

Laís de Holanda Bezerra Sanchez



DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS LEUCEMIAS AGUDAS

Academia de Ciência e Tecnologia

São José do Rio Preto, 2020

Laís de Holanda Bezerra Sanchez



DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS LEUCEMIAS AGUDAS

Artigo apresentado como trabalho de conclusão de curso, para Pós Graduação em Hematologia e Banco de Sangue, pela Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto.

Academia de Ciência e Tecnologia

São José do Rio Preto, 2020

Sumário

1. Resumo	4
2. Introdução	4
3. Metodologia	4
4. Leucemia Linfoide Aguda (LLA).....	5
5. Leucemia Mieloide Aguda (LMA).....	9
6. Conclusão	11
7. Referências	12

1. Resumo

As Leucemias Agudas, são neoplasias de características malignas, que podem ser expressas como Leucemia Linfóide Aguda (LLA), ou Leucemia Mieloide Aguda (LMA), dependendo de qual linhagem apresentará alterações. Ambas, apresentam células imaturas de característica blástica, sendo igual ou superior a 20% na contagem diferencial do material da medula óssea.

Nas leucemias da linhagem linfóide, é classificado três subtipos L1, L2 e L3. Já nas leucemias mieloides, os subtipos variam de M0 até M7.

Toda a celulariedade, é muitas das vezes expressa no hemograma, o qual, a princípio sugere uma hipótese diagnóstica, que deve ser analisada com cautela e confirmada com exames mais específicos, como a imunofenotipagem e citogenética.

Realização correta dos exames, e clareza na execução são fundamentais para o profissional responsável, liberando assim um laudo correto e claro para o médico.

2. Introdução

As Leucemias Agudas (LLA e LMA) são doenças cancerígenas que podem acometer o indivíduo seja na fase infantil ou adulta da vida, alterando a hematopoiese e apresentando celulariedade jovem neoplásica (acima de 20%) na medula óssea e no sangue periférico.

Em suas classificações, apresentam subtipos muito importantes os quais são fundamentais para classificação diagnóstica. Na LLA, a variação é L1, L2 e L3, entretanto na LMA são oito subtipos M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7. Cada um destes apresenta características e marcadores de imunofenótipos importantes, que serão apresentadas ao decorrer deste trabalho.

3. Metodologia

O presente artigo tem como finalidade apresentar de forma simples e clara o tema “Diagnóstico laboratorial das leucemias agudas”, realizado através de resumos das aulas teóricas do módulo de leucemias, consultas acadêmicas digitais em portais como Scielo, PubMed, Google Academico e no site da AC&T.

4. Leucemia Linfoide Aguda (LLA)

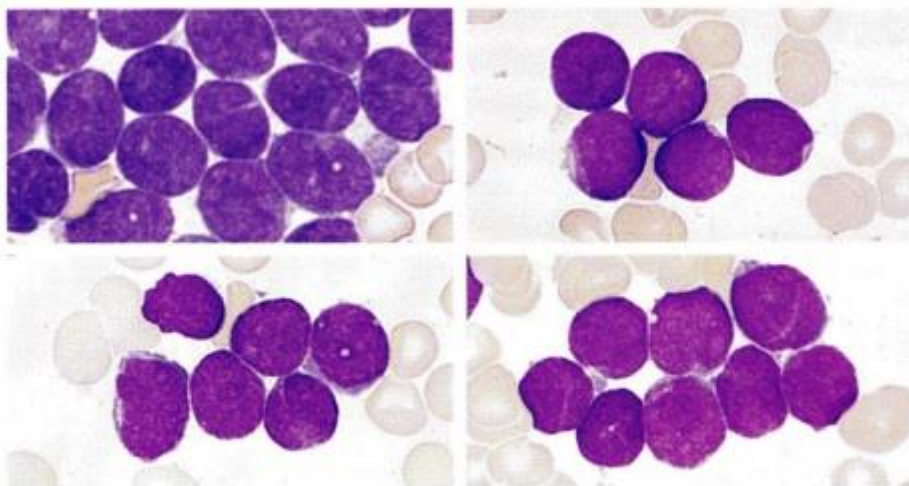
A Leucemia Linfoide Aguda (LLA), é uma neoplasia de característica maligna que afeta o sistema hematopoiético do indivíduo, sendo mais comum na infância e mais frequente em meninos brancos, podendo ser encontrada em pacientes adultos.

Nesta neoplasia a medula óssea (MO) é acometida pela produção desordenada da linhagem linfoide jovem (blastos), ocupando a maior parte do espaço medular, causando a diminuição da produção de glóbulos vermelhos e plaquetas.

As LLA tiveram sua classificação por subtipos, definidas por um grupo de hematologistas franceses, americanos e britânicos, denominada Classificação FAB, utilizando critérios da morfologia celular e citoquímica. Sendo assim, foi definido que as leucemias agudas são denominadas quando apresentam mais de 30% de blastos na MO (FARIAS;CASTRO, 2004).

Assim, de acordo com as características celulares, presença ou ausência de basofilia, tamanho celular, vacuolização e nucléolos, foi definido três subtipos de leucemias linfoides agudas: L1, L2 e L3.

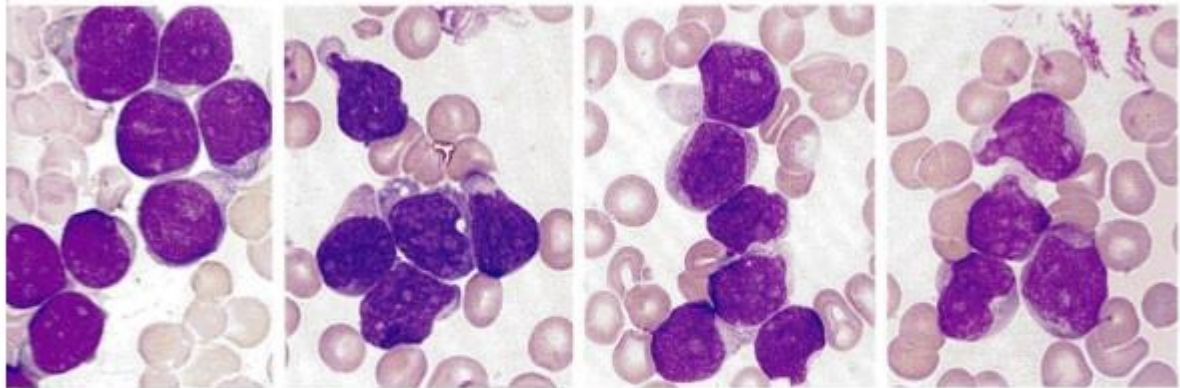
L1: Celulariedade linfoide jovem (linfoblastos) mais uniformes, com tamanho diminuído e citoplasma escasso. A cromatina é frouxa porém mais escura e nucléolo com difícil visualização.



Leucemia linfoblástica aguda, subtipo L₁: células primitivas imaturas uniformes, um tanto pequenas, com citoplasma escasso e núcleos arredondados ou fendidos, geralmente com apenas um nucléolo.

Fonte: Fadel, 2010.

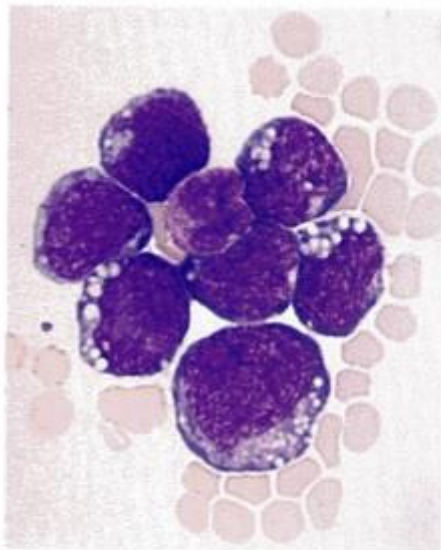
L2: Linfoblastos pleomórficos, com maior variação que a L1. Apresentam tamanho variado, basofilia, ausência de granulação, cromatina frouxa e nucléolos visíveis.



Leucemia linfoblástica aguda, subtipo L2 células primitivas imaturas que variam consideravelmente de tamanho e quantidade de citoplasma; a proporção nuclear/citoplasma raramente é tão elevada quanto um L1. Os núcleos são variáveis quanto a forma e freqüência contem muitos nucléolos.

Fonte: Fadel, 2010.

L3: Linfoblastos de tamanho aumentado, com basofilia citoplasmática, cromatina frouxa e nucléolos. Geralmente a sua basofilia é intensa e com muitos vacúolos.

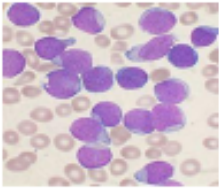
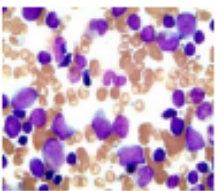
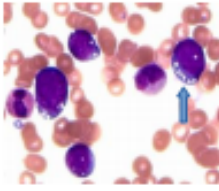


Leucemia linfoblástica aguda, subtipo L₃: células primitivas imaturas com citoplasma de coloração azul intensa, contendo numerosos vacúolos perinucleares pequenos. Esse aspecto está geralmente associado com o tipo de células B (LLA-B).

Fonte: Fadel, 2010.

O quadro a seguir, comparativo dos três subtipos de LLA;

Classificação Franco-Americana-Britânica de leucemia linfoblástica aguda e suas características.

Características celulares	L1	L2	L3
Morfologia			
Diâmetro celular	Predominância de células pequenas e homogêneas	Grandes e heterogêneas	Grandes e homogêneas
Cromatina nuclear	Fina ou aglomerada	Fina	Fina
Forma do núcleo	Regular podendo apresentar fenda ou endentação	Irregular podendo apresentar fenda ou endentação	Regular, redondo ou oval
Nucléolos	Indistintos ou não visíveis	1 ou mais por célula, grandes e proeminentes	1 ou mais por célula, grandes e proeminentes
Quantidade de citoplasma	Escassa	Moderadamente abundante	Moderadamente abundante
Basofilia citoplasmática	Ligeira	Ligeira	Intensa
Vacúolos Citoplasmáticos	Ausentes	Ausentes	Presentes

Fonte: Adaptado de Alves et al.(2012)

Com o passar dos anos, houveram o surgimento de novas técnicas e padronizações para diagnóstico, sendo assim a Organização Mundial da Saúde (OMS), propôs uma nova classificação, usando como base a morfologia celular e também a citocímica, imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular (JAFFE et al., 2001; VARDIMAN et al., 2009).

Com a nova classificação, a presença de linfoblastos na MO passou de 30% para 20%, sendo suficientes para o diagnóstico da doença (ONCIU et al., 2009; WANDT et al., 2010)

O diagnóstico da LLA é fundamentado através da análise do quadro do paciente, juntamente com os resultados dos exames morfológicos e citoquímicos. Laboratorialmente destacam-se a morfologia celular, seja ela através do sangue periférico (SP) ou aspirado da medula óssea (MO), com presença de maior ou igual a 20% de blastos; Imunofenotipagem, ideal para saber qual tipo de linfócito é predominante na neoplasia (B ou T); Citogenética, que tem papel importante no prognóstico da doença, mostrando qual o grau de agressividade da mesma; Biologia Molecular, quando disponível é recomendada, ou usada para confirmação dos resultados já obtidos, sendo padrão ouro no diagnóstico, porém com custo mais elevado.

Geralmente o hemograma é o primeiro exame apresentar características morfológicas da doença ao laboratorialista, associado ao quadro de possíveis graus de anemias, neutropenia, trombocitopenia e geralmente, em 40% dos casos o número de leucócitos estão normais ou até mesmo reduzidos.

É de extrema importância o mielograma, o qual é realizado uma punção na crista ílica posterior/anterior, ou no osso esterno (não recomendado para crianças, devido a fragilidade deste osso). Assim é realizado a aspiração do material hematopoiético, e confeccionado lâminas e corado com corante hematológico, de acordo com a padronização de cada laboratório. Desta forma, é feita análise microscópica das células e destas é necessário encontrar pelo menos 20% de linfoblastos.

Com o laudo do mielograma, confirmando a LLA, o próximo passo é a realização da imunofenotipagem, capaz de identificar informações através de proteínas celulares, como a linhagem celular dos linfócitos.

Em 85% dos casos apresentam-se na forma de LLA-B, que podem ser: Pró B, B comum ou B madura, sendo informações ligadas a maturação do linfócito. Os 15% restantes, estão associados a LLA-T, que podem ser: Precoce, Intermediária ou Tardia.

Os sintomas da LLA e LMA são bem similares, como cansaço, falta de ar, febre e sangramentos. Em casos mais graves, os gânglios podem aumentar de tamanho, os testículos apresentarem inflamação, ter vômitos, dor de cabeça e até acometimento do Sistema Nervoso Central (SNC).

Atualmente 70% das crianças com LLA, são curáveis, e cerca de 50% dos adultos jovens. O mau prognóstico é de 5% na infância, já nos adultos o índice eleva para 25%, tendo maior risco, já que apresentam o cromossomo Ph positivo.

Tratamento é realizado através de quimioterapias associadas. No início do tratamento, é denominado indução, até obter a remissão que é objetivo. Após a remissão, o tratamento deve

continuar, com a pós remissão. Em casos mais graves, ou de tratamento mau sucedido, o médico analisa a possibilidade de transplante de MO.

5. Leucemia Mieloide Aguda (LMA)

Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é um tipo de leucemia que afeta a linhagem mielóide do tecido hematopoiético, o qual inicia uma reprodução clonal maligna com características blasticas com grande variedade, ocasionando uma deficiência na produção benigna das células normais e déficit na quantidade celular madura normal.

Esta patologia atinge principalmente adultos, podendo aparecer em crianças com menor percentual, não apresentando correlação com sexo ou etnia dos pacientes.

A LMA também apresenta uma subclassificação, a qual a FAB (Grupo de hematologistas franceses, americanos e britânicos) propôs. Atualmente são oito subtipos, sendo classificado de M0 a M7, usando como critério aspectos morfológicos e citoquímicos.

Tabela com os oito subtipos de LMA e suas definições, segundo a FAB.

Tipo	Definição	Características morfológicas	Classificação imunofenotípica
M0	Leucemia mielóide de blastos muito indiferenciados	Blastos muito indiferenciados, citologia e imunocitoquímica não definem dados específicos.	MPO;CD13;CD33;CD34; CDw65; CD117;HLA-DR
M1	Leucemia mieloblástica sem maturação	Blastos indiferenciados em alta % (>30%). Pouca maturação para mieloblasto. Bastonetes de Auer às vezes.	CD13;CD33;HLA-DR
M2	Leucemia mielóide com maturação	Blastos indiferenciados (> 30%) e diferenciação até promielócito (< 20%). Citoplasma c/ grânulos azurófilos e bastonetes de Auer.	MPO;CD13;CD15;CD19; CD33;CD34;CD56;CDCDw65;CD117;HLA-DR
M3	Leucemia promielocítica	Maioria é promielócito c/ hipergranulações. Bastonetes de Auer são comuns e núcleo reniforme ou bilobado.	MPO; CD9; CD13;CD15;CD33;CD64; CDw65;CD68;CD117
M4	Leucemia mielomonocítica	Assemelha-se a M2 e M5. > de 20% de cels monocíticas e > 20% de promonócitos e monócitos na medula óssea e/ou sangue.	MPO;CD2;CD11b;CD13; CD14;CD15;CD33;CD34; CD64;CDw65;CD117; HLA-DR

M5a	Leucemia mielocítica diferenciada	Morfologia monoblástica (> 80%), porém com diferenciação até monocítica. Quantidade de monócitos no sangue é maior que na medula.	MPO;CD11b;CD13;CD14; CD33;CD64;CDw65;CD117; HLA-DR
M5b	Leucemia mielocítica indiferenciada	Morfologia promonocítica (> 80% são promonócitos); blastos grandes c/ cromatina delicada, citoplasma basófilo e volumoso e pseudópodos.	CD15;CD33;CD64;CDw65; HLA-DR
M6	Eritroleucemia	> 50% são eritroblastos (formas bizarras) e > 30% são mieloblastos ou promonócitos (associação com blastos M1, M2 ou M4).	Glycophorin A;CD33
M7	Leucemia megacarioblástica	Células indiferenciadas (> 30%) "tipo linfoblastos ou megacariócitos" no sangue. Expressão de antígenos de plaquetas.	CD13;CD33;CD34;CD41a; CD42;CD61;CD34;CDw65; HLA-DR

Tabela adaptada de <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/19208/9995>; Silveira NA et e al.,2008

Segundo Silva, Pilger, Castro e Wagner (2006) A suspeita das leucemias agudas é geralmente ao acaso, através de exames rotineiros, quando por exemplo o hemograma do paciente dá alguns indícios ao médico. Contagem de plaquetas baixas, hemoglobina diminuída, células brancas podem apresentar diminuídas, normais ou elevadas, porém no diferencial das células brancas há presença de blastos, neutropenia e o aparelho indica flags de alterações.

Segundo a OMS algumas anormalidades citogenéticas são recorrentes como t(8;21) (AML1-ETO), inversão(16) (CBFB-MYH11), na leucemia promielocítica aguda ocorre a t(15;17) (PML-RARA), entre outras. Já o quadro clínico, apresenta hiper viscosidade devido elevação do número de leucócitos, insuficiência de MO e podendo ter infiltração extra-medular como no fígado, linfonodos, baço, pele, etc.

O diagnóstico é realizado através da análise de vários exames, com associação da clínica do paciente. No quadro mais comum, o paciente costuma apresentar palidez, esplenomegalia, dor óssea, manifestações hemorrágicas como petéquias no corpo, infiltrações cutâneas e atrofia gengival. (SILVA; PILGER; CASTRO; WAGNER, 2006)

Técnicas para o diagnóstico laboratorial incluem também a imunofenotipagem, citogenética e estudos de biologia molecular, quando necessário e disponível. Assim é possível saber através de marcadores presentes na célula patogênica, qual seu tipo que é fundamental para o tratamento correto e seu prognóstico.

A imunofenotipagem por citometria de fluxo geralmente é mais comum, para saber qual tipo de leucemia se trata, linfóide ou mieloide, também tem papel importante na ação pós diagnóstica onde se inicia o tratamento e detecção da doença residual mínima, onde o paciente ainda apresenta células malignas porém em pouca quantidade, sendo difícil sua detecção. O aspirado da medula óssea e sangue periférico são as amostras mais comuns neste exame, porém cortes histológicos, também podem ser usados.

A tabela a seguir mostra alguns marcadores usados na imunofenotipagem para diagnóstico dos subtipos da LMA;

Classificação da imunofenotipagem da LMA					
Marcadores	LMA-M0/M1/M2	LMA-M3	LMA-M4/M5a/M5b	LMA-M6	LMA-M7
CD13/CD33	++	++	++	+	++
CD65	±/+ / ++	+	++	±	±
MPO	-/+ / ++	++	++	+	-
CD11c	- ou ±	-	++	-	-
CD14	-	-	+ / + / ++	-	-
CD15	± / ± / ++	±	-	-	-
CD36	-	-	+	++	+
H-antígeno	-	-	-	++	+
CD235a (Glicoforina 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.

O tratamento da LMA é bem parecido com o da LLA, é utilizado fármacos quimioterápicos com intenção de obter a remissão da doença. O médico optará pelo tratamento de acordo com os fatores de cada paciente, idade, grau da doença e suas classificações. É fundamental o acompanhamento após a remissão, sempre realizando exames de rotina, como forma de monitoramento.

6. Conclusão

De acordo com as informações apresentadas, podemos concluir que as Leucemias agudas são doenças cancerígenas as quais precisam de muito cuidado e atenção para diagnosticá-las. Profissionais laboratoriais competentes que usem do seu conhecimento

para emitir laudos com informações que ajudem os médicos a oferecer o melhor diagnóstico e tratamento as seus pacientes.

As leucemias apresentadas, LLA e LMA tem como sua principal característica morfológica a presença de blastos na análise celular em lâmina de esfregaço, seja ela da medula óssea ou sangue periférico, sendo de fundamental importância a solicitação de exames complementares para diagnóstico.

Atualmente as técnicas mais usadas são a imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular, que além de indicar o diagnóstico também auxiliam no tratamento pós remissão da doença e detectam se houver o aparecimento da doença residual mínima, a qual o paciente ainda apresenta uma pequena quantidade de células malignas podendo proliferar e voltar a doença.

7. Referências

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol.* 1981 Apr;47(4):553-61

Silveira NA, Arraes, SMAA. A imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: uma revisão. *Arq Mudi.* 2008;12(1):5-14.

Jiménez-Morales S, Hidalgo-Miranda A, Ramírez-Bello J. Leucemia linfoblástica aguda infantil: una aproximación genómica [Acute lymphoblastic leukemia: a genomic perspective]. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2017 Jan-Feb;74(1):13-26. Spanish. doi: 10.1016/j.bmhmx.2016.07.007. Epub 2017 Jan 27.

SILVA, Grazielle C. da; PILGER, Diogo A.; CASTRO, Simone M. de; WAGNER, Sandrine C.. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas: laboratory diagnosis of acute myeloid leukemias. *Laboratory diagnosis of acute myeloid leukemias.* 2006. .. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442006000200004.

SILVEIRA, Neiva Albertina da; ARRAES, Sandra Mara Alessi Aristides. A IMUNOFENOTIPAGEM NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS LEUCEMIAS AGUDAS: uma revisão. UMA REVISÃO. 2008. .. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/19208/9995>.

HAMERSCHLAK, Nelson. Leucemia: fatores prognósticos e genética: artigo de revisão. ARTIGO DE REVISÃO. 2008. .. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572008000500008.

MARTINS, S.L.R.; FALCÃO, R.P.. A importância da imunofenotipagem na Leucemia Mielóide Aguda: artigo de revisão. *Artigo de Revisão.* 2000. .. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-42302000000100009&script=sci_arttext. Acesso em: 26 fev. 2006.

CAVALCANTE, Matheus Santos; ROSA, Isabelly Sabrina Santana; TORRES, Fernanda. LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA E SEUS PRINCIPAIS CONCEITOS: acute lymphid leukemia and its main concepts. ACUTE LYMPHIDLEUKEMIA AND ITS MAIN CONCEPTS. 2017. .. Disponível em: <http://www.faema.edu.br/revistas/index.php/Revista-FAEMA/article/view/578/464>.

BRAGA, Giovanna Alves de Araújo. LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA: revisão de literatura. REVISÃO DE LITERATURA. .. Disponível em: http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/hematologia/serie_branca/leucemias_linfomas_mieloma/leucemias/21-Leucemia-mieloide-aguda.pdf

MELLO JÚNIOR, Martinho de Palma e. LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA: revisão bibliográfica. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. 2010. .. Disponível em: http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/hematologia/serie_branca/leucemias_linfomas_mieloma/leucemias/46-Leucemia-linfoide-aguda.pdf.