

A IMUNOFENOTIPAGEM NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS LEUCEMIAS AGUDAS: UMA REVISÃO

Neiva Albertina da Silveira*, Sandra Mara Alessi Aristides Arraes**[□]

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

RESUMO. A leucemia aguda, doença maligna e progressiva, é dividida em duas categorias dependendo do tipo celular envolvido: a linfocítica (LLA) e a mielocítica (LMA), as quais são divididas em subtipos. Além destas, as leucemias agudas bifenotípicas e a indiferenciada são também observadas em alguns pacientes. A LLA é mais comum em crianças entre 3 e 7 anos de idade, podendo ocorrer também em adultos, enquanto a LMA é rara na infância. No Brasil, estima-se que a leucemia aguda corresponda de 95 a 98% dos casos de doenças malignas em crianças e 70 a 80% dos casos de leucemia aguda são leucemias linfocíticas. O curso, o prognóstico e o tratamento destas doenças são dependentes do diagnóstico correto. A classificação das leucemias hoje é baseada nos critérios morfológicos, métodos citogenéticos, citoquímicos e imunológicos como a imunofenotipagem. A imunofenotipagem é uma técnica especial para classificação das leucemias indiferenciadas linfóides ou mielóides, subclassificação de leucemias, identificação de leucemias bifenotípicas, monitoração de terapias e de doença residual mínima ou recorrente. Com a utilização da citometria de fluxo e de diferentes fluorocromos é possível identificar os múltiplos marcadores celulares presentes nestas patologias. Para caracterizar e diferenciar os tipos celulares nas leucemias agudas utiliza-se um painel mínimo de anticorpos. Por exemplo, a detecção de mieloperoxidase (MPO), associada à CD13/CD33 (mielóide), CD79, CD22 e CD19 (células B), CD3 e CD7 (células T) identificam noventa e oito por cento das leucemias agudas. O objetivo deste trabalho foi relatar o uso da imunofenotipagem no diagnóstico diferencial entre as leucemias agudas.

PALAVRAS-CHAVE: leucemia mielóide aguda; leucemia linfóide aguda; imunofenotipagem.

Silveira NA, Arraes, SMAA. Immunophenotyping in the differential diagnosis of acute leukemias: a review. Arq Mudi. 2008;12(1):5-14.

ABSTRACT. The acute leukemia, a malign and progressive disease, is divided in two categories depending on the involved cellular type: the lymphocytic leukemia (LLA) and the myelocytic leukemia (LMA), which are divided in subtypes. The acute biphenotypic leukemia and the undifferentiated are also observed in some patients. LLA is more common in children between three and seven years old, but can also attack adults, while LMA is rare in the childhood. In Brazil, the acute leukemia corresponds of 95 to 98% of the malign disease cases in children and 70 to 80% are lymphocytic leukemias. The course, the prognostic and treatment of these diseases are dependent of the correct diagnosis. Nowadays the classification of leukemias is based on the morphologic approaches, cytogenetics, cytochemicals and immunologicals, as methods imunophenotyping. Immunophenotyping is a special technique for classification of the undifferentiated lymphoid or myeloid leukemias,

*Farmacêutica responsável pela farmácia básica e pela farmácia do Hospital do Município de Doutor Camargo-PR;

**Professora de Imunologia Clínica – Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR. [□] Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Campus Universitário; CEP: 87020-900; Maringá-PR. e-mail: smarraes@uem.br

subtypes of leukemias, identification of biphenotypic leukemias, therapies and minimal residual disease or its revival monitoring. The flow cytometry and different fluorochrome have made it possible to identify several cellular markers present in these diseases. To characterize and differentiate the cellular types in acute leukemias a minimum panel of antibodies is used. For example, the myeloperoxidase (MPO) detection, associated to CD13/CD33 (myeloid), CD79, CD22 and CD19 (B cells), CD3 and CD7 (T cells) can identify ninety eight percent of the acute leukemias. The aim of this work was reporting the use of the immunophenotyping in the differential diagnosis among the acute leukemias.

KEY WORDS: acute myeloid leukemia; acute lymphoid leukemia; immunophenotyping.

INTRODUÇÃO

As leucemias agudas são doenças monoclonais caracterizadas pela proliferação de células hematopoiéticas anormais na medula óssea, nos nódulos linfáticos, no baço e outros órgãos e no sangue. Acometem qualquer tipo de célula sanguínea, como hemácias, leucócitos e plaquetas, prejudicando suas funções normais (Kroetz, Czlusniak, 2003). A leucemia resulta de uma anormalidade que ocorre em uma célula progenitora do sistema hematopoiético na medula óssea e o tipo de célula envolvido determinará o tipo de leucemia (Ghaddar, Estey, 1996; Jacobs, Wood, 2002).

Há dois tipos de leucemias, a aguda e a crônica. Esta distinção é baseada no comportamento de casos não tratados, pois nas leucemias agudas o paciente invariavelmente irá a óbito em meses, enquanto que na crônica, o paciente poderá sobreviver por alguns anos (Del Vecchio et al., 2004). A leucemia aguda é dividida em duas categorias, a linfocítica (LLA) e a mielocítica (LMA). Estas categorias são classificadas em subtipos (Quadros 1, 2 e 3), sendo o diagnóstico diferencial de extrema importância na escolha do curso da terapia, melhor resposta ao tratamento, bem como seu prognóstico (Lackritz, 2003).

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, crise blástica (estágio terminal de leucemia mielóide crônica

com desenvolvimento de leucemia mielóide aguda), mielodisplasias, a síndrome de Down, policitemias e viroses, podem aumentar o risco de desencadear esta doença (McKenna, 2000; Quade, 2002; Colby-Graham, Chordas, 2003).

No início, a leucemia não apresenta sintomatologia porque a quantidade de células leucêmicas é insuficiente para causar qualquer alteração clínica. Quando a quantidade de células anormais atingir 10^{11} a 10^{13} , os primeiros sintomas começarão a manifestar-se (<http://www.labcorp.com/datasets/labcorp/html/chapter/mono/dp000100.htm>). Quando o clone de célula maligna se multiplica e se infiltra na medula óssea e na circulação periférica, começam a ocorrer infecções, hemorragias, neutropenias, plaquetopenias, palidez, fadiga, perda de peso, dor lombar, edema glandular e abdominal, visão turva e comprometimento do sistema nervoso central (Quade, 2002).

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 freqüente em adultos mais velhos (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. Apresenta um prognóstico pobre, especialmente em pacientes idosos. (Silva et al., 2006). Se não forem tratados, 95% dos pacientes portadores de leucemia aguda morrerão em um ano após o diagnóstico (Rothe, Schmitz, 1996).

A classificação das leucemias é baseada nos métodos diagnósticos morfológicos e imunológicos. Esta classificação tem grande importância principalmente para definir a terapêutica a ser empregada, pois sabendo da origem, se linfóide ou mielóide e os seus subtipos, a conduta terapêutica será completamente diferente. A classificação morfológica foi desenvolvida em 1976 por um grupo de hematologistas franceses, americanos e britânicos (classificação FAB), para definir cada tipo de marcador imunológico que está presente nas diferentes leucemias (Bennett et al., 1976; Bennett et al., 1981; Bennett et al.,

1985; Mendonça, 2003). Segundo a classificação FAB, a LMA possui subtipos diferenciados de acordo com o estágio de desenvolvimento celular, a saber: M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7 (Quade, 2002; Oliveira et al., 2004) (Quadro 1).

As LLA são primariamente classificadas em linhagens T e B pelas características imunofenotípicas dos linfoblastos (Quadro 2), detectando-se o nível de diferenciação do processo leucêmico. A LLA é subdividida, também pela classificação FAB em: L1, L2 e L3 (Meadows et al., 1995; Farias, Castro, 2004) (Quadro 3).

Quadro 1. Classificação das LMA conforme FAB e características imunológicas.

| 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;CDw65;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 |
|-----------|----------------------------|---|--|

Adaptado de <http://www.meds.com/leukemia/facts/facts.html>; Bennett et al., 1976; Bennett et al., 1981; Bennett et al., 1985.

Quadro 2. Classificação imunofenotípica e as características imunológicas de LLA

| Classificação Imunofenotípica | Características imunológicas |
|-------------------------------|--|
| LLA-B (linfócitos B) | Pró-B: HLA-DR;TdT;CD34;CD19;CD21 e CD22c (citoplasmático) Tipo comum (Calla): HLA-DR;TdT;CD10;CD19;CD20;CD21 e CD22c Pré-B: HLA-DR;TdT;CD10;CD19;CD20;CD21 e CD22c B maduro: HLA-DR;TdT;CD10;CD19;CD20;CD22c;CD79 e SmIg (imunoglobulina de superfície) |
| LLA-T (linfócitos T) | Pré-T: HLA-DR;TdT;CD3c;CD5;CD7; e CD10 Tipo intermediário: TdT;CD1a;CD2;CD3c;CD7;CD10 e CD4/CD8 T maduro: TdT;CD2;CD3c;CD3;CD5;CD7; CD10 e CD4/CD8 |

Adaptado de Farias, Castro, 2004; Meadows et al., 1995.

Quadro 3. Classificação FAB e as características morfológicas de LLA

| Tipo | Definição | Características morfológicas |
|-----------|---|--|
| L1 | Leucemia linfocítica com diâmetro celular pequeno | Maioria das células é pequena e homogênea, com cromatina fina ou aglomerada. Núcleo regular e citoplasma escasso. |
| L2 | Leucemia linfocítica com diâmetro celular grande | Células heterogêneas, com cromatina nuclear fina, núcleo irregular, com um ou mais nucléolos e citoplasma abundante. |
| L3 | Leucemia linfocítica com diâmetro celular grande | Células homogêneas, com cromatina fina, núcleo regular podendo ser redondo ou oval. |

Adaptado de Farias, Castro, 2004; Bennett et al. 1976; Béné MC et al. 1995.

A leucemia linfocítica aguda tipo T (LLA-T) frequentemente pode causar organomegalia, sendo que na infância tem o pior prognóstico do que leucemia linfocítica aguda tipo B (LLA-B), requerendo terapia mais agressiva. Em adultos, a LLA-T tem melhor prognóstico que a LLA-B (Pui et al., 1993; Pui et al., 1999).

Os tipos de leucemias aguda linfocíticas B e T podem ser identificados utilizando a classificação imunofenotípica e suas características (Quadro 2), como também podem ser diferenciados com segurança utilizando as características morfológicas (Quadro 3).

Os marcadores CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 e CD8, estão altamente relacionados à linhagem de células T. As células B expressam em suas membranas imunoglobulinas (Ig) que aparecem a partir da segunda metade do estágio de diferenciação. A detecção de “terminal deoxynucleotidyl transferase” (TdT), HLA-DR e CD34 não identifica a linhagem B, mas definem o estágio de maturação desta linhagem, pois estes marcadores são restritos aos estágios imaturos, contudo, o antígeno HLA-DR é encontrado em todos os estágios de maturação destas células. As moléculas CD10, CD22, Ig, CD20 e CD21 são expressos seqüencialmente na superfície das células B. Analogamente ao antígeno CD3 em células T, os antígenos CD22 e CD79 são determinantes encontrados no citoplasma e superfície celular e, portanto, específicos para células B. O marcador CD5 que é considerado marcador para células T, pode também ser encontrado em tecidos linfóides B (Del Vecchio et al., 2004).

Em leucemia linfocítica aguda do tipo T pode apresentar co-expressão das moléculas CD3 e CD7 citoplasmáticas ou na superfície celular. Pode ocorrer também a expressão de CD1a, CD2, e CD4/CD8 (Stasi et al., 1995), sendo que a expressão de CD3 citoplasmática é altamente específica para a linhagem T. Os subtipos de LLA podem ser identificados como L1, L2 e L3 em um microscópio e pela semelhança aos linfócitos T ou B. Na maioria das crianças, as células mais freqüentes são de L1 e estão relacionadas a linfócitos B, enquanto em adultos são mais freqüentes as L2. Os linfócitos B são acometidos em 85% das LLA e os linfócitos T em 15% dos casos (Lackritz, 2003).

Para a diferenciação de LMA e LLA e seus subtipos deve-se levar em consideração que nas células T e células B (Quadro 2), pesquisa-se CD3 citoplasmático, presente em células T, e CD22, presente em células B. A molécula CD14 é significativa nas formas de diferenciação monocítica e a expressão de CD15 está presente na maioria dos casos de M2 e M4 (Béné et al., 1999). Foi descrito em leucemia aguda promielocítica ou M3 a co-

expressão de antígenos CD9 e CD68 e ausência de HLA-DR. Outros marcadores são menos freqüentes em LMA, como o CD2, encontrado apenas em crianças (Jean et al., 1995) ou outros muito raramente co-expressos (CD10, CD19 e CD20) (Stasi et al., 1995). Drexler et al. (1988) relataram que a análise de CD13 ou CD33 (no citoplasma) é importante para definir LMA indiferenciada e a presença de CD41, CD42 ou CD61 são marcadores importantes para megacariócitos.

Após definir as linhagens das leucemias agudas, uma análise adicional de CDw65 e CD117 pode aumentar a sensibilidade para a detecção de células mielóides. A pesquisa de mieloperoxidase (MPO), associada à CD13/CD33 (mielóide), CD79 e CD19 (células B), CD3 com CD7 (células T), identificam 98% das leucemias agudas (Yenerel, Sargin, 1991). Contudo, a expressão de CD7, presente em LLA-T, foi relatada em 10% dos casos de LMA (Reilly et al., 1996). O antígeno HLA-DR também é encontrado em outras linhagens de células e sugerem um estágio de imaturidade ou ativação de células T, mas são também encontradas em células B (Béné et al., 1999). Em linhagem de célula B (LLA-B), a expressão de CD10 (CALLA) é um fator prognóstico favorável (Lebien, McCormack, 1989; Rego et al., 1999).

Além das leucemias agudas monocíticas e linfocíticas, outras leucemias agudas também são observadas em alguns pacientes. A **doença residual mínima** ocorre quando após o tratamento farmacológico, o paciente entra em remissão, e as células leucêmicas residuais presentes são indetectáveis pelo exame morfológico, ou seja, encontram-se em número abaixo de 5% das células da medula óssea, podendo multiplicar-se, causando recidivas. Segundo Béné et al. (1999) e Vidriales et al. (2003) para monitorar o paciente, aconselha-se associar técnicas de investigações cromossômicas e imunofenotipagem com análise multiparamétrica de citometria de fluxo envolvendo amplo painel de anticorpos monoclonais, com o objetivo de detectar possíveis células malignas remanescentes. Béné et al. (1999)

relataram também que a imunofenotipagem (IFT) possui alta sensibilidade para detectar baixo número de células anormais ($\leq 10^{-4}$ células). A doença residual mínima é considerada um fator prognóstico em LMA (Drexler et al., 1988), pois a detecção de blastos leucêmicos residuais tem alto valor em recidivas.

A **leucemia aguda bifenotípica** é uma transformação maligna de células progenitoras pluripotentes hematopoéticas que são capazes de diferenciar-se em mielóide ou linfóide. Caracteriza-se pela expressão de ambos marcadores linfóides e mielóides em uma mesma célula que podem ser detectados utilizando anticorpos monoclonais. Contudo, o uso de anticorpos monoclonais para estabelecer a linhagem hematopoética tem sido freqüentemente criticado, pois, sua reatividade pode não ser restrita a uma única linhagem. A leucemia bifenotípica corresponde de 13 a 39% dos casos de leucemias agudas (Khalil et al., 1995; Stasi et al., 1995). Foi relatado que a freqüência de antígenos linfóides em LMA varia de 2 a 60%, dependendo do painel de anticorpos monoclonais empregados e de fatores técnicos. Além disto, alguns marcadores como CD7, CD13 e CD33 não são totalmente específicos para as linhagens mielóide ou linfóide durante o estágio de maturação (Stasi et al., 1995).

A **leucemia aguda indiferenciada** é de difícil diagnóstico, em função da dificuldade em identificar a linhagem celular envolvida, pois as células mostram traços morfológicos e citoquímicos semelhantes. Com a utilização de técnicas envolvendo anticorpos, esta dificuldade diminuiu, mas não o suficiente (Stasi et al., 1995). Em 2 a 3% dos casos de leucemias agudas em adultos e em 1% dos casos em crianças, mesmo com o emprego de um amplo painel de marcadores, ainda não é possível determinar a linhagem celular específica (Bennett et al., 1991; van't Veer, 1992; Stasi et al., 1995).

São descritos também outros fenótipos das leucemias agudas, como as formas que afetam as células NK (CD2, CD7, CD19,

CD56), contudo são doenças muito raras (Basso et al., 2001).

DIAGNÓSTICO

Segundo Jacobs, Wood (2002) o diagnóstico clínico das leucemias agudas geralmente é feito por acaso, em um exame de rotina médico, quando o hemograma é sugestivo pela apresentação de linfocitose. O hemograma apresentará contagem de plaquetas diminuída e no esfregaço sangüíneo (formas das células) serão observados os sinais de infecção que incluem neutrófilos multi-segmentados, aumento na porcentagem de linfócitos ou granulações tóxicas nestas células, e o número de células brancas por mm^3 de sangue está freqüentemente normal. Outros exames como os de coagulação sangüínea, os testes químicos de rotina (eletrólitos, creatinina, etc.), o esfregaço da medula óssea e, algumas vezes a biópsia da medula óssea podem ser utilizados como complementares para o diagnóstico.

Nas últimas três décadas houve progresso no diagnóstico em função do desenvolvimento de novas metodologias, e como conseqüência, a detecção precoce das leucemias agudas, que antes invariavelmente era fatal (Wang et al., 1995). Metodologias mais avançadas como a imunofenotipagem, a citogenética e a biologia molecular são indicadas para o diagnóstico (Stasi et al., 1995; Reilly et al., 1996). A imunofenotipagem eleva para 99% o percentual de casos corretamente classificados, permitindo identificar a linhagem celular e os diferentes estágios de maturação da célula. A citometria de fluxo é o método preferido para a análise das linhagens e da maturação das células nas leucemias, pois a utilização de anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos permite determinar múltiplos antígenos co-expressos em uma única célula. Sendo assim, a imunofenotipagem multi-paramétrica permite a detecção de antígenos aberrantes co-expressos e a análise de clones e da heterogeneidade de células leucêmicas (Del Vecchio et al., 2004).

O tratamento adequado da doença dependerá do diagnóstico correto, pois a

conduta médica a ser tomada como a escolha do protocolo farmacológico (que são vários e específicos para cada tipo celular envolvido), o prognóstico da doença e a detecção da doença residual mínima dependem essencialmente da definição do tipo celular envolvido na patologia (Pui et al., 2008). No Brasil o tratamento de LMA é realizado, de modo geral, segundo normas preconizadas internacionalmente (Lorand-Metze, 2003).

IMUNOFENOTIPAGEM (IFT)

A imunofenotipagem, com a utilização da citometria de fluxo, tem se tornado uma importante ferramenta no diagnóstico de doenças malignas hematológicas. A IFT detecta antígenos de superfície, citoplasmático e nuclear, expressos por células leucêmicas. A citometria de fluxo é um método rápido e objetivo que permite a determinação simultânea de múltiplas propriedades físicas de partículas isoladas em suspensão, como, as células (Mahnke, Roederer, 2007). Trata-se de um método especial que detecta e identifica os marcadores celulares expressos em cada tipo e subtipo das leucemias agudas, mostrando em que estágio de desenvolvimento encontra-se o clone leucêmico. A caracterização das leucemias por imunofenotipagem é particularmente útil quando a morfologia é de difícil interpretação, identificando os subtipos particulares de leucemias não reconhecidos pelos critérios morfológicos, que podem ter significância prognóstica (Drexler et al., 1988; Béné et al., 1999; Martins, Falcão, 2000).

A IFT também pode elucidar pontos importantes para o prognóstico e terapia das leucemias agudas. A técnica é indicada, por exemplo, na classificação das leucemias indiferenciadas linfóides ou mielóides, na subclassificação de leucemias, na identificação de leucemias bifenotípicas, na monitoração de terapias, na doença residual mínima ou recorrente, na avaliação da leucocitose, etc. (Drexler et al., 1988; Béné et al., 1999). Mais recentemente, muitos avanços na instrumentação, como o uso de “software” e a disponibilidade de múltiplos fluorocromos têm facilitado a imunofenotipagem multi-

paramétrica. As vantagens da IFT multi-paramétrica são a análise diferencial de células normais e anormais em espécimes de sangue periférico ou medula óssea (<http://www.meds.com/leukemia/flow/flow0.html>) e a detecção simultânea de marcadores múltiplos em populações de células distintas. Resultam assim, na detecção rápida e objetiva de antígenos aberrantes co-expressos, bem como a capacidade para analisar a heterogeneidade e a clonalidade das células malignas (Perfetto et al., 2004).

A IFT baseia-se na reação antígeno-anticorpo, utilizando-se anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos como a ficoeritrina (PE), o isotiocianato de fluoresceína (FITC) e a alofocianina (APC) na identificação dos diferentes marcadores celulares, os quais podem ser intracitoplasmáticos e/ou de superfície celular (Rothe, Schmitz, 1996; Wood et al., 2007). Sugere-se um painel mínimo de combinações de anticorpos e fluorocromos para a imunofenotipagem, capaz de identificar e caracterizar as leucemias agudas com um número limitado de anticorpos (Perfetto et al., 2004).

Algumas recomendações devem ser observadas para a execução da IFT. A primeira requer que as células (medula óssea, linfonodo ou sangue) sejam recém coletadas, para que desse modo produzam resultados em poucas horas. A segunda é que o material coletado deve ser cuidadosamente misturado com anticoagulante (EDTA, heparina ou ACD) e rapidamente transportado, em temperatura ambiente, para o laboratório que realizará a citometria de fluxo e preferencialmente, deve ser analisado até 24 horas após a coleta. Esse material deve ser separado para análises pelo gradiente de centrifugação utilizando solução de ficoll hypaque (Basso et al., 2001; Béné, 2005).

O conhecimento do número de células patológicas na medula óssea e sangue periférico é importante para o diagnóstico das várias condições de leucemias. Por exemplo, de acordo com a classificação FAB, o diagnóstico diferencial de LLA ou de

síndromes mielodisplásticas e da LMA é baseado na porcentagem de células blásticas na medula óssea (Basso et al., 2001).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico específico das leucemias agudas requer sempre a citologia e, freqüentemente, a citoquímica e a imunofenotipagem. A importância da imunofenotipagem como método de diagnóstico rápido em leucemias agudas está estabelecido, permitindo definição correta da linhagem celular e subtipos em cerca de 99% dos casos. O uso dos marcadores celulares tem papel importante por ajudar na determinação da estratégia a ser utilizada no tratamento farmacológico, assim como na seleção de células para o transplante. A utilidade da citometria de fluxo depende do painel dos anticorpos escolhidos, do entendimento desta metodologia e do conhecimento dos marcadores antigênicos necessários para a alta qualidade da IFT. A interpretação dos resultados deve compreender a história clínica do paciente e os outros testes diagnósticos realizados. Pois, de um diagnóstico correto e preciso dependerá a escolha do tratamento adequado e o prognóstico da doença.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Thaís Gomes Verzignassi Silveira pela revisão do manuscrito e à Profª Drª Rosilene Fressati Cardoso pela revisão do abstract.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Basso G, Buldini B, De Zen L, Órfão A. New methodological approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica*. 2001;86:675-92.
Béné MC. Immunophenotyping of acute leukaemias. *Immunol Lett*. 2005;98:9-21.
Béné MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia*. 1995;9:1783-6.
Béné MC, Bernier M, Castoldi G, Faure GC, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Órfão A, van't Veer MB. Impact of immunophenotyping

on management of acute leukemias. *Haematologica*, 1999;84:1024-34.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33:451-8.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. - The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: Concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol*. 1981;47:553-51.

Bennett J M, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French American British Cooperative Group. *Ann Int Med*. 1985;103:620-5.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Proposal for the recognition of minimal differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0). *Br J Haematol*. 1991;78: 325-9.

Colby-Graham FM, Chordas C. The childhood leukemias. *J Pediatr Nurs*. 2003;8(2):87-95.

Del Vecchio L, Brando B, Lanza F, Ortolani C, Pizzolo G, Semenzato G, Basso G. Recommended reporting format for flow cytometry diagnosis of acute leukemia. *Haematologica*. 2004;89:594-8.

Drexler HG, Gignac SM, Minowada J. Routine immunophenotyping of acute leukemias. *Blut*. 1988;57:327-39.

Farias MG, Castro SM. Diagnóstico Laboratorial da Leucemias Linfóides Agudas. *J Bras Patol Med* 2004;40:91-8.

Ghaddar HM, Estey EH: Acute Myelogenous Leukemia. In Pazdur R: *Medical Oncology - A Comprehensive Review*, 2nd ed, New York: PRR Inc, 1996. p.27-36.

<http://www.labcorp.com/datasets/labcorp/html/chapter/mono/dp000100.htm>. Acute Leukemia Profile, Flow Cytometry. Acesso em 06.06.2004.

<http://www.meds.com/leukemia/flow/flowO.html> Atlas with Flow Cytometry in AML. Leukemia Library. Acesso em 05.05.2008.

<http://www.meds.com/leukemia/facts/facts.html>. Atlas, Facts, & Current Treatment Trends in AML. Acesso em 05.05.2008.

Jacobs P, Wood L. Chronic Lymphocytic Leukemia – the haematologic basis for diagnosis and treatment. *Haematology*. 2002;7:33-41.

- Jean CYW, Beure GP, Soamboonsrup P, Neame PB. Monoclonal Antibodies in the Management of Acute Leukemia. *Am J Haematol*. 1995;50:188-99.
- Khalil SH, Jakson JM, Pyle HH, Robichaud M. Immunophenotyping of acute leukemia at King Faisal specialist hospital and research center. *Ann Saudi Med*. 1995;15:137-9.
- Kroetz FM, Czylusniak GD. Alterações bucais e condutas terapêuticas em pacientes infanto-juvenis submetidos a tratamentos anti-neoplásicos. *UEPG Ci Biol Saúde, Ponta Grossa*, 2003;9(2):41-8.
- Lackritz B. Leukemia Introduction. *CancerLynx*, 2003. Disponível em: <http://www.cancerlynx.com/leukemia.html>. Acesso em 05.05.2008.
- Lebien TW, McCormack RT, The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10) - Emancipation from a functional enigma. *Blood*. 1989;73:625-35.
- Lorand-Metze I. O tratamento da Leucemia Mielóide Aguda no Brasil: o que já progredimos e o que podemos melhorar. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2003;25(1):1-2.
- Mahnke YD, Roederer M. Optimizing a Multi-colour Immunophenotyping Assay. *Clin Lab Med*. 2007;27(3):469-85.
- Martins SLR, Falcão RP. A importância da imunofenotipagem na Leucemia Mielóide Aguda. *Rev Assoc Med Bras*. 2000;46(1):57-62.
- McKenna, S.J. Leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000;89(2):137-9.
- Mendonça N. Leucemia mielóide aguda na criança: como andamos no Brasil? *J Pediatrics*. 2003;79:476-7.
- Meadows AT, Belasco JB, Sinntah D. Leucemia linfoblástica oncológica prática. Rio de Janeiro: Revinter; 1995. p.295-305.
- Oliveira BM, Deniz MS, Viana MB. Leucemias agudas na infância. *Rev Méd Minas Gerais*. 2004;14(1 Supl 1):S33-S9.
- Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:648-55.
- Pui C-H, Behm FG, Crist WM. Clinical and Biologic Relevance of Immunologic Marker Studies in Childhood. *Acute Lymphoblastic Leukemia*. *Blood*. 1993;82(2):343-62.
- Pui C-H, Boyett JM, Relling MV, Harrison PL, Rivera GK, Behm FG, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Gajjar A, Evans WE. Sex Differences in Prognosis for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*. 1999;7(3):818-24.
- Pui C-H, Robson LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008; 371:1030-43.
- Quade G. Adult acute myeloid leukemia. *Med News Nat Cancer Inst*. 2002;2:243-58.
- Rego EM, Tone LG, Garcia AB, Falcao RP. CD10 and CD19 fluorescence intensity of B-cell precursor in normal and leukemic bone marrow. Clinical characterization of CD10^{strong} and CD10^{weak} common acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 1999;23: 441-50.
- Reilly JT, Bain BJ, England JM, Hyde K, Matutes E, Murphy M, Stephens A, Wood JK. The role of cytology, cytochemistry, immunophenotyping and cytogenetic analysis in the diagnosis of haematological neoplasms. *Clin. Lab. Haematol*. 1996;18:231-6.
- Rothe G, Schmitz G. Consensus Document on Leukemia Immunophenotyping. European Working Group on Clinical Cell Analysis (EWGCCA). *Leukemia*. 1996;10:877-95.
- Silva GC, Pilger DA, Castro SM, Wagner SC. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(2):77-84.
- Stasi R, Taylor CG, Venditti A, Del Poeta G, Aronica G, Bastianelli C, Simone MD, Buccisano F, Cox MC, Bruno A, Piccioni D, Abruzzese E, Sargent JM, Tribalto M, Amadori S. Contribution of immunophenotypic and genotypic analysis to the diagnosis of acute leukemia. *Ann Hematol*. 1995;71: 13-27.
- van't Veer MB. The diagnosis of acute leukemia with undifferentiated or minimal differentiated blast. *Ann Hemaol*. 1992;64:161-5.
- Vidriales MB, Orfao A, San-Miguel JF. Immunologic monitoring in adults with acute lymphoblastic leukemia. *Curr Oncol Rep*. 2003;5:413-18.
- Yenerel MN, Sargin D. Immunophenotyping of acute myeloid leukemia by alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase immunocytochemical technique. *Med Bull*. 1991;32:1.
- Wang JC, Beauregard P, Soamboonsrup P, Neame PB. Monoclonal antibodies in the management of acute leukemia. *Am J Hematol*. 1995;50:188-99.
- Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, Oldaker T, Shenkin M, Stone E, Wallace P. 2006 Bethesda International Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematolymphoid Neoplasia by Flow Cytometry: Optimal Reagents

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

and Reporting for the Flow Cytometric Diagnosis of Hematopoietic Neoplasia. Cytometry Part B (Clinical Cytometry). 2007;728:S14-S22.

Recebido em: 10.01.07

Aceito em: 24.06.08

Revista indexada no *Periodica*, índice de revistas Latino Americanas em Ciências <http://www.dgbiblio.unam.mx> (ISSN 1980.959X).

Continuação de: Arquivos da Apadec (ISSN 1414.7149)