

ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS – GRADUAÇÃO LATU –SENSU EM
IMUNOLOGIA HEMATOLÓGICA E HEMOTERÁPICA

RODRIGO CÂMARA BORGES

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS LEUCEMIAS MIELÓIDES
AGUDAS**

São José do Rio Preto
2014

Academia de Ciência e Tecnologia

RODRIGO CÂMARA BORGES

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS LEUCEMIAS MIELÓIDES
AGUDAS**

Artigo apresentado pela Academia de Ciência e Tecnologia, como requisito parcial para a obtenção do título de especialista em Imunologia Hematológica e Hemoterápica.

São José do Rio Preto
2014

Resumo:

As leucemias agudas caracterizam-se pela proliferação clonal e pelo bloqueio maturativo das células hematopoéticas, com substituição difusa da medula óssea por células neoplásicas. A leucemia mielóide aguda (LMA) é um grupo heterogêneo de doenças clonais do tecido hematopoético, que acomete predominantemente idosos de 60 anos de idade. A LMA apresenta oito subtipos distintos morfológicamente: LMA M0 a M7. Os métodos diagnósticos para identificação da LMA e classificação dos subtipos são baseados em critérios morfológicos, citoquímicos e de imunofenotipagem, acrescidos de análise genética. Além de ser importante para a diferenciação do tipo da linhagem da leucemia, se mielóide (LMA) ou linfóide (LLA), o diagnóstico é também de grande importância para identificar a leucemia bifenotípica aguda (BAL). O objetivo desse trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre LMA, dando ênfase aos métodos laboratoriais utilizados para a sua identificação e diferenciação.

Palavras Chave:

Leucemia Mielóide Aguda, Citoquímica, Imunofenotipagem, Citogenética, Genética Molecular.

Abstract:

The acute leukemias are characterized by the clonal proliferation and blockage of hematopoietic cells, with diffuse substitution of the bone marrow by neoplastic cells. The acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous group of clonal disease in the hematopoietic tissue and predominantly affects people older than 60. The AML has eight morphologically different subtypes: AML M0 to M7. The diagnostic methods for identification of AML and subtypes classification are based on morphological, cytochemical and immunophenotyping patterns, besides genetic and molecular analyses. The diagnosis of leukemia is important to the lineage differentiation in AML or ALL and also for the identification of biphenotypic acute leukemia (BAL). The aim of this study was to perform a bibliographic review of AML, giving emphasis on laboratory methods useful for its identification and differentiation.

Key Words:

Acute myeloid leukemia, Cytochemistry, Immunophenotype, Cytogenetics, Molecular genetics.

INTRODUÇÃO:

Leucemias constituem um grupo de neoplasias malignas caracterizado pela proliferação descontrolada de células hematopoéticas na medula óssea e/ou nos tecidos linfóides, as quais, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem se infiltrar em outros sistemas orgânicos(SWERDLOW et. al.). A proliferação descontrolada de células leucêmicas resulta de uma expansão clonal de uma célula-tronco que sofreu uma série de alterações genéticas, que se acumulam em um único clone celular, o que confere vantagem proliferativa em relação às demais células e impede seu processo de diferenciação. Em decorrência dessa proliferação, as células leucêmicas inibem a produção das células sanguíneas normais, como os leucócitos, os eritrócitos e as plaquetas. Além disso, devido à não funcionalidade das células leucêmicas, os indivíduos afetados, além de sofrerem de anemia e distúrbios hemorrágicos, são mais suscetíveis às infecções(ESTEY, 2001).

As leucemias são classificadas de acordo com o tipo celular envolvido e o grau de maturação das células. As leucemias agudas (LA) caracterizam-se pela proliferação clonal acompanhada de bloqueio maturativo (anaplasia) variável, o que possibilita a existência de diferentes subtipos de leucemias.

Nas leucemias agudas enquadram-se as leucemias mielóides agudas (LMA)(ANJOS et. al.). A LMA é um grupo heterogêneo de doenças clonais do tecido hematopoético, que se caracteriza pela proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mielóide (mieloblastos), ocasionando produção insuficiente de células sanguíneas maduras normais, com conseqüente substituição do tecido normal. Desse modo, a infiltração da medula é freqüentemente acompanhada de neutropenia, anemia e plaquetopenia(PELLOSO et. al.).

Os eventos moleculares precisos e responsáveis pela transformação leucêmica ainda não são conhecidos, entretanto o resultado final consiste na proliferação inexorável das células hematopoéticas imaturas que perderam a sua capacidade de diferenciação normal(GOLDMAN e

BENNETT, 2001). No entanto, a ativação de protooncogenes e as mutações (alterações genéticas), em genes supressores que regulam o ciclo celular, parecem estar envolvidas na patogênese das leucemias, pois levam à perda dos mecanismos normais controladores da proliferação (divisão celular), diferenciação-maturação e/ou de morte celular programada(BAIN, 2003).

ETIOLOGIA:

Diferentemente da leucemia linfóide aguda (LLA), há inúmeros fatores considerados como causais para o aparecimento da LMA. No entanto, apenas três deles têm essa relação perfeitamente estabelecida: exposição crônica ao benzeno, utilização de agentes alquilantes e exposição à radiação ionizante(LOPES et. al.).

Muitas das doenças mieloproliferativas crônica, como leucemia mielóide crônica, policitemia vera e síndromes mielodisplásicas, podem evoluir para LMA. Assim como na LLA, as síndromes de Down e de Bloom estão associadas à maior incidência da doença.

INCIDÊNCIA E PATOGÊNESE:

Há aumento na incidência da LMA com a idade, representando 20% das leucemias agudas na faixa etária pediátrica e 80% na adulta. Nos Estados Unidos a taxa de incidência dessa doença é de 2,5/100 mil habitantes(LOPES et. al.).

O aparecimento da LMA resulta de mutações somáticas que ocorrem nas células hematopoéticas precursoras ou nas mias diferenciadas. Translocações cromossômicas estão presentes em mais de 80% dos pacientes e levam a fusões de partes dos genes envolvidos que passam a codificar proteínas alteradas que freqüentemente desarranjam os sinais celulares, levando à transformação maligna(GOLDMAN e BENNETT, 2001).

ASPECTOS CLÍNICOS:

O quadro clínico está diretamente relacionado à disfunção da hematopoiese normal ocasionada pela infiltração, causada pela doença, da medula óssea e dos diversos órgãos ou sistemas. Assim, palidez cutâneo-mucosa, fraqueza, palpitação e dispnéia ao esforço têm relação com a presença de anemia. Queixa de epistaxes, sangramento fácil, manchas roxas pelo corpo, petéquias e equimoses correlacionam-se com o número de plaquetas. Sinais e sintomas de infecções são incomuns ao diagnóstico, uma vez que apenas excepcionalmente o número de neutrófilos encontra-se diminuído nessa fase. Muitos pacientes apresentam hipertrofia gengival ou abscessos dentários (GOLDMAN e BENNETT, 2001; LOPES et. al.).

Quadros clínicos de tiflíte, lesão inflamatória necrozante de íleo terminal, ceco ou cólon ascendente, constituem-se em grava forma de apresentação inicial. Menos da metade do número de pacientes apresenta-se com hepatomegalia ou esplenomegalia e esperam-se enfartamentos ganglionares apenas na leucemia monocítica. Ao contrário da LLA, dores ósseas ou articulares e envolvimento do SNC ocorrem mais raramente.

CLASSIFICAÇÃO:

As leucemias são classificadas com base no tipo celular envolvido e no estado de maturidade das células leucêmicas. Assim, as LA caracterizam-se pela presença de células muito imaturas (denominadas blastos) e por evolução rapidamente fatal em pacientes não-tratados (SZCZEPANSKI et. al.)

Os primeiros sistemas de classificação das LA eram baseados somente em investigações citomorfológicas e citoquímicas (Tabela 01). A morfologia ainda representa um modelo central, mas foi incorporada em sistemas de classificações atuais, como imunofenotipagem para um delineamento mais preciso da linhagem hematopoética, e estágio de diferenciação de leucemias em particular (DOUER, 2003).

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

- M0 – LMA sem diferenciação morfológica;
- M1 – LMA com mínima diferenciação morfológica;
- M2 – LMA com diferenciação (componente monocítico <20%);
- M3 – LMA promielocítica hipergranular;
- M4 – LMA mielomonocítica (células monocíticas ≥20%)
- M5 – LMA monocítica (com células monocíticas ≥20% das células leucêmicas);
- M5a – LMA monoblástica (sem diferenciação, blastos ≥80%);
- M5b – LMA monocítica (com diferenciação, blastos <80%);
- M6 – eritroleucemia e variante;
- M7 – LMA megacarioblástica;

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 (BRUCE, 2003).

Tabela 1		Sistemas de classificação de leucemias agudas	
Grupo		Classificação	
FAB* (1976)		Primeira classificação mundialmente aceita Critérios: morfológicos e citoquímicos Blastos na LA > 30% na medula óssea LMA (M1 a M6) Em 1985, essa classificação foi revisada e adotam-se critérios , imunofenotípicos, incluindo o subtipo LMA M7, através da confirmação de blastos plaquetários, e o subtipo M0, através de marcadores nacionais.	
MIC**		Critérios: morfológicos, imunológicos e citogenéticos	
EGIL***		Critérios: imunológicos (expressão de antígenos na superfície celular a partir de painéis de anticorpos monoclonais)	
WHO**** (1997)		Foi proposta a classificação que separa e define os subtipos de leucemias agudas (mielóide, linfóide e bifenotípica) Blastos na LA > 20% na medula óssea LMA passa a ser valorizada através de seus dados de recorrência citogenética e da história clínica e/ ou aspectos displásicos na medula óssea	

*French-American-British.

**Morphological-Immunological-Cytogenetic.

***European Group for the Immunological Characterization of Leukemias.

****World Health Organization.

Adaptado de Szczepanski et al .,2003.

ASPECTOS LABORATORIAIS:

Geralmente, o diagnóstico de LMA inicia-se a partir de uma suspeita clínica e baseia na avaliação do sangue periférico e da medula óssea(BAIN, 2003). 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(TALLMAN, 2004). O uso de procedimentos diagnósticos permite a identificação do tipo celular envolvido na leucomogênese, o que é fundamental para orientar a terapêutica e determinar, até certo ponto, o prognóstico das leucemias(SILVA, 2006).

Presença de anemia é um achado constante. Anisocitose, isto é, diferença no tamanho das hemácias, é a alteração morfológica mais freqüente. Plaquetopenia também é um achado freqüente ao diagnóstico. Aproximadamente metade do número de pacientes apresenta-se com leucocitose ao diagnóstico, sendo normal o achado de 5% a 95% de mieloblastos. O restante dos portadores de LMA apresenta-se com leucócitos abaixo de $5 \times 10^3/\text{mm}^3$ e identificação dos mieloblastos pode não ser muito fácil, exigindo realização de esfregaços com a camada de leucócitos obtida após centrifugação do sangue periférico. Em alguns casos, encontra-se uma inclusão citoplasmática azurofílica em forma de bastão, que recebe o nome de bastonete de Auer, muito específica dos mieloblastos. Aproximadamente 5% dos casos apresentam-se com números de leucócitos maiores que $100 \times 10^3/\text{mm}^3$, o que pode provocar hemorragias cerebrais e pulmonares ou priapismo como conseqüência da leucostase(SILVA,2006).

As colorações citoquímicas (Tabela 02) usadas no diagnóstico e na classificação das leucemias podem ser aplicadas tanto à medula óssea quanto ao sangue periférico, auxiliando na confirmação da origem mielóide e/ou monocítica. Apesar dos progressos da imunofenotipagem. As reações citoquímicas ainda são úteis no diagnóstico das LMA.

As principais colorações em uso são a fosfatase alcalina; mieloperoxidase (MPO); Sudão negro B (sudan Black B [SSB]); naftol AS-D; cloroacetato esterase (CAE); esterases inespecíficas, como alfa-naftil acetato

esterase (ANAE); reação de ácido para-aminossalicílico (ácido periódico de Schiff [PAS]) e fosfatase ácida.

A mieloperoxidase ou SBB positiva confirma a natureza mielóide dos blastos e revela os bastonetes de Auer em aproximadamente 65% dos casos. Ela é específica para as linhagens de granulócitos, eosinófilos e monócitos(BAIN, 2003).

Geralmente, o mielograma é hipercelular por causa de infiltração da medula óssea por 30% a 95% de mieloblastos e há diminuição na eritropoiese, granulocitopoiese e megacariocitopoiese. Como na LLA, a coleta do mielograma pode ser difícil ou falha por causa da fibrose ou impactação de células que impedem sua aspiração.

Nesses casos, deve-se realizar também a biópsia de medula óssea e coletar lâminas para o estudo citológico. Além disso, as secções de medula permitem avaliação do grau e extensão da fibrose existente. É comum o aparecimento de fibrose na LMA, mas é particularmente intensa nas leucemias megacarioblásticas.

Tabela 2	Colorações Citoquímicas
M0	MPO ⁻ ;SBB ⁻ ;esterases ⁻
M1	MPO/SBB+ em ≥ 3% das células
M2	MPO+; SBB+
M3	MP++; SBB++
M4	MPO+; SBB+; esterase inespecífica+ com inibição pelo NaF; ANAE
M5	MPO-; esterase++
M6	MPO-; SBB-;ANAE++
M7	MPO-;SBB-;ANAE+ na zona de Golgi

MPO: mieloperoxidase; SBB: Sudão negro B (Sudan Black B); ANAE: alfa-naltil acetatoesterase; NaF: fluoreto de Sódio; (+) positivo; (-) negativo.

Tabela 3	Classificação da imunofenotipagem da LMA				
Marcadores	LMA-M0/M1/M2	LMA-M3	LMA-M4/M5a/M5b	MLA-M6	MLA-M7
CD13/CD33	++	++	++	+	++
CD65	±/+ / ++	+	++	±	±
MP0	-/+ / ++	++	++	+	-
CD11c	- ou ±	-	++	-	-
CD14	-	-	+ / + / ++	-	-
CD15	± / ± / ++	±	-	-	-
CD36	-	+	+	++	+
H-Antígeno	-	+	-	++	+
CD235a (Gliforina A)	-	-	-	+	-
CD41/CD61	-	-	-	-	++
CD42	-	-	-	-	+
CD34	++ / ++ / +	±	± / + / ±	+	++
CD117	++	+	+	+	+
HLA-DR	++ / ++ / +	-	++	+	++
TdT	+	±	+	+	±

-: < 10% das leucemias são positivas; ±: 10%-25% das leucemias são positivas; +: 25%-75% das leucemias são positivas; ++: >75% das leucemias são positivas.

Adaptado de Szczepanski et al., 2003.

Tabela 4	Análise Citogenética: Cromossomos anormais na LMA			
Anormalidades	Fusão de genes	Subtipo	Frequência	
			Crianças (%)	Adultos (%)
t (8;21) (q22;q22)	AML1-ETO	M2/M1	10-15	8-12
inv (16) (p13q22)	CBFβ-MYH11	M4eo	6-12	8-12
t(15;17) (q22/q21)	PML-RARα	M3/M3v	8-15	8-10
t(9;11) (p22;q23)	MLL-AF9	M5a	8-10	1-2
t(3;21) (q26;q22)	AML1-EAP/E11	-	1	<1
t(6;9) (p23;q34)	DEK-CAN	M1/M2	1-2	Rara
inv(3) (q21;q26)	EVII	-	<1	1-2
t(1;22) (p13q13)	OTT-MAL	M7	2	<1
Trissomia do 8	-	-	1-4	3-5
Trissomia do 11	-	M1/M2	-	<1
Complexo	-	-	6	10-20

Adaptado de Schoch & Haferlach, 2002

Conclusão:

Até bem pouco tempo, diagnóstico da LMA era baseado exclusivamente na morfologia e na citoquímica do sangue 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 mielóide e subtipos de LMA.

A identificação de fatores prognósticos permite a estratificação dos pacientes em grupo de risco, não generalizando os subtipos de LMA, o que possibilita uma abordagem terapêutica diferenciada. Além disso, os métodos diagnósticos para uma avaliação adequada somente serão possíveis com estudos mais aprofundados das técnicas, baseados em uma ampla combinação dos mesmos. Porém, esses estudos são caros, consomem tempo e requerem habilidade de pessoas experientes em laboratórios referenciais centralizados.

Sabe-se que o grau de evolução da LMA está significativamente relacionado ao aumento da proliferação celular clonal. Assim, a partir da análise genética, a expressão dos genes identificados na doença fornece razões para estudos futuramente predativos para o diagnóstico e intervenção terapêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; HARRIS N.L. et al. **WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC Press; 2008.
2. ESTEY, E.H. **Therapeutic options for acute myelogenous leukemia**. **Cancer**. 2001;92(5): 1059-73
3. ANJOS, A.R.; SILVA, M.A.; BORELLI, P. **Matriz extracelular e leucemia**. *Ver Bras Hematol Hemoter*, v. 22, n. 3, p. 404-12, 2000.
4. PELLOSO, L.A.F. et al. **Cariótipo em leucemia mielóide aguda: importância e tipo de alteração em 30 pacientes ao diagnóstico**. *Ver Assoc Med Bras*, v. 49, n.2, p. 150-5, 2003.
5. GOLDMAN, L.; BENNETT, J.C. **Cecil Tratado de Medicina Interna**. 21 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2001.
6. BAIN, B.J. et al. **Diagnóstico em Leucemias**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.
7. LOPES, L.; IYAYASU, H.; CASTRO, R.M.R.P.S. **Oncologia para a graduação**. 2 ed. São Paulo: Tecmedd, 2008.
8. SZCZEPANSKI, T.; van VELDEN, V.H.J.; van DONGEM, J.J.M. **Classification systems for acute and chronic leukemias**. *Best Pract Res Clin Haematol*, v.16, n. 4, p. 561-82, 2003.
9. BRUCE, D.C. et al. **Revised Recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia**. *J. Clin Oncol*, v. 21, n. 24, p. 4642-9, 2003.
10. TALLMAN, M. S. **Relevance of pathologic classifications and diagnosis of acute myeloid leukemia to clinical trials and clinical practice**. *Cancer Treat Res*, n. 121, p. 45-67, 2004.
11. SILVA, G. C. et al. **Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas**. *J Bras Patol Med Lab*. v. 42 , n. 2, p. 77-84, 2006.