

IMUNOFENOTIPAGEM DAS LEUCEMIAS

MARCELO GUSTAVO DE PIER

RESUMO

A caracterização imunofenotípica tem sido o método preferencial para a determinação da linhagem celular e análise da maturação das células nas neoplasias hematológicas. O desenvolvimento de ampla gama de anticorpos monoclonais e das potencialidades do citômetro de fluxo têm impulsionado esta área nos últimos 20 anos.

A análise multiparamétrica através da citometria de fluxo é um método rápido, objetivo e quantitativa para determinação delinhagem celular. Além de determinar a linhagem nos grandes grupos, mielóide, células B, T e NK, a caracterização imunológica contribui sobremaneira para a classificação em subgrupos mais específicos como a Leucemia Mielóide Aguda (LMA) com diferenciação mielóide mínima (M0 da FAB), LMA sem maturação, leucemia eritroblástica aguda, leucemia megacarioblástica aguda e leucemias bifenotípicas.

Cada CD pode ser representado por vários anticorpos monoclonais que reconhecem o mesmo antígeno, mas não necessariamente o mesmo epítipo, produzidos por diferentes clones de células. Isto explica os comportamentos diferentes entre resultados obtidos com o uso de monoclonais diversos.

O diagnóstico é definido conjuntamente com dados clínicos, morfológicos e citoquímicos, citogenéticos e moleculares, baseados no padrão típico de expressão antigênica nos diferentes distúrbios caracterizados clinicamente.

As LLA de linhagem B são quase sempre CD19, CD79a, CD10, HLA-DR e TdT positivas. A expressão de CD20 e CD22 são variáveis.

As Leucemias Mielóides Agudas são definidas pela expressão de dois ou mais dos marcadores anti-MPO, CD117, CD13 e/ou CD33. O marcador mielóide mais específico é o anti-MPO seguido do CD117 (c-kit). A imunofenotipagem é crítica para o diagnóstico diferencial entre LMA mínimamente diferenciada e LLA.

Palavra Chave: Imunofenotipagem, imunofenótipos, Citometria de Fluxo, Leucemias.

INTRODUÇÃO

Desde o primeiro relato dessa doença como uma entidade clínica, em 1845, até os dias atuais, é notável a evolução ocorrida no entendimento da biologia das leucemias. Durante esse período, as doenças hematológicas serviram como modelo para o desenvolvimento dos conceitos atuais da imunologia, principalmente nas áreas da diferenciação linfocitária e da genética molecular. De maneira complementar, o desenvolvimento dessas áreas, juntamente com os avanços técnicos no campo da imunologia, permitiram um maior entendimento das leucemias. As leucemias representam um grupo heterogêneo de doenças clonais de precursores

Artigo de conclusão de curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de Sangue (maio de 2007 - junho de 2008).

Endereço para correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050-130, São José do Rio Preto, SP
e-mail: a.c.t.@terra.com.br

hematopoiéticos, caracterizadas por anomalias quantitativas e qualitativas. 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. Recentemente, métodos diagnósticos mais sofisticados (imunológicos e moleculares) redefiniram a classificação das leucemias de acordo com a origem celular, linfóide (B ou T e maturidade celular) e mielóide, além do tipo de anormalidade genética envolvida.

A classificação das leucemias segundo esse critério tem grande importância na terapêutica e, portanto, na resposta obtida. A determinação da origem celular irá influenciar diretamente a conduta clínica, já que a partir dela se saberá se a leucemia é linfóide ou mielóide, levando a dois caminhos clínicos totalmente diferenciados. Além disso, o reconhecimento da origem celular nas leucemias linfóides (B ou T) também fornece informação importante para a estratificação inicial da conduta clínica a ser adotada. Vale ressaltar que o reconhecimento do estágio de maturação diferencia entre as formas agudas ou crônicas e é fator relevante na avaliação do prognóstico do paciente. Isso é bastante claro quando se trata de uma leucemia linfoblástica aguda (LLA) de origem B. Nesses casos, a própria definição do estágio de maturação está relacionada às translocações cromossômicas ocorridas. Além disso, a informação obtida a partir do diagnóstico é ainda de grande utilidade para reorientar a terapêutica durante o processo de tratamento e principalmente após o término, na procura de doença residual mínima (DRM).

A metodologia padrão para a classificação das leucemias inclui morfologia, citocímica, estudo de marcadores celulares (citometria de fluxo), citogenética e análise molecular. Já a sua avaliação preliminar inclui o hemograma, que fornece dados essenciais como a contagem global, diferencial, o comprometimento da hematopoiese e a morfologia dos leucócitos. Uma vez sugerido o diagnóstico de leucemia, é necessária a avaliação morfológica do aspirado de medula óssea para sua confirmação. A classificação morfológica das leucemias agudas mais comumente utilizada foi desenvolvida em 1976 por um grupo de hematologistas franceses, americanos e britânicos (classificação FAB) e classifica a LLA em três subtipos, designados L1, L2 e L3. As leucemias mielóides agudas (LMA) são caracterizadas por sete subtipos M0 - M7, de acordo com o grau de maturação dos precursores mielóides envolvidos.

CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é um método rápido e objetivo que permite a determinação de múltiplas propriedades físicas simultaneamente de partículas isoladas em suspensão, em nosso caso, as células.

Podemos detectar e quantificar antígenos celulares de superfície, citoplasmáticos e nucleares.

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

Artigo de conclusão de curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de Sangue (maio de 2007 - junho de 2008).

Endereço para correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050-130, São José do Rio Preto, SP
e-mail: a.c.t.@terra.com.br

ser mantidas à temperatura ambiente (entre 18°C e 22°C) e, preferencialmente, o material deve ser analisado até 24 horas após a coleta.

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*).

Cada CD pode ser representado por vários anticorpos monoclonais que reconhecem o mesmo antígeno, mas não necessariamente o mesmo epítipo, produzidos por diferentes clones de células. Isto explica os comportamentos diferentes entre resultados obtidos com o uso de monoclonais diversos.

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 (Figura 1). 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. (Figura 2)

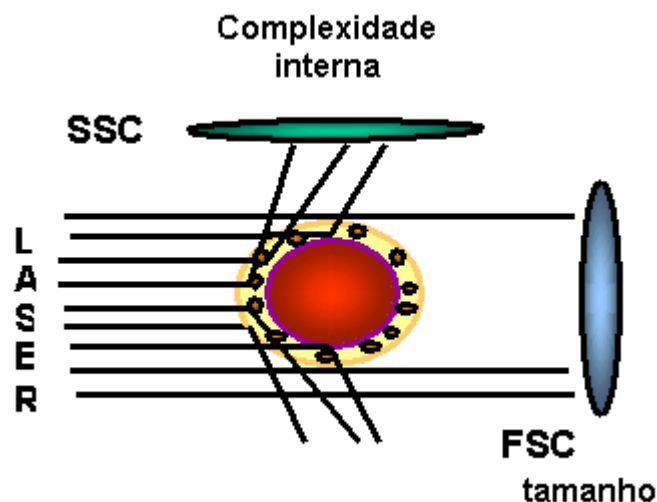


Figura 1: Citômetro de Fluxo: análise das características físicas das células – tamanho e complexidade interna.

Artigo de conclusão de curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de Sangue (maio de 2007 - junho de 2008).

Endereço para correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050-130, São José do Rio Preto,SP
e-mail: a.c.t.@terra.com.br

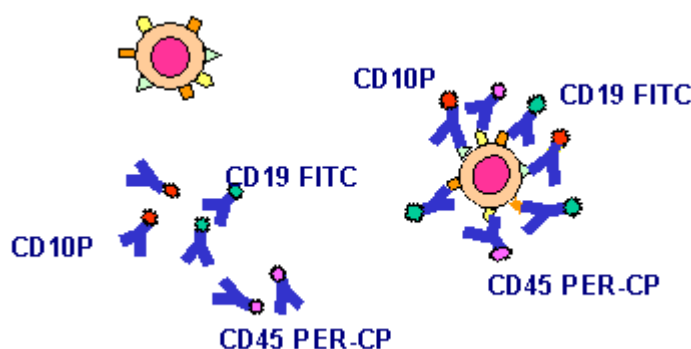


Figura 2: Imunofluorescência Direta.

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. (Figura 3)

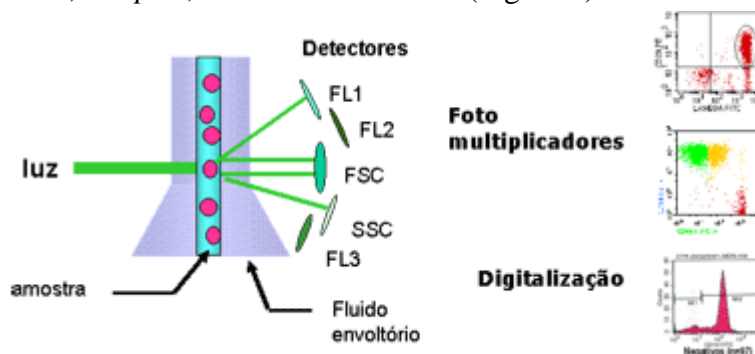


Figura 3: Representação esquemática do citômetro de fluxo.

A citometria de fluxo é 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

O diagnóstico é definido conjuntamente com dados clínicos, morfológicos e citoquímicos, citogenéticos e moleculares, baseados no padrão típico de expressão antigênica nos diferentes distúrbios caracterizados clinicamente.

No início, os esforços se dirigiam principalmente na tentativa de definir as linhagens leucocitárias (antígenos de mielóides, de células B, T e NK) e seus diversos estádios

Artigo de conclusão de curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de Sangue (maio de 2007 - junho de 2008).

Endereço para correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050-130, São José do Rio Preto,SP
e-mail: a.c.t.@terra.com.br

maturativos. Atualmente, além destes aspectos, têm sido estudados os antígenos de ativação, moléculas de adesão, receptores de citocinas, moléculas de células endoteliais.

Tabela 1: Principais antígenos utilizados em Hematopatologia

CD	Anticorpos Monoclonais	Células que expressam	Função
CD 1a	Leu6 T6 BL6 NA1/34	Céls T tímicas, subgrupo de céls.B, céls, de Langerhans	glicoproteína 48kD que se liga a b2-microglobulina
CD2	LEU5b T11 GF10.3 MT910	Todas as céls.T, maioria das NK	ligante de LFA-3
CD3	LEU4 T3 UCHT1 UCHT1	céls T tímicas e maduras	estrutura do TCR, transdução de sinal
CD4	LEU3a T4 BL4 MT310	algs, céls T tímicas, T auxiliadoras, monócitos, macrófagos	correceptor de MHC classe II, receptor do HIV
CD5	LEU1 T1 BL1a DK23	céls T maduras e tímicas,subgrupo de céls. B	ativação de céls. T, ligante de CD72
CD7	LEU9 3A1 8H8 DK23	Todas as céls T, céls. NK	ativação de céls. T e NK
CD8	LEU2a T8 B9.2 DK25	Subgrupo de céls T tímicas, T supressora/citotóxica, subgrupo de NK.	correceptor do MHC de classe I
CD10	CALLA J5 ALB1 SS2/36	Precursor B e céls B do centro germinativo; algumas céls T tímicas, PMN	endopeptidase neutra
CD13	LEU M7 MY7 SJ1D1 WM47	céls. Mielóides	aminopeptidase N
CD14	LEU M3 MY4 RMO52 TÜK4	Monócitos maduros;leve reação em algumas céls. B	
CD15	LEU M1 80H5 CD3-1	céls. mielocíticas e monocíticas	antígeno Lewis-X, adesão celular e fagocitose
CD16	LEU 11a	céls NK, granulócitos	receptor de IgG, Fc famma

Artigo de conclusão de curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de Sangue (maio de 2007 - junho de 2008).

Endereço para correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050-130, São José do Rio Preto,SP
e-mail: a.c.t.@terra.com.br

			RIII
CD19	LEU12 B4 J4.119 HD37	céls B precursoras e maduras	ativação de céls. B
CD20	LEU16 B1 Bly-1 Bly-1	céls B precursores tardios e maduros	canal de Ca ⁺⁺ . Ativação de céls B
CD22	LEU14 B3 SJ10.1H11 TO15	céls. B precursoras e maduras	molécula de adesão celular
CD25	Tac	céls T e B ativadas, Hairy cell leukemia, ATLL	receptor da cadeia alfa a IL-2
CD30	Ki-1 Ber-H2	céls T ativadas, Reed - Sternberg, linfoma anaplásico de grandes céls.	Receptor de fator de crescimento
CD33	LEUM9 MY9 P3HL90 WM54	céls. mielóides e monocíticas	molécula de adesão do ácido siálico
CD34	HPAC1 QBEND10	céls. Progenitoras	
CD38	T10	céls. linfóides progenitoras e céls. Plasmáticas	ativação leucocitária
CD41	Pit-1 P2 5B12	Megacariócitos e plaquetas	gpIIb/IIIa, receptor para fibrinogenio/fibronectina
CD42B	ZS22	Megacariócitos e plaquetas	gpIIb, receptor para o fator de von Willebrand-ristocetina
CD43	Leu 22, leucosialina, sialoforina	céls. T, céls. Mielóides, alguns linfomas B	liga-se ao CD45(ICAM-1) e pode ser anti-adesivo
CD45	HLE-1 KC56 J33 T29/33	pan-hematopoético	transdução de sinal: tirosinafosfatase
CD45RO	UCHL1	Subgrupo de céls B, subgrupo de T(memória), monócitos, macrófagos	transdução de sinal: tirosinafosfatase
CD45RA	2H4	céls B, subgrupo de céls T (virgem), monócitos	transdução de sinal: tirosinafosfatase
CD45RB	T200	Subgrupos de céls T. céls B, monócitos, macrófagos, granulócitos	transdução de sinal: tirosinafosfatase

Artigo de conclusão de curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de Sangue (maio de 2007 - junho de 2008).

Endereço para correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050-130, São José do Rio Preto, SP
e-mail: a.c.t.@terra.com.br

CD56	LEU19 NKH-1 T199	céls. NK e céls. T citotóxicas	molécula de adesão celular
CD57	HNK-1 LEU7	céls. NK	
CD61	SZ21 Y2/51	megacariócitos e plaquetas	GPIIb/IIIa, molécula de adesão celular com CD41, receptor de fibrinogenio
CD71	T9	céls. Eritróides, precursores linfóides	receptor de transferrina
CD79a	HM57	céls. B precursoras e maduras	Mb-1; transdução de sinal da Ig de superfície para o citoplasma
CD103	HML-1 a6 aE integrina	linfócitos intraepiteliais, hairy-cell leukemia	integrina
CD117	c-kit	céls. Mielóides precursoras	receptor de c-kit
HLA-DR	Ia 7.2	céls B. monócitos, progenitores mielóides e céls T ativadas	antígeno de apresentação, MHC classe II
IgM m *		céls. B virgens	reconhecimento de Ag, ativação de céls. B
IgG g *		céls. B memória	reconhecimento de Ag, ativação de céls. B, imunidade humoral
IgD d *		céls. B virgens	reconhecimento de Ag, ativação de céls. B
IgA a *		céls. B memória	reconhecimento de Ag, ativação de céls. B, imunidade de mucosas
IgE e *		céls. B memória	reconhecimento de Ag, ativação de céls. B, reação de hipersensibilidade
k **		céls. B	reconhecimento de Ag, ativação de céls. B
l **		céls. B	reconhecimento de Ag, ativação de céls. B
TdT		céls linfóides imaturas	rearranjo de Ig e TCR

* cadeia pesada de imunoglobulina; ** cadeia leve de imunoglobulina; TCR - receptores de células T; TdT-deoxinucleotidil transferase terminal.

Artigo de conclusão de curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de Sangue (maio de 2007 - junho de 2008).

Endereço para correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050-130, São José do Rio Preto,SP
e-mail: a.c.t.@terra.com.br

O esquema abaixo demonstra a seqüência de expressão antigênica na diferenciação de células B. Exemplificamos assim a modulação de expressão de antígenos que ocorrem nas células hematopoéticas nos seus diversos estadios maturativos sendo que alguns antígenos se restringem a determinados estadios. (Figura

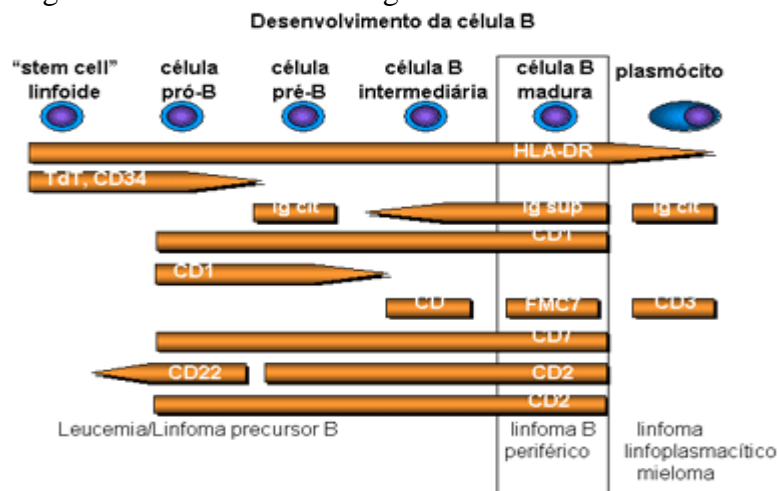


Figura 4: A seqüência de expressão antigênica na diferenciação da linhagem linfóide B

Um painel inicial permite a distinção entre LMA e LLA: os marcadores linfóides B CD19, CD79a, CD10, CD22 cit, os marcadores linfóides T CD7, CD3 cit, os marcadores mielóides CD13, CD33, CD117 e anti-MPO e o marcador de células progenitoras CD34. O uso de um maior número de marcadores aumentará a probabilidade de se identificar uma expressão aberrante que poderá servir para acompanhamento de doença residual mínima assim como auxilia no reconhecimento de leucemias bi-linhagem (bi-clonais) e bifenotípicas.

As LLA de linhagem B são quase sempre CD19, CD79a, CD10, HLA-DR e TdT positivas. A expressão de CD20 e CD22 são variáveis.

As seguintes tabelas mostram as reatividades para os principais marcadores imunológicos nos diferentes subtipos de leucemias agudas.

Tabela 2: Classificação Imunológica das LLAs correlacionada com achado citogenético e significado prognóstico

Imunofenótipo	Marcadores Imunológicos					associação freqüente com leucemias específicas e significado prognóstico	% dos casos
	CD19 CD79	CD10	m cit	Ig sup*	CD3 cit		
Pró-B ou Pré-pré B	+	-	-	-	-	rearranjo de MLL como a t(4;11)(q23;p13) associado a pior prognóstico	1
comum	+	+	-	-	-	associa-se com hiperdiploidia rearranjo TEL-AML1, de bom prognóstico	50-60

Artigo de conclusão de curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de Sangue (maio de 2007 - junho de 2008).

Endereço para correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050-130, São José do Rio Preto, SP
e-mail: a.c.t.@terra.com.br

Pré B	+	+	+	-	-	associa-se com t(1;19) (q23;p13)	20-25
B	+	-/+	-	+	-	protocolo terapêutico específico	3
T	-	-/+	-	-	+		18

Ig sup - imunoglobulina de superfície; CD3 cit-CD3 citoplasmático; m cit micitoplasmática

As Leucemias Mielóides Agudas são definidas pela expressão de dois ou mais dos marcadores anti-MPO, CD117, CD13 e/ou CD33. O marcador mielóide mais específico é o anti-MPO seguido do CD117 (c-kit). A imunofenotipagem é crítica para o diagnóstico diferencial entre LMA mínimamente diferenciada e LLA. Na leucemia eritróide aguda, os eritroblastos em geral são negativos para os marcadores mielóides e anti-MPO e expressam glicoforina A e hemoglobina A. Os mieloblastos expressam CD13, CD33, CD11 e anti-MPO. Na leucemia megacarioblástica aguda, o CD13, CD33 podem ser positivos, o CD34, o pan-leucocitário CD45 e o HLA-DR são freqüentemente negativos, mas expressam os marcadores para glicoproteínas plaquetárias, CD41 e CD61.

Algumas associações relevantes entre imunofenótipo e anormalidades genéticas e comportamento clínico

- As LLA comuns com CD10+ , cadeia pesada de imunoglobulina m citoplasmática negativa (mCit -) e CD45 de fraca intensidade, apresentam associação significativa com hiperdiploidia (>50 cromossomos) e presença do rearranjo gênico TEL-AML1 que são fatores de prognóstico favorável nas LLA em crianças
- As LLA pré-B, em um terço dos casos, têm se associado com a t(1;19)(q23;p13) e a fusão gênica E2A-PBX1, que se associa a mau prognóstico. Esta anormalidade molecular se correlaciona com o fenótipo CD19+ CD10+ CD34- mCit +.
- A expressão de antígenos mielóides é um fator de mau prognóstico em LLAs de adultos, mas não em crianças. Apresenta uma associação com a presença da t(9;22)(q34;q11) que, quando presente, determina mau prognóstico.
- Nas LLA-T, a expressão de CD10 ocorre em 30 a 40% dos casos e associa-se a melhor prognóstico quando comparado aos casos CD10-, ainda com melhor resposta à prednisona.
- As LLA-T com CD1a +, representam um subgrupo distinto com melhor evolução e uma melhor resposta ao corticosteróide.

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

- LMA mínimamente diferenciada: expressam um ou mais antígenos pan-mielóides CD13, CD33, CD117N mas não marcadores linfóides. Frequentemente expressam CD34, CD38 e HLA-DR. Em geral, o prognóstico é desfavorável.
- Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) apresenta expressão intensa de CD33 e CD13 variável. Em geral, o HLA-DR e CD34 são negativos e quando positivos, estão

Artigo de conclusão de curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de Sangue (maio de 2007 - junho de 2008).

Endereço para correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050-130, São José do Rio Preto,SP
e-mail: a.c.t.@terra.com.br

presentes somente em parte da população leucêmica; o CD15 é, em geral, fracamente positivo ou então negativo. A LPA variante microgranular, além do HLA-DR e CD34 negativos, expressam CD2; o CD56 também pode ser positivo em alguns casos.

- LMA com t(8;21)(q22;q22): LMA com maturação, expressa, além dos antígenos mielóides CD13, CD33, e MPO, o marcador linfóide B CD19 e de CD34+ e CD56+, indicativo de prognóstico mais desfavorável. Via de regra, entretanto, esse leucemia está associado a prognóstico favorável.

- LMA com inv(16)(p13;q22), LMA mielomonocítica variante eosinofílica que, além dos marcadores mielomonocíticos habituais CD13+, CD33+, MPO +, CD14+, CD4+, CD11b+, CD11c+, CD64+ expressa frequentemente CD2 e evolui favoravelmente com o tratamento.

Entretanto, é importante ressaltar que estes fenótipos não são suficientemente específicos para que tenham um valor diagnóstico definitivo para estas subclasses, sendo frequentemente necessária a investigação de anormalidades moleculares quando possível.

Tabela 3. Imunofenotipagem das Doenças Linfoproliferativas Crônicas B

DLPC-B	Ig sup	CD19	CD20/CD22	CD23	CD5	CD11c	FMC7	CD25	CD10	CD79b
LLC	Fraco	+	Fraco	+	+	Fraco	-	-/+	-	-
LP	+	+	+	-	-/+	-	+	-/+	-	+
HCL	+	+	+	-/+	-	+	+	++	+/-	+
LM	+	+	+	-	+	-/+	+	-/+		+
LZM	+	+	+	-	+	-/+	+	-/+	-	+
LF	+	+	+	-/+	-	-	+	-/+	+	+

LLC- Leucemia Linfóide Crônica

LF -Linfoma Folicular

LZM- Linfoma B de zona marginal Ig sup – Imunoglobulina de superfície

LM- Linfoma da Zona do Manto

HCL – Hairy Cell Leukemia

LP- Leucemia Prolinfocítica

Tabela 4. Perfil Imunofenotípico das Doenças Linfoproliferativas Crônicas T leucemizadas

DLPC-T	CD3	CD2	CD4	CD5	CD7	CD8	CD16	CD25	CD56	CD57
LGL-T	+	+	-	+	+/-	+	+	NR	-/+	+
LGL-NK	-	+	-	+	-	-	+	NR	+	-
LP-T	+	+	+	+	+	-	-	-/+	-	-
ATLL	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
SS/MF	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Artigo de conclusão de curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de Sangue (maio de 2007 - junho de 2008).

Endereço para correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050-130, São José do Rio Preto, SP
e-mail: a.c.t.@terra.com.br

DLPC-T Doença Linfoproliferativa Crônica T ; LGL-T Linfocitose de Células Grandes Granulares –T; LGL-NK Leucemia de Células Grandes Granulares –Natural Killer; LP-T Leucemia Pró-linfocítica T; ATLL Leucemia Linfoma T do adulto; SS/MF Síndrome de Sézary/Micose Fungoide

LEUCEMIA DE CÉLULAS CABELULAS (HCL)

A origem da leucemia de células cabeludas (HCL) foi controversa por vários anos. A publicação por Bouroncle et al., em 1958, com o título “*Reticuloendoteliose Leucêmica*”(1) afirmava ser uma neoplasia de células reticulares. O debate sobre a origem dessas células mononucleares ser do sistema fagocítico apresentou posições contrárias pela sua fraca capacidade fagocítica e pela presença de receptores Fc da molécula de imunoglobulina na superfície celular. A demonstração de que a imunoglobulina é restrita à cadeia leve indica que a HCL origina-se de uma célula B maligna. É uma doença rara, com incidência de 2% entre as leucemias, observadas em adultos, geralmente homens (relação 5:1), com idade média de 55 anos. O quadro de pancitopenia com esplenomegalia associado a uma punção aspirativa seca da medula óssea, decorrente da fibrose reticulínica, sugere o diagnóstico de HCL(2-4).

As células características são mononucleares com citoplasma abundante, com projeções finas e alongadas pela superfície celular, núcleos redondos ou ovais, observadas no sangue periférico, infiltrando a medula óssea e na polpa vermelha do baço (figura 4). e nos histogramas CD45 x SSC a região dessas células é tipicamente ao lado da região de linfócitos maduros (figura 5). Ao trabalhar em histogramas sequenciais discriminam-se as células pan-B (CD19, CD20), o que auxilia a precisão da análise (figura 6). A análise de histogramas sequenciais é indicada principalmente nos aspirados de medula óssea pela população de linhagem linfóide medular ser composta de toda a ontogênese da célula B.

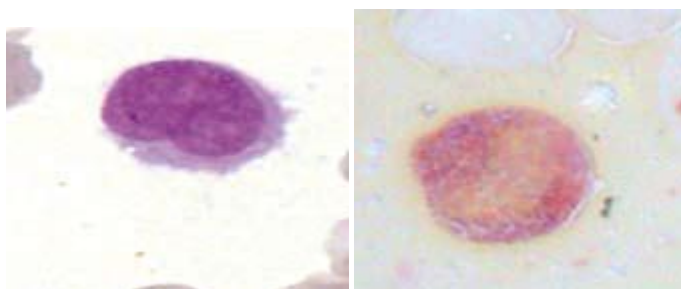


Figure 5. A - Células cabeludas no sangue periférico **B** - Fosfatase ácida inibida por tartarato **A B**

As células tumorais apresentam imunoglobulinas de superfície IgM, IgD, IgG ou IgA e expressam antígenos de linhagem linfóide B (CD19, CD20, CD22, CD79b).

São tipicamente CD5, CD10 e CD23 negativas e expressam fortemente o CD25, CD11c e CD103(5,6). O FMC-7 apresenta expressão variável. A HCL apresenta expressão intensa do CD45, semelhante a outras leucemias linfóides B maduras. Nos histogramas de FSC (*Forward Scatter* – volume) x SSC (*Side Scatter* – granularidade) e nos

Artigo de conclusão de curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de Sangue (maio de 2007 - junho de 2008).

Endereço para correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050-130, São José do Rio Preto, SP
e-mail: a.c.t.@terra.com.br

histogramas CD45 x SSC a região dessas células é tipicamente ao lado da região de linfócitos maduros (figura 2). Ao trabalhar em histogramas seqüenciais discriminam-se as células pan-B (CD19, CD20), o que auxilia a precisão da análise (figura 5). A análise de histogramas seqüenciais é indicada principalmente nos aspirados de medula óssea pela população de linhagem linfóide medular ser composta de toda a ontogênese da célula B.

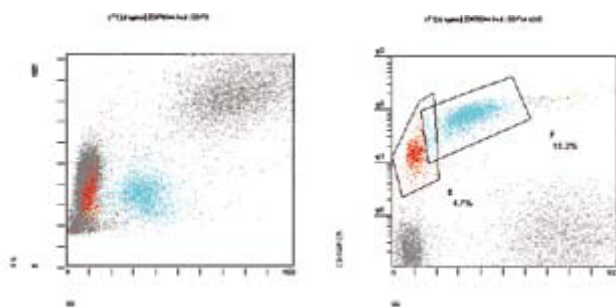


Figura 6. Histogramas com análise de células linfóides B/células cabeludas na medula óssea

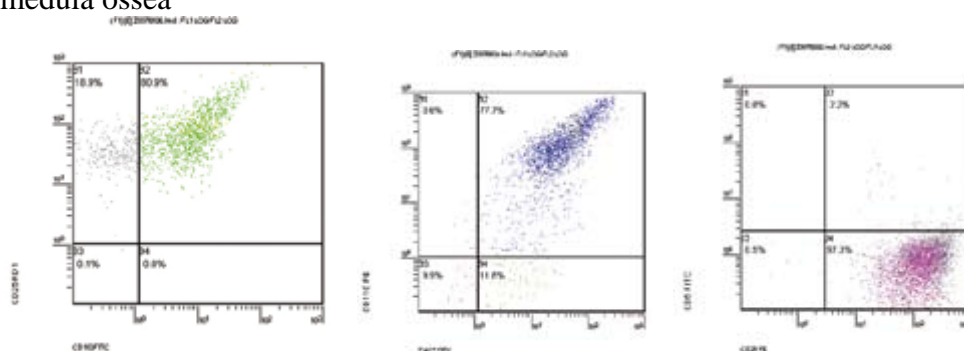


Figura 7. Histogramas característicos de pacientes com leucemia de células Cabeludas

A baixa especificidade isoladamente dos anticorpos monoclonais CD11c, CD22, CD25 e FMC-7 no diagnóstico de HCL pode ser contornada com a coexpressão desses marcadores, e a forte intensidade de expressão do CD20, CD103 e do próprio CD19, CD20 e do CD22 e da morfologia característica e citoquímica de fosfatase ácida tartarato resistente (figura 1). O TRAP está presente na maioria dos casos, sendo muito sensível, mas pouco específico(7). Ocorre na virose por Epstein Barr, na síndrome de Sézary, na leucemia pró-linfocítica B e na leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico difuso de pequenas células. A composição de isotipos de imunoglobulinas de cadeia pesada IgG, IgA, IgM e IgD pode ser explicada por estudos funcionais que sugerem que a HCL representa uma leucemia pós-proliferativa, nos últimos estágios da ontogênese das células B normais. A forte expressão antigênica do CD11c e do CD103 é específica de HCL. O CD25 apresenta intensidade fraca a moderada.

A HCL variante (HCLv) expressa os antígenos pan-B e imunoglobulina de superfície, assim como o CD11c e o FMC7 (fraca intensidade) não expressam o CD25 e o CD23.

Artigo de conclusão de curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de Sangue (maio de 2007 - junho de 2008).

Endereço para correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050-130, São José do Rio Preto,SP
e-mail: a.c.t.@terra.com.br

Dos antígenos característicos de HCL, quase sempre um deles está ausente: o CD11c, ou o CD25 ou o CD103. A diferenciação com HCL é também pela linfocitose, a célula contém nucléolo evidente e ausência de neutropenia. Em relação ao TRAP, ocasionalmente é positivo, porém não ocorre uma forte marcação.

A diferenciação com o linfoma esplênico da zona marginal é possível pela fraca intensidade de expressão do CD103 e dos outros marcadores imunológicos característicos de HCL. O linfoma esplênico de célulasvilosas (SLVL) apresenta esplenomegalia maciça com linfocitose e ausência de fibrose reticulínica na medula óssea. Os linfócitos apresentam projeções citoplasmáticas semelhantes às da HCL, mas apenas em um a dois sítios da superfície celular. Os anticorpos CD19, CD20 e CD22 e a imunoglobulina de superfície apresentam-se de moderada a forte intensidade, a célula pode expressar o FMC-7 e o CD11c, mas não se observa a co-expressão dos três antígenos característicos de HCL: CD11c, CD25 e CD103 (tabela 1).

Tabela 5 - Imunotipagem nas doenças linfoproliferativas B
MoAb B-LL/SLL B – PLL HCL HCLv SLVL/SMZL

	B-LL/SLL	B – PLL	HCL	HCLv	SLVL/SMZL
CD5	(++)	(+)	(-)	(+/-)	(+/-)
CD10	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)
CD11c	(+/-)	(-)	(++)	(+/-)	(+/-) até (++)
CD23	(++)	(-)	(-)	(-)	(+/-)
CD25	(+/-)	(+/-)	(+)	(+/-)	(+/-)
CD103			(++)	(+/-)	(+/-)
FMC-7	(+/-)	(++)	(++)	(-)	(+/-) até (++)
Ig H	IgM/D	IgM	IgG/A/M		
Ig sup.	(+/-)	(++)	(++)	(++)	(++)
TRAP			(++)	(+/-)	

MoAb = anticorpos monoclonais

B-LL = leucemia linfocítica B; SLL: linfoma linfocítico de células pequenas

B-PLL = leucemia prolinfocítica B; HCL: leucemia de células cabeludas

HCLv = leucemia de células cabeludas variante; SLVL: linfoma esplênico de células vilosas

SMZL = linfoma esplênico da zona marginal

TRAP = fosfatase ácida tartarato resistente

Expressão antigênica: (-):negativa; (+/-): fraca; (+): moderada; (++) : forte

LEUCEMIAS AGUDAS BI - LINHAGEM

Alguns casos de leucemias apresentam duas populações distintas de blastos, expressando marcadores de diferentes linhagens.

LEUCEMIA BIDIFERENCIADA

Em 2 a 3 % dos casos de leucemias agudas em adultos e em 1% em crianças, mesmo com o emprego de um amplo painel de marcadores, não é possível determinar a linhagem celular específica, sendo então denominados Leucemias Indiferenciadas. Estes casos não expressam antígenos linhagem-específicos como o CD79a cit (associados à linhagem B, excetuando-se alguns casos de LLA-T), CD22 cit, CD3 e MPO. Em geral, as células blásticas são CD34+, HLA-DR+, CD38+ e CD7+.

Artigo de conclusão de curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de Sangue (maio de 2007 - junho de 2008).

Endereço para correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050-130, São José do Rio Preto,SP
e-mail: a.c.t.@terra.com.br

LEUCEMIA BIFENOTÍPICA

A leucemia bifenotípica ocorre em 4 a 6% das leucemias agudas, situações em que há coexpressão de marcadores mielóides e linfóides B ou T, ou ainda, a concomitância de marcadores linfóides B e T.

Alguns marcadores estão associados a determinadas linhagens celulares, mas não são específicos das mesmas sendo que a sua presença não determina uma forma bifenotípica, mas sim aberrante de um marcador. Adotando-se o sistema de *score* proposto pela *European Group for the Immunologic Classification of Leukaemia (EGIL)*, é necessária a soma de 2,5 pontos ou mais para se assinalar cada linhagem celular. Alcançando-se essa pontuação em duas linhagens caracteriza-se leucemia bifenotípica.

Tabela 6. Sistema de *score* proposto pela European Group for the Immunologic Classification of Leukaemia (EGIL).

Score	linfoide B	linfoide T	mielóide
2	CD79a cit IgM cit CD22 cit	CD3 (sup/cit) anti-TCR	MPO
1	CD19 CD20 CD10	CD2 CD5 CD8 CD10	CD117 CD13 CD33 CD65
0,5	TdT CD24	TdT CD7 CD1a	CD14 CD15 CD64

* CD79 a pode ser expresso em alguns casos de LLA T

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. Também ocupa um importante papel no diagnóstico das doenças linfoproliferativas crônicas e no monitoramento de doença residual mínima. 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.

Artigo de conclusão de curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de Sangue (maio de 2007 - junho de 2008).

Endereço para correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050-130, São José do Rio Preto,SP
e-mail: a.c.t.@terra.com.br

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Lorenze.F.Therezinha, manual de hematologia- Propêndica e clínica, 3° edição – 2003
<http://www.labimuno.org.br/aulas/CITOMETRIA%20DE%20FLUXO%20Aula%20pr%C3%A1tica.ppt>.
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151684842007000200007&lng=e&nrm=iso&tlng=e
http://www.einstein.br/REVISTA/arquivos/PDF/438-Einstein5-2_Online_AO438_pg123-128.pdf.
<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v38n1/a06v38n1.pdf>.
http://www.inca.gov.br/rbc/n_50/v03/pdf/ARTIGO1.pdf.
<http://www.fleury.com.br/Medicos/SaudeEmDia/ManualHematologia/pages/ImunofenotipagemdasNeoplasiasHematol%C3%B3gicas.aspx>
http://www.diagnosticosdaamerica.com.br/exames/imunofenotipagem_leucocitos.shtml
<http://www.ameo.org.br/interna2.php?id=25>
http://www.diagnosticosdaamerica.com.br/exames/imunofenotipagem_leucemias.shtml
<http://pegasus.fmrp.usp.br/projeto/artigos/artigo160.pdf>
<http://www.grapo.hpg.ig.com.br/tipos/lc/04.htm>
<http://www.progenetica.com.br/manualexames.pdf>
http://www.biagnostica.pt/pdfs/imunofenotipagem_leucocitaria_resumo_programas.pdf
http://www.oncopediatria.org.br/portal/hotsites/congressoX/view.jsp?valor=AO_xml/OP-AO-36&estilo=apres

Artigo de conclusão de curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de Sangue (maio de 2007 - junho de 2008).

Endereço para correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050-130, São José do Rio Preto,SP
e-mail: a.c.t.@terra.com.br