

AC&T - ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PÓS GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA CLÍNICA E LABORATORIAL

RAFAELLA YUKIE KOKUBUN

**A IMPORTÂNCIA DA IMUNOFENOTIPAGEM NO DIAGNÓSTICO
DAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS**

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2023

RAFAELLA YUKIE KOKUBUN

**A IMPORTÂNCIA DA IMUNOFENOTIPAGEM NO DIAGNÓSTICO DAS
LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS**

Trabalho de Conclusão de Curso para
obtenção do título de pós-graduação
em Hematologia Clínica e Laboratorial
apresentado à Academia de Ciência e
Tecnologia (AC&T) de São José do
Rio Preto.

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2023

A importância da imunofenotipagem no diagnóstico das leucemias mieloides agudas

RESUMO

As leucemias agudas caracterizam-se pela proliferação clonal e pelo bloqueio maturativo das células hematopoiéticas, com substituição difusa da medula óssea por células neoplásicas. A leucemia mieloide aguda (LMA) é um grupo heterogêneo de doenças clonais do tecido hematopoiético, que acomete predominantemente idosos acima de 60 anos de idade.

Apesar de a grande maioria das leucemias mieloides agudas terem o seu diagnóstico definido pelos critérios morfológicos do grupo FAB, a imunofenotipagem tornou-se hoje um exame absolutamente necessário para a sua confirmação diagnóstica. Ressalta-se a sua importância no diagnóstico das leucemias LMA-M0 e LMA-M7, bem como das bifenotípicas, que somente foram reconhecidas e caracterizadas com a introdução desta metodologia.

O desenvolvimento de ampla gama de anticorpos monoclonais e das potencialidades do citômetro de fluxo têm impulsionado esta área nos últimos 20 anos.

Palavras-chave: Leucemia mieloide aguda, imunofenotipagem, citometria de fluxo

The importance of immunophenotyping in the diagnosis of acute myeloid leukemias

ABSTRACT

Acute leucemias are characterized by clonal proliferation and maturational blockade of hematopoietic cells, with diffuse replacement of the bone marrow by neoplastic cells. Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous group of clonal diseases of the hematopoietic tissue, which predominantly affects elderly people over 60 years of age.

Although the vast majority of acute myeloid leucemias have their diagnosis defined by the morphological criteria of the FAB group, immunophenotyping has now become an absolutely necessary test for its diagnostic confirmation. Its importance is emphasized in the diagnosis of AML-M0 and AML-M7, as well as biphenotypic leucemias, which were only recognized and characterized with the introduction of this methodology.

The development of a wide range of monoclonal antibodies and the capabilities of the flow cytometer have boosted this area in the last 20 years.

Keywords: Acute myeloid leukemia, immunophenotyping, flow cytometry.

OBJETIVO

O principal objetivo é descrever a importância da imunofenotipagem no diagnóstico das leucemias mieloides agudas, destacando os principais imunofenótipos encontrados em cada uma delas e distinguindo-as entre si.

INTRODUÇÃO

Na hematopoiese normal as células tronco hematopoiéticas se dividem para manter no final do processo um pool adequado de células maduras e diferenciadas na corrente sanguínea. Esse processo de divisão na hematopoiese normal ocorre por um mecanismo de divisão assimétrica em que a célula tronco ao se dividir origina um progenitor mieloide ou linfóide, ou faz uma auto renovação e produz outra célula tronco hematopoiética idêntica.

Nas leucemias ocorre uma proliferação celular clonal exacerbada, na maioria das vezes com bloqueio maturativo e substituição difusa da medula óssea por células neoplásicas, devido a alguma alteração genética (translocação, deleção, inversão) ou fatores externos que podem contribuir ou aumentar os riscos de mutações e falhas no mecanismo de reparo das células. Na maioria dos casos, as células leucêmicas extravasam para o sangue, onde podem ser vistas em grande número. Essas células também podem infiltrar o fígado, baço, linfonodos e outros tecidos. As leucemias são classificadas de acordo com o tipo celular envolvido e o grau de maturação das células.

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença clonal do tecido hematopoiético que se caracteriza pela proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mieloide, ocasionando produção insuficiente de células sanguíneas maduras normais. Deste modo a infiltração da medula é frequentemente acompanhada de neutropenia, anemia e plaquetopenia.

A LMA compreende cerca de 25% das leucemias infantis, frequentemente desenvolvendo-se na infância, porém a sua incidência aumenta com a idade. É a leucemia aguda mais comum em adultos, com média de idade de início aos 68 anos. Também pode ocorrer como um câncer secundário após radioterapia ou quimioterapia para um tipo diferente de câncer.

Devido à extrema heterogeneidade das entidades englobadas sob a mesma denominação, tanto no aspecto clínico como no comportamento biológico, é fundamental a utilização de critérios diagnósticos precisos para a sua classificação. A utilização da imunofenotipagem nas leucemias agudas contribui para a confirmação precisa da linhagem celular leucêmica. O papel fundamental da imunofenotipagem é a definição diagnóstica das leucemias minimamente diferenciadas (M0) e nas megacariocíticas (M7), situação em que a morfologia não permite diagnóstico preciso.

CLASSIFICAÇÃO DAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS

Os primeiros sistemas de classificação das leucemias agudas eram baseados somente em investigações citomorfológicas e citoquímicas. A morfologia ainda representa um modelo central, mas foi incorporada em sistemas de classificações atuais, como imunofenotipagem para um delineamento mais preciso da linhagem hematopoiética, e estágio de diferenciação de leucemias em particular.

De acordo com o sistema de classificação French-American-British (FAB), as leucemias mieloides agudas são ainda morfológicamente subclassificadas em oito tipos:

- LMA – M0: diferenciação mínima;
- LMA – M1: sem maturação;
- LMA – M2: com maturação;
- LMA – M3: promielocítica aguda (hipo ou hipergranular);
- LMA – M4: mielomonocítica aguda;
- LMA – M5: a) monoblástica;
b) monocítica;
- LMA - M6: eritroleucemia;
- LMA – M7: megacariocítica.

Contudo, a classificação FAB está em desuso e está sendo substituída pela classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS). A classificação da OMS apresenta recomendações atualizadas e modificadas dos critérios diagnósticos utilizados pela FAB, valorizando critérios citogenéticos.

Existe também uma minoria de leucemia aguda que apresenta características de ambas as linhagens (mieloide e linfóide) e, por essa razão, são designadas leucemias de linhagem mista, híbrida ou leucemia bifenotípica aguda (BAL). As BAL são doenças raras, responsáveis por mais de 5% das leucemias agudas.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Geralmente, o diagnóstico de leucemia mieloide aguda inicia-se a partir de uma suspeita clínica e se baseia na avaliação do sangue periférico e da medula óssea. Embora a morfologia continue sendo o fundamento para o diagnóstico, técnicas adicionais incluindo imunofenotipagem, avaliação citogenética e estudos de genética molecular tornaram-se essenciais e, em alguns casos específicos, são ferramentas complementares obrigatórias. O uso de procedimentos diagnósticos permite a identificação do tipo celular envolvido na leucemogênese, o que é fundamental para orientar a terapêutica e determinar até certo ponto o prognóstico das leucemias.

Realiza-se o diagnóstico de leucemia mieloide aguda quando as células blásticas mieloides são $\geq 20\%$ das células nucleadas da medula óssea ou $\geq 20\%$ das células não-eritróides quando o componente eritróide é $> 50\%$ ou em qualquer porcentagem de blastos na presença de anomalias citogenéticas recorrentes [t (8; 21), t (15; 17), inv (16) ou t (16; 16)].

- **Hemograma**

Em 90% dos casos há anemia em graus variáveis que é devida à falha na produção. Os reticulócitos habitualmente estão entre 0,5 e 2%. A leucometria pode estar aumentada, normal ou diminuída e em todas estas situações pode haver neutropenia e a presença de

mieloblastos, exceto em alguns pacientes leucopênicos, situação em que os blastos podem não ser encontrados. A plaquetopenia está presente na grande maioria dos casos.

- **Mielograma**

A avaliação de esfregaço de aspirado de medula óssea corado por Leishman, May-Grünwald-Giemsa ou Wright-Giemsa, deve ser feita de imediato como forma de análise preliminar da morfologia e direcionamento dos demais exames.

A medula na leucemia mieloide aguda, via de regra, é hiperclular às custas de blastos cuja morfologia deve ser analisada para distinguir os diferentes tipos de células como os mieloblastos (tipo I: mieloblastos com cromatina frouxa, nucléolos proeminentes, citoplasma sem grânulos; blastos tipo II: semelhantes ao tipo I, exceto por conterem de 1 a 15 grânulos azurófilos; blastos tipo III que contêm uma área correspondente ao complexo de Golgi e numerosos grânulos azurófilos), promielócitos displásicos na leucemia promielocítica aguda, monoblastos e promonócitos na leucemia monocítica e megacarioblastos na leucemia megacariocítica.

- **Citoquímica**

- 1) Mieloperoxidase (MPO) - A mieloperoxidase é específica para diferenciação mieloide e é positiva nos grânulos dos mieloblastos. Os monoblastos são negativos ou positivos em finos grânulos.
- 2) Negro de Sudam - Os mieloblastos são positivos enquanto os linfoblastos negativos.
- 3) Esterase inespecífica - Alfa naftil acetato esterase apresenta positividade difusa em monoblastos; megacarioblastos e linfoblastos podem ter positividade citoplasmática multifocal que é parcialmente resistente a fluoreto de sódio (NaF) ao passo que nos monoblastos, a atividade da esterase é totalmente inibida.

- **Imunofenotipagem**

A imunofenotipagem identifica os antígenos celulares de superfície, citoplasmáticos e nucleares. Os mieloblastos normalmente não expressam marcadores linfoides, imunoglobulina de membrana ou de citoplasma. A capacidade da citometria de fluxo em identificar a diferenciação mieloide se aproxima de 98%, mas para tanto deve-se usar uma bateria de anticorpos que assegure a distinção entre LMA e LLA, LMA minimamente diferenciada, leucemia megacarioblástica e eritróide aguda, dentre outras. Além disso, o emprego de múltiplos marcadores pode ajudar a identificar fenótipos associados a determinadas anomalias citogenéticas, fenótipos aberrantes que podem auxiliar na detecção de doença residual pós terapia ou situações raras como as leucemias bifenotípicas ou de duas linhagens.

Os painéis de anticorpos monoclonais (AcMo) deve conter o marcador pan-leucocitário CD45, marcadores dos precursores hematopoiéticos (CD 34, HLA-DR, Tdt e CD 45), linhagem B (CD 19, CD 20, CD 22 e CD 79a), linhagem T (CD 2, CD 3, CD 5 e CD 7), mieloide (CD 13, CD33, CD 15, MPO e CD 117), monocítica (CD14, CD11c e CD64), eritróide (CD71 e glicoforina A) e megacarioblástica (CD 41 e CD 61).

CITOMETRIA DE FLUXO

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é um exame de alta complexidade, rápido e objetivo que tem sido o método preferencial para a determinação da linhagem celular e análise da maturação das células nas neoplasias hematológicas. O objetivo da técnica é avaliar o tamanho, a complexidade e a expressão antigênica das células de interesse, sendo possível identificá-las e classificá-las como normais ou anômalas, auxiliando a conduta clínica

Os anticorpos monoclonais utilizados são habitualmente submetidos aos critérios do International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens, ocasião em que um grupo de laboratórios de referência avalia, caracteriza e classifica os anticorpos submetidos. O primeiro destes Workshops ocorreu em Paris em 1982 e o sétimo, na Inglaterra, em 2000. Uma vez aceitos por este colegiado, esses anticorpos recebem a designação CD (cluster of differentiation).

A análise pode ser realizada em sangue periférico, aspirado de medula óssea ou linfonodo, colhido com o anticoagulante EDTA, heparina ou ACD. As amostras devem ser mantidas à temperatura ambiente (entre 18°C e 22°C) e, preferencialmente, o material deve ser analisado até 24 horas após a coleta.

A citometria de fluxo mede as propriedades de células em suspensão, orientadas num fluxo laminar e interceptadas uma a uma por um feixe de LASER. As modificações ocasionadas nesse feixe de luz devidas à presença da célula serão então detectadas e mensuradas por sensores (detectores). A luz dispersa é coletada por um sistema óptico que permite identificar as células pelo seu tamanho e granularidade interna. Hemácias, plaquetas, linfócitos, monócitos e granulócitos podem ser assim identificados e quantificados. Os diferentes fluorocromos que marcam cada antígeno absorvem a luz e emitem-na num comprimento de onda maior e específico. Cada fluorocromo possui um padrão espectral distinto de absorção e emissão, de tal maneira que até três cores de luz podem ser opticamente separadas com os filtros seletivos encontrados nos citômetros comuns. Os antígenos são então detectados por diferentes detectores de fluorescência permitindo o estudo simultâneo de 2 a 3 antígenos (p. ex. Anti-CD45-PerCP, Anti-CD19-isotiocianato de fluoresceína e anti-CD10-ficoeritrina), utilizando-se anticorpos monoclonais específicos marcados com diferentes substâncias fluorescentes, em geral através da técnica de imunofluorescência direta.

Os fótons de luz gerados atingem detectores específicos e são convertidos em impulsos elétricos proporcionais ao número de fótons recebidos. Estes impulsos são convertidos em sinais digitais podendo oferecer os resultados em diferentes formas de análise tais como histogramas, dot-plot, tabelas entre outros.

A citometria de fluxo é uma técnica rápida, precisa, quantitativa e reproduzível. A análise da população de células anômalas é realizada através de uma “janela” que pode ser definida de duas maneiras: 1- Baseada no tamanho e complexidade interna das células, um equivalente da morfologia celular. 2- Aplicando-se uma “janela” imunológica, isto é, definem-se populações de células especificamente coradas por anticorpos (por exemplo, CD45 de diferentes intensidades e com determinada complexidade interna); uma vez identificada a população de células ela é então caracterizada quanto à linhagem celular, grau de maturação ou anormalidades e quanto à coexpressão anormal de antígenos

RESULTADOS

As células progenitoras hematopoéticas podem ser identificadas através da expressão de determinados antígenos característicos pelos diferentes estágios de diferenciação. Os marcadores mais utilizados para a linhagem mieloide são: CD13, CD33, CD65, MPO, CD11c, CD14, CD15, CD36, CD41, CD61, CD42, CD34, 10 H-antígeno, CD117 e HLA-DR.

Os mais frequentes nessa diferenciação são os CD13 e CD33, por esse motivo são denominados de antígenos panmieloide.

Há várias associações entre perfis imunofenotípicos e subgrupos específicos de LMAs como:

- A LMA sem maturação demonstra expressão moderadamente intensa de CD45, pelo menos um marcador mieloide CD13 ou CD33 e, quase sempre, HLA-DR, CD34 e CD117. Em geral, não expressam marcadores de leucemias mais diferenciadas como o CD15, CD11b ou CD14. Expressão aberrante de CD56 ou CD7 não é infrequente. Uma pequena parte dos blastos pode ter mieloperoxidase (MPO).
- A LMA com diferenciação apresenta células mais maduras como promielócitos e mielócitos. CD45 é fraca ou moderadamente positiva e, raramente, HLA-DR é negativa. Há expressão de CD34 e CD117, CD13, CD33 e expressão mínima de CD15 e outros antígenos associados a estágios mais avançados da maturação granulocítica. Há perda da intensidade de CD 33 e ganho de marcadores como CD13, CD15 e CD11b.
- A LMA-M2 com t (8;21) apresenta CD13, CD33 e MPO, além da co-expressão frequente do antígeno linfóide CD19. CD34 está presente bem como CD56, mas não tão frequente quanto CD19, cuja expressão associa-se a prognóstico desfavorável.
- A LMA-M3 com t (15;17) é CD13, CD33 e CD117 positiva. Habitualmente negativa para HLA-DR e CD34, porém quando positiva é apenas em uma parte das células. Há co-expressão frequente de CD2 e CD9 e, por vezes, de CD56.
- A LMA-M4 com inv (16) apresenta expressão de CD13, CD33, MPO, CD14, CD4, CD11b, CD11c, CD64 e/ou CD36, porém nenhum é específico de inv (16).
- As leucemias monoblástica e monocítica – M5, aguda expressam além do CD13, CD33 e CD117, alguns marcadores monocíticos, como o CD14, CD4 e CD11c. CD34 é em geral negativo e o CD33 e CD11c são intensamente positivos.
- A LMA com diferenciação eritróide - M6 é geralmente CD45 negativa, expressão brilhante de CD71 e glicoforina positiva. No entanto, a morfologia e contagem de blastos contribuem sobremaneira para a conclusão diagnóstica.
- A LMA com diferenciação megacariocítica - M7 apresenta a expressão de CD61 e CD41. Porém, deve-se tomar cuidado para não interpretar erroneamente as plaquetas agregadas a mieloblastos. CD13 ou CD33 podem ser positivos e CD34, CD45, MPO e HLA-DR são frequentemente negativos.

Classificação da imunofenotipagem da LMA					
Marcadores	LMA- M0/M1/M2	LMA – M3	LMA – M4/M5a/M 5b	LMA – M6	LMA – M7
CD13/CD33	++	++	++	+	+
CD45	++ / + / +	+	±	-	-
CD117	+ / - / +	+	+ / + / -	-	-
CD11b	± / + / +	±	+ / + / -	-	-
CD71	-	-	-	++	-
CD65	+ / - / +	+	+ / + / +	-	+
MPO	± / + / ++	++	+ / + / -	+	-
CD11c	- / ±	-	++	-	-
CD14	-	-	+ / + / -	-	-
CD15	± / ± / ++	+	+ / - / +	-	-
CD36	-	-	+	++	+
H-antígeno	-	-	-	±	+
CD41/CD61	-	-	-	-	++
CD42	-	-	-	-	+
CD34	++ / - / +	±	+ / - / -	-	+
CD114	++	+	+	-	+
HLA-DR	++ / + / +	+	+ / + / +	-	+
Glicoforina A	-	-	-	++	-

CONCLUSÃO

A leucemia mieloide aguda é a leucemia aguda mais comum em adultos. Até bem pouco tempo, o diagnóstico da LMA era baseado exclusivamente na morfologia e na citoquímica do sangue e da medula óssea. Atualmente, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais e citometria de fluxo assumiram o papel principal para a definição precisa das células blásticas de linhagem mieloide e subtipos de LMA.

A classificação das leucemias agudas permite a correta separação dos pacientes leucêmicos nas categorias LMA e LLA. Entretanto, foi a partir dos sistemas de classificação, juntamente com os avanços ocorridos em imunofenotipagem, e devido a crescente importância em eventos genéticos, que hoje há o reconhecimento da importância de um diagnóstico mais preciso, indicando fatores prognósticos e uma terapia mais adequada a cada subtipo de LMA.

A contribuição da imunofenotipagem no diagnóstico das leucemias agudas está bem estabelecida, permitindo a definição correta da linhagem celular em cerca de 98% dos casos, dado fundamental na definição da abordagem terapêutica. O grande desenvolvimento do conhecimento em relação às novas moléculas da superfície da célula com um papel funcional definido, como o de enzimas de superfície, moléculas de adesão, receptores de citocinas, poderá representar uma nova abordagem permitindo classificação das leucemias em subgrupos “funcionais” contribuindo para um conhecimento crescente da biologia destas neoplasias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PIER, Marcelo Gustavo de. Imunofenotipagem das Leucemias. Anais da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, 2008. Disponível em: <www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/revista_virtual/imunologia/imuno08.pdf>. Acesso em: 03 de junho de 2023.
- MANCINI, Natália. Exame de Imunofenotipagem: o que é e como é feito. Revista Abrale online, 2022. Disponível em: <<https://revista.abrale.org.br/exame-de-imunofenotipagem-o-que-e-e-como-e-feito/>>. Acesso em: 03 de junho de 2023.
- FLEURY, Medicina e Saúde. Leucemia Mieloide Aguda (LMA). FLEURY, Medicina e Saúde. Disponível em: <<https://www.fleury.com.br/medico/manuais-diagnosticos/hematologia-manual/leucemia-mieloide-aguda>>. Acesso em: 03 de junho de 2023.
- FLEURY, Medicina e Saúde. Imunofenotipagem nas neoplasias hematológicas. FLEURY, Medicina e Saúde. Disponível em: <<https://www.fleury.com.br/medico/manuais-diagnosticos/hematologia-manual/imunofenotipagem-neoplasias>>. Acesso em: 03 de junho de 2023.
- MIGLIAVACCA, Dra. Michele Patrícia. Entenda o que é imunofenotipagem e as diferentes aplicações para diagnósticos de doenças. DASA genômica, 2020. Disponível em: <<https://www.dasagenomica.com/blog/imunofenotipagem/>>. Acesso em: 03 de junho de 2023.
- SILVA, Grazielle C.; PILGER, Diogo A.; CASTRO, Simone M. de; WAGNER, Sandrine C. Diagnóstico laboratorial das leucemias mieloides agudas. SCIELO, 2006. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/jbpml/a/C6NQ7KQYbZNSdpp7TGW7vpk/?lang=pt>>. Acesso em: 03 de junho de 2023.
- Leucemia Mieloide Aguda. PFIZER. Disponível em: <<https://www.pfizer.com.br/sua-saude/oncologia/leucemia-mieloide-aguda-e-o-tipo-mais-comum-e-agressivo-em-adultos>>. Acesso em: 10 de junho de 2023.
- BICARDI, Bianca Chiesa. A importância da imunofenotipagem no diagnóstico das leucemias, com destaque para a leucemia bifenotípica. Anais da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, 2008. Disponível em: <https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/artigos/leucemia/TCC_Pos.pdf>. Acesso em: 10 de junho de 2023.
- MARTINS, S. L. R.; FALCÃO, R. P. A importância da imunofenotipagem na Leucemia Mieloide Aguda. Rev. Assoc. Med. Bras. 46 (1) - Mar, 2000. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/ramb/a/3jpsbjcpSbDSYBVk6tg7ftS/?lang=pt>>. Acesso em: 10 de junho de 2023

- NUNES, Ellen Beatriz. Imunofenotipagem de Leucemias Mieloides Agudas. Anais da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, 2008. Disponível em: <https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/hematologia/serie_branca/leucemias_linfomas_mieloma/leucemias/18-Imunofenotipagem-das-leucemias-mieloides-agudas.pdf>. Acesso em: 10 de junho de 2023.
- SILVEIRA, N. A.; ARRAES, S. M. A. A. A imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: uma revisão. Arq Mudi. 2008;12(1):5-14. Disponível em: <<file:///C:/Users/User/Downloads/19208-Texto%20do%20artigo-78068-1-10-20121119.pdf>>. Acesso em: 10 de junho de 2023.