

Artigo / Article

Análise comparativa da intensidade de fluorescência de CD10 e de CD19 em blastos leucêmicos e hematogônias

CD10 and CD19 fluorescence intensity of leukemic blasts and hematogones – A comparative analysis

Jesamar C. Matos¹Fátima M. G. Jorge¹José A. N. Queiroz²

Hematogônias são células jovens normais da medula óssea responsáveis pela produção das células de linhagem B do sistema imunológico. A leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B representa um dos tipos de transformação neoplásica destes precursores hematopoéticos. Devido à alta similaridade citológica das hematogônias e dos blastos leucêmicos, é possível haver erros de interpretação em suas análises, sendo importante, em algumas circunstâncias, o uso de técnicas complementares diagnósticas para diferenciá-las. Os antígenos CD10 e CD19 estão expressos em ambos os tipos celulares, e uma extensão no uso de outros marcadores é necessária para caracterização da natureza benigna ou maligna das células. Foram testadas possíveis diferenças nas curvas de expressão de CD10 e CD19 dos dois tipos celulares. Para o grupo em estudo, foram colhidas 39 amostras de pacientes portadores de LLA de linhagem B por ocasião do diagnóstico. A idade variou de 0 a 14 anos com uma média de 6,6 anos. Como grupo controle, foram também colhidas 36 amostras de medula óssea de pacientes pediátricos não portadores de neoplasia. A idade variou de 0 a 15 anos com uma média de 5 anos. Nos dois grupos, as diferenças nos gráficos das distribuições de intensidade de fluorescência (IF) de CD10 e CD19 foram analisadas quanto aos parâmetros: Média (ME), desvios-padrão (DP), coeficientes de variação (CV), coeficientes de inclinação (CI) e coeficiente de curtose (CC). Os valores individuais destes parâmetros de cada amostra foram comparados com os intervalos gerados pelo grupo controle: $ME \pm 2DP$; $ME \pm 2,5DP$ e $ME \pm 3DP$. Foi possível distinguir os dois grupos com 89,7% e 75%, 79,5% e 100%, 71,8% e 100%, de sensibilidade e especificidade para os respectivos intervalos. As expressões de CD10 e CD19 em blastos e hematogônias são diferentes, podendo ser de utilidade prática na distinção entre os dois tipos celulares. Rev. bras. hematol. hemoter. 2007;29(2):114-118.

Palavras-chave: Hematogônia; citometria de fluxo; leucemia linfóide aguda.

Introdução

Células precursoras linfóides de linhagem B, também conhecidas como hematogônias, presentes na medula óssea em condições normais, apresentam características morfológicas e imunofenotípicas semelhantes aos blastos leucêmicos na leucemia linfoblástica aguda (LLA). Pode haver dificuldades na diferenciação laboratorial dos dois tipos celu-

lares, sendo, por vezes, necessária uma extensão do seu estudo para melhor caracterização.¹³ As hematogônias, pelas técnicas de coloração convencionais com o azul de metileno, parecem muito com os blastos das LLAs subtipo L1 da classificação franco-americana-britânica (FAB).⁵ A diferenciação se faz necessária visto que, em algumas circunstâncias, os precursores normais da medula óssea podem estar aumentados e conduzir a um erro de interpretação. Pacientes porta-

¹HIAS – Hospital Infantil Albert Sabin "Centro de Referência do Diagnóstico do Câncer da Criança e do Adolescente Dr. Murilo Martins"

²UFC – Departamento de Patologia e Medicina Legal.

Trabalho desenvolvido no Centro de Referência do Diagnóstico do Câncer da Criança e do Adolescente Dr. Murilo Martins (Fortaleza/Ce)

Correspondência: Jesamar Correia Matos
Rua da Paz, 240 Apto 101 – Mucuripe
60165-160 – Fortaleza-Ce – Brasil
E-mail: jesamar@uol.com.br

dores de LLA também podem ter um aumento de células jovens linfóides na medula óssea com características blásticas após tratamento quimioterápico ou transplante de medula óssea, como consequência de um estado regenerativo deste órgão, sem que necessariamente represente uma falha terapêutica ou recidiva da doença. O mesmo pode acontecer na reavaliação citológica no vigésimo nono dia dos protocolos terapêuticos para LLA onde, de rotina, se realiza um mielograma.¹¹ O CD19 e o CD10 já foram referidos na literatura para distinção de blastos leucêmicos dos precursores linfóides normais da medula por técnicas quantitativas de citometria de fluxo (CMF), pela análise diferencial da intensidade de expressão destes marcadores.² A imunofenotipagem multiparamétrica é uma ferramenta poderosa para se obter uma clara diferenciação entre células normais e doentes.³

As células normais podem ser diferenciadas morfologicamente das patológicas, entretanto, não é incomum a dúvida diagnóstica. A CMF, com o uso de vários anticorpos monoclonais, permite a identificação precisa das células quanto à sua linhagem, nível de maturação e natureza destas quanto à benignidade ou malignidade. Sua caracterização já está bem definida na literatura.^{4,12} A identificação de um perfil imunofenotípico é a base na distinção das duas entidades e requer um painel de anticorpos amplo. A dupla expressão de CD10 e CD19 constitui o perfil básico de células linfóides de linhagem B.⁷ O uso isolado destes dois marcadores imunológicos para diferenciação precisa de blastos leucêmicos de hematogônias não foi encontrado em publicações anteriores.

Casística e Métodos

O objetivo foi a comparação dos histogramas da expressão do marcador CD10 e do CD19 em hematogônias e blastos leucêmicos quanto às suas características geométricas. O estudo foi realizado no Hospital Infantil Albert Sabin, de Fortaleza, no período de janeiro a dezembro de 2004, com a coleta de 36 amostras de medula óssea de pacientes pediátricos, não portadores de neoplasia, para o grupo controle, e 39 amostras de medula óssea de pacientes pediátricos portadores de LLA de linhagem B. As extensões de medula foram coradas com o azul de metileno, segundo Leishman, para a análise citológica e citoquímica, por dois citopatologistas. Adotou-se o critério de 30% de blastos sobre o total dos elementos nucleados da medula para o diagnóstico de LLA. O estudo imunofenotípico por CMF foi realizado com o FACSCalibur e software

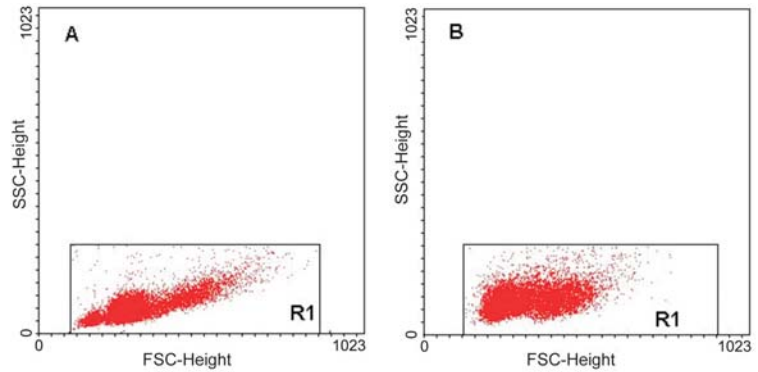


Figura 1. Dot plot representativo da definição da região R1 (FSC x SSC) em pacientes não-neoplásicos (A) e em pacientes com LLA (B)

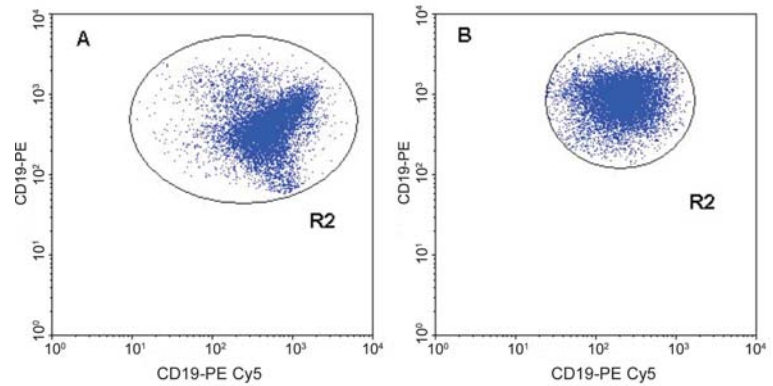


Figura 2. Dot plot representativo da definição da região R1 (FL2 x FL3) em pacientes não-neoplásicos (A) e em pacientes com LLA (B)

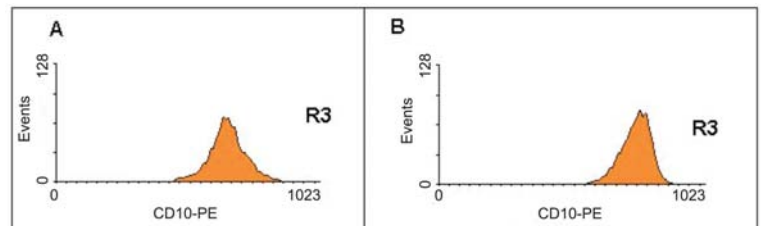


Figura 3. Histogramas representativos da expressão da IF de CD10 em R3 (R1

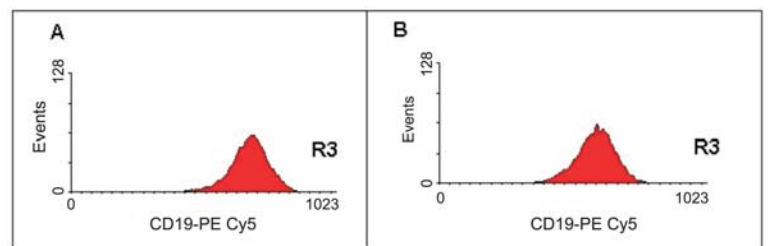


Figura 4. Histogramas representativos da expressão da IF de CD19 em R3 (R1 ∩ R2) em pacientes não-neoplásicos e em pacientes com LLA (B)

CellQuest (Becton Dickinson). Como controle de qualidade e compensação do citômetro foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD45 nas três cores FITC, PE (Clones: ML2-IQP) e PE-Cy5; (Clone: HI30 BD – Pharmingen) em amostras de sangue periférico de pacientes sem neoplasia. Para o diagnóstico e classificação das leucemias utilizaram-se os critérios do grupo EGIL⁶ sendo realizada a aquisição de 10.000 eventos na região (GATE) de pequeno tamanho e baixa complexidade definida pelos parâmetros FSC x SSC. Utilizou-se um painel de três cores com os seguintes marcadores: CD19-PE Cy5 (Clone: HIB19 BD – Pharmingen); CD10-PE (Clone: ALB1 – Immunotech); CD22-PE (Clone: HIB22 – Immunotech); CD79a-PE (Clone: HM47 BD – Pharmingen); CD45-PE Cy5 (Clone: HI30 BD – Pharmingen); CD34-PE (Clone: 581 – IQP); TdT-PE (Clone: E17-1519 BD – Pharmingen); HLA-DR-FITC (Clone: G46-6 BD – Pharmingen); CD3-FITC (Clone: UCHT1 – Immunotech); CD7-FITC (Clone: B-B7 – IQP); CD13-PE (Clone: 22A5 – IQP); CD33-PE (Clone: WM53 BD – Pharmingen) e MPO-FITC (Clone: 266.6K2 – IQP). O processamento seguiu o protocolo de consenso para imunofenotipagem das neoplasias hematológicas por CMF¹⁴ e o General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology.² Na aquisição das amostras dos dois grupos em estudo utilizou-se um painel de duas cores (PE e PE-Cy5) registrando-se apenas os eventos com dupla expressão de CD10 e CD19. Definiu-se inicialmente uma região de pequeno tamanho e baixa complexidade (R1) no dot plot FSC x SSC (Figura 1). Uma segunda região (R2) foi definida no dot plot FL-2 x FL-3 na área referente a dupla positividade para CD10 e CD19 respectivamente (Figura 2). A região (R3) foi definida pela interseção das duas primeiras regiões (R3 = R1 ∩ R2). Foram adquiridos e gravados 10.000 eventos em R3, obtendo-se as curvas de IF de CD10 (Figura 3) e IF de CD19 (Figura 4) em histogramas. Todas as aquisições foram analisadas pela planilha gráfica em Excel® ReadFCS para extração dos valores de FL2 e FL3 de cada evento e posterior cálculo dos seguintes parâmetros de avaliação (PA): ME de IF de CD10 (PA1); DP de IF de CD10 (PA2); CV de IF de CD10 (PA3); CI de IF de CD10 (PA4); CC de IF de CD10 (PA5); ME de IF de CD19 (PA6); DP de IF de CD19 (PA7); CV de IF de CD19 (PA8); CI de IF de CD19 (PA9); e CC de IF de CD19 (PA10). Nas LLAs: ME de IF de CD10 (PA11); DP de IF de CD10 (PA12); CV de IF de CD10 (PA13); CI de IF de CD10 (PA14); CC de IF de CD10 (PA15); ME de IF de CD19 (PA16); DP de IF de CD19 (PA17); CV de IF de CD19 (PA18); CI de IF de CD19 (PA19); e CC de IF de CD19 (PA20).

Utilizou-se o teste estatístico de Kolmogorov-Smirnov (KS) e o teste-t de Student para análise dos valores obtidos para estes parâmetros. Os valores individuais dos PA, de cada amostra, da medula dos pacientes com LLA foram comparados com os intervalos gerados pela ME ± 2 DP, ME ±2,5 DP e ME ±3 DP dos respectivos PA do grupo controle.

Resultados

No grupo controle, 19 (52,7%) pacientes eram do sexo masculino e 17 (47,3%) do sexo feminino e a idade variou de 0 a 15 anos com uma média de 5 anos. Nos pacientes portadores de LLA, 23 (58,9%) eram do sexo masculino e 16 (41,1%) do feminino e a idade variou de 0 a 14 anos com uma média de 6,6 anos. Na análise citológica, de acordo com a classificação FAB, das 39 amostras do grupo dos pacientes com LLA, 28 (71,8%) foram LLA-L1, nove (23,1%) LLA-L2 e dois (5,1%) LLA-L3. No estudo imunofenotípico dos pacientes com LLA, pela classificação do grupo EGIL: vinte (51,3%) B-II; 17 (43,6%) B-III; dois (5,1%) B-IV; e nenhuma B-I.

Os valores dos PA dos dois grupos, pela análise estatística de Kolmogorov-Smirnov, apresentaram uma distribuição normal para um α de 0,05. As médias dos valores de cada PA foram comparadas nos dois grupos pelo teste-t de Student e foram diferentes para um α de 0,05 para os seguintes parâmetros: PA2 vs. PA12; PA5 vs. PA15; PA7 vs. PA17; e PA9 vs. PA19. Com base na distribuição de frequências normais, determinaram-se três intervalos para todos os valores dos PA do grupo controle, definidos pela: ME ± 2 DP; ME ± 2,5 DP; e ME ± 3 DP (Tabela 1). Os valores absolutos, de cada PA de cada amostra dos dois grupos, foram avaliados dentro das distribuições de frequências dos respectivos parâmetros do grupo controle nos três intervalos. No grupo controle, nove das 36 amostras (25%) apresentaram, no mínimo um PA fora do intervalo determinado pela ME ± 2 DP. Nenhuma amostra deste grupo apresentou valor fora do intervalo quando aplicado ME ± 2,5 ou 3,0 DP. Nas amostras dos pacientes com leucemia: 35 (89,7%), 31 (79,5%) e 28 (71,8%) das 39 apresentaram respectivamente PA com valores fora dos intervalos definidos pela ME ± 2, 2,5 e 3 DP do grupo controle. A sensibilidade e especificidade na detecção de doença foram calculadas com base na teoria de probabilidades. Obteve-se uma sensibilidade de 89,7%, 79,5% e 71,8% e uma especificidade de 75%, 100% e 100% para os respectivos intervalos ME ± 2, 2,5 e 3DP. O melhor resultado quanto à sensibilidade versus especificidade foi obtido com o intervalo ME ±2,5 DP. Com uma especificidade de 100%, cada PA teve sua sensibilidade determinada individualmente. O parâmetro mais sensível na detecção de doença foi o ME de IF de CD10 em 18

Tabela 1. Valores das ME e dos DP dos parâmetros de avaliação e intervalos definidos pela Média ±2 DP, Média ±2,5 DP e Média ±3 DP do grupo controle

	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6	PA7	PA8	PA9	PA10
Média	689,9	70,7	10,28	-0,40	1,10	704,27	79,44	11,34	-0,67	0,63
D.P.	32,2	9,9	1,58	0,44	0,87	38,13	7,56	1,45	0,33	0,73
ME-2DP	625,4	50,8	7,12	-1,28	-0,64	628,01	64,32	8,44	-1,33	-0,83
ME+2DP	754,5	90,5	13,44	0,48	2,84	780,53	94,56	14,24	-0,01	2,09
ME-2,5DP	609,2	45,8	6,33	-1,50	-1,08	608,95	60,54	7,72	-1,50	-1,20
ME+2,5DP	770,6	95,5	14,23	0,70	3,28	799,60	98,34	14,97	0,16	2,46
ME-3DP	593,1	40,8	5,54	-1,72	-1,51	589,88	56,76	6,99	-1,66	-1,56
ME+3DP	786,8	100,5	15,02	0,93	3,72	818,66	102,13	15,69	0,32	2,83

DP = desvio-padrão

Tabela 2. Valores da média e do DP dos parâmetros de avaliação intervalos definidos pela Média \pm 2 DP, Média \pm 2,5 DP e Média \pm 3 DP dos pacientes portadores de LLA

	PA11	PA12	PA13	PA14	PA15	PA16	PA17	PA18	PA19	PA20
Média	712,1	80,6	12,4	-0,4	0,3	713,8	70,0	10,2	-0,2	0,3
D.P.	122,4	27,4	7,4	0,3	0,6	93,1	16,9	3,8	0,3	0,9
ME-2DP	467,3	25,8	-2,4	-1,0	-0,9	527,6	36,2	2,6	-0,8	-1,5
ME+2DP	956,9	135,4	27,2	0,2	1,5	900,0	103,8	17,8	0,4	2,1
ME-2,5DP	406,1	12,1	-6,1	-1,2	-1,2	481,1	27,8	0,7	-1,0	-2,0
ME+2,5DP	1018	149,1	30,9	0,4	1,8	946,6	112,3	19,7	0,6	2,6
ME-3DP	344,9	-1,6	-9,8	-1,3	-1,5	434,5	19,3	-1,2	-1,1	-2,4
ME+3DP	1079	162,8	34,6	0,5	2,1	993,1	120,7	21,6	0,7	3,0

DP = desvio-padrão ME = média

amostras das 39 (46,1%) seguido em ordem crescente do DP da IF de CD19 em 14 amostras das 39 (35,9%); ME e CV das IF de CD19 em 13 amostras das 39 (33,3%) para os dois parâmetros; CV da IF de CD10 em 11 amostras das 39 (28,2%); DP da IF de CD10 em sete amostras das 39 (17,9%); CI e CC da IF de CD19 em uma amostra das 39 (2,5%) e os CI e CC de CD10 com 0%. O CI e CC de CD10 e CD19 não tiveram valor no resultado final da sensibilidade para o intervalo média + 2,5 DP. Para CD10 nenhuma das amostras dos pacientes com leucemia foi identificada com valores fora dos intervalos do grupo controle. Para CD19 foram identificadas duas amostras dos doentes, entretanto, uma das amostras também foi identificada por dois outros parâmetros, e a outra foi identificada por três outros parâmetros.

Discussão

Hematogônias são células indiferenciadas da medula óssea e correspondem aos precursores linfóides de linhagem B normais⁶ que estão em número bastante reduzido, mas podendo chegar, em algumas circunstâncias, a representar até 72% dos elementos nucleados da medula óssea.¹³ As leucemias linfoblásticas agudas são proliferações monoclonais de células linfóides imaturas caracterizadas pelo acúmulo destas na medula óssea e disseminação para o resto do organismo com infiltração de praticamente qualquer órgão.⁸ A dificuldade no diagnóstico diferencial morfológico entre hematogônias e blastos leucêmicos, às vezes, pode exigir complementação diagnóstica com as técnicas laboratoriais mais avançadas. O aumento de células jovens na medula óssea ocorre em diversas situações clínicas, sendo mais evidente nos quadros regenerativos medulares que seguem as aplasias transitórias como: pós-indução terapêutica por quimioterápicos com supressores medulares no tratamento de neoplasias; pós-transplantes de medula óssea; citopenias congênitas e auto-imunes.¹¹ Hematogônias podem ser bem caracterizadas através do estudo multiparamétrico por citometria de fluxo, onde estas sempre exibem um perfil imunológico característico composto de subgrupos em diferentes estágios maturativos.^{1,15} A simples referência de positividade de células para CD10 e CD19 bem como a visualização dos gráficos, não permite a diferenciação entre um tipo neoplásico de um não-neoplásico. A base para sua dife-

renciação reside no conhecimento da expressão dos marcadores de maturidade e imaturidade das células hematopoéticas normais assim como a expressão de marcadores aberrantes.^{9,16}

Este estudo, diferente dos anteriores realizados,^{4,13,10} avalia a expressão de apenas dois marcadores, CD10 e CD19, presentes em células neoplásicas e precursores B normais. As curvas de expressão de CD10 e CD19 foram analisadas em seus aspectos geométricos. Dada a alta semelhança da expressão de CD10 nos dois tipos celulares, assim como de CD19, não é possível a distinção entre neoplásico e não-neoplásico sem a aplicação dos recursos matemáticos e estatísticos. Os parâmetros, ME, DP, CV, CI e CC para ambos os marcadores dos dois grupos foram analisados e apresentaram diferenças significativas.

Os valores dos PA das amostras dos pacientes com LLA foram comparados com os intervalos ME \pm 2DP, ME \pm 2,5DP e ME \pm 3DP para definição de um *cut-off* com melhor sensibilidade e especificidade. A ME \pm 2,5DP apresentou maior sensibilidade, 79,5%, para uma especificidade de 100%. Em ordem crescente, a maior sensibilidade foi para: a média de IF de CD10 em 18 amostras das 39 (46,1%); o DP da IF de CD19 em 14 amostras das 39 (35,9%); a ME de IF de CD19 e do CV da IF de CD19 em 13 amostras das 39 (33,3%); CV da IF de CD10 em 11 amostras das 39 (28,2%); o DP da IF de CD10 em sete amostras das 39 (17,9%); os CI e CC da IF de CD19 em uma amostra das 39 (2,5%); e os CI e CC de CD10 em nenhuma (0%). Nenhuma amostra dos pacientes com leucemia apresentou valor do CI e CC de CD10 fora dos intervalos determinados nas amostras dos pacientes não neoplásicos. O CI e CC de CD19 identificaram três amostras dos doentes que também foram identificadas por outros parâmetros. Os CI e CC de CD10 e CD19 não alteraram o resultado final da sensibilidade. A sensibilidade e especificidade global de todos os parâmetros para o intervalo ME \pm 2,5DP foi de 79,5% com uma especificidade de 100%.

Conclusão

A utilização de apenas dois marcadores CD19 e CD10 possibilita diferenciar hematogônias de blastos leucêmicos com alta sensibilidade (79,5%) e especificidade (100%). A análise das características geométricas: média; desvio-padrão; coeficiente de variação; coeficientes de inclinação; e coeficientes de curtose, das curvas de CD10 e CD19 apresentam diferenças significativas permitindo esta diferenciação.

Abstract

Hematogones are normal immature cells from bone marrow that are responsible for the production of the immune system's B cell lineage. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) of precursor B cells

represents one type of neoplastic transformation of hematogones. Due to their high similarity, there are risks of erroneous interpretation making the use of complementary diagnostic techniques necessary. CD10 and CD19 antigens are expressed on both types of cells so, the use of other monoclonal antibodies is necessary to identify their malignant or benign nature. In an attempt to avoid the use of different antibodies, we investigated possible differences in the expressions of CD10 and CD19 in both cell types. We collected 36 samples of bone marrow from non-neoplastic patients as a control group. The ages of the patients ranged from 0 to 15 years with an average of 5 years. Also 39 samples from patients with ALL of B cells were collected. The ages of these individuals ranged from 0 to 14 years with an average of 6.6 years. We analyzed the differences between the fluorescence in respect to average intensity, standard deviation, variation, inclination and kurtosis coefficients for the two markers. The individual values of each sample were compared with the intervals generated by the values of the control group: mean \pm 2SD; mean \pm SD and mean \pm 3SD. It was possible to distinguish the groups with 89.7% and 75%; 79.5% and 100% and 71.8% e 100% of sensitivity and specificity, respectively for the three intervals. In conclusion, the expression of CD10 and CD19 antigens on blasts and hematogones are significantly different and may be useful in the differentiation of the two cell types. Rev. bras. hematol. hemoter. 2007;29(2):114-118.

Key words: Hematogones; flow cytometry; acute lymphoblastic leukemia.

11. McKenna RW, Washington LT, Aquino DB, Picker LJ. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. Blood. 2001;98(8):2498-2507.
12. Rothe G, Schmitz G, Adorf D, Barlage S. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Leukemia. 1996;10:877-95.
13. Rimsza LM, Larson RS, Winter SS, Foukar K. Benign hematogenerich lymphoid proliferations can be distinguished from B-lineage acute lymphoblastic leukemia by integration of morphology, immunophenotype, adhesion molecule expression and architectural features. Am J Clin Pathol. 2000;114(1):66-75.
14. Rimsza LM, Douglas VK, Tighe P, Saxonhouse MA. Benign B-cell precursors (hematogones) are the predominant lymphoid population in the bone marrow of preterm infants. Biol Neonate. 2004;86:247-53.
15. Vidriales MB, Perez JJ, Lopez-Berges MC. Inmunofenotipo del linfoblasto normal y patológico y sus implicaciones en la detección de enfermedad residual mínima em la leucemia aguda linfoblástica (LAL) del adulto. Haematologica. 2002;87(1):262-7.
16. Weir EG, Cowan K, LeBeau P, Borowitz MJ. A limited antibody panel can distinguish B-precursors acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with the four color flow cytometry: implications for residual disease detection. Leukemia 1999; 13:558-67.

Avaliação: Editor e dois revisores externos

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 17/04/06

Aceito após modificações: 04/12/06

Referências Bibliográficas

1. Babuskova O, Železnikov T, Mleakova A. The knowledge on the '3rd type hematogones' could contribute to more precise detection of small numbers of precursor B-acute lymphoblastic leukemia. Neoplasma. 2005;52(6):502-9.
2. Bain BJ, Barnett D, Linch D, Mattutes E. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders. Clin Lab Haem. 2002;24:1-13.
3. Basso G, Buldini B, Zen L, Orfao A. New methodological approaches for immunophenotyping acute leukemias. Haematologica. 2001; 86:675-92.
4. Campana D, Janossy G. Proliferation of normal and malignant human immature lymphoid cells. Blood. 1988;71(5):1201-10.
5. Campana D, Behm FG. Immunophenotyping of leukemia. Journal of Immunological Methods. 2000;243:59-75.
6. Davis RE, Longacri TA, Conbleet J. Hematogones in the bone marrow of adults. Hematopathology. 1993;102(2):202-11.
7. Dworzark MN, Fritsch G, Froschi G, Printz D, Gadner H. Fourcolor flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. Blood. 1998;92(9):3203-9.
8. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. In: Brunning, D.D. Precursor B lymphoblastic leukaemia/lymphoblastic lymphoma. IARCPress. 2001;1:111-7.
9. Kaleem Z, Ctawford E, Pathan MH, Jasper L. Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data. Arch Pathol Lab Med. 2003;127:42-8.
10. Longacre TA, Foucar K, Crago S. Hematogones: A multiparameter analysis of bone marrow precursor cells. Blood. 1989; 73 (20): 543-52.