

**ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**

**GISELE APARECIDA MACHADO**

A importância do diagnóstico das Leucemias Agudas de linhagem mieloide e  
linfóide

**São José do Rio Preto**

## RESUMO

A importância diagnóstica das Leucemias Agudas de linhagem mielóide e linfóide.

As Leucemias Agudas são uma doença clonal do tecido hematopoético caracterizada pela proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mielóide e linfóide, ocasionando produção insuficiente de células sanguíneas maduras normais. O diagnóstico da Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é feito quando se observam mais de 20% de blastos na medula óssea (MO) segundo Organização Mundial da Saúde (OMS) e Grupo Cooperativo Francês, Americano e Britânico (FAB) este que, também tem a classificação da LMA em 7 subtipos morfológicos: LMA-M0 (indiferenciada), LMA-M1 (sem maturação), LMA-M2 (com maturação), LMA-M3 (promielocítica) e M3-V (LPA variante hipogranular), LMA-M4 (mielomonocítica) e M4-Eo (com eosinofilia medular), LMA-M5a (monoblástica) e LMA-M5b (monocítica), LMA-M6 (eritroleucemia), LMA-M7 (megacariocítica). A classificação da Leucemia Linfóide Aguda são: LLA tipo L1 - blastos pequenos e homogêneos, difícil observar nucléolos. LLA tipo L2 - blastos de tamanho variável, heterogêneo, nucléolos grandes visíveis. Diagnóstico diferencial com LMA-M7. LLA tipo L3 - blastos grandes, citoplasma basófilo e vacuolizado. Forma de pior prognóstico. Dentre as técnicas utilizadas para diagnosticar as Leucemias Agudas Aguda inclui-se a análise morfológica de células blásticas da medula óssea. Então procede-se à imunofenotipagem e análise citogenética. Determina-se antes a relação entre expressão de antígenos, subtipos da FAB, anormalidades cromossômicas além de características clínicas para avaliar o significado prognóstico do imunofenotípico, a morfológica e citogenética, promovendo a melhor definição da terapêutica; definição de prognóstico e eventual detecção posterior de doença residual mínima, recaída ou evolução clonal. Tão logo o diagnóstico seja possível, os pacientes devem ser submetidos a tratamento quimioterápico inicial, chamado de indução da remissão para que ocorra o desaparecimento das células blásticas na medula óssea.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	4
2. OBJETIVO.....	11
3. MÉTODOS.....	12
4. DESENVOLVIMENTO.....	13
5. CONCLUSÃO.....	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

## **A importância do diagnóstico das Leucemias Agudas de linhagem mielóide e linfóide.**

### 1. Introdução

Na Leucemia Aguda a alteração que desencadeia o processo neoplásico pode ocorrer em qualquer das diferentes linhagens celulares da hematopoese, dando em consequência origem aos vários tipos de Leucemia atualmente conhecidos. (ZAGO et al., 2001; MEDEIROS et al., 2004).

As leucemias agudas são desordens malignas decorrentes da expansão clonal de um precursor hematopoético com um fenótipo definido pela etapa da diferenciação celular, seja de linhagem linfóide ou mielóide. (ZAGO et al., 2001; MEDEIROS et al., 2004).

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é uma doença clonal do tecido hematopoético caracterizada pela proliferação anormal de células progenitoras da linhagem mielóide, ocasionando produção insuficiente de células sanguíneas maduras normais. (ZAGO et al., 2001)

Os sinais e sintomas clínicos da Leucemia Mielóide Aguda devem-se à infiltração da medula óssea e eventualmente outros órgãos causando hepatomegalia, esplenomegalia, hipertrofia de gengiva, dor óssea, comprometimento sistema nervoso central inibindo a hematopoese normal. Os pacientes apresentam sinais e sintomas de anemia, sangramento freqüentemente de tipo purpúrico devido a plaquetopenia e febre às vezes sem foco infeccioso aparente devido à neutropenia. (ZAGO et al., 2001).

As leucemias são grupos heterogêneos de neoplasias hematológicas, que resultam da transformação total ou parcial das células blásticas. A perda parcial da capacidade de diferenciação e o tipo de linhagem comprometida representam as bases para a classificação destas neoplasias.

As leucemias podem ser classificadas de varias maneiras: (1) pela morfologia e citoquímica, complementada pela imunofenotipagem, proposta pelo grupo French-American- British (FAB); (2) pela morfologia, imunofenotipagem e citogenética, proposta pelos grupos MIC (classificação morfológica, imunológica e citogenética); (3) pela imunofenotipagem somente, proposta pelo grupo European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL); (4) por eventos antecedentes; (5) pela natureza da célula progenitora na qual a mutação leucemogênica ocorreu. (QUIXABEIRAL et al.,2008)

A etiologia da Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é na maioria dos casos de origem indeterminada. No entanto, doenças de natureza genética, agentes físicos como irradiações ionizantes, produtos químicos e medicamentos, principalmente os usados em tratamento de neoplasias, podem estar envolvidos no desenvolvimento de leucemias. (ZAGO et al., 2001).

O diagnóstico da Leucemia Mielóide Aguda (LMA) ocorre quando se observam mais de 20% de blastos na medula óssea (MO) conforme os critérios da Organização da Saúde (JAFFE et al., 2001), ou quando a porcentagem de blastos esteja menor que 20%, e mesmo assim há alterações genéticas definidas. Existem critérios com aspectos morfológicos e citoquímicos para determinação da Leucemia Mielóide Aguda, conforme o grupo cooperativo FAB.

Em 1975 o grupo cooperativo FAB propôs a primeira classificação em cinco diferentes subtipos, M1, M2, M3, M4, M5, M6 e logo em 1985 foi revisado e passado a ter sete subtipos acrescentando M0 e M7 tendo como base o diagnóstico morfológico características nucleares e citoplasmáticos e no grau de maturação das células blásticas.(MARTINS et al.,2000; ZAGO et al., 2001; GREER et al., 2003).

O subtipo LMA-MO é definido somente pelos marcadores imunológicos (presença de marcadores mielóides e ausência de linfóides) em pacientes que não apresentam critérios morfológicos e citoquímicos de LMA, o subtipo M1 e M2 mostram diferenciação pelo grau de maturação granulocítica, o subtipo M3 é caracterizado por uma célula blástica hipergranular típica e a variante M3-V hipogranular, o subtipo M4 e M5 apresentam diferenciação monocítica, o subtipo

M6 diferenciação eritroblástica e M7 predomínio de diferenciação megacarioblástica. (ZAGO et al., 2001; GREER et al., 2003).

Portanto, para se fazer o diagnóstico de LMA deve-se examinar morfológicamente as células blásticas da medula óssea, quando há mais de 20% de blastos e há características conforme a descrição da FAB proceder à imunofenotipagem, à análise citogenética, ao teste citoquímico para definição do subtipo.

Mielograma é a avaliação de esfregaço de aspirado de medula óssea, deve ser feita imediato como forma de análise preliminar da morfologia e direcionamento dos demais exames.

Citoquímica: \* MPO – a mieloperoxidase é específica para diferenciação mielóide, sendo positiva nos grânulos dos mieloblastos, na série granulocítica neutrofílica e eosinofílica e na série granulocítica basofílica. E são negativos em eritrócitos, linfócitos, megacariócitos e basófilos maduros.

\* Negro de Sudam – os mieloblastos são positivos enquanto os linfoblastos, os linfócitos são negativos.

\* Esterase inespecífica – alfa naftil acetato esterase, alfa naftil butirato esterase, naftol AS-D acetato esterase tem reação positiva intensa macrófagos, plaquetas também apresentando positividade difusa em monoblastos; megacarioblastos, linfoblastos podem ter positividade citoplasmática multifocal que é parcialmente resistente a fluoreto de sódio ao passo que nos monoblastos, megacariócitos, plaquetas e plasmócitos a atividade da esterase é totalmente inibida. (ZAGO et al., 2001; FLEURY, 2003; GREER et al., 2003)

Imunofenotipagem permite reconhecer o clone anormal, definir a linhagem, o estágio de diferenciação, características prognósticas e fenótipos aberrantes para monitorar a doença residual mínima (PELLOSO et al., 2003).

O estudo imunofenotípico tem importância por ser uma metodologia ágil, que detecta as características imunofenotípicas das LMAs possuindo também interesse de investigação clínica determinando a sensibilidade diagnóstica do imunofenótipo e sua relação com os subtipos FAB; examinar a relação entre expressão de antígenos, subtipos FAB, anormalidades cromossômicas e

características clínicas; avaliar o significado prognóstico dos diferentes achado imunofenotípicos e comparar com outros fatores prognósticos, especialmente a morfologia, citoquímica, e a citogenética (MARTINS et al.,2000)

Identifica os antígenos celulares de superfície, citoplasmáticos e nucleares. Os mieloblastos normalmente não expressam marcadores linfóides, imunoglobulinas, de membrana ou de citoplasma. A capacidade da citometria de fluxo em identificar a diferenciação mielóide 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 entre outras.(FLEURY, 2003) O estudo simultâneo de alguns antígenos utilizando a citometria de fluxo permite a identificação de células leucêmicas com distribuição aberrante, quando comparados aos precursores mielóides normais.

São alterações pesquisadas essas expressão anômala pode ser evidenciada por meio da detecção de antígenos de outras linhagens, como a presença de CD19, CD5 e CD2 em mieloblastos; expressão assíncrona de antígenos, com a presença de CD34 presente nos estágios iniciais de maturação juntamente com CD15, presente em estágios evolutivos tardios monitoração de doença residual mínima. (MARTINS et al.,2000; GREER et al., 2003)

Biópsia de Medula Óssea (BMO) deve-se fazer para a diferenciação do diagnóstico entre síndrome mielodisplásica e anemia aplástica oferece melhor quantificação da celularidade e pode demonstrar ilhotas residuais e eritropoese e megacariocitopoese (ZAGO et al., 2001), além de aspectos não evidenciados pelo aspirado como o grau de fibrose, que via de regra é intensa nas leucemias megacarioblásticas. (FLEURY, 2003)

Cariótipo é o estudo das alterações cromossômicas deve ser feito ao diagnóstico para se prover a melhor classificação da LMA e escolha terapêutica, definição de prognóstico e eventual detecção posterior de doença residual, recaída ou evolução clonal.

Cerca de 75% das LMA apresentam alterações de cariótipo sendo mais comuns a t(15;17) na LMA-M3, t(8;21)na LMA-M2, inv(16) na LMA-M4Eo,

alterações envolvendo 11q23 na LMA-M5, trissomia 8, monossomia 7, trissomia 21, e perda do X ou Y na LMA-M2.(JAQUES WALLACH, 2003). Casos de LMA secundários a tratamento quimioterápico prévio com antracíclicos ou radioterapia apresentam -5/5q-, -7/7q- enquanto as secundárias a derivados de epipodofilotoxinas apresentam alterações envolvendo 11q23.

Os cariótipos com as alterações t(8;21), t(15;17), inv(16), t(16;16) del(16q) são consideradas de bom prognóstico. Os cromossomos com alterações 3, 9, 11, 20, 21, -5/5q-, -7/7q- e t(9;22) ou Philadelphia (Ph) são consideradas de prognóstico desfavorável. Alterações +6, -Y, del(12p) e trissomia 8 e outras alterações menos freqüentes são consideradas como prognóstico intermediário bem como cariótipo normal. (PELLOSO et al., 2003).

Hibridação in situ por fluorescência (FISH) esta técnica teve um avanço marcante que é a utilização de sondas marcadas com elementos fluorescentes; (seqüência de DNA) complementar à seqüência alvo que se pretende pesquisar. (ZAGO et al., 2001)

Existem sondas para diversos loci gênicos e bastante úteis na prática diária; FISH permite fazer a análise diretamente na lâmina onde o tecido está fixado e o resultado deste ensaio pode ser armazenado de várias formas uma vez que o microscópio de fluorescência pode ligar a uma câmara de vídeo ou fotográfica nas quais acoplados filtros que absorvem luz UV em diversos comprimentos.(ZAHA, 1998)

A vantagem desta técnica reside fundamentalmente em três aspectos: rapidez, porque em poucas horas obtém-se um resultado, pois não há a necessidade d cultura de células para obtenção de metáfases e a análise pode ser feita nas interfases; sensibilidade, porque em um único experimento podem ser analisadas 500, 1000 ou mais células enquanto pelo estudo citogenético convencional são avaliadas cerca de 20 a 50 células que entram em divisão; especificidade porque só será detectado aquilo que está sendo investigado. (FLEURY, 2003)

Polimerase em cadeia por tanscriptase reversa (RT-PCR) é um método de amplificação de ácidos nucleicos a partir de moléculas de RNA convertidas em

DNA complementar que é isolado e convertido a atividade Transcriptase Reversa (RT) .(ZAHA, 1998).

Tem sido bastante útil , particularmente na detecção de doença residual. Com efeito, uma vez determinado, ao diagnóstico, qual a alteração genética presente, deve-se conferir seu aparecimento por métodos mais sensíveis. Assim, casos de LPA t(15;17) ou rearranjo PML/RARA devem ser monitorados até o desaparecimento do rearranjo subseqüente manutenção desta negatividade para assegurar a remissão completa contínua. A presença de positividade pode indicar recrudescimento da doença. (FLEURY, 2003)

Mais recentemente, uma variante do método de RT-PCR com potencial de oferecer resultados quantificáveis, para os transcritos específicos de certas leucemias com maior prevalência, trata-se de PCR em tempo-real ou real-time permite o acompanhamento do numero de cópias feitas numa PCR utilizando um marcador com química fluorescente.(ZAHA, 1998).

Como conseqüência, o método é mais sensível, mais rápido, oferece maiores controles de qualidade, permitindo auditar-se o processo de amplificação e elimina a contaminação no laboratório. Este último ponto é crítico e motivo de grande preocupação para os laboratórios que empregam métodos de PCR a pouca chance de contaminação com real-time PCR se dá porque o tubo de reação não precisa ser aberto ao seu final; á que a detecção ocorre on-line, durante os ciclos de amplificação. (ZAHA, 1998; FLEURY, 2003).

Leucemia Linfóide Aguda resultad da proliferação clonal de precursores linfóides anormais na medula óssea. Embora possa ocorrer em qualquer idade, sua incidência é maior entre crianças de dois a cinco anos, diminuindo entre adolescentes e adultos jovens, voltando a crescer após 60 anos de idade. A maioria dos casos (mais de 70%) ocorre em menores de 20 anos de idade (pico entre 3-4 anos, aumentando novamente após os 40 anos). É a forma mais comum de leucemia no infante. Acomote mais frequentemente o sexo masculino. Raro

em idosos (acima de 60 anos: < 5% dos casos). Corresponde a 20% das leucoses nos adultos. (PEDROSA, et al 2002)

As mesmas doenças e síndromes genéticas ou adquiridas, e os mesmos fatores ambientais citados como predisponentes a provocar LMA, são também atribuídos à LLA, porém de maneira menos evidente em muitos casos.

O diagnóstico é através do exame citológico do sangue periférico, da medula óssea e do líquido (líquido céfalo-raquidiano - LCR). O diagnóstico de LLA é estabelecido, quando 25% ou mais das células nucleadas da medula óssea são linfoblastos. Os seguintes exames são procedidos:

- Citomorfologia e Citoquímica (PAS, Sudam Black e Fosfatase Ácida) do sangue periférico ou da medula óssea.
- Imunofenotipagem do sangue periférico ou da medula óssea.
- Citogenética convencional da medula óssea ou do sangue periférico. (Conduitas do Inca, 2001)

## 2. Objetivo

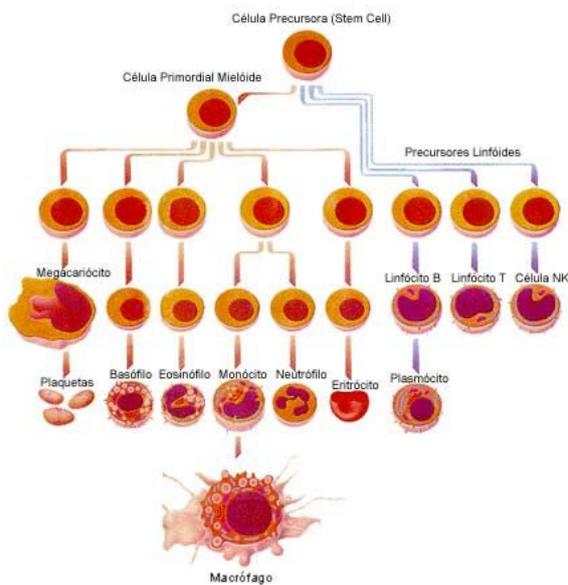
Apresentar as abordagens e métodos utilizados no diagnóstico das Leucemias Agudas: Mielóide e Linfóide

### 3. Métodos

Realizado a revisão bibliográfica através de livros, publicações e artigos científicos absorvidos de revistas.

#### 4. Desenvolvimento

O tipo de leucemia mais freqüente na criança é a leucemia linfóide aguda (ou linfoblástica). A leucemia mielóide aguda é mais comum no adulto. Esta última tem vários subtipos: mieloblástica (menos e mais diferenciada), promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritrocítica e megacariocítica.



A leucemia mielóide aguda LMA representa em torno de 15 a 20% das leucemias da infância e 80% dos adultos, na maioria dos casos não havendo evidência da influência de fatores genéticos. Em 1975 o grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) propôs a primeira classificação em cinco diferentes subtipos, M1, M2, M3, M4, M5, M6 e logo em 1985 foi revisado e passado a ter sete subtipos acrescentando M0 e M7 tendo como base o diagnóstico morfológico características nucleares e citoplasmáticas e no grau de maturação das células blásticas. Além de alguns subtipos apresentarem suas variantes: LMA-M2v, LMA-M3-V, LMA-M4-Eo, LMA-M5a e LMA-M5b. (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001; GREER et al., 2003)

Categorias morfológicas, citoquímicas e imunofenotípicas das LMAs:

1- LMA-M0 tem característica de infiltração de 20% de células blásticas sendo morfológicamente indiferenciados, tendo blastos pequenos, com cromatina frouxa e nucléolo grande, sem bastonetes de Auer com reação citoquímica negativa para peroxidase. (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001; JAQUES WALLACH, 2003)

O estudo imunofenotípico apresenta uma população blástica com relação entre tamanho/grânulo (FSC/SSC) baixa, com positividade para pelo menos um dos antígenos de linhagem mielóide CD33, CD13 ou CD11b. É muito importante a realização da imunofenotipagem para diferenciar a LMA-MO da LLA-L2. (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001;)

2- LMA-M1 tem como característica um número alto de blastos na medula óssea, cerca de 90% das células nucleadas, com presença de granações e bastonetes de Auer, com reação citoquímica positiva para mieloperoxidase. (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001; JAQUES WALLACH, 2003)

A imunofenotipagem tem pelo menos três marcadores: anti-MPO, Cd13, CD33, CDw65 ou CD117 (c-kit). Também outros podem estar presentes mas não freqüentes como: HLA-Dr, CD34, CD7, CD4, Cd11b. Este subtipo não está associado ao pior prognóstico clínico, mas em alguns casos a doença pode ser confundida com LLA. (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001)

3- LMA-M2 é caracterizado pela presença de 20 a 90% de blastos na medula óssea possuem granação citoplasmática e reação positiva para mieloperoxidase, com uma porcentagem inferior a 20% de células monocíticas diferenciando da M4. A cariotipagem: t(8;21)(q22;q22); região crítica de 21 q translocada para 8q; perda frequente de cromossomo sexual . Predilacao aumentada para esta leucemia na síndrome de Down (trissomia do 21). (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001; JAQUES WALLACH, 2003)

A imunofenotipagem apresenta positividade para os marcadores MPO, CD13, CD33, CDw65 ou Cd117 (c-kit). Tem outros marcadores expressos, mas não específicos HLA-DR, CD34, CD11b.

LMA-M2v é uma variante que caracteriza-se por apresentar blastos grandes com abundante citoplasma basofílico. Os bastonetes de Auer são freqüentes. Promielócitos, mielócitos e granulócitos maduros com variados graus de displasia. A reação citoquímica para mieloperoxidase é positiva em pelo menos 3% dos blastos. (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001)

A imunofenotipagem são positivos para os antígenos: CD13, CD33, CD65w e anti-MPO. No entanto os antígenos característicos da linhagem linfóide B CD19 ou da linhagem NK CD56 associados ao antígeno CD34. Pacientes com LMA-M2v expressam os antígenos CD19 e CD56 tem forte correlação com translocação t(8;21), tendo uma maior taxa de remissão completa possuindo melhor prognóstico. (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001)

4- LMA-M3 tem como característica apresentar células com aparência promielócitos, devendo ser considerados como blastos. Os blastos apresentam núcleo excêntrico e citoplasma com abundante granulação, com alguns bastonetes de Auer. Na forma variante da LMA-M3V mostra os promielócitos hipogranular e microgranular. Nos dois casos a reação citoquímica é positiva para mieloperoxidase. A Cariotipagem ocorre frequentemente t(15;17)(q22;q12). (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001; JAQUES WALLACH, 2003)

A imunofetipagem apresenta relação FSC/SSC alta, os blastos apresentam grande autofluorescência e positividade para os marcadores CD13 e CD33 e negativos para os antígenos CD34, HLA-DR e CD14. Com esses achados imunofenotípico tem correlação com a translocação t(15;17). (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001)

5- LMA-M4 tem como característica nas células leucêmicas do sangue periférico a presença de granulocíticos e monocíticos. Os blastos monocíticos são diferenciados pela reação citoquímica com presença de atividade esterase.

A imunofenotipagem apresenta os antígenos da linhagem mielóide CD13, CD33. Os antígenos da linhagem monocítica CD4, CD14, CD15 e CD11b podem estar expressos em variável porcentagem. A cariotipagem quase todos os pacientes mostram inversão do cromossomo 16 [inv(16)(p13;q22)]; < 20% mostram translocação equilibrada entre braço curto de um cromossomo 16 e

braço longo de outro cromossomo 16 [t(16;16)(p13.1;q22)]. (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001; JAQUES WALLACH, 2003)

LMA-M4 Eo é uma variante definida pela presença de 20 a 80% de componente monocítico das células blásticas na medula óssea e assim associando-se a um aumento do componente eosinofílico anormal. Os blastos em algumas ocasiões podem conter bastonetes de Auer, como na LMA-M4, mas sua característica é a presença de eosinofilia com eosinófilos em diferentes estágios de maturação. Os grânulos eosinofílicos são maiores, que os normalmente observados em precursores eosinófilos normais. Os eosinófilos maduros podem apresentar hiposegmentação nuclear. Os blastos apresentam reação citoquímica positiva para mieloperoxidase. (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001)

A imunofenotipagem tem marcadores positivos para os antígenos da linhagem mielóide CD13 e CD33, e também para os da linhagem monocítica CD14, CD15 e Cd11b. ;tendo o antígeno CD2 como expressão apresenta correlação com a inversão do cromossomo 16. Os pacientes com LMA-M4 Eo tem ótimo prognóstico e respondem bem a indução quimioterápica. Geralmente são pacientes mais jovens apresentando leucocitose e organomegalia. (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001)

6- LMA-M5 é quando o paciente tem 80% ou mais das células não eritróides da medula óssea, como os monoblastos, promonócitos ou monócitos. Apresentando também uma variante LMA-M5a (sem diferenciação) tem como característica mais de 80% de células grandes com cromatina frouxa e citoplasma agranular enquanto que outra variante LMA-M5b (com diferenciação) acima de 20% dos blastos tem maturação evidenciada pelo contorno irregular do núcleo e pela presença de grânulos no citoplasma. (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001)

Os monoblastos são células grandes com citoplasma abundante e basofilia acentuada. Não é comum a presença de bastonetes de Auer. Os promonócitos tem núcleo convoluto e irregular. A reação citoquímica para mieloperoxidase é negativa e a reação esterase é fortemente positiva. (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001)

Na imunofenotipagem é característico a presença de população blástica com relação FSC/SSC mais do que M0 e M1. O antígeno de linhagem mielóide positivo é o CD33 e o negativo é o CD13 e os antígenos CD14 e CD15 são positivos, também é possível a presença fraca de CD34. Pela presença de CD33 e CD4 associados aos CD13 e CD34 negativos tem correlação com a t(9;11). Os pacientes com LMA-M5 tem maior prevalência de tumor extramedular com filtração na gengiva, pele, tubo digestivo e sistema nervoso central. (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001).

7- LMA-M6 tem como característica apresentar a porcentagem de blastos menor que 20% de todas as células nucleadas da medula óssea e mais de 20% de mieloblastos do total de células não eritróides na medula óssea.

Na imunofenotipagem as células blásticas não eritróides apresentam positivos para os antígenos associados a linhagem mielóide, como CD13, CD33, anit-MPO, com ou sem os antígenos associados as células precursoras, como HLA-DR e o CD34. (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001)

8- LMA-M7 é definida pela presença de mais de 20% de megacarioblastos entre as células nucleadas na medula óssea. Os blastos são de tamanhos variáveis com citoplasma agranular podendo ter protrusões. A cariotipagem tem relatado anormalidades de cromossomos 21. (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001; JAQUES WALLACH, 2003)

A imunofenotipagem é fundamental para diagnosticar este subtipo apresentando marcadores de linhagem mielóide CD13 e CD33 frequentemente presentes, mas para diagnosticar a LMA-M7 é definido pela positividade para os antígenos de linhagem megacariocítica: CD41, CD42 ou CD61. Deve-se ter cuidado na coleta do material para minimizar a agregação das plaquetas a superfície do blasto para evitar falsos positivos para antígenos da série plaquetaria. É importante a imunofenotipagem para diferenciar pois pode ser confundida com LLA. Este subtipo ocorre em casos de pacientes com síndrome de Down. (MARTINS et al., 2000; ZAGO et al., 2001)

A translocação t(8;16)(p11;p13) é uma aberração ocorrendo periodicamente de novo após tratamento relacionado a LMA associado a

diferenciação LMA-M4 da LMA-M5 sendo caracterizados os casos pelo exon MOZ sobre descrito 16/CBP exon 3 e exon de CBP 2/MOZ exon. Foram análises citogenética e FISH em quatro casos fundindo o MOZ gene (8p11) com o CBP gene (16p13). Foi descoberta as fusões químicas de RNA amplificam MOZ-CBP e fusões de CBP-MOZ através da reação RT-PCR e fluorescência em hibridação de situ -FISH. (SCHMIDT et al., 2004)

A técnica RT-PCR pode ser valiosa desde que seja rotineira da translocação t(8:16)(p11;p13), e os dados dos pontos de ruptura nestes intros conduzem a armação recíproca exon de MOZ 16/CBP em armação com o exon de CBP 2/MOZ em 17 cópias de fusões químicas (SCHMIDT et al., 2004)

O diagnóstico por RT-PCR é de muita importância e útil para a descoberta rotineira de t(8:16)(p11;p3) com leucemias com resultados positivos podendo assim contribuir para determinação da aberração na LMA-M4 e LMA-M5 assim podendo também monitorar a doença residual mínima ajudando no tratamento. (SCHMIDT et al., 2004)

No diagnóstico da LMA, a citogenética é um marcador de prognóstico clínico bem definido, permite caracterizar as translocações balanceadas pro anormalidades cromossômicas, ganho ou perda de cromossomos que são peculiares as leucemias e encontradas em mais de 65% dos casos. (PELLOSO et al., 2003).

É considerado como cariótipo favorável: inv(16), t(16;16), del(16q), t(15;17) com ou sem alterações secundárias, t(8;21) sem del(9q) ou cariótipo complexo; como cariótipo intermediário: cariótipo normal, +8, +6, -Y, del(12p) enquanto para os cariótipos desfavoráveis: envolvendo os cromossomos 3, 9, 11, 20, 21, del(5q), -5, del(7q) e cariótipos complexos. (PELLOSO et al., 2003).

A taxa de cariótipo alterados em LMA é de 80% valor este que se encontra nos valores dos relatados pela literatura que está de 65% a 95%. Ficando evidente a importância do cariótipo na definição dos grupos de risco e a necessidade desse exame para o tratamento da LMA. (PELLOSO et al., 2003)

A Leucemia linfóide aguda (LLA) é o tipo mais comum de câncer infantil, constituindo cerca de um terço de todas as neoplasias malignas da criança. O tratamento da LLA é prolongado, variando de dois a três anos. A LLA evoluiu de uma doença mal definida e intratável na metade do século passado para uma doença que está entre as mais entendidas e as mais curáveis no início deste século. (PEDROSA, et al., 2002)

O gene de expressão na hora do diagnóstico é uma ferramenta essencial para classificação de leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica, que após tratamento, a sensibilidade e especificidade de recaída era respectivamente de 87% e 69%. Predição de grandes níveis baixos da doença residual mínima em 29 dias foi tentar iniciar o tratamento, mas sendo possível para precursor B agrupado e precursor T. No entanto, é necessário focalizar a predição da doença residual mínima podendo determinar a intensidade de indução de terapia. (WILLENBROCK et al., 2004)

O diagnóstico de LLA é atualmente feita através de morfologia, imunofenotipagem e análises citogenéticas de amostra de medula óssea, como também em exames clínicos. Os resultados obtidos indicam análise de expressão de gene usando microarrays de DNA sendo uma ferramenta promissora para predição de recaída ou resposta de tratamento na infância com LLA. (WILLENBROCK et al., 2004).

Patogenia: O desencadeamento da proliferação neoplásica parece ocorrer de maneira similar àquela citada na LMA. Há oncogenes que se encontram em sítios, por exemplo: oncogenes *mos* e *abl*, acometidos em certas translocações em LLA que também existem em certos tipos de LMA.

Classificação:

As LLA podem ser de dois tipos: tipo B (mais frequente) ou de tipo T, dependendo da linhagem a ser acometida. A classificação mais utilizada é a do grupo FAB, que se baseia na morfologia observada no hemograma e mielograma:

- LLA tipo L1 - blastos pequenos e homogêneos, difícil observar nucléolos.

- LLA tipo L2 - blastos de tamanho variável, heterogêneo, nucléolos grandes visíveis. Diagnóstico diferencial com LMA-M7.
- LLA tipo L3 - blastos grandes, citoplasma basófilo e vacuolizado. Forma de pior prognóstico.

Existe ainda uma classificação mais abrangente (MIC) para a LLA, tal como para a LMA.

O principal objetivo dessas classificações é separar LLA de LMA, especialmente naqueles casos muito indiferenciados, além de determinar terapêutica adequada e prognóstico.

Existe um tipo de LLA tipo pré-B, que corresponde a maioria dos casos de LLA. É definido por marcadores imunológicos. E com estes, é possível determinar células até mais indiferenciadas, como as da LLA tipo pré-B inicial (early pre-B), que é mais comum em crianças e tem bom prognóstico. LLAs de tipo B correspondem a 80% dos casos e em geral têm melhor prognóstico que os de tipo T, sendo estes mais frequentes em adultos. Todavia os de tipo B são os mais comuns tanto em crianças como em adultos. LLAs indiferenciadas: tipo pré-B e tipo pré-B inicial.

O quadro clínico é idêntico ao da LMA, porém na LLA é mais comum adenomegalia e esplenomegalia, além de fenômenos compressivos decorrentes de infiltrações e neuroleucemia.

O diagnóstico é através do exame citológico do sangue periférico, da medula óssea e do líquido (líquido céfalo-raquidiano - LCR).

O diagnóstico de LLA é estabelecido, quando 25% ou mais das células nucleadas da medula óssea são linfoblastos. Os seguintes exames são procedidos:

- Citomorfologia e Citoquímica (PAS, Sudam Black e Fosfatase Ácida) do sangue periférico ou da medula óssea.
- Imunofenotipagem do sangue periférico ou da medula óssea.
- Citogenética convencional da medula óssea ou do sangue periférico. (Conduas do Inca, 2001).

O mielograma revela hiper celularidade com grande substituição das células normais pelo clone linfoblástico leucêmico (mínimo de 30%). Auxilia também na classificação FAB.

Importantes exames citoquímicos são o do Sudan negro e da peroxidase, ambos negativos na LLA (positivos na LMA). PAS é positivo. Não há bastonete de Auer.

A morfologia e a citoquímica não diagnosticam todos os casos, sendo muitas vezes necessário realizar maiores estudos como o da citogenética, sendo que certas anomalias determinam melhor ou pior prognóstico, por exemplo:

bom prognóstico: hiperdiploidia (>50 cromossomos), del -6q (mais no tipo LLA-L2 mau prognóstico: t(8;14 - mais comum na LLA-L3), t(8;22), t(4;11), t(2;8), t(9;22), t(8;14), t(1;19 - mais comum na LLA pré-B), cromossomo Ph1 (Filadélfia, característico mais da leucemia mielóide crônica).

#### 4. Conclusão

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e a Linfóide Aguda (LLA) são um problema que vem atingindo pessoas da população em geral e o diagnóstico é feito a partir de um quadro clínico agudo.

Aspecto morfológico, citoquímica, técnicas de imunofenotipagem e citogenética, vem sendo utilizados para definir e classificar as leucemias agudas; muito importante para a verificação do prognóstico e acompanhamento das células da medula óssea.

Reações Citoquímicas são utilizadas para diferenciação dos subtipos LMA, através de coloração das células da medula óssea e sangue sem modificar sua morfologia, auxiliando na classificação da leucemia.

Através do RT-PCR é possível realizar monitoramento sensível do clone maligno, que pode ajudar e guiar decisões de tratamento e eventuais melhorias a um paciente com prognóstico desfavorável.

A imunofenotipagem permite reconhecer o clone normal definindo as diferenciações, características prognósticas e fenótipos aberrantes para monitorar a doença residual mínima.

A citogenética, no diagnóstico de LMA é um marcador de anormalidades cromossômicas, por exemplo, a taxa de cariótipo alterado da LMA é de mais ou menos 80%, importante para evidenciar o grupo de risco e guiar estratégias de tratamento para estes pacientes.

Com os avanços destas técnicas o diagnóstico, tratamento após a identificação e classificação da leucemia vem melhorando a qualidade de vida e esperança de uma sobrevida. Cerca de 40% dos pacientes em tratamento tem uma sobrevida de cinco anos ou mais, desde que o tratamento se inicie assim que diagnosticada.

A Leucemia Linfóide Aguda evoluiu de uma doença mal definida e intratável na metade do século passado para uma doença que está entre as mais entendidas e as mais curáveis no início deste século. Esse sucesso foi obtido graças não somente ao melhor conhecimento da doença, a introdução de novas

drogas com protocolos terapêuticos adequados, mas sobretudo ao melhor tratamento de suporte

## 5. Referência Bibliográfica

GREER,J.P; FOERSTER,J; LUKENS,J; RODGERS,G.M; PARASKEVAS,F; GLADER,B. Wintrob's Clinical Hematology. Volume 2. 11ª edição. Philadelphia (USA): Lyppincott Willians & Wilkins, 2003. 2719 p.

JAFFE, E.S; HARRIS, N.L; STEIN, H; VARDIMAN, J.W. World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of Hematopoeitic and Lymphoid Tissues. IARC Press Lyon 2001.

JAQUES WALLACH,M.D. Interpretação de Exames Laboratorias. Rio de Janeiro: Medsi. 7ª Edição, 2003. 1068 p.

KEUNG,Y.K; BEATY,M; POWELL,B.L; MOLNAR,I; BUSS,D; PETTENATI,M. Philadelphia chromosome positive myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia – retrospective study and review of literature. Revista Leukemia Research, v.28, p. 579-586, 2004.

MARTINS, S.L.R; FALCÃO, R.P. A importância da imunofenotipagem na Leucemia Mielóide Aguda. Revista da Associação Médica Brasileira, São Paulo, v.46, n.1,2000.

FLEURY- Centro de Medicina Diagnóstica - Manual Fleury de Diagnóstico em Hematologia: Leucemia Mielóide Aguda, São Paulo, 2003.

MEDEIROS,G.E.B; LIMA,F.M; SILVA,T.M.A; ALBUQUERQUE,E.S; SERAFIM,E.S.S; PEREIRA,N.M.L. Acompanhamento do Perfil Hematológico de pacientes portadores de Leucemia Linfóide Aguda tratados pelo protocolo Gbtli- Lla-93 . Revista News Lab, São Paulo, n.63, p. 118-125,2004

PELLOSO, L.A.F; CHAUFFAILLE, M.L.L.F; GHANAME, F.S; YAMAMOTO,M; BAHIA, D.M.M; KERBARY, J. Cariótipo em Leucemia Mielóide Aguda: Importância e tipo de alteração em 30 pacientes ao diagnóstico. Revista da Associação Médica Brasileira, São Paulo, v.49, n.2, p. 150-155,2003.

SCHIMIDT, H.H; STREHL,S; THALER,D; SILL,H; LINKESCH,W; JAGER,U; SPERR,W; GREINIX,H.T; KONNIG,M; EMBERGER,W; HAAS,O.A. RT-PCR and FISH analysis of acute myeloid leukemia with t(8;16) (p11;p13) and chimeric MOZ and CBP transcripts: breakpoint cluster region and clinical implications. Revista Nature Publishing Groups, v.48, p.1115-1121,2004.

RIZZATTI,E.G; PORTIERES,F.L; MARTINS,S.L.R; REGO,E.M; ZAGO,M.A; FALCÃO,R.P. Microgranular and t(11;17)/ PLZF-RAR $\alpha$  variants of acute promyelocytic leukemia also present the flow cytometric pattern of CD13, CD34 and CD15 expression characteristic of PML-RAR $\alpha$  gene rearrangement. American Journal of Hematology, v.76, p. 44-51,2004.

WILLENBROCK,H; JUNCKER,A.S; SCHMIEGELOW,K; KNUDSEN,S; RYDER,L.P. Prediction of immunophenotype, treatment response, and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia using DNA microarrays. Revista Nature Publishing Group, v.18, p. 1270-1277,2004.

ZAHA,A. et al. *Biologia Molecular Básica*. Porto Alegre: Ed. Mercado Aberto,1998.336p.

ZAGO,M.A; FALCÃO,R.P; PASQUINI,R. *Hematologia: Fundamentos e Prática*. São Paulo: Atheneu, 2001.1043 p.

QUIXABEIRAL, V.B.L.; SADDI, V.A. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. RBAC, vol. 40(3): 199-202, 2008

Conduas do Inca/MS / Inca/MS – Procedures. Leucemia Agudas na Infância e na adolescência. Revista Brasileira de Cancerologia, vol. 47(3): 245-257, 2001

PEDROSA, F.; LINS, M. Leucemia linfóide aguda: uma doença curável. Rev. Bras. Saude Mater. Infant. v.2 n.1 Recife jan./abr. 2002