

**SUELEN STEPHANE FERREIRA DE OLIVEIRA**

**CONHECENDO OS IMUNOFENÓTIPOS DAS LEUCEMIAS**

**São Jose do Rio Preto- SP 2017**

**SUELEN STEPHANE FERREIRA DE OLIVEIRA**

**CONHECENDO OS IMUNOFENÓTIPOS DAS LEUCEMIAS**

Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de pós-graduação em Hematologia clínica, laboratorial e banco de sangue apresentado à Academia de Ciências e Tecnologia.

**São Jose do Rio Preto - SP 2017**

## **“CONHECENDO OS IMUNOFENÓTIPOS DAS LEUCEMIAS”**

## **“GETTING TO KNOW THE IMMUNOPHENOTYPES OF LEUKEMIA”.**

Suelen Stephane F. de Oliveira

\*Endereço de Correspondência: AC&T Rua Bonfá Natale, 1860, CEP 15050130, São José do Rio Preto, SP e-mail: a.c.t.@terra.com.br

1. Acadêmico do curso de pós graduação Lato Sensu em Hematologia Clínica, laboratorial e Banco de Sangue – Academia de Ciências e Tecnologia (São José do Rio Preto).

O autor do presente estudo declara que não possuem nenhum potencial conflito de interesse em relação ao presente artigo.

Trabalho desenvolvido na área de Análises Clínicas

## RESUMO

A hematopoese consiste no processo de formação, maturação e diferenciação de células sanguíneas, esse processo se inicia na medula óssea pelas células pluripotentes que residem lá. A medula óssea possui um microambiente que possibilita o crescimento e a diferenciação das células, ela regula a hematopoese por meio da secreção de fatores solúveis, interações célula-célula e interação célula-matriz extracelular e/ou citoesqueleto, essas substâncias servem de estímulos para a diferenciação celular. Durante o processo de diferenciação, as células vão adquirindo características próprias e surgem os antígenos de membranas/citoplasma que é específico para cada linhagem celular. Uma série de reuniões internacionais *“Internacional Leukocyte Differentiation Workshops”* foram realizadas a fim de estabelecer uma nomenclatura unificada para esses antígenos, podendo dessa forma estabelecer padrões antigênicos para as diferentes linhagens hematopoéticas. Os antígenos de membrana foram classificados conforme seu peso molecular e especificidade antigênica sendo então denominados *Clusters of Differentiation-CDs*, ou grupo de diferenciação. O conhecimento desses CD's foi possível através da técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo. Essa técnica permite conhecer os imunofenótipos das linhagens hematopoéticas e num processo leucêmico, permite classificar as neoplasias. A identificação do clone leucêmico de acordo com linhagem celular foi um grande avanço para o tratamento e cura das leucemias.

Palavras Chave: Leucemias, Imunofenótipos, Imunofenotipagem

## **ABSTRACT**

Hematopoiesis consists of the process of formation, maturation and differentiation of blood cells, this process begins in the bone marrow by the pluripotent cells that reside there. Bone marrow has a microenvironment that enables cell growth and differentiation, regulates hematopoiesis by secreting soluble factors, cell-cell interactions, and extracellular cell-matrix and / or cytoskeletal interaction. These substances serve as stimuli for differentiation. During the differentiation process, the cells acquire their own characteristics and arise the membrane / cytoplasmic antigens that is specific to each cell line. A series of international meetings "International Leukocyte Differentiation Workshops" were held to establish a unified nomenclature for these antigens, thus establishing antigenic patterns for the different hematopoietic lineages. Membrane antigens were classified according to their molecular weight and antigenic specificity and were then called Clusters of Differentiation-CDs, or differentiation group. The knowledge of these CD's was possible through the technique of immunophenotyping by flow cytometry. This technique allows to know the immunophenotypes of the haemotopoietic lines and in a leukemic process, allows to classify the neoplasias. Identification of the leukemic clone according to cell line was a major advance in the treatment and cure of leukemias.

## **Key Word's**

Leukemias, Immunophenotypes, Immunophenotyping

## INTRODUÇÃO

### HEMATOPOESE E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Para que possamos entender a leucemogênese, é necessário compreender o processo de hematopoese. O sistema hematopoético se origina da 3ª camada germinativa do embrião (ou mesoderma), a partir da 7ª semana surgem as ilhotas sanguíneas e na 8ª semana de vida do embrião inicia a circulação sanguínea. O fígado fetal torna-se o principal sítio de hematopoese até 20ª semana da gestação, em seguida essa função assumida pela medula óssea (MO) de praticamente todos os ossos do feto. Em seguida a hematopoese se inicia na medula óssea no interior dos ossos longos. Da 32ª semana até o nascimento, todo espaço medular é ocupado por tecido hematopoético, neste período a medula óssea é bastante representativa nos ossos chatos e nas epífises dos ossos longos, onde estão presentes todas as células hematopoéticas inclusive as pluripotentes <sup>8, 12</sup>.

Quando as células sanguíneas atingem o amadurecimento, elas atravessam as paredes delgadas dos sinusóides medulares e são lançadas na corrente sanguínea. A célula pluripotente responsável pela formação de todas as células sanguíneas divide-se guardando sempre a característica de pluripotencialidade. As células filhas evoluem num sentido mais avançado, são ainda indiferenciadas, com capacidade de multiplicação, mas já orientada para uma única linhagem celular. A seguir essas células atingem um grau maior de diferenciação que as torna unipotente, capazes de dar origem a uma apenas uma determinada série sanguínea <sup>8</sup>.

Durante o processo de diferenciação, primeiro ocorre à separação entre a linhagem linfóide e mielóide, a seguir a separação entre a linhagem granulocítica, monocítica e eritróide-megacariocítica. As células diferenciadas são identificadas facilmente através de seus aspectos morfológicos, estas constituem a maior parte dos elementos figurados da medula óssea e são capazes de apenas algumas divisões celulares <sup>8,12</sup>. Entre as células pluripotentes medulares e as células maduras/diferenciadas que entram no sangue há várias fases intermediária, sendo elas representadas pela figura 1.

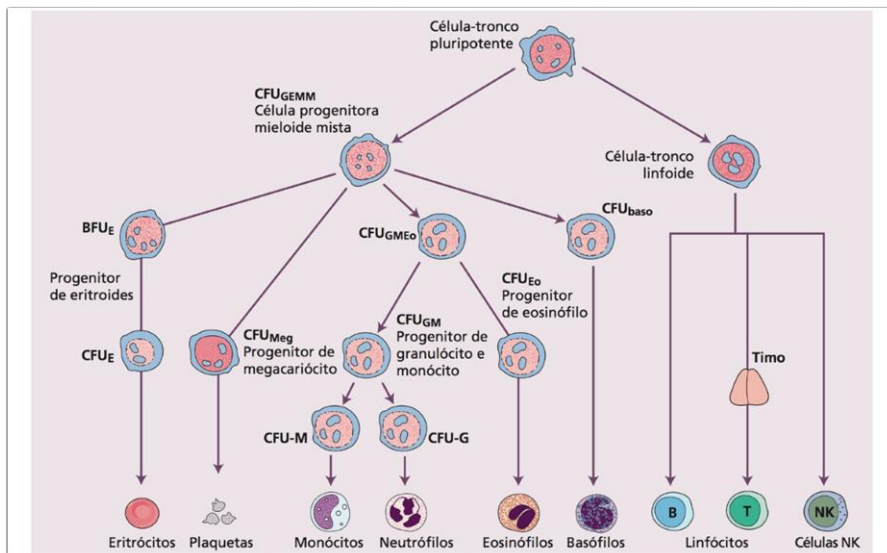


Figura01: Diferenciação hematopoética, fonte HOFMAN, 2013

As estruturas anatômicas hematopoéticas da medula óssea que colaboram para a diferenciação celular podem ser divididas em estroma e células hematopoéticas. O estroma é constituído por fibroblastos, adipócitos, macrófagos, linfócitos e células endoteliais dos sinusóides medulares, e um componente acelular, representado pela matriz extracelular. O estroma constitui o microambiente que possibilita o crescimento e a diferenciação das células hematopoéticas, regula a hematopoese por meio da secreção de fatores solúveis (G-CSF, GM-CSF, M-CSF, Interleucinas, SCF, dentre outros) interações célula-célula (via moléculas de adesão específicas como integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 2$ , e selectinas) e célula-matriz extracelular e/ou citoesqueleto (compostos por proteínas, glicoproteínas e proteoglicanas), essas substâncias servem de estímulos para a diferenciação celular<sup>6</sup>.

Durante o processo de diferenciação, as células vão adquirindo características próprias e surgem os antígenos de membranas/citoplasma que é específico para cada linhagem celular. Uma série de reuniões internacionais “*Internacional Leukocyte Differentiation Workshops*” foram realizadas a fim de estabelecer uma nomenclatura unificada para esses antígenos, podendo dessa forma estabelecer padrões antigênicos para as diferentes linhagens hematopoéticas. Os antígenos de membrana foram classificados conforme seu peso molecular e especificidade antigênica sendo então denominados *Clusters of Differentiation-CDs*, ou grupo de diferenciação<sup>11</sup>.

A tabela 01 representa os principais antígenos presente nas células hematopoéticas e suas respectivas funções.

Anticorpo	Localização	Função
CD1a	Células T tímicas, subgrupo de células B, células de Langerhans	Glicoproteína 48kD que se liga a $\beta$ 2-microglobulina
CD2	Todas as células T, maioria das NK	ligante de LFA-3
CD3	Células T tímicas e maduras	Estrutura do TCR, transdução de sinal
CD4	Células T auxiliares, monócitos, macrófagos	Co-receptor de MHC classe II, receptor do HIV
CD5	Células T maduras e tímicas, subgrupo de células B (Células B1)	Ativação de células T, ligante de CD72
CD7	Todas as células T, células NK	Ativação de células T e NK
CD8	Subgrupo de células T tímicas, T supressora/citotóxica, subgrupo de NK.	Co-receptor do MHC de classe I
CD10	Precursor B e Células B do centro germinativo, PMN	Endopeptidase neutra
CD13	Células Mielóides	Amino-peptidase N
CD14	Monócitos maduros e precursores	
CD15	Células mielocíticas e monocíticas	Antígeno Lewis-X, adesão celular e fagocitose
CD16	Células Natural Killer, Granulócitos	Receptor para cadeia pesada das Imunoglobulinas
CD19	Células B precursoras e maduras	Ativação de células B
CD20	Células B precursores tardios e maduros	Canal de $Ca^{++}$ . Ativação de células B
CD22	Células B precursoras e maduras	Molécula de adesão celular
CD33	Células mielóides e monocíticas	Molécula de adesão do ácido siálico
CD34	Células Progenitoras	?
CD38	Células linfóides progenitoras, Células Plasmáticas, Células T ativadas	Ativação leucocitária
CD41	Megacariócitos e plaquetas	gPIIb/IIIa, receptor para fibrinogênio/fibronectina
CD45	Pan-hematopoético	Transdução de sinal: tirosina-fosfatase
CD56	Células NK e células T citotóxicas	Molécula de adesão celular
CD61	Megacariócitos e plaquetas	GPIIb/IIIa, molécula de adesão celular com CD41, receptor de fibrinogênio
CD79a	Células B precursoras	Mb-1; transdução de sinal da Ig de superfície para o citoplasma
CD117	Células mielóides precursoras	receptor de c-kit
HLA-DR	Células B, monócitos, progenitores mielóides e células T ativadas	Antígeno de apresentação, MHC classe II
IgM *	Células pré-B, Linf B naive	Reconhecimento da cadeia pesada da imunoglobulina M
TdT	Células linfóides imaturas	Rearranjo de Igs e TCR

Fonte: (Martins SLR *et al.*, 2000; Silva GC *et al.*, 2006).

Tabela 01: Principais antígenos de diferenciação celular usados na identificação celular em processos leucêmicos e hematopoese normal

A identificação desses CD's foi possível através da técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo. Essa técnica permite conhecer os imunofenótipos das leucemias, logo é possível classificá-las de acordo com sua linhagem, esse assunto será discutido mais adiante.

## DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Para que possamos conhecer os imunofenótipos das leucemias é necessário entendermos o processo de diferenciação celular.



## Diferenciação de células Linfóides

Os tecidos linfóides podem ser primários (generativos) ou secundários (periféricos). Os primários são os tecidos onde os linfócitos expressam, pela primeira vez, os receptores antigênicos e onde adquirem maturidade fenotípica e funcional, são eles a Medula Óssea (MO) e o timo. A MO, além de originar todos os linfócitos, é o local de maturação das células B, enquanto a diferenciação de linfócitos T ocorre no timo. Os órgãos linfóides secundários são: linfonodos, baço e tecido linfóide associado às mucosas e à pele. Nesses órgãos ocorrem as respostas imunes aos antígenos<sup>12</sup>.

### *Diferenciação de Linfócitos B*

Os linfócitos B são precursores de células secretoras de imunoglobulinas. A célula mais precoce da linhagem linfóide B em humanos, aparece no fígado fetal no 2º trimestre do desenvolvimento intra-uterino. No 3º trimestre e na 1ª semana de vida as células B também são produzidas no baço e, após o nascimento a MO é o principal local de geração das células de linhagem B, condição que se perpetua durante toda a vida. O ciclo do linfócito B pode ser convencionalmente dividido em desenvolvimento da célula B na MO e diferenciação e maturação nos órgãos linfóides periféricos. Estes estágios podem ser diferenciados pela expressão de marcadores celulares assim como pela fase de rearranjo das cadeias de imunoglobulinas (Ig)<sup>12</sup>.

Os precursores linfóides B e T são diferenciados por marcadores de linhagem específicos e não pela morfologia. No caso do precursor B essa célula expressa **CD34**. O primeiro rearranjo que ocorre na célula B precursora, envolve a sequência do gene que codificará a cadeia pesada da imunoglobulina (IgH) e ocorre em células pró-B expressando **CD43**. Ainda nesta fase, a enzima **TdT** (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) envolvida no processo de recombinação somática de toda a linhagem linfóide, é expressa junto com duas proteínas **RAG 1** e **RAG 2**. Um dos marcadores mais precoces da linhagem B é o **CD19**, que é uma molécula presente em todo o desenvolvimento da linhagem B, exceto nos plasmócitos. Outros antígenos que definem o estágio de diferenciação das células B e seus progenitores, são o **CD22**, **CD10** e **CD79a** e **cadeia M**. As células pró-B são definidas pela expressão do **HLA-DR**, **CD19** e **rearranjo do gene IgH**. Após o aparecimento do **CD19**, essas células podem expressar o **CD10 (CALLA)**<sup>12</sup>.

O antígeno **CD10** é uma glicoproteína conhecida previamente como a enzima endopeptidase neutra relacionada à proliferação e diferenciação de diversos tecidos, é um antígeno de superfície, originalmente conhecido como cALLA (common acute lymphoblastic leukemia antigen). Esta molécula é especializada em clivagens de aminoácidos formadores de peptídeos, clivando

referencialmente aminoácidos neutros. A sua expressão está restrita aos precursores linfóides na MO. Foi um dos primeiros marcadores avaliados para a identificação de células leucêmicas em crianças com LLA. Nas LLAs-B atua como marcador para caracterização das etapas maturativas, estando presente em estágios bem imaturos dos blastos de célula B. Nas LLAs-T, o CD10 está presente em aproximadamente 30,0 % dos casos, sendo considerado um marcador imunofenotípico aberrante <sup>9</sup>.

O próximo estágio de diferenciação é o de célula pré-B. Nesse estágio aparece a expressão de **cadeia M intracitoplasmática** sem cadeia leve, além dos antígenos **CD19 e CD22** <sup>12</sup>.

A expressão de **IgM** na superfície da célula B caracteriza o estágio de linfócito B imaturo. A partir desse estágio essas células sofrem dois caminhos: apoptose na MO ou migração para os órgãos linfóides periféricos onde amadurecem e se diferenciam em células produtoras de imunoglobulinas. Essas células podem perder o **CD19** e expressam os antígenos **CD38 e CD138** <sup>12</sup>.

A coexpressão de **IgM** e **IgD** é acompanhada pela capacidade de recircular e a aquisição da competência funcional, e é por isso que as células B IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> são também denominadas células B maduras.

Os plasmócitos tem um aparelho secretor bem desenvolvido, tem a capacidade de secretar grandes quantidades de imunoglobulinas solúveis no soro e nos tecidos. Esse tipo celular apresenta a expressão de **CD38, CD11c**, imunoglobulina intracitoplasmática (**clg**) e **CD138** <sup>12</sup>.

O resumo dos diferentes tipos de antígenos em cada estágio da maturação do Linfócito B está representado na tabela abaixo.

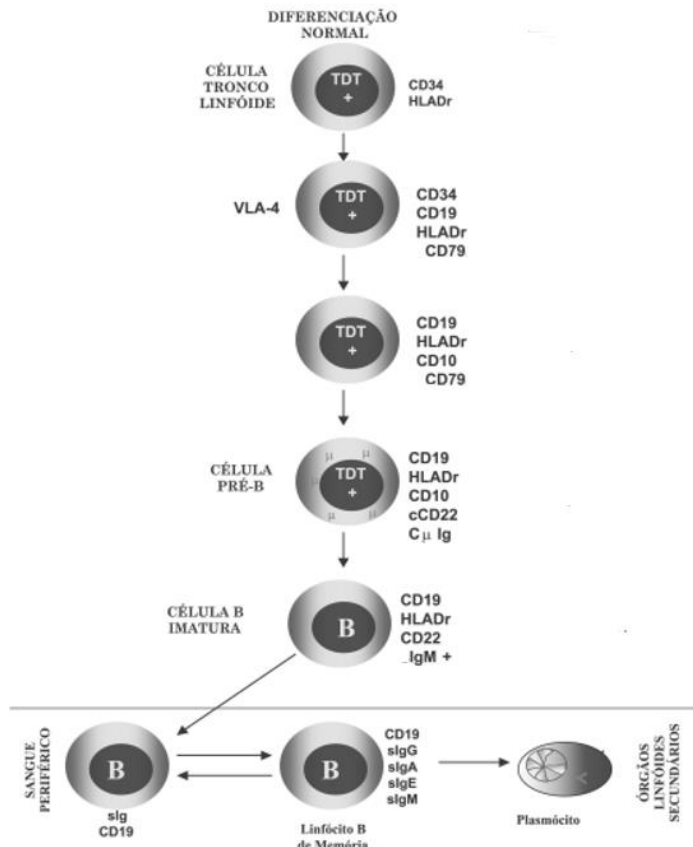


Figura 02: Diferenciação de Linfócitos B

### Diferenciação de Linfócitos T

Durante a embriogênese e no período pós-natal, precursores T da MO migram para o timo onde se diferenciam em células T imunocompetentes que são liberadas para o sangue periférico e tecidos linfóides. Ao contrário dos linfócitos B, as células precursoras que expressam **CD34/CD7/cCD3+**, deixam a MO e entram no timo, onde continuam com o seu programa de diferenciação que inclui o rearranjo dos genes responsáveis pelos receptores de **células T (TCR)** e a expressão das demais moléculas de superfície. Esses rearranjos se processam por ação das enzimas recombinases (RAGs) e, posteriormente, ocorre a ação da enzima **TdT** que insere um número variável de novas bases no DNA das regiões que sofrem rearranjo, assim, elas promovem um aumento de repertório de células T <sup>9</sup>.

No timo, as células precursoras (**CD7+**) sofrem um processo de maturação que é extremamente complexo e resulta na formação de um variedade de células T funcionais. Os linfócitos T adquirem, mantêm e/ou perdem marcadores como o CD2, CD3, CD1a, CD5, CD4 e CD8, permitindo a caracterização de diferentes estágios maturativos <sup>9</sup>.

O precursor **CD34+/CD7+**, proveniente da MO, migra para a camada subcapsular do córtex tímico e rapidamente expressa os marcadores **CD2** e **CD5**, este precursor é chamado pró-T. Ele pode se diferenciar em duas linhagens de células T diferentes. A maioria (95%) se diferencia em células pré-T corticais que expressam **CD1a**, **CD4**, **CD8**, **proteínas citoplasmáticas TCRab** e **CD3**. Na camada medular do timo, esses timócitos (pré T medulares) formam duas subpopulações: a maioria de células **CD4+/CD8-** e a minoria de **CD4-/CD8+**, ambas já expressando **CD3/TCRab** <sup>9</sup>.

Alternativamente, o precursor pró-T (**CD34+/CD7+/CD2+/CD5+**) pode se diferenciar em células pré-T **CD4-/CD8-(5%)** que expressam inicialmente **TCRgd citoplasmático** e, posteriormente, **CD3** e **TCRgd** na membrana. A seguir, estes três tipos de timócitos maduros (**TCRab CD4+**, **TCRab CD8+**, e **TCRgd**) migram para a periferia. Dos linfócitos circulantes, 95% expressam **TCRab** e, apenas 5% **TCRgd** (Figura abaixo).

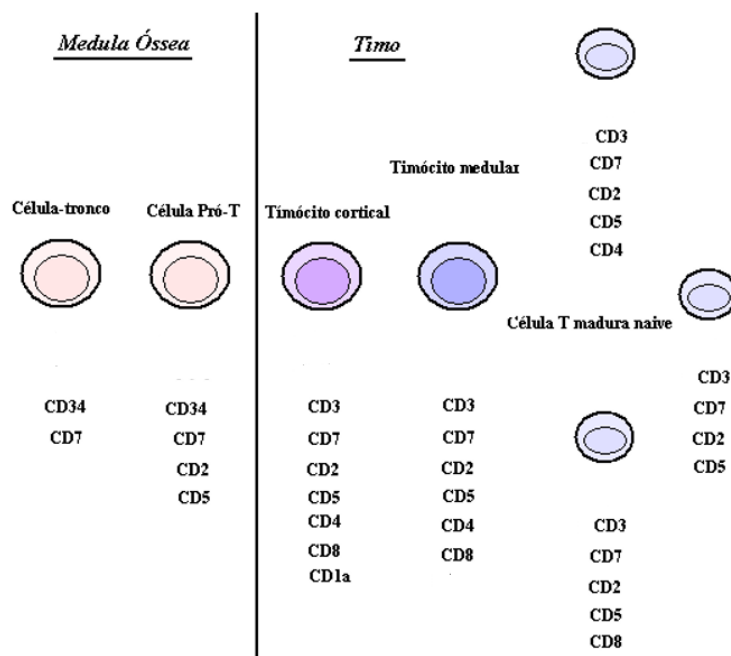


Figura 03: Diferenciação de Linfócitos T

A passagem dos precursores T pelo timo tem duas funções: a produção de células T maduras e a seleção de clones não auto-reativos. Ambas dependem da participação das células epiteliais, dendríticas e macrófagos. Os linfócitos T que emigram do timo e colonizam os órgãos linfoides secundários são chamados de células virgens (*naive*), pois ainda não foram ativadas por contato com antígenos. Após o contato com antígenos, os linfócitos T participam da resposta imunológica como linfócitos T-auxiliares (**CD4+**) ou T-citotóxicos (**CD8+**) e, terminada a resposta, a maioria morre, mas alguns sobrevivem e constituem os linfócitos de memória, que têm vida longa e são armazenados ao longo do tempo <sup>9</sup>.

A sequência de maturação das células T envolve a expressão progressiva de antígenos de diferenciação que estão representados esquematicamente na figura abaixo:

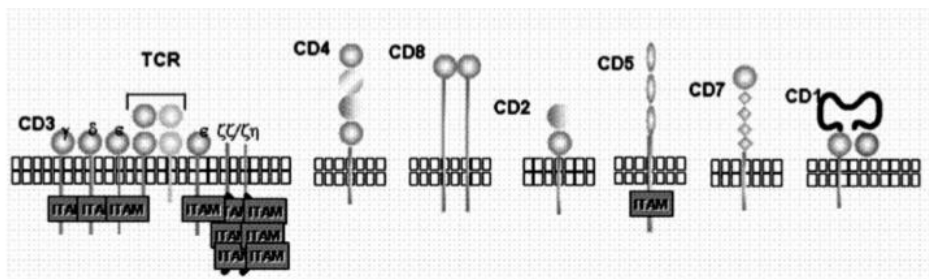


Figura 04: Sequência de Maturação de Linfócitos T

A estrutura mais específica é o conjunto de moléculas formado pelo receptor de célula T ou TCR é o **CD3**. Este último é um complexo formado por quatro cadeias, essas são responsáveis por realizar transdução de sinal na ativação do TCR <sup>9</sup>.

O **CD4** é uma molécula que interage com o MHC de classe II e que está presente na superfície de células T-auxiliares. O **CD8** interage com MHC de classe I e está presente em células T-citotóxicas. As glicoproteínas de diferenciação que são importantes na definição do estágio de maturação da célula T são o **cCD3**, o **CD1a**, o **CD3** de membrana, e o **TCR**, enquanto as moléculas **CD2**, **CD5** e **CD7** são consideradas antígenos pan-T, pois se mantêm ao longo de toda a diferenciação das células T, tanto nas células auxiliares como nas citotóxicas <sup>9</sup>.

O **CD1a** é uma molécula expressa em células dendríticas, e em linfócitos é restrita ao subgrupo de timócitos corticais, sua estrutura assemelha-se ao complexo MHC de classe I, e sua função nas células apresentadoras de antígeno (APCs) está relacionada à apresentação de antígenos lipídicos, é um marcador de importância nas LLAs-T, é utilizado na classificação maturativa das células T e representa um bom prognóstico em crianças com LLA-T <sup>9, 2</sup>.

O **CD2** pode ser caracterizado como uma molécula de adesão celular que tem como ligante o **CD58** (expresso em APCs). O **CD5**, que não é exclusivo de células T, é um receptor de ação dupla, dando tanto sinais estimulatórios quanto inibitórios, dependendo do tipo de célula (T ou B) e do estágio de desenvolvimento (timócito ou T maduro) no qual ele é expresso. O **CD7** permanece com sua função indeterminada, podendo estar envolvido na regulação da produção de citocinas por células T <sup>9</sup>.

As células *Natural Killer* (NK) consiste em uma subpopulação celular de linfócitos que origina de um precursor linfóide na medula óssea. Apresentam morfologia de um grande linfócito granular e expressam antígenos próprios como o **CD56** e **CD57** além de antígenos relacionados com o **CD16**, e não específicos como o antígeno leucocitário comum ou CD45, o CD38 o CD2 e o CD8 expressando também moléculas de adesão como o CD11a,b,c e o LFA1. Das moléculas largamente utilizadas na identificação de células NK, o **CD16** tem significado funcional, ele representa o receptor para IgG, conferindo a célula NK a capacidade de lisar células alvo revestida de IgG, este fenômeno é conhecido como “citotoxicidade mediado por células dependente de anticorpos”, ou ADCC <sup>2</sup>.

Todo o processo de diferenciação da linhagem linfóide está representado na figura abaixo.

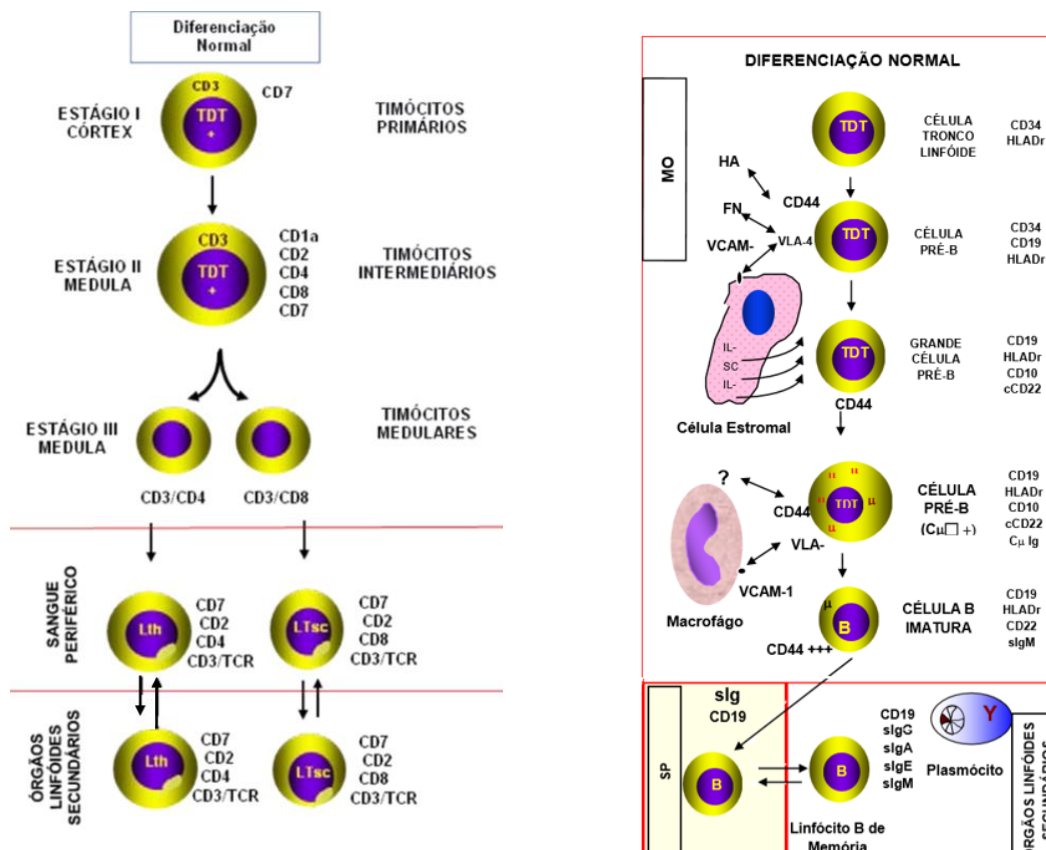


Figura 05: Diferenciação de Linfócitos

## Diferenciação da Linhagem Mielóide

As células pluripotentes hematopoiéticas dão origem às unidades formadoras de colônias: granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos (GFU-GEMM) e as células-pluripotentes linfóides (LSC). Por sua vez, a CFU-GEMM (**CD34+**, **HLADR+**, **CD33+**) origina as células unipotentes direcionadas à eritropoese. A granulopoese e a monopoese surgem através da

unidade formadora de colônia de granulócitos e monócitos (CFU-GM). Os megacariócitos surgem através das unidades formadoras de colônias dos megacariócitos (UFC-Meg). (OLIVEIRA)

A CFU-GM além de preservar a expressão **CD34<sup>+</sup>**, **HLADR<sup>+</sup>**, **CD33<sup>+</sup>**, passa a expressar o **CD13** e **CD15**. O **CD33** é uma glicoproteína com expressão em células progenitoras da linhagem mielóide e cuja expressão tende a desaparecer no mielócito. O **CD13** é o receptor para aminopeptidase-N, é expresso na linhagem mielomonocítica <sup>12</sup>.

O mieloblasto apresenta a expressão **CD34<sup>+</sup>**, **HLADR<sup>+</sup>**, **CD33<sup>+</sup>**, **CD13<sup>+</sup>**, **CD15<sup>+</sup>** e o receptor do c-Kit (**CD117**) e receptor para IgG (**CD32**). Nesta fase as células passam a expressar a **mieloperoxidase**, o mais importante marcador da linhagem granulocítica. No promielócito ocorre perda do HLADR e CD34, a célula passa a apresentar o fenótipo **CD33<sup>+</sup>**, **CD32<sup>+</sup>** e **CD117<sup>+</sup>** e uma baixa densidade do **CD11b**. A identificação desse fenótipo é importante em leucemias promielocíticas. O mielócito exibe uma forte expressão do **CD11b**, além do **CD13**, **Cd15** e **CD32**. Nos bastonetes inicia-se a expressão do receptor para a fração constante do IgG (**CD16**) que se intensifica nos segmentados <sup>12</sup>.

Nos monócitos o **CD33** e **HLADR** se mantêm em todos os estágios de diferenciação, surge também o **CD11** e **CD14** <sup>12</sup>.

Na diferenciação eritrocitária ocorre expressão do **HLADR**, **CD34** e **CD33** e após perda desses marcadores o único que sobra é a **glicoforina**, que é um importante marcador em eritroleucemias <sup>12</sup>.

A megacariopoese humana é representada por uma pequena fração de células. O elemento mais imaturo dessa linhagem é CFU-Meg que apresenta o fenótipo **CD34** e **HLADR**. Os marcadores específicos para megacariócitos são glicoproteínas plaquetárias detectadas pelos anticorpos **CD41** (glicoproteína IIb/IIIa), **CD42** (receptor para fator de Von Willebrand) e **CD61** (marcador de megacarioblasto imaturo) <sup>12</sup>.

Todo o processo de diferenciação da linhagem mielóide está representado na figura abaixo.

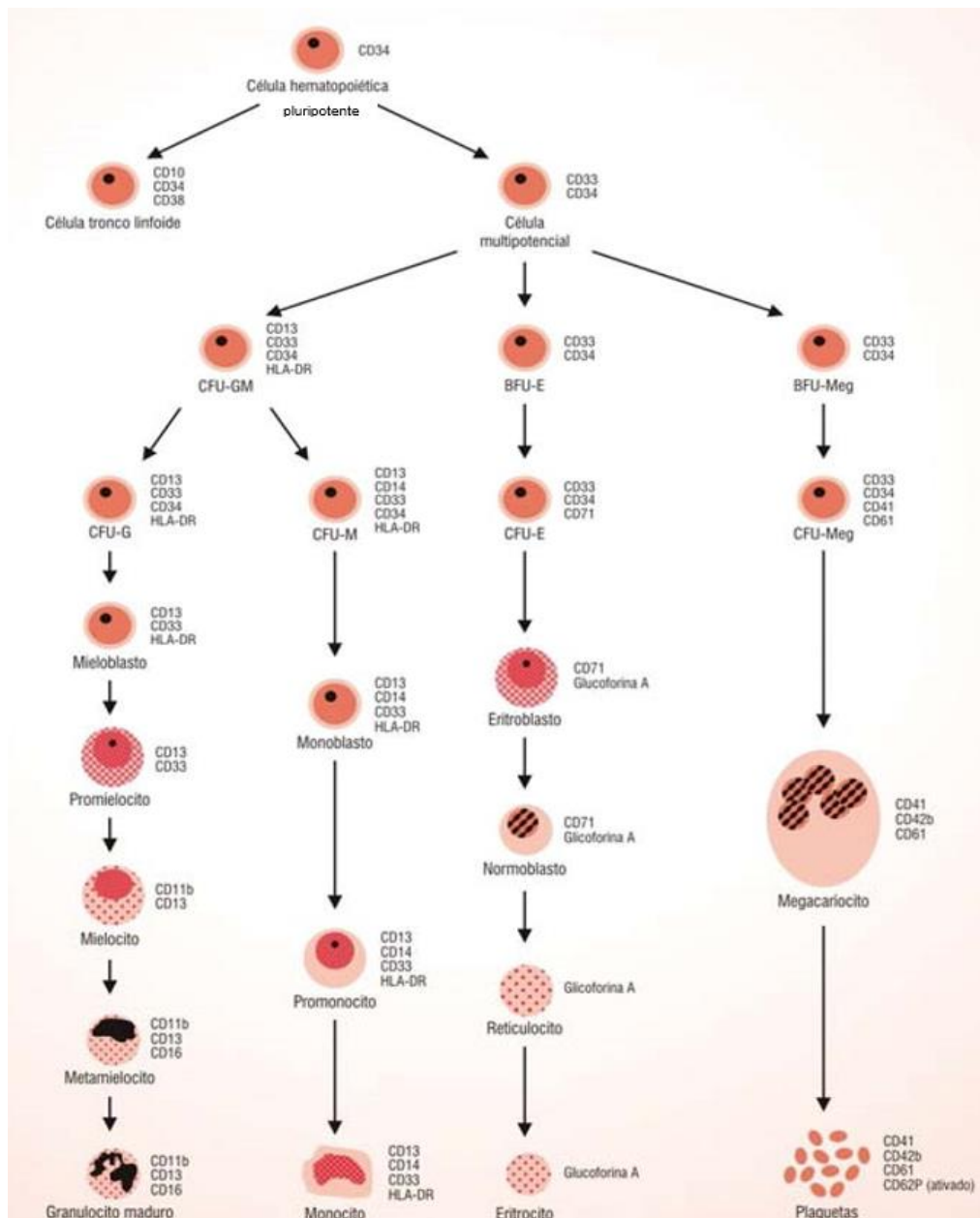


Figura 06:Diferenciação da Linhagem Mielóide

O conhecimento de todas essas moléculas existente nos leucócitos nos revela informações importante sobre a hematopoese e em casos de neoplasias, permite classificar o tipo de leucemia, isso torna o tratamento mais assertivo, aumentando assim as chances de cura.

## IMUNOFENOTIPAGEM

A imunofenotipagem, com a utilização da citometria de fluxo, tem se tornado uma importante ferramenta no diagnóstico de doenças malignas hematológicas, pois revela o perfil imunofenotípico dos leucócitos podendo refletir o desempenho do sistema imune de um indivíduo,



ou a linhagem celular de um processo neoplásico. Através de ligações específicas com anticorpos monoclonais é possível detectar antígenos de superfície, citoplasmático e nuclear, esses antígenos surgem durante o processo de diferenciação celular e já foram apresentados em parágrafos anteriores <sup>3</sup>.

A citometria de fluxo (CF) é um método rápido e objetivo que permite a determinação simultânea de múltiplas propriedades físicas de partículas isoladas em suspensão celular. Trata-se de um método que detecta e identifica os marcadores celulares expressos em cada tipo e subtipo das leucemias, mostrando em que estágio de desenvolvimento encontra-se o clone leucêmico <sup>8</sup>.

O sistema operacional de um citômetro de fluxo é constituído de: fontes luminosas do tipo laser, jogos de lentes, um amplificador e processador de sinais luminosos, e um sistema de software que capacitam avaliação de múltiplos parâmetros num fluxo celular contínuo, com contagens feitas separadamente de cada partícula <sup>8</sup>.

Os citômetros disponíveis no mercado têm uma fonte luminosa argon-laser que gera luz monocromática. A câmera de fluxo tem um canal ou filete de sucção por onde passa a amostra, sendo que cada célula que passa neste filete emitirá luz em todas as direções, e esta luz emitida é proporcional ao tamanho celular. Este filete atravessa feixes luminosos gerados por fontes de raio laser com emissão luminosa, estes raios são então separados por filtros e espelhos próprios de acordo com o tamanho da onda emitida.

Os sinais resultantes são digitalizados e enviados para o processamento no computador. A confirmação mais simples de um CF é a combinação de dois parâmetros de dispersão luminosa: forward low angle scatter (FSC-tamanho celular) e 90° Side Scatter (SSC-complexidade interna) juntamente com os sinais de fluorescência, ou seja, a luz refratada que é medida em dois ângulos diferentes, chamadas características de dispersão (scatter). Os sinais fluorescentes são decorrentes da positividade dos antígenos de membrana nas células examinadas, ou seja, emite os sinais dos marcadores celulares <sup>8</sup>.

O sinal FSC é primariamente dependente do volume de partículas ou células, enquanto o sinal SSC provê uma medida da organização interna, granulação citoplasmática, densidade nuclear e estruturas celulares externas.

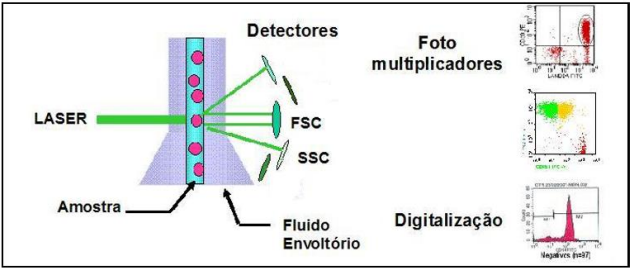


Figura 07: Sistema de um Citômetro

Os AcMos produzidos contra antígenos celulares são agrupados de acordo com a origem e diferenciação celular e sob a denominação de CD. Esta nomenclatura se aplica aos epítomos das moléculas reconhecidos pelo anticorpo. As descrições sobre *Clusters of Differentiation-CDs* e características dos marcadores, comumente utilizados no diagnóstico de doenças hematológicas estão sumarizados na tabela abaixo <sup>11,12</sup>:

Tabela 02: Anticorpos usados em imunofenotipagem de leucócitos

Marcadores de células precursoras.			
CD	ANTÍGENO [nome e função]	REATIVIDADE COM CÉL. HEMATOPOÉTICA	AcMo. [clone]
CD34	Antígeno de células precursoras	Células precursoras linfóides e mielóides	HPCA-1/ My10 HPCA-2/8G12 BI-3C5
CD90	Antígeno Thy-1	Alguns linfócitos T e B imaturos e um pequeno número de células CD34 <sup>+</sup> da MO	F15-42-1 5E10
CD117	c-kit, SCFR, SLF	Células progenitoras hematopoéticas, células formadoras de colônia e mastócitos	17F11 YB5.B8 104D2
CD133	PROM1, prominin 1	Células-tronco hematopoéticas primitivas, células CD34 <sup>+</sup> comprometidas com a via granulocítica/ monocítica	AC133
-	TdT / função no rearranjo dos genes de TCR e Ig (inserção de nucleotídeos nos sítios de junção)	Células linfóides imaturas, algumas células precursoras mielóides e virtualmente todas as LLAs e algumas LMAs	HTdT-1

Marcadores de células B.

CD	ANTÍGENO [nome e função]	REATIVIDADE COM CÉL. HEMATOPOÉTICA	AcMo. [clone]
CD10	Antígeno de LLA comum (CALLA)/ endopeptidase	Células precursoras B Linfócitos B foliculares Timócitos corticais e granulócitos	J5 VIL-A1 BA-3
CD19	Todas as células B/ função na ativação de células B; associado ao CD21	Precursores de células B Linfócitos B	Leu-12 B4 HD37
CD20	Antígeno de célula B/ função na ativação de células B	Subpopulação de células precursoras B Todos os linfócitos B Células dendríticas foliculares	Leu-16 B1L26
CD20 (FMC7)	Antígeno de células B maduras/ detecta epitopo conformacional na molécula CD20	Linfócitos B (todos os linfócitos B positivos para FMC7 são sempre CD20 positivos)	FMC7
CD21	Antígeno de célula B/ CR2 (receptor CD3d); receptor de EBV	Linfócitos B (células foliculares do manto) Células dendríticas foliculares e timócitos	OKB7 B2

CD	ANTÍGENO [nome e função]	REATIVIDADE COM CÉL. HEMATOPOÉTICA	AcMo. [clone]
CD22	Antígeno de célula B/ função na adesão e ativação de células B	Precursores de células B Linfócitos B	Leu-14/SHCL-1 RFB4 HD39
CD23	Antígeno de célula B/ FcεRII (baixa afinidade pelo receptor FC de IgE); Existem dois tipos para diferenciar o domínio citoplasmático (FcεRIIa and FcεRIIb)	FcεRIIa é expresso em linfócitos B (células foliculares do manto) e células B; FcεRIIb é expresso por linfócitos B, monócitos, eosinófilos e células dendríticas	Leu-20/EBVCS-5 Tu1
CD37	Antígeno de célula B (molécula tetraspan)	Linfócitos B Frac expressão em células T, monócitos e granulócitos	RFB7 Y29/55
CD72	Antígeno de célula B/ antígeno ligante do CD5	Células precursoras B Linfócitos B	J3-109
CD79a	mb-1; Igα (dissulfeto ligada ao Cd79b e associado com Ig de membrana)/ transdução de sinal da Ig de membrana para o citoplasma	Precursores de células B (expressão citoplasmática). Células B positivas para Ig de membrana	HM57
CD79b	B29; Igβ (dissulfeto ligada ao Cd79a e associado com Ig de membrana)/ transdução de sinal da Ig de membrana para o citoplasma	Precursores de células B (expressão citoplasmática). Células B positivas para Ig de membrana	B29/ 123
CD138	Antígeno de células plasmáticas	Células plasmáticas e mieloma múltiplo	B-B4
CD179a	Porção proximal da cadeia leve Igκ ou λ.	Células precursoras B	HSL96
CD179b	λ5, porção distal que toma parte da cadeia leve de células preB.	Células precursoras B	HSL11
-	Ig citoplasmática	Células positivas para Ig citoplasmáticas (imunoblastos, imunócitos e células plasmáticas)	Anti-soro convencional e AcMo
-	Ig de membrana; IgM, IgD, IgG, IgA e IgE	Células positivas para sIg Cada clone de célula B expressa apenas um tipo de cadeia leve de Ig (κ e λ.)	Anti-soro convencional e AcMo
-	Igμ-Cy Pré -B (expressão citoplasmática fraca Igμ).	Células pré-B. Apenas as cadeias pesadas μ fracamente expressas no citoplasma (nenhuma cadeia leve de Ig madura)	anti-μ antisera

Marcadores de células T.

CD	ANTÍGENO [nome e função]	REATIVIDADE COM CÉL. HEMATOPOÉTICA	AcMo. [clone]
CD1	Antígeno T6; antígeno comum em timócitos/ proteína MHC-like; pode se associar com a microglobulina $\beta 2$	Timócitos corticais Células de Langerhans Subpopulação de células dendríticas e linfócitos B	OKT6 NA1/34 7C4/160/4G9 7C6/162/3B10
CD2	Antígeno T11; receptor SRBC; LFA-2 /receptor de ativação de célula T; ligante para o CD58	Todas as células T A maioria das células NK Três diferentes epitopos antigênicos são conhecidos, dos quais apenas um é o sítio de ligação do SRBC	Leu-5B OK711 T11
CD3	Antígeno T3 (associado com TCR)/ transdução de sinal do TCR para o citoplasma	Células T imaturas: expressão citoplasmática Células T maduras: expressão de membrana	Leu-4/ SK7 OKT3 UCHL1 VIT-3
CD4	Antígeno T4/ envolvido no reconhecimento de antígeno MHC de classe II; receptor de HIV	Células T (expressão de membrana); Subgrupo de timócitos corticais células T-helper/linfócitos T induzidos Subpopulação de monócitos e macrófagos Algumas LMAs	Leu-3 <sup>o</sup> OKT4
CD5	Antígeno T1/ função na proliferação da célula T; ligante do CD72 nos linfócitos B	Timócitos e linfócitos T maduros, subpopulação de linfócitos B; LLC	Leu-1 T1
CD6	Antígeno T12/ antígeno relacionado com CD5	Timócitos e linfócitos T maduros, subpopulação de linfócitos B; LLC	OK17 T12
CD7	Antígeno Tp41/ receptor da porção Fc de IgM (Fc $\mu$ R)?	Quase todas as células T Células NK Subpopulação de células mielóides imaturas; Algumas LMAs	Leu-9 3A1 WT1
CD8	Antígeno T8/ envolvido no reconhecimento MHC de classe I	Timócitos corticais Linfócitos T citotóxicos/ supressores Células NK	Leu-2 <sup>o</sup> OKT8
-	TCR $\alpha\beta$ (TCR clássico; TCR2)	TCR $\alpha\beta$ é expresso pela maioria das células T maduras CD3 <sup>+</sup>	WT31 BMA031
-	TCR $\beta$	Presente na maioria dos timócitos corticais e muitas LLAs-T	$\beta$ F1
-	TCR $\gamma\delta$ (TCR alternativo; TCR1)	TCR $\alpha\beta$ é expresso pela minoria das células T maduras CD3 <sup>+</sup>	anti-TCR- $\gamma/\delta$ -1 TCR $\delta$ 1
-	Domínio V $\beta$	Subpopulação de timócitos e células T	de 20-25 anticorpos V $\beta$ reconhecem de 65-75% dos linfócitos T do sangue

Marcadores de células T.

CD	ANTÍGENO [nome e função]	REATIVIDADE COM CÉL. HEMATOPOÉTICA	AcMo. [clone]
-	Domínio Vδ	Subpopulação de timócitos e células T	Vδ1 (R9,12) Vδ2 (IMMU389, BB3)
-	Domínio Vy	Subpopulação de timócitos e células T	Vy2/3/4 (23D12) Vy 3/5 (56.3) Vy8(R4.5) Vy9 (Ti-γA, IMMU360)
-	TCF1/ fator de transcrição específico de célula T	Timócitos Células T ativadas	TCF1

Marcadores de células NK.

CD	ANTÍGENO [nome e função]	REATIVIDADE COM CÉL. HEMATOPOÉTICA	AcMo. [clone]
CD56	NCAM; PI ligante e formas transmembrana	Células NK Alguns linfócitos	Leu-19/My31 NKH-1
CD57	Antígeno de célula natural killer	Subpopulação de células NK Subpopulação de linfócitos T Algumas células B	Leu-7/ HNK-1
CD94	Kp43, inibidor de HLA classe I	Células NK Poucos linfócitos T	Z199 Z270 NKH-3 HP-3B1
CD158	Família KIR, inibitório para células NK para diferentes receptores HLA classe I	Células NK Poucos linfócitos T	EB6 HP-3E4 GL183 CH-L X9 Z27 Q66 Q241
CD161	NKR-P1A, receptor lectina- like de células NK da subfamília B	Maioria das células NK, timócitos e células T de fígado fetal Célula T madura CD3 <sup>+</sup>	DX12 191B8
CD335	NCR1, NKp46, receptor de citotoxicidade natural	Células NK	BAB281
CD336	NCR2, NKp44, receptor de citotoxicidade natural	Células NK ativadas	Z231
CD337	NCR3, NKp30, receptor de citotoxicidade natural	Células NK	Z25

Marcadores de células mielóides.

CD	ANTÍGENO [nome e função]	REATIVIDADE COM CÉL. HEMATOPOÉTICA	AcMo. [clone]
CD11b	Integrinas, CR3	Monócitos Granulócitos Células NK Células linfóides ativadas	LPM 19c
CD13	Aminopeptidase N Glicoproteína 150	Granulócitos Monócitos Células progenitoras mielóides	WM-47
CD14	Lipopolissacarídeo, Receptor LPS-R	Monócitos e neutrófilos	TUK-4
CD15	Antígeno associado a granulócitos	Granulócitos e precursores mielóides	C3D-1
CD33	P67	Progenitoras mielóides Monoblastos LMA	WM-54
CD41	Glicoproteína IIb/IIIa	Megacariócitos e plaquetas	5B12
CD42	Glicoproteína Iba	Megacariócitos e plaquetas	AN51
CD61	Glicoproteína IIIa	Megacariócitos e plaquetas	Y2/51
CD68	Glicoproteína 110	Monócitos Macrófagos Osteoclastos	KP1 EBM11 PG-M1
CD117	c-Kit	Células progenitoras LMA-M0 a M2	104D2

Marcadores sem linhagem específica.

CD	ANTÍGENO [nome e função]	REATIVIDADE COM CÉL. HEMATOPOÉTICA	AcMo. [clone]
CD9	Antígeno p24 (molécula tetraspan) / indução de agregação plaquetária	Subpopulação de células precursoras B Linfócitos B (células centro-foliculares) Monócitos Megacariócitos Plaquetas Eosinófilos Basófilos	BA-2
CD11b	Antígeno p170, integrina $\alpha M$ , receptor 3a do sistema Comple- mento	Neutrófilos Monócitos Células NK Subgrupo de linfócitos (células T CD8 <sup>+</sup> e células B de memória)	ICRF44; D12; CLB; mon- granv1



CD	ANTÍGENO [nome e função]	REATIVIDADE COM CÉL. HEMATOPOÉTICA	AcMo. [clone]
CD11c	p150, antígeno 95 (cadeia $\alpha$ da integrina); associado com antígeno CD18/molécula de adesão; CR4 (C3b), receptor C3dg)	Monócitos Macrófagos Granulócitos Subpopulações de linfócitos (células HCL-like do baço e células NK)	Leu-M5/SHCL3
CD16	Fc $\gamma$ RIII (baixa afinidade para porção Fc de IgG); Fc $\gamma$ RIIIA (forma transmembrana) e Fc $\gamma$ RIIIB (forma pi- ligante)	Granulócitos neutrofílicos Monócitos e macrófagos (fraca) Células NK Fc $\gamma$ RIIIb é ausente em granulócitos de pacientes PNH	Leu-11b, 5D2 CLB-FcR-granv1 Esses Ac reconhecem tanto Fc $\gamma$ RIIIA e Fc $\gamma$ RIIIB
CD24	Antígeno granulocítico de célula B, proteína PI-ligante nos granulócitos	Células B Granulócitos; ausente em granulócitos de pacientes PNH	BA-1; VB-C5
CD25	Antígeno Tac/ cadeia $\alpha$ do receptor de IL-2 (baixa afinidade ao IL-2R); alta afinidade ao IL-2R quando associado a cadeia $\beta$ (antígeno CD122) e/ou cadeia $\gamma$	Células T Macrófagos e linfócitos ativados HCL	2A3; ACT-1
CD27	Superfamília de receptor TNF/ receptor para antígeno CD70	Células T maduras e ativadas Linfócitos B de memória e células NK	L128 OKT 18 <sup>+</sup> 1A4CD27
CD38	Antígeno T10	Células B e T ativadas Células precursoras (timócitos) Subpopulações de células B (células B foliculares) Células plasmáticas	Leu-17/ HB7 OKT10
CD103	HML-1 (integrina 1 dos linfócitos da mucosa humana); cadeia $\alpha$ E que esta associada a cadeia $\beta$ 7	Linfócitos T associados a mucosas (especialmente células T CD8 <sup>+</sup> ), de 2-6% dos linfócitos do sangue	B-ly7
-	Granzima B	Linfócitos T citotóxicos Linfocinas Células NK	CLB-B11 GrB-7 MCA1645
-	TIA1; proteína ligadora de RNA associada aos grânulos citotóxicos	Linfócitos T citotóxicos Células NK ativadas	TIA 1
-	PRF1; perforina	Grânulos citoplasmáticos de células NK Células T citotóxicos	8G9
-	HLA-DR, antígeno não-polimórfico/ molécula de MHC classe II	Células hematopoéticas precursoras Células B Células T ativadas Células monocíticas Macrófagos	L243 OKDr

## LEUCEMIAS

As leucemias são neoplasias hematológicas malignas e heterogêneas, que têm a sua origem em células da medula óssea. Os primeiros casos foram relatados no século XIX com a observação de alteração da medula óssea em pacientes que foram a óbito <sup>7</sup>.

Como já citado, a hematopoese consiste no processo de maturação em cascata da linhagem hematopoética, iniciada pelas células pluripotentes que residem na medula óssea. A leucemia decorre de um erro genético que compromete esse processo de maturação <sup>8</sup>.

Dependendo do tipo da linhagem comprometida, a leucemia é classificada como mieloide ou linfoide. A forma linfoide ou linfoblástica pode ser dividida segundo as células afetadas em: de células B ou de células T. Em geral, as leucemias se distinguem em agudas e crônicas. As leucemias agudas, têm origem nas células primitivas do sistema hematopoético, são caracterizadas pelo acúmulo das células-troncos (blastos) e a perda da capacidade de diferenciação em células maduras, as leucemias crônicas ou periféricas se originam nas células em estágios maturativos tardios <sup>4</sup>.

Modelos mais complexos foram desenvolvidos para classificar as leucemias, com o objetivo de estratificá-las quanto ao risco e melhor adequar o protocolo de tratamento. Os modelos variam quanto aos métodos diagnósticos e se dividem em classificação FAB (Grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico, 1976, critérios morfológicos-citoquímicos), MIC (1986, critérios morfológicos, imunológicos e citogenéticos), EGIL (Grupo Europeu de Estudos, 1995, critérios imunofenotípicos) e WHO (World Health Organization, 2001, critérios citogenéticos/moleculares, história de terapia prévia ou aspectos mielodisplásicos) <sup>16</sup>. Neste artigo discutiremos a classificação EGIL pelo método de imunofenotipagem.

O diagnóstico laboratorial da leucemia inclui hemograma e mielograma para a contagem, análise morfológica e testes citoquímicos das células hematopoéticas. O aumento de blastos na medula óssea em 20% para a WHO ou 30% para o grupo FAB confirma o diagnóstico de leucemia <sup>4</sup>.

A etiologia da doença não está clara. Contudo, alguns fatores como exposição a irradiações e a substâncias químicas carcinogênicas, drogas antineoplásicas específicas, fator hereditário, anormalidades cromossômicas constitucionais, mielodisplasias, a síndrome de Down, policitemias e viroses, podem aumentar o risco de desencadear esta doença <sup>15</sup>.

No Brasil, estima-se que a leucemia aguda corresponda de 95 a 98% dos casos de doenças malignas em crianças e, que entre 70 e 80 % das leucemias agudas sejam leucemias linfocíticas, ocorrendo entre 3 e 7 anos de idade (Mendonça, 2003). A LMA é mais frequente em adultos (acima de 60 anos de idade) em mais de 50% dos casos, representado 15 a 20% das leucemias da infância e 80% das leucemias dos adultos <sup>7</sup>.



## IMUNOFENOTIPAGEM NAS LEUCEMIAS

O grupo EFIL em 1995 (*Grupo Europeu para caracterização Imunológica das Leucemias*) propôs critérios para a classificação imunológica das leucemias agudas com o objetivo de esclarecer as diretrizes desta classificação baseado na expressão de marcadores e uniformizar o diagnóstico das doenças hematológicas.

O painel de marcadores recomendados pelo grupo EGIL para leucemias agudas, está listado na tabela abaixo <sup>5</sup>:

<b>Primeira triagem</b>	
Linfóide B	CD 19, CD22 citoplasmático, CD79a, CD10
Linfóide T	CD3 citoplasmático, CD2, CD7
Mielóide	anti-aMPO, CD13, CD33, CDw56, CD117
Não específico de linhagem	TdT, CD34, HLA-DR
<b>Segunda triagem</b>	
Se LLA de linhagem B	IgM citoplasmático, kappa, lambda, CD20, CD24
Se LLA de linhagem T	CD1a, CD3 membrana, CD4, CD5, CD8, anti-TCR $\alpha\beta$ , anti-TCR $\gamma\delta$
Se LMA	anti-lisozima, CD14, CD15, CD41, CD61, CD64, anti-glicoforina A

(Fonte: BENE *et al.*, 1995)

Tabela 03: Painel de Marcadores usados em imunofenotipagem

Também foi proposto pelo grupo EGIL critérios para o diagnóstico de leucemias aguda bifenotípica, conforme tabela abaixo:

<b>Pontuação</b>	<b>Linhagem B</b>	<b>Linhagem T</b>	<b>Linhagem Mielóide</b>
2	CD79a, cIgM cCD22	cCD3/mCD3 anti-TCR $\alpha\beta$ anti-TCR $\gamma\delta$	anti-aMPO (anti-lisozima)
1	CD19, CD10 CD20	CD2, CD5 CD8, CD10	CD13, CD33, CDw65
0,5	TdT, CD24	TdT, CD7 CD1a	CD14, CD15, CD64, CD117

Nota: Cada marcador corresponde à pontuação indicada; c (citoplasmático); m (membrana). (Fonte: BENE *et al.*, 1995)

Tabela 04: Painel de Marcadores usados em imunofenotipagem

Considerando-se que as leucemias representam a expansão clonal de uma célula em determinado estágio de sua diferenciação, os AcMo permitem classificar estas neoplasias conforme suas expressões antigênicas.

As células da linhagem B imaturas dão origem as leucemias linfoblásticas que são subdivididas em quatro estágios conforme as expressões fenotípicas equivalentes à diferenciação linfocitária precursora B.

- LLA pró-B: (HLA-DR+, TdT+, CD19+);
- LLA- pré-pré-B (comum ou Calla+) (HLA-DR+, TdT+, CD19+, CD10+, CD22+);
- LLA pré-B (HLA-DR+, TdT+, CD19+, CD10+, CD22+, cμ+);
- LLA de células B: (HLA-DR+, TdT+, CD19+, CD20+, CD22+, Ig+).

LLA do tipo pró-B representa 5% dos casos de leucemias em crianças e 10% em adultos. A LLA do tipo comum ou CALLA+ representa 75% dos casos LLA infantil e 50% em adultos, sendo que a expressão do CD10 torna o prognóstico favorável. A LLA pré B representa 15% dos casos em crianças e 10% em adultos. A LLA de células B está presente em 2% a 5% de crianças e adultos, apresenta um fenótipo incomum que é a expressão de cadeias leves de imunoglobulinas na membrana celular, esse tipo de leucemia representa um prognóstico desfavorável, pois há elevada incidência de envolvimento no sistema nervoso central <sup>14</sup>.

As características das leucemias linfoblásticas T são, a presença de TdT e cCD3+, bem como a expressão do antígeno p40 (CD7). LLA's de linfócitos T se subdividem em:

- LLA pré T: CD7+
- LLA-T Intermediária: CD2, CD1a+, CD7+, CD4+, CD8+
- LLA-T Medular: mCD3+, CD1a-, CD+ ou CD8+

Clinicamente não parece haver diferenças entre LLA pré T e LLA-T. As LLA-Ts em pelo menos 20% dos casos podem apresentar CD10+ além de CD2, cCD3, CD1+, conforme análises epidemiológicas. O linfoma linfoblástico (LiLb) representa a etapa de timócitos maduros onde a célula apresenta CD3 na membrana e na grande maioria CD4 ou CD8 positivos. Estes casos estão associados na sua grande maioria à apresentação clínica tumoral com alargamento de mediastino anterior e leucocitose elevada. São sempre TdT+, o que os distingue das neoplasias periféricas, pois o aspecto as vezes maduro das células linfóides podem ser confundidos com a leucemia pró-linfocítica. As proliferações de origem T maduras são sempre TdT e CD1a negativas

e podem apresentar expressões heterogêneas de antígenos T e da mesma forma que as proliferações B, têm perfis imunofenotípicos característicos para cada entidade clínica <sup>1</sup>.

Em relação às leucemias mielocíticas, os marcadores imunológicos desempenham papel secundário na classificação. No entanto, os AcMo são relevantes para o diagnóstico de LMA-M7. Apesar de células mielóides apresentarem marcadores enzimáticos importantes para sua identificação, a reatividade individual dos AcMo anti-mielóides em LMA tem sido utilizada com valor prognóstico.

Os AcMos dos grupos CD33, CD13, CD117, CD14, CD15, e CD11b mostram-se os mais específicos com positividade superior a 40% dos casos de LMA, sendo suas expressões pouco comuns em LLA (5%). O interesse da utilização de AcMo reativos com antígenos de expressão granulocítica e/ou monocítica permite, principalmente, estabelecer níveis maturativos das células leucêmicas e correlacionar suas expressões com os subtipos morfológicos da classificação FAB. Dentro destes conceitos, já existem, expressões antigênicas definidas para cada subtipo FAB. Por exemplo, a expressão de HLA-DR é reconhecida na maioria dos LMA, com exceção de M3, M6 e M7 <sup>12</sup>.

Por outro lado, não sendo conhecidos AcMos cuja reatividade individual seja restrita a qualquer subtipo FAB, M1 a M5, alguns estudos tentaram definir fenótipos imunológicos compostos que apresentam percentuais diferentes de cada grupo de AcMo relacionado ao subtipo morfológico. Por exemplo, LMA com componente monocítico apresenta um fenótipo composto pela expressão de HLA-DR+, CD33+, CD13+/-, CD14+, CD11b+ e CD15+/- . Os subtipos M1 a M3 caracterizam-se por maior heterogeneidade, sendo os subtipos M1/M2 mais frequentemente HLA-DR+, CD33+/CD13+, enquanto M3 é HLA-DR-, exibindo expressão variável de CD33/ CD13/CD14 e sempre CD15+/CD11b+ <sup>12, 13</sup>.

A identificação imunológica de casos de LMA com blastos muitos imaturos é de grande valor no diagnóstico diferencial entre LLA (principalmente L2 da classificação FAB) e LMA-M1/MO. Neste grupo de leucemias, os anticorpos como CD12, CD33 e anti-linfóides são os elementos que definem o subtipo leucêmico. Em alguns destes casos, co-existem duas expressões fenotípicas e estas leucemias são denominadas de bifenotípicas, mistas ou mesmo "leucemia com infidelidade de linhagem imunológica" <sup>12, 13</sup>.

Além dos exemplos acima, os AcMo reativos com as glicoproteínas plaquetárias (Ib, IIB/IIla, IIIa, IV) tornaram possível o diagnóstico de leucemias megacarioblásticas (M7), sem necessidade de recorrer a análises por microscopia eletrônica. Dos vários AcMo reativos com glicoproteínas

plaquetárias, os do grupo CD42 e CD41 parecem reagir com células mais maduras enquanto CD61 identifica os megacarioblastos mais imaturos <sup>12</sup>.

Finalmente, é importante ressaltar o valor de anticorpos específicos como LICR.LON.R10, EP-1 e alfa-glicoforina no diagnóstico das leucemias eritroblásticas com morfologia de células indefinidas <sup>12, 13</sup>.

## CONCLUSÃO

O impacto da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico e acompanhamento de leucemias tem sido rapidamente expandido. Este avanço é atribuído ao resultado da inovação da ciência que levou a produção de centenas de anticorpos monoclonais e o avanço da tecnologia a laser. Com o aprimoramento de técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo é possível a identificação de diversos tipos de leucemias de acordo com linhagens celulares e estágios maturativos. As informações quanto a antígenos de membrana são de grande relevância para a identificação de origem celular, clonalidade e fidelidade de linhagem celular maligna. Estes exames são importantes para classificação, acompanhamento e monitorização terapêutica, além de ser o método ideal, para detecção de doença residual mínima das leucemias agudas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, K. B., LICHTMAN, H. A., PILLAI, S. – **Imunologia Celular e Molecular**, Saunders, 8ªed., São Paulo – SP, 2015.
2. ALVES, G. V. d. A. – **Caracterização Hematológica e Imunofenotípica em Pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda**, Tese Doutorado (Rede Nordeste de Biotecnologia), Natal, RN, 2012. Disponível em < [https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/12648/1/GabrielaVAA\\_TESE.pdf](https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/12648/1/GabrielaVAA_TESE.pdf) >. Acesso em 20/12/2017.
3. BAIN, B. J. – **Células Sanguíneas - Um guia Prático** - 5ª ed., Porto Alegre, RS – 2016
4. FAILACE, Renato. **Hemograma: Manual de interpretação**. 5ª ed. Porto Alegre, RS: Artes Médicas, 2009
5. CHAUFFAILLE, M. L. F. L.; YAMAMOTO, M. - **Classificação das Leucemias Agudas. Citologia, Citoquímica, Imunofenotipagem, Citogenética e Genética Molecular, Tratado de Hematologia**, Cap. 38, Disponível em < <http://docplayer.com.br/19897702-Classificacao-das-leucemias-agudas-citologia-citoquimica-imunofenotipagem-citogenetica-e-genetica-molecular.html> >. Acesso em 20/12/2017.

6. HOFMAN, A. V. – **Fundamentos em Hematologia** – 6ª ed. Porto Alegre, RS, Artmed, 2013
7. INCA, Instituto Nacional do Câncer – **Estimativas de Câncer no Brasil** – Disponível em < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/> >. Acesso em 01/12/2017.
8. LORENZI, Therezinha. **Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica**. 4 ed. Rio de Janeiro, RJ: Medsi, 2006.
9. MANSUR, M. B. – **Mutações do Gene *NOTCH 1* e Outras Alterações Moleculares Relacionadas a Etiopatogênese das Leucemias Linfoblásticas Agudas de Linhagem T (LLA-T)**, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em < [http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/Mutacoes\\_do\\_gene\\_Notchi\\_e\\_outras\\_alteracoes\\_moleculares\\_relacionadas\\_etiopatogenese\\_Mansur\\_Marcela\\_Braga.pdf](http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/Mutacoes_do_gene_Notchi_e_outras_alteracoes_moleculares_relacionadas_etiopatogenese_Mansur_Marcela_Braga.pdf) >. Acesso em 30/11/2017.
10. MARTINS, D. M.; GAGLIANI, L. H. – **Importância da Citometria de Fluxo no Diagnóstico Diferencial das Leucemias** – Revista Unilus Ensino e Pesquisa, Vol.5, nº8, jan-jun 2008. Santos – SP. Disponível em < <http://revista.unilus.edu.br/index.php/ruep/article/view/39> >. Acesso em 20/11/2017.
11. NAOUN, P.C. – **Avanços Tecnológicos em Hematologia Laboratorial** - Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia, 2001, 23 (2). Disponível em < <http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbhh/v23n2/13304.pdf> >, Acesso em 10/12/2017.
12. OLIVEIRA, M. S. P. – **Leucemias agudas, Abordagem Imunomolecular no Diagnóstico e na Pesquisa**, Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 2008.
13. PILGER, D. A.; SILVA, G. C.; CASTRO, S. M.; WAGNER, S. C. – **Diagnóstico Laboratorial das Leucemias Mieloides Agudas**, Revista Brasileira de Patologia Medica e Laboratorial, vol. 42, Abril 2006
14. REGO, E. M.; SANTOS, G. A. S.; - **Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses**, Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2009. Disponível em < [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-84842009000500016&script=sci\\_abstract&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-84842009000500016&script=sci_abstract&lng=pt) >, Acesso em 12/12/2017.
15. SILVA, E. F. – **Identificação de Células Leucêmicas por Citometria de Fluxo Utilizando Lecitinas Conjugadas**, Tese de Doutorado (Universidade Federal de Pernambuco). Recife, PE, 2010. Disponível em <

[http://www.repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/2224/arquivo79\\_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/2224/arquivo79_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y) >. Acesso em 02/12/2017.

16. SILVEIRA, N. A.; ARRAES, S. M. A. A.; - **A imunofenotipagem no Diagnóstico Diferencial das Leucemias Agudas: Uma revisão**. Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – RS, 2008. Disponível em <  
<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/viewFile/19208/9995>>. Acesso em 22/12/2017.