipos de amostras.

A espectroscopia Raman mostrou ter potencial como ferramenta diagnóstica das leucemias agudas para o incremento das técnicas atualmente disponíveis, permitindo que os médicos definam o diagnóstico precoce de forma rápida e minimamente invasiva, iniciando com brevidade a conduta compatível com os quadros de seus pacientes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRALE - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA. (Org.). SÃO PAULO. **Leucemia Mielóide Aguda**. 2016. Disponível em: <<http://www.abrale.org.br/lma/o-que-e>>. Acesso em: 09 abr. 2017.

ALDAMIZ-ECHEVARRIA, C.; AGUIRRE-GARCIA, M.S. A behavior model for blood donors and marketing strategies to retain and attract them. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.467-475, jun. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0104-1169.3398.2439>.

ARACYTIN: Citarabina: José Cláudio Bumerad - CRF-SP nº 4376. Itália: Actavis Italy S.p.A. 2013. Bula de remédio.

ARBER, D.A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, [s.l.], v. 127, n. 20, p.2391-2405, 11 abr. 2016. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>.

ATKINS, C.G. et al. Raman Spectroscopy of Blood and Blood Components. **Applied Spectroscopy**, [s.l.], v. 71, n. 5, p.767-793, 11 abr. 2017. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0003702816686593>.

AVILA, C.M.; ROMEIRO, N.C. Protein tyrosine kinases: challenges in the development of drugs aimed at cancer therapy. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.59-82, 2010. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20100007>

AVIVI, I.; ROWE, J.M. Prognostic factors in acute myeloid leukemia. **Current Opinion In Hematology**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.62-67, jan. 2005. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/01.moh.0000148760.15412.df>.

AZAN, A. et al. Demonstration of the Protein Involvement in Cell Electroporation using Confocal Raman Microspectroscopy. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, p.40448-40458, 19 jan. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep40448>.

BAHIA, D.M.M. et al. Leucemia Mielóide Aguda t(8;21) após tratamento de hipertireoidismo com iodo radioativo: Leucemia secundária?. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.147-138, abr. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842002000200010>.

BANKAPUR, A. et al. Raman Tweezers Spectroscopy of Live, Single Red and White Blood Cells. **Plos One**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.1-11, 29 abr. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010427>.

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal Of Chemometrics**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.166-173, 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cem.785>.

BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review **Environmental Health Perspectives**, [s.l.], v. 115, n. 1, p.138-145, 30 nov. 2006. Environmental Health Perspectives. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.9023>.

BENNETT, J.M. et al. Proposals for classification of acute leukemias: French-american-British (FAB) co-operstive group. **British Journal of Haematology**, v.33, n4, p.451-458, Ago.1976

BIENZ, M. Risk Assessment in Patients with Acute Myeloid Leukemia and a Normal Karyotype. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.1416-1424, 15 fev. 2005. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-04-1552>.

BIONDI, A.. P.A. Pizzo, D.G. Poplack (eds). Principles and Practice of Pediatric Oncology. **Annals of Oncology**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.661-667, 1 abr. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdg166>.

BODANESE, B. et al. Discrimination of Basal Cell Carcinoma and Melanoma from Normal Skin Biopsiesin VitroThrough Raman Spectroscopy and Principal Component Analysis. **Photomedicine and Laser Surgery**, [s.l.], v. 30, n. 7, p.381-387, jul. 2012. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2011.3191>.

BOLLMANN, P.W.; GIGLIO, A. Chronic myeloid leukemia: past, present, future. **Einstein (São Paulo)**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.236-243, jun. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-45082011rb2022>.

BONIFACIO, A. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood plasma and serum using Ag and Au nanoparticles: a systematic study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 406, n. 9-10, p.2355-2365, 4 fev. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-014-7622-1>.

BRNCO, I.M.B.H.P. Prevenção do câncer e educação em saúde: opiniões e perspectivas de enfermagem. **Texto Contexto Enfermagem**. v.14, n 2, p246-249. abr-jun. 2005

BRAZIEL, R.M. Molecular Diagnostics. **Hematology**, [s.l.], v. 2003, n. 1, p.279-293, 1 jan. 2003. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/asheducation-2003.1.279>.

BRITO-SILVA, K. et al. Integralidade no cuidado ao câncer do colo do útero: avaliação do acesso. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 48, n. 2, p.240-248, abr. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-8910.2014048004852>.

BROWMAN, G.P.; NEAME, P.B.; SOAMBOONSRUP, P. The contribution of Cytochemistry and Immunophenotyping to the reproducibility of the FAB Classification in acute leukemia. **Blood**, v. 68, n. 4, p.900-905, Out. 1986. PMID3756352

BYRD, J.C. et al. Patients With t(8;21)(q22;q22) and Acute Myeloid Leukemia Have Superior Failure-Free and Overall Survival When Repetitive Cycles of High-Dose Cytarabine Are Administered. **Journal of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 17, n. 12, p.3767-3775, dez. 1999. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.1999.17.12.3767>.

CALLERA, F. et al. High prevalence of morphological subtype FAB M1 in adults with de novo acute myeloid leukemia in São José dos Campos, São Paulo. **Sao Paulo Medical Journal**, [s.l.], v. 124, n. 1, p.45-47, fev. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-31802006000100010>.

CALLERA, F. et al. **Manual de Condutas em Doenças Onco-Hematológicas do Adulto**. 2013. Disponível [http://issuu.com/tiago185/docs/manual\\_de\\_condutas\\_em\\_doencas\\_onco-hematologicas\\_d](http://issuu.com/tiago185/docs/manual_de_condutas_em_doencas_onco-hematologicas_d)>Acesso em: 31 maio 2018.

CAMPION, A. Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials. Practical Spectroscopy Series. **Journal of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 123, n. 42, p.10427-10427, out. 2001. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja004845m>.

CARVALHO, Q.G.S.; PEDROSA, W.A.; SEBASTIÃO, Q.P. Leucemia mieloide aguda versus ocupação profissional: perfil dos trabalhadores atendidos no Hospital de Hematologia de Recife. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, [s.l.], v. 45, n. 6, p.1446-1451, dez. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0080-62342011000600024>.

CASTRO, G.C.; BRAGA, A.P.; YEHIA, H.C. Análise de Metodologia de Seleção de Características e Aplicação para Seleção e Classificação de Tipos de Leucemia Aguda.

**Proceedings Seminário Interno da Disciplina de Técnicas Clássicas de Reconhecimento de Padrões**, p83. jul.2010,

CASTRO, M.S.M.; VIEIRA, V.A.; ASSUNÇÃO, R.M. Padrões espaço temporais da mortalidade por câncer de pulmão no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.131-143, jun. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-790x2004000200003>.

CHAN, J.W. et al. Nondestructive Identification of Individual Leukemia Cells by Laser Trapping Raman Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 80, n. 6, p.2180-2187, mar. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac7022348>.

CHAUFFAILLE, M.L.L.F.; BORRI, D.; MARTINS, S.L.R. Leucemia mielóide aguda t(8;21): frequência em pacientes brasileiros. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.99-103, 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842004000200006>.

CHENG J, SAKAMOTO KM. Topics in Pediatric Leukemia - Acute Myeloid Leukemia. **Medscape General Medicine**. v.7, n.1, mar.2005.

CHESELLS, J. M., et al. The Impact of Age on Outcome in Lymphoblastic Leukaemia; MRC UKALL X and XA Compared: a Report from the MRC Paediatric and Adult Working Parties. **Leukemia**, [s.l.], v. 12, n. 4, Leukemia,1998, pp.463-473

DAUNOBLASTINA: Cloridrato de Daunorrubicina: José Cláudio Bumerad - CRF-SP nº 4376. Itália: Actavis Italy S.p.A. 2013. Bula de remédio.

COLLEONI, G.w.b. et al. Leucemia mielóide aguda Ph1-positivo de novo ou crise blástica de leucemia mielóide crônica? Análise molecular e evolução clínica de um caso. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.253-255, set. 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-42301998000300015>.

CROW, P. et al. The use of Raman spectroscopy to identify and characterize transitional cell carcinoma in vitro. **BJU International**, [s.l.], v. 93, n. 9, p.1232-1236, jun. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-410x.2004.04852.x>.

DANTAS, G.K.S. et al. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA EM PACIENTES INFANTO-JUVENIS. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, [s.l.], p.3-18, 2015. Universidade Vale do Rio Verde (UninCor). <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v13i1.1877>.

DESCHLER, B; LÜBBERT, M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. **Cancer**, [s.l.], v. 107, n. 9, p.2099-2107, 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.22233>.

DOHNER, H. et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, [s.l.], v. 115, n. 3, p.453-474, 30 out. 2009. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-07-235358>.

EKLOUH-MOLINIER, C. et al. In vivo confocal Raman microspectroscopy of the human skin: highlighting of spectral markers associated to aging via a research of correlation between Raman and biometric mechanical measurements. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 407, n. 27, p.8363-8372, 22 ago. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-015-8964-z>

ERRANTE, P.R.; FRAZÃO, J.B.; CONDINO NETO, A. Congenital neutropenia. **Brazilian Journal of Allergy And Immunology (BJAI)**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.23-38, 2013. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/2318-5015.20130006>.

ESPARZA, S.; SAKAMOTO, K. Topics in pediatric leukemia acute lymphoblastic leukemia. *Medscape General Medicine*, v.7, n.1, p.23, Mar. 2005

ESTEY, E.; DÖHNER, H. Acute myeloid leukaemia. **The Lancet**, [s.l.], v. 368, n. 9550, p.1894-1907, nov. 2006. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(06\)69780-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(06)69780-8).

FAILACE, R.; PRANKE, P. Avaliação dos critérios de liberação direta dos resultados de hemogramas através de contadores eletrônicos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.159-166, 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842004000300004>.

FARIA, D.L.A ; SANTOS, L.G.C.A. A demonstração sobre o espalhamento inelástico da luz: repetindo o experimento de Raman. *Química Nova*, n.20, v.3, p.319-23, 1997.

FARIAS, M.G.; CASTRO, S.M.. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s.l.], v. 40, n. 2, p.91-98, abr. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442004000200008>.

FENDER, A.B. et al. Congenital Leukemia Cutis. **Pediatric Dermatology**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.34-37, jan. 2008. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1525-1470.2007.00578.x>.

FERNANDES, L. et al. Estudo do processo inflamatório do tendão do manguito rotator por espectroscopia FT-Raman. In: IX ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E V ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO - UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA, 2005, São José dos Campos: Univap, 2005. v. 1, p. 323 - 325

FERREIRA, M.M.C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.724-731, set. 1999. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40421999000500016>.

GARDIN, C. et al. Postremission treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia in first complete remission after intensive induction chemotherapy: results of the multicenter randomized Acute Leukemia French Association (ALFA) 9803 trial. **Blood**, [s.l.], v. 109, n. 12, p.5129-5135, 15 jun. 2007. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-02-069666>.

GELADI, P.; KOWALSKI, B.R. Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 185, p.1-17, 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670\(86\)80028-9](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670(86)80028-9).

GOKBUGET, N. et al. TREATMENT OF ADULT ALL ACCORDING TO PROTOCOLS OF THE GERMAN MULTICENTER STUDY GROUP FOR ADULT ALL (GMALL). **Hematology/Oncology Clinics of North America**, [s.l.], v. 14, n. 6, p.1307-1325, dez. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0889-8588\(05\)70188-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0889-8588(05)70188-x).

GÖKBUGET, N.; HOELZER, D. Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **Seminars in Hematology**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.64-75, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminhematol.2008.09.003>.

GOMES, F.S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de Nutrição**, [s.l.], v. 20, n. 5, p.537-548, out. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52732007000500009>.

GONZÁLEZ-SOLÍS, J.L. et al. Monitoring of chemotherapy leukemia treatment using Raman spectroscopy and principal component analysis. **Lasers in Medical Science**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.1241-1249, 10 jan. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-013-1515-y>.

GROTTO, H.Z.W. O hemograma: importância para a interpretação da biópsia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 31, n. 3, p.178-182, 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842009005000045>.

GUIMARÃES, L.O. Caracterização de subpopulações de Leucemi Mieloide Aguda portadora de rearranjo MLL quanto à resposta diferencial ao tratamento em longo prazo com Citarabina [tese de doutorado]. [São Paulo]: USP - Universidade de São Paulo, 2015. Disponível em: <file:///C:/Users/Downloads/Larissa.pdf>.

GUYTON, A.C; HALL, J.E. **Guyton & Hall - Tratado de Fisiologia médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. Unidade VI.

HAFERLACH, T. et al. Diagnostic pathways in acute leukemias: a proposal for a multimodal approach. **Annals of Hematology**, [s.l.], v. 86, n. 5, p.311-327, 14 fev. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-007-0253-2>.

HAMERSCHLAK, N. et al. Estudo retrospectivo do tratamento de leucemia mielóide aguda com o transplante de medula óssea: a experiência brasileira. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.11-18, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842006000100005>.

HAMERSCHLAK, N. Leucemia: fatores prognósticos e genética. **Jornal de Pediatria**, [s.l.], v. 84, n. 4, p.52-57, ago. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0021-75572008000500008>.

HANLON, E. B et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Physics in Medicine and Biology**, [s.l.], v. 45, n. 2, p. 51-59, feb.2000.

HEANEY, Mark L.; GOLDE, David W. Myelodysplasia. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 340, n. 21, p.1649-1660, 27 maio 1999. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199905273402107>

HELMAN, R. et al. Acute myeloid leukemia: update in diagnosis and treatment in Brazil. **Einstein (São Paulo)**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.179-183, jun. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-45082011ao1853>.

HOBRO, A.J. et al. Time Dependence of SERS Enhancement for Pyrimidine Nucleosides. **Journal of Physical Chemistry C**, [s.l.], v. 114, n. 16, p.7314-7323, 29 mar. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp908968h>.

HUANG, Wei E. et al. Raman Microscopic Analysis of Single Microbial Cells. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 76, n. 15, p.4452-4458, ago. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac049753k>.

HUANG, C. et al. Multiclass Prediction with Partial Least Square Regression for Gene Expression Data: Applications in Breast Cancer Intrinsic Taxonomy. **BioMed Research**

**International**, [s.l.], v. 2013, p.1-9, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/248648>.

HUTCHINGS, J. et al. Rapid Raman microscopic imaging for potential histological screening. **Biomedical Optical Spectroscopy**, [s.l.], p.305-320, 7 fev. 2008. SPIE. <http://dx.doi.org/10.1117/12.786440>.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde (Comp.). **Estimativas de Câncer para 2018**. 2018. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/subtipos>>. Acesso em: 13 maio 2018.

JACKSON, M.; SOWA, M.G.; MANTSCH, H.H. Infrared spectroscopy: a new frontier in medicine. **Biophysical Chemistry**, [s.l.], v. 68, n. 1-3, p.109-125, out. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0301-4622\(97\)80555-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0301-4622(97)80555-8).

JERMYN, M. et al. Raman spectroscopy detects distant invasive brain cancer cells centimeters beyond MRI capability in humans. **Biomedical Optics Express**, [s.l.], v. 7, n. 12, p.5129-5137, 16 nov. 2016. The Optical Society. <http://dx.doi.org/10.1364/boe.7.005129>.

JESS, P.R.T. et al. Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy. **International Journal of Cancer**, [s.l.], v. 121, n. 12, p.2723-2728, 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.23046>.

JUNG, S. Theragnostic pH-Sensitive Gold Nanoparticles for the Selective Surface Enhanced Raman Scattering and Photothermal Cancer Therapy. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 85, n. 16, p.7674-7681, 9 ago. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac401390m>.

LASCH, P. Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [s.l.], v. 117, p.100-114, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2012.03.011>.

LEITE, E.P. et al. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.413-421, dez. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1519-38292007000400009>.

LEVINE, R. L.; GILLILAND, D. G. Myeloproliferative disorders. **Blood**, [s.l.], v. 112, n. 6, p.2190-2198, 8 set. 2008. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-03-077966>.

LEYTO-CRUS, F. Leucemia Mieloide Aguda. **Revista de Hematologia**, México, v. 1, n. 19, p.24-40, jan. 2018. Disponível em: <<http://www.medigraphic.com/pdfs/hematologia/re-2018/re181d.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2018.

LIMA, M.C. et al. Acute Myeloid Leukemia: analysis of epidemiological profile and survival rate. **Jornal de Pediatria**, [s.l.], v. 92, n. 3, p.283-289, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2015.08.008>.

LONDON, S.J. A Prospective Study of Benign Breast Disease and the Risk of Breast Cancer. **Jama: The Journal of the American Medical Association**, [s.l.], v. 267, n. 7, p.941-944, 19 fev. 1992. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1992.03480070057030>.

LOWENBERG, B; BURNETT, A K. **Acute Myeloid Leukaemia in Adults**. Irlanda: Elsevier, 2003. 221 p. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/8523808\\_Adult\\_acute\\_myeloid\\_leukaemia](https://www.researchgate.net/publication/8523808_Adult_acute_myeloid_leukaemia)>. Acesso em: 13 maio 2018.

LOWENBERG, B.; DOWNING, J. R.; BURNETT, A. Acute Myeloid Leukemia. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 341, n. 14, p.1051-1062, 30 set. 1999. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199909303411407>.

MAHADEVAN-JANSEN, A. Raman spectroscopy for the detection of cancers and precancers. **Journal Of Biomedical Optics**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.31-70, 1996. SPIE-Intl Soc Optical Eng. <http://dx.doi.org/10.1117/12.227815>.

MANAGÒ, S. et al. A reliable Raman-spectroscopy-based approach for diagnosis, classification and follow-up of B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-13, 19 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep24821>.

MAQUELIN, K. et al. Raman Spectroscopic Method for Identification of Clinically Relevant Microorganisms Growing on Solid Culture Medium. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 72, n. 1, p. 12-19, jan. 2000. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac991011h>.

MAQUELIN, K. et al. Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 324-329, 1 jan. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.41.1.324-329.2003>.

MARTINS, S.L.R.; FALCÃO, R.P. A importância da imunofenotipagem na Leucemia Mielóide Aguda. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.57-62, mar. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-42302000000100009>.

MATTHÄUS, C. et al. Chapter 10 Infrared and Raman Microscopy in Cell Biology. **Methods in Cell Biology**, [s.l.], p.275-308, 2008. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)00610-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x(08)00610-9).

MENG-ER, H. et al. Use of All-trans Retinoic Acid in the Treatment of Acute Promyelocyte Leukemia. **Haematology and Blood Transfusion / Hämatologie Und Bluttransfusion**, [s.l.], p.88-96, 1989. Springer Berlin Heidelberg. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-74621-5\\_14](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-74621-5_14).

MICHAELIS. **Dicionário UOL da Língua Portuguesa**. 2018. Disponível em: <<http://michaelis.uol.com.br/moderno-portugues/busca/portugues-brasileiro/HEMATOLOGIA/>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

MITCHELL, B. L. et al. **Journal of Raman Spectroscopy**. v.39, p380-388, 2008.

MOORMAN, A. V. et al. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. **Blood**, [s.l.], v. 109, n. 8, p.3189-3197, 15 abr. 2007. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-10-051912>.

MORTUZA, F. Y. Minimal Residual Disease Tests Provide an Independent Predictor of Clinical Outcome in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.1094-1104, 15 fev. 2002. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.20.4.1094>.

MROZEK, K. et al. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification?. **Blood**, [s.l.], v. 109, n. 2, p.431-448, 15 jan. 2007. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-06-001149>.

MRÓZEK, K.; A HEEREMA, N.; BLOOMFIELD, C.D. Cytogenetics in acute leukemia. **Blood Reviews**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.115-136, jun. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0268-960x\(03\)00040-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0268-960x(03)00040-7).

NAUMANN, D et al. FT-IR spectroscopy and FT-Raman spectroscopy are powerful analytical tools for the non-invasive characterization of intact microbial cells. **Journal of Molecular Structure**, [s.l.], v. 347, p.399-405, mar. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2860\(95\)08562-a](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2860(95)08562-a).

NAVES, M.M.V. Beta - caroteno e câncer. **Revista de Nutrição**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.99-115, dez. 1998. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52731998000200001>.

NEYMAN, J. Outline of a Theory of Statistical Estimation Based on the Classical Theory of Probability. **Philosophical Transactions of The Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, [s.l.], v. 236, n. 767, p.333-380, 30 ago. 1937. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rsta.1937.0005>.

NGUYEN, D. V.; ROCKE, D. M. Tumor classification by partial least squares using microarray gene expression data. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.39-50, 1 jan. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/18.1.39>.

NGUYEN, D. V.; ROCKE, D. M. Multi-class cancer classification via partial least squares with gene expression profiles. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 18, n. 9, p.1216-1226, 1 set. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/18.9.1216>.

NUNES, C.A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 23, n. 11, p.2003-2010, nov. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532012005000073>.

OCEAN Optics. 2018. **Raman Spectroscopy**. Disponível em: <<https://oceanoptics.com/measurementtechnique/raman-spectroscopy>>. Acesso em: 25 maio 2018.

OKUNO, E. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DEVIDO A RADIAÇÕES E A ELABORAÇÃO DE RECOMENDAÇÕES. **Revista Brasileira de Física Médica**, São Paulo, v. 1, n. 3, p.43-55, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.rbfm.org.br/rbfm/article/view/34/v3n1p43>>. Acesso em: 20 maio 2018.

OLIVEIRA, A.P; MARCHIORI, E.; SOUZA JUNIOR, A.S. Comprometimento pulmonar nas leucemias: avaliação por tomografia computadorizada de alta resolução.

**Radiologia Brasileira**, [s.l.], v. 37, n. 6, p.405-412, dez. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-39842004000600005>.

OLIVEIRA, F.S.S.; GIANA, H.E.; SILVEIRA, L. Discrimination of selected species of pathogenic bacteria using near-infrared Raman spectroscopy and principal components analysis. **Journal of Biomedical Optics**, [s.l.], v. 17, n. 10, p.821409-821430, 9 out. 2012. SPIE-Intl Soc Optical Eng. <http://dx.doi.org/10.1117/1.jbo.17.10.107004>.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS NO BRASIL. BRASÍLIA. (Ed.). Casos de câncer devem aumentar 70% até 2038, calcula OMS. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/casos-de-cancer-devem-aumentar-70-ate-2038-calcula-oms/>>. Acesso em: 13 maio 2018.

ONG, Y.H.; LIM, M.; LIU, Q. Comparison of principal component analysis and biochemical component analysis in Raman spectroscopy for the discrimination of apoptosis and necrosis in K562 leukemia cells. **Optics Express**, [s.l.], v. 20, n. 20, p.22158-22172, 12 set. 2012. The Optical Society. <http://dx.doi.org/10.1364/oe.20.022158>.

OTTMANN, O. G. Treatment of Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology**, [s.l.], v. 2005, n. 1, p.118-122, 1 jan. 2005. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/asheducation-2005.1.118>.

OZAKI, Y. et al. Raman Spectroscopic Study of Cataract Formation: Emory Mouse Cataract. **Applied Spectroscopy**, [s.l.], v. 41, n. 4, p.597-605, maio 1987. SAGE Pu

PARIKH, R. et al. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. **Indian Journal of Ophthalmology**, [s.l.], v. 56, n. 1, p.45-50, 2008. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0301-4738.37595>.

PARK, T.S. et al. Acute erythroleukemia with der(1;7)(q10;p10) as a sole acquired abnormality after treatment with azathioprine. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, [s.l.], v. 186, n. 1, p.58-60, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2008.06.003>

PATEL, J.P. et al. prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 366, n. 12, p.1079-1089, 22 mar. 2012. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1112304>.

PELLOSO, L.A.F. et al. Cariótipo em leucemia mielóide aguda: importância e tipo de alteração em 30 pacientes ao diagnóstico. **Revista da Associação Médica Brasileira**,

[s.l.], v. 49, n. 2, p.150-155, jun. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-42302003000200032>.

PINO-BLANCO, D. et al. Caracterización inmunofenotípica de pacientes con leucemia mieloide aguda. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, Cuba, v. 1, n. 30, p.27-35, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.medigraphic.com/pdfs/revcubheminmhem/rch-2014/rch141e.pdf>>. Acesso em: 03 maio 2018.

PINTO, M.T.; PICHON-RIVIERE, A.; BARDACH, A. Estimativa da carga do tabagismo no Brasil: mortalidade, morbidade e custos. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.1283-1297, jun. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311x00192013>.

PLACKE, T. et al. Requirement for CDK6 in MLL-rearranged acute myeloid leukemia. **Blood**, [s.l.], v. 124, n. 1, p.13-23, 24 abr. 2014. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-02-558114>.

PODSTAWKA, E.; NIAURA, G. Potential-Dependent Characterization of Bombesin Adsorbed States on Roughened Ag, Au, and Cu Electrode Surfaces at Physiological pH. **Journal of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 113, n. 31, p.10974-10983, 6 ago. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp903847c>.

PUI, C.; EVANS, W.E. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 354, n. 2, p.166-178, 12 jan. 2006. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra052603>.

RAJU, T.N.K. et al. Two. **Pediatrics**, [s.l.], v. 116, n. 3, p.732-735, 1 set. 2005. American Academy of Pediatrics (AAP). <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2005-1134>.

RAVANDI, F. Therapy-related acute promyelocytic leukemia. **Haematologica**, [s.l.], v. 96, n. 4, p.493-495, 31 mar. 2011. Ferrata Storti Foundation (Haematologica). <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2011.041970>.

RIBAS, M.M. **Clínica Geral e Hematologia: Leucemias Agudas**. 2016. Disponível em: <<http://www.marleneribas.com.br/img/posts/p/1342825319.jpg>>. Acesso em: 13 maio 2018.

RODRIGUES, A.G.; GALZERANI, J.C. Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.43091-43099, dez. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-11172012000400009>

ROWE, J.M. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial. **Blood**, [s.l.], v. 106, n. 12, p.3760-3767, 1 dez. 2005. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-04-1623>.

SAGRILLO, M.R. et al. Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.94-101, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842005000200008>.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. UNESP 2003, 115p.

SALLAN, S.E. Myths and Lessons from the Adult/Pediatric Interface in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology**, [s.l.], v. 2006, n. 1, p.128-132, 1 jan. 2006. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/asheducation-2006.1.128>.

SANCHES, F.L.F.Z. et al. Comparison of biochemical and immunological profile of pediatric patients with acute myeloid leukemia in relation to healthy individuals. **Jornal de Pediatria**, [s.l.], v. 91, n. 5, p.478-484, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2014.12.004>.

SANTOS, E. **Development of a Rapid and Low Cost Methodology for the Diagnosis of Sickle Cell Anemia**. 2014. 1 v. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Universidade de São Paulo - Usp, São Paulo, 2014.

SANZ, M. A. Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia. **Hematology**, [s.l.], v. 2006, n. 1, p.147-155, 1 jan. 2006. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/asheducation-2006.1.147>.

SCHAFFEL, R.; SIMÕES, B.P. Leucemia Linfoblástica Aguda Filadélfia positiva. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 30, p.52-58, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842008000700013>.

SCHATZ, G.C.; VANDUYNE, R. **Electromagnetic Mechanism of Surface-Enhanced Spectroscopy**. In: Chalmers J. and Griffiths P.R.E. Nova York: John Wiley & Sons Ltd, 2002. 17 p. Disponível em: <[https://cpb-us-e1.wpmucdn.com/sites.northwestern.edu/dist/f/44/files/2012/10/2002\\_Schatz.pdf](https://cpb-us-e1.wpmucdn.com/sites.northwestern.edu/dist/f/44/files/2012/10/2002_Schatz.pdf)>. Acesso em: 02 jan. 2018.

SEBALLOS, L. et al. Competitive binding effects on surface-enhanced Raman scattering of peptide molecules. **Chemical Physics Letters**, [s.l.], v. 447, n. 4-6, p.335-339, out. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2007.09.040>.

SILVA, G.C. da et al. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.77-84, abr. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442006000200004>.

SILVA, A.M. **Identificação do Espectro protéico plasmático de pacientes com Leucemia Mieloide Aguda através da espectroscopia Raman: Uma nova metodologia para o monitoramento.** 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Biomédica, Bioengenharia, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

SLOVAK, M.L. et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. **Blood**, San Antonio, v. 13, n. 96, p.4075-4083, dez. 2000. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.868.2486&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

SMITH, E; DENT, G. **Modern Raman sprectroscopy: a pratical approach.** Chichester: John Wiley & Sons, 2013. 217p

SOSSELA, F.R.; ZOPPAS, B.C.A.; WEBER, L.P. Chronic Myeloid Leukemia: clinical aspects, diagnosis and main changes observed in complete blood count. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [s.l.], v. 49, n. 2, p.127-130, 2017. Revista Brasileira de Analises Clinicas. <http://dx.doi.org/10.21877/2448-3877.201700543>

SOUZA, F.B. et al. Avaliação do ácido láctico intramuscular através da espectroscopia Raman: novas perspectivas em medicina do esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.388-395, nov. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-86922003000600004>.

STONE, N. et al. Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. **Faraday Discussions**, [s.l.], v. 126, p.141-147, 2004. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b304992b>.

SWERDLOW, S.H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood**, [s.l.], v. 127, n. 20, p.2375-2390, 15 mar. 2016. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>.

TAKATSUKI, K; MATSUOKA, M; YAMAGUCHI, K. Adult T-cell leukemia in Japan. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, Japão, v. 1, n. 13, p.15-19, mar. 1996.

THOMAS, D.A. Philadelphia Chromosome Positive Acute Lymphocytic Leukemia: A New Era of Challenges. **Hematology**, [s.l.], v. 2007, n. 1, p.435-443, 1 jan. 2007. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/asheducation-2007.1.435>.

VANNA, R. et al. Raman spectroscopy for the assessment of acute myeloid leukemia: a proof of concept study. **Biomedical Vibrational Spectroscopy Vi: Advances in Research and Industry**, [s.l.], p.1-10, 4 mar. 2014. SPIE. <http://dx.doi.org/10.1117/12.2039186>.

VARDIMAN, J.W. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood**, [s.l.], v. 100, n. 7, p.2292-2302, 21 jun. 2002. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-04-1199>.

VELLOSO, E.D.R.P. et al. Molecular and cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia: review and case studies. **Einstein (São Paulo)**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.184-189, jun. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-45082011ao2041>.

VERRASTRO, T.; LORENZI, T.F.; WENDEL NETO, S. **Hematologia e hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica**. São Paulo: Atheneu, 2005.pp3-4.

WEI, F. et al. Aromatic Amino Acids Providing Characteristic Motifs in the Raman and SERS Spectroscopy of Peptides. **Journal Of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 112, n. 30, p.9158-9164, jul. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jp8025732>.

WHO - World Health Organization. Haematopoietic and lymphoid malignancies. In: International Agency for Ressearch on Cancer (IARC). World Cancer Report. Lyon: IARC; 2014. p. 703-722

WILKINSON, G.R.R.J.H. Clark and R. E. Hester (Editors). Advances in infrared and Raman spectroscopy, vol. 12. Wiley, New York. 1985. **Journal of Raman Spectroscopy**, [s.l.], v. 17, n. 6, p.487-487, dez. 1986. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jrs.1250170613>.

ZANICHELLI, M.A.; COLTURATO, V.R.; JAIRO SOBRINHO. Indicações em transplante de células-tronco hematopoéticas em pacientes adultos com leucemia

linfoide aguda. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 32, p.54-60, maio 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842010005000030>.

ZERBINI, M.C.N. et al. Classificação da Organização Mundial da Saúde para os tumores dos tecidos hematopoético e linfoide, 4a edição, 2008 - principais modificações introduzidas em relação à 3a edição, 2001. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s.l.], v. 57, n. 1, p.66-73, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-42302011000100019>

# APÊNDICE

## Apêndice A

UNIVERSIDADE PAULISTA -  
UNIP / VICE-REITORIA DE  
PESQUISA E PÓS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ESPECTROS RAMAN DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E COM LEUCEMIAS AGUDAS e A DEFINIÇÃO DE UM PERFIL ESPECTRAL PARA DIAGNÓSTICO PRECOCE E

**Pesquisador:** ADRIANO MORAES DA SILVA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 67895617.5.0000.5512

**Instituição Proponente:** Universidade Paulista - UNIP / Vice-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.059.140

**Apresentação do Projeto:**

adequada

**Objetivo da Pesquisa:**

adequado

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

de acordo

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

nada a declarar

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

adequados

**Recomendações:**

nada a declarar

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

nada a declarar

**Endereço:** Rua Dr. Barcelar, 1212

**Bairro:** Vila Clementino

**CEP:** 04.026-002

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)5586-4090

**Fax:** (11)5586-4073

**E-mail:** cep@unip.br

Continuação do Parecer: 2.059.140

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_887196.pdf	03/05/2017 19:36:18		Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.jpg	03/05/2017 19:35:39	ADRIANO MORAES DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	rosto.pdf	28/03/2017 20:07:29	ADRIANO MORAES DA SILVA	Aceito
Outros	intencao_pesquisa.JPG	28/03/2017 10:29:56	ADRIANO MORAES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_Detalhado_RAMAN_Adriano_Landulfo.doc	26/03/2017 18:14:06	ADRIANO MORAES DA SILVA	Aceito
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO.jpg	26/03/2017 18:09:06	ADRIANO MORAES DA SILVA	Aceito
Outros	TERMO_DE_AUTORIZACAO_PRONTUARIO.jpg	26/03/2017 18:07:11	ADRIANO MORAES DA SILVA	Aceito
Outros	NAO_TCLE.jpg	26/03/2017 18:02:17	ADRIANO MORAES DA SILVA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 11 de Maio de 2017

---

**Assinado por:**  
**MENDEL ABRAMOWICZ**  
**(Coordenador)**