

IMUNOFENOTIPAGEM DE LEUCEMIAS MIELÓIDES AGUDAS

Ellen Beatriz Nunes

Resumo:

Apesar de a grande maioria das leucemias mielóides 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.

Abstract:

Instead of the most the acute myeloid leukemia get their the diagnostic defined by morphological criteria from FAB group, the immunophenotyping has become an absolutely necessary exam for the diagnostical acknowledgement. Become notable the diagnostic importance of LMA-M0 and LMA-M7 leukemia, as well as the byphenotypics, that only was recognized and characterized with the introduction of this methodology.

INTRODUÇÃO

As leucemias ocorrem pela proliferação neoplásica generalizada ou acúmulos de células hematopoéticas. São classificadas de acordo com o tipo celular envolvido e o grau de maturação das células. As leucemias agudas se caracterizam pela proliferação clonal acompanhada de bloqueio maturativo, que possibilita a existência de diferentes subtipos de leucemias.

A Leucemia Mielóide Aguda é uma doença clonal do tecido hematopoético que se caracteriza pela proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mielóide, ocorrendo a produção insuficiente de células sanguíneas maduras normais, caso frequentemente acompanhado de neutropenia, anemia e plaquetopenia.

Ainda não se sabe ao certo o mecanismo que leva a célula progenitora da linhagem mielóide a perder o controle da proliferação celular, ocasionando a expansão do clone leucêmico.

A LMA é predominante em adultos mais velhos (acima de 60 anos), e representa 15-20% das leucemias agudas da infância, sendo mais comum no sexo masculino, com prognóstico pobre. Na maioria dos casos não há evidência da influência de fatores genéticos ou diferença de incidência entre raças, como no caso da leucemia linfóide aguda.

A grande maioria das LMAs podem ser diagnosticadas morfolologicamente através de exames de sangue periféricos ou esfregaços da medula óssea, no entanto, é o mielograma que confirma ou descarta esse diagnóstico. 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.

As causas exatas ainda não são conhecidas, são influenciadas por fatores genéticos e ambientais, resultam de mutações somáticas no DNA devido à radiação ou substâncias cancerígenas.

A LMA é mais comum em adultos, ela se subdivide em vários subtipos e, tradicionalmente usa-se os critérios da FAB (Franco, Americano, Britânico) para a classificação das leucemia mielóides aguda (tab1).

Tabela 1. Classificação FAB das LMA

Nomenclatura F.A.B.	Subtipos morfológicos
M0	LMA sem diferenciação morfológica; POX -, SBB -, esterases -, marcadores imunológicos mielóides +
M1	LMA com mínima diferenciação morfológica, POX/SBB + em $\geq 3\%$ das células
M2	LMA com diferenciação, componente monocítico <20%, POX+, SBB+. Alguns casos com t(8;21)
M3	LMA promielocítica hipergranular com t(15;17), POX ++, SBB++ M3-variante hipogranular com t(11;17) ou t(5;17)
M4	LMA mielo-monocítica (células monocíticas $\geq 20\%$), POX+, SBB+, esterase não específica+ com inibição pelo NaF, M4 variante apresenta inv(16)
M5	LMA monocítica, com células monocíticas $\geq 20\%$ das células leucêmicas M5a - LMA monoblástica (sem diferenciação, blastos $\geq 80\%$) M5b - LMA monocítica (com diferenciação, (blastos < 80%)
M6	Eritroleucemia e variante
M7	LMA megacarioblástica, marcadores imunológicos +

F.A.B.- Franco Americano Britânico; POX - reação de peroxidase; SBB - reação de Negro de Sudan

Diagnóstico Laboratorial

A LMA inicia-se a partir da suspeita clínica como: palidez, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, febre em consequência de infecções, faringite, petéquias e outras manifestações hemorrágicas, dor óssea, hipertrofia gengival e infiltrações cutâneas. E se baseia também na avaliação do sangue periférico, como o hemograma que apresenta contagem de plaquetas e hemoglobinas baixas, contagem de células brancas que variam entre < 1000 a 200.000/ul, contagem diferencial de células brancas anormais com neutropenia e presença de blastos e anemia normocrômica e normocítica, e da medula óssea. Técnicas adicionais como imunofenotipagem, avaliação citogenética e estudos de genética molecular, são essenciais e, em alguns casos específicos, sendo fundamental para orientar a terapêutica e determinar o prognóstico das leucemias.

Importância Diagnóstica da Imunofenotipagem

A imunofenotipagem é realizada por meio de anticorpos monoclonais marcados, que reconhecem epítomos específicos de antígenos celulares. As técnicas empregadas podem ser a citometria de fluxo ou imunistoquímica.

A importância da imunofenotipagem reside, principalmente, no diagnóstico das LMA-M0 e M7, mas também em alguns casos de M5a, além de auxiliar no diagnóstico das LMA-M3, M2 e M1/M2.

No uso sistemático da imunofenotipagem nas leucemias agudas, foram definidos dois novos subtipos de leucemias mielóides agudas:

- 1) LMA-M0_ caracterizada pela infiltração da medula óssea por células blásticas, as quais possuem reação citoquímica para mieloperoxidase (MPO) negativa, e marcação imunológica para antígenos da linhagem mielóide.

Morfologia: blastos pequenos, cromatina frouxa e nucléolo evidente, apresentando citoplasma agranular, sem bastonetes de Auer.

O estudo imunofenotípico revela uma população blástica com relação entre tamanho/grânulo baixa, com positividade para pelo menos um dos antígenos de linhagem mielóide CD33, CD13 e/ou CD11b. É importante a realização da imunofenotipagem para diferenciar a LMA-M0 da LLA-L2, e consequente orientação correta ao tratamento.

- 2) LMA-M7_ é definida pela presença de >30% de megacarioblastos entre as células nucleadas na medula óssea.

Morfologia: blastos de tamanhos variados, citoplasma geralmente agranular, podendo apresentar protusões. A medula óssea frequentemente apresenta aumento das fibras de reticulina, e comumente o aspirado da medula óssea é de difícil obtenção. Em alguns casos é necessário a biópsia para diagnóstico.

Os marcadores de linhagem mielóide CD13 e CD33 frequentemente estão presentes, e o diagnóstico de LMA-M7 é definido pela positividade para antígenos de linhagem megacariocítica CD41 (complexo glicoprotéico IIb,IIIa), CD42 (glicoproteína Ib) e/ou CD61(glicoproteína IIIa). Pelos critérios morfológicos e citoquímicos, podem ser confundida com as LLAs e também com a LMA-M0.

A LMA-M7 tem maior incidência em crianças portadoras de Síndrome de Down, que compõem um subgrupo com boa resposta terapêutica.

Para a caracterização dos demais subtipos FAB de LMAs o papel da imunofenotipagem é menos importante, porém colabora com os achados morfológicos e citoquímicos para determinação do diagnóstico e fatores prognósticos.

Antígenos de Diferenciação Mielóide

As células progenitoras hematopoéticas podem ser identificadas através da expressão de determinados antígenos característicos pelos diferentes estágios de diferenciação. Os principais marcadores associados a diferenciação mielóide são CD117, CD13, CD33, CD65, CD11c, CD14, CD64, CD41, CD61 e anti-MPO, os mais frequentes nessa diferenciação são os CD13 e CD33, por esse motivo são denominados de antígenos pan-mielóide (Tabela 2).

O diagnóstico imunofenotípico das LMAs, geralmente é estabelecido através da presença de antígenos associados à diferenciação mielóide na superfície e/ou citoplasma das células blásticas e na ausência de antígenos linfóides B e T.

Tabela 2. Principais antígenos de diferenciação celular

Antígenos de ampla expressão	
Pan-mielóide	CD13, CD33, CD65, MPO
Pan-células B	cCD22, CD19, cCD79a
Pan-células T	cCD3, CD2, CD5, CD7
Antígenos associados à imaturidade celular ou ativação	
Imaturidade	TdT, CD34, HLA-DR
Antígenos expressão linhagem-específica e dependente da maturação	
Células mielóides	CD14, CD15, glicoforina A, CD41, CD61
Células B	CD20, CD23, FMC7, cIgm, sIg
Células T	CD1a, CD4, CD8
Células NK	CD16, CD56, CD57

CD - do cluster differentiation; c - citoplasmático

Leucemias Agudas Bifenotípicas

A imunofenotipagem tornou-se importante também para o reconhecimento das leucemias bifenotípicas mielóide-linfóide, as quais se diferenciam por marcadores linfóides anômalos. As leucemias bifenotípicas caracterizam-se por apresentar antígenos de superfície, citoplasmáticos ou nucleares. O diagnóstico de leucemia bifenotípica é alcançado quando se

tem dois ou mais pontos para duas linhagens específicas. Este grupo de leucemias deve ser tratado como LMA.

CONCLUSÃO

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

Devido ao sistema de classificação e aos avanços ocorridos em imunofenotipagem e a crescente importância em eventos genéticos, o diagnóstico ficou mais preciso, indicando fatores prognósticos e uma terapia mais adequada a cada subtipo de LMA.

Experiências clínicas tem demonstrado a importância vital de anormalidades citogenéticas na determinação da sobrevivência de pacientes com LMA. O grau da evolução da LMA está significativamente relacionado ao aumento da proliferação celular clonal. Assim, através da análise genética, a expressão dos genes identificados na doença fornece razões para estudos futuramente preditivos para diagnóstico e intervenção terapêutica.

REFERÊNCIAS

1. ANJOS, A.R.; SILVA, M.A.; BORELLI, P. Matriz extracelular e leucemia. Rev Bras Hematol Hemoter, v.22, n.3, p. 404-12, 2000.
2. BAIN, J.B. Diagnóstico em leucemias. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.
3. DOUER, D. The epidemiology of acute promyelocytic leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol, v. 16, n. 3, p. 357-67, 2003.
4. FERRARA, F. Unanswered question in acute myeloid leukaemia. Lancet Oncol, v. 5, p. 443-50, 2004.

5. IOVINO, C.S. ; CAMACHO, L. H. Acute myeloid leukemia: a classification and treatment update. Clin J Oncol Nurs, v. 7, n.5, p. 535-40, 2003
6. LOWENBERG,B. Prognostic fators in acute myeloid leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol, v.14, n. 1, p. 65-75, 2001.
7. MARTINS, S.L.R.; FALCÃO, R.T. A importância da imunofenotipagem na leucemia mielóide aguda. Rev. Assoc Med Bras, v. 46, n.1, p. 57-62, 2000.
8. HOYER, J.D. et al. Detection and classification of acute leukemia by the Coulter sSTKS Hematology Analyzer. Am J Clin Pathol, v.106, n.3, p. 352-8, 1996
9. BENNETT, J.M.; CATOVSKY D.; DANIEL, M.T. et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia Br J Haematol. p. 325-329, 1991.
10. VIDRIALES, M.B.; ORFAO, A.; LÓPES-BERGES, M.C et al. Light scatter characteristics of blasts cells in acute myeloid leukaemia: association with morphology and immunophenotype. J Clin Pathol. p. 456-462, 1995.
11. CATOVSKY, D.; MATUTES, E. The classification of acute leukemia. Leukemia 1992; p. 1-6.