



Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas.

Rayssa Geovanna Pereira Borges

A importância da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico e monitoramento das leucemias linfoides agudas

Goiânia, 2020.

Rayssa Geovanna Pereira Borges

A importância da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico e monitoramento das leucemias linfoides agudas

Trabalho de conclusão de curso pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás, curso de Ciências Biológicas Modalidade Médica.

Área de Concentração: Hematologia/Imunologia **Orientador (a):** Dra. Valéria Bernadete Leite Quixabeira.

Goiânia-Go,2020.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dra.: . Valéria Bernadete Leite Quixabeira - Orientadora.

Prof. Sc- Renato Matheus Souza - Banca examinadora.

Prof. Dr. Hermínio Maurício da Rocha Sobrinho - Banca examinadora.

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado em: 23/10/2020 as 9:50h (TEAMS).

Goiânia, 2020

Sumário

2. OBJETIVOS	8
2.1 GERAL.....	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
3. METODOLOGIA	9
4. DESENVOLVIMENTO	

RESUMO

As leucemias linfoides agudas são um conjunto de doenças linfoproliferativas malignas, que se originam por desajustes na medula óssea vermelha e no timo. A leucemia linfóide aguda é uma enfermidade que acomete preferencialmente indivíduos em idade infantil, pode ser classificada em B ou T. Os sinais e sintomas podem se manifestar nos pacientes da seguinte maneira: Febre como causa primária ou secundária a leucemia, fadiga, anemia, trombocitopenia, dores ósseas; dentre outros sintomas frequentes, também estão associados a adenomegalia, hepatomegalia e esplenomegalia. Sabe-se que os órgãos linfoides tanto primários (medula óssea e timo) quanto secundários (baço, tonsilas e adenoides) estão diretamente ligados neste processo. A imunofenotipagem por citometria de fluxo participa diretamente do diagnóstico e monitoramento, auxiliando no manejo clínico dos pacientes. A citometria de fluxo é uma metodologia utilizada para o estudo fenotípico e funcional de células que são preparadas em suspensão. Devido à sua capacidade ímpar de analisar vários parâmetros simultaneamente numa única célula, a citometria de fluxo se tornou a técnica de escolha para análises multiparamétricas celulares.

Palavras-Chave: leucemias, leucemia linfoides agudas, Citometria de fluxo, imunofenotipagem.

1. INTRODUÇÃO

As leucemias linfoides aguda são um conjunto de doenças linfoproliferativas malignas, que se originam por desajustes na medula óssea vermelha e no timo. As leucemias linfoides aguda de linhagem do tipo B foram classificadas nos grupos: pró-B, comum, pré-B e B maduro. A LLA do tipo comum (Calla) expressa CD10, o que causa um impacto favorável no prognóstico e expressa também CD22(c) no citoplasma e CD19 e/ou CD20; representando 75% dos casos de leucemia infantil e 50% dos casos em adultos. A leucemia pré-B expressa cadeia pesada μ citoplasmática, em adição a expressão de CD19, CD20 e CD10 e representa aproximadamente, 15% dos casos em crianças e 10% dos casos em adultos. (1)

Finalmente, a LLA do tipo pró-B representa 5% dos casos em crianças e 10% em adultos, enquanto, a do tipo B maduro, está presente em 2% a 5% de crianças e adultos, apresenta um fenótipo incomum, caracterizado pela expressão de cadeias leves de imunoglobulina na superfície de membrana (SmIg) (2,3). As LLAs de linhagem T dividem-se em três subgrupos, de acordo com os antígenos de diferenciação correspondentes aos níveis de diferenciação intratímica normal: LLA pré-T, T-intermediário e maduro. Na LLA pré-T, as células expressam CD3(c) no citoplasma, mas não na superfície celular, expressando caracteristicamente CD7, CD2, CD5 e TdT. Na LLA do tipo T intermediário, as células passam a expressar fortemente CD3(c), CD2, CD1a e podem co-expressar CD4 e CD8. A leucemia linfoblástica aguda tem como característica ser mais comum em crianças entre dois e cinco anos segundo os dados isso representa cerca de $\frac{1}{4}$ dos casos, manifestando em crianças do sexo masculino em maior frequência. Com maior incidência em pacientes com síndrome Down, síndrome de Bloom, neurofibromatose tipo I e ataxia-telangiectasia. Os fatores ambientais, a exposição intrauterina a radiação, exposição a pesticidas e solventes; também foram associadas ao risco de desenvolver LLA na infância. (4)

Para diagnóstico das leucemias são avaliados: a cito morfologia, o imunofenotipo e as alterações genéticas dos linfoblastos. Inicialmente o paciente manifesta um processo de produção celular na medula óssea exacerbado, que se manifesta no sangue periférico como leucocitose entre outros sintomas. (4,5)

Sendo a imunofenotipagem por citometria de fluxo uma das principais formas de diagnóstico das leucemias, o objetivo deste trabalho será demonstrar sua importância no diagnóstico e monitoramento das leucemias linfoides agudas. (6)

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Evidenciar a importância da citometria de fluxo no diagnóstico e monitoramento das leucemias linfoides agudas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Entender a atuação da citometria nas doenças degenerativas hematológicas com ênfase nas leucemias com foco na detecção primária dessas enfermidades.

3. METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão narrativa sobre o tema proposto, a fim de aprimorar o conhecimento referente aos aspectos relevantes sobre o uso da citometria de fluxo como ferramenta para diagnóstico e monitoramento nas leucemias linfoides agudas. Os artigos utilizados foram de 1999 a 2019, o critério de escolha foi baseado em artigos científicos (experimentais ou revisões), dissertações e teses. A pesquisa foi realizada em bancos de dados indexados (PubMed, Scielo, NCBI) usando as palavras chave: leucemia linfóide aguda, citometria de fluxo, imunofenotipagem, diagnóstico e monitoramento no idioma inglês.

4.DESENVOLVIMENTO

4.1 Sintomatologia nas Leucemias Linfoides Agudas

Nas LLA linfoides agudas Os sinais e sintomas podem se manifestar nos pacientes da seguinte maneira: Febre como causa primária ou secundária a leucemia, fadiga, anemia, trombocitopenia, dores ósseas; dentre outros sintomas frequentes, também estão associados a adenomegalia, hepatomegalia e esplenomegalia. Sabe-se que os órgãos linfoides tanto primários (medula óssea e timo) quanto secundários (baço, tonsilas e adenoides) estão diretamente ligados neste processo. Órgãos não linfoides tais como o sistema nervoso central, testículos, ossos e pele também podem ser acometidos.(6)

A artrite pode ser crônica ou recorrente, ocorrendo em poucas articulações e de forma desregulada, podendo ser metástase. Obtém-se com maior frequência em crianças com LLA de células B e leucometria baixa.(7)

Os pacientes com LLA-T podem manifestar também: sintomas respiratórios e derrame pleural decorrente a massa mediastinal anterior. (8)Está descrito que os principais parâmetros para o diagnóstico das leucemias linfoides agudas são: 1. Avaliação das células hematológicas (normais ou anômalas); Caso seja anômala, definir qual linhagem (linfoide ou mieloide) e sublinhagem (tipo B ou T) está alterada; 2. Definição de fase maturativa das células: imaturas (leucemias/ linfoma linfoblastico B ou T) ou maduras (linfomas B ou T). (8)

A imunofenotipagem por citometria de fluxo participa diretamente auxiliando no manejo clínico dos pacientes tanto no momento do diagnóstico quanto do acompanhamento. 9

4.2 Aspectos gerais e fundamentos da citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma metodologia utilizada para o estudo morfológico, fenotípico e funcional de células suspensas em um fluido líquido. Devido à sua capacidade ímpar de analisar vários parâmetros simultaneamente numa única célula, a Citometria de fluxo se tornou a técnica de escolha para análises multiparamétricas em células. Os citômetros de fluxo são resultado do desenvolvimento de uma variedade de ferramentas e da aplicação de técnicas desenvolvidas na área da computação; da biotecnologia (produção de anticorpos monoclonais e de fluorocromos); da tecnologia da radiação LASER; e da eletrônica, possibilitando a avaliação

de características físicas, químicas e biológicas de vários tipos celulares (humano, modelos experimentais, protozoários, fungos, bactérias). (10)

4.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo nas Leucemias Linfoides Agudas

Nos dias atuais a imunofenotipagem por citometria de fluxo consiste em um mecanismo mais relevantes para a definição de frequência das subpopulações celulares dentro de um conjunto amostral heterogêneo, e permite principalmente, analisar o perfil de expressão molecular nas células, estabelecendo o fenótipo individual das mesmas, através da imunomarcagem de antígenos de superfície celular ou intracitoplasmáticos com anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos. Estes antígenos de superfície são também conhecidos como grupos de diferenciação celular (clusters designations -CD) e são classificados em grupos de linhagem, sublinhagem, atividade funcional e grau maturativo das células que compõem as distintas populações evidenciadas por citometria de fluxo. A imunofenotipagem auxilia fortemente na execução de diagnósticos clínicos, determinação de progressão da doença, monitoramento da resposta e/ou eficácia de tratamento; separação de células com determinado fenótipo para ensaios celulares funcionas in vitro, transferência celular autóloga ou adotiva para e análises de expressão gênica, proteica e metabólica de uma população celular específica. Estes CD são moléculas proteicas estudadas considerando a ontogenia das linhagens celulares hematológicas (eritrocítica, granulocítica, monocítica, linfocítica [T, B e NK] e megacariocítica). Desta forma, foi demonstrado nos trabalhos selecionados, que há grupos de diferenciação (CD) exclusivos a determinada linhagem e grupos que podem ser expressos em linhagens diferentes de acordo com o grau maturativo e funcional das mesmas. Segue abaixo as tabelas 1 e 2, referentes aos CD da linhagem linhagem linfoide B e linhagem linfoide T (Tabela 1 e 2). (10,11)

Tabela 1- Grupos de diferenciação celular da linhagem linfoide B

Imunofenótipo dos Linfócitos B	Função
CD 20	Canal de cálcio e ativação das células.B
CD19	Ativação das células b
CD22	Molécula de adesão celular.
CD79b	MB-1 transdução de sinal da Ig de superfície para o citoplasma
CD10	Endopeptidase neutra
IgSm	Co-receptor celular
NTdT	Caracterização fenotípica das células leucemicas

CD34	A expressão da molécula CD34 identifica uma célula CD34+ já comprometida, enquanto um fenótipo CD34+ e CD38+ identifica uma subpopulação de células tronco hematopoéticas mais comprometidas.
------	---

Tabela 2 Grupos de diferenciação celular da linhagem linfóide T

Imunofenótipo dos Linfócitos T	Função
CD3	Pan linfócito T
CD2	Interage com outras moléculas de adesão, como o antígeno-3 linfócito-funcional (LFA-3/CD58) em humanos, ou o CD48 em roedores, o qual é expressado na superfície de outras células
CD5	Serve para mitigar sinais do BCR de forma que as células B-1 podem ser ativadas apenas por estímulos intensos (como proteínas bacterianas) e não por proteínas tissulares normais
CD4	Reconhecem os peptídeos ligados às moléculas do MHC de classe II.
CD1a	Células e funções Antígeno CD Células Funções CD1 a Timócitos, células dendríticas, linfócito B (CD1c), células do epitélio intestinal (CD1d) Molécula semelhante ao MHC de classe I, especializada na apresentação de antígeno.
CD8	Reconhecem seletivamente peptídeos que são ligados às moléculas do MHC de classe I, e as células T CD4 reconhecem os peptídeos do MHC de classe I.
nTdT	Caracterização fenotípico das células leucêmicas

CD34	A expressão da molécula CD34 identifica uma célula CD34+ já comprometida, enquanto um fenótipo CD34+ e CD38+ identifica uma subpopulação de células tronco hematopoéticas mais comprometidas.
------	---

5. CONCLUSÃO

As Leucemias Agudas Linfóides são doenças graves e com sintomatologia bem definida na literatura. Podem ocorrer em qualquer faixa etária, tendo maior incidência em crianças e adultos jovens. São entidades provocadas por alterações genéticas a nível das células hematopoiéticas linfóides precursoras, que provocam a proliferação descontrolada e assíncrona destas células com alteração do fenótipo. Sendo assim, o diagnóstico precoce e correto é de extrema importância para a sobrevivência dos pacientes.

Por isso, a imunofenotipagem por citometria de fluxo é considerada ferramenta importante para diagnóstico e monitoramento destas doenças. A citometria de fluxo por ser uma técnica multiparamétrica e com alta sensibilidade permite identificar com acurácia o clone leucêmico.

Porém, ressalta-se que é necessário a realização do diagnóstico e acompanhamento das LLAs, também por técnicas de citogenética e biologia molecular para classificação diagnóstica definitiva, escolha de protocolo de tratamento e prognóstico da doença.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Lyon : LARC 2008.
2. Lee MLM. Leucemia linfóide aguda. In: Carvalho ES, Carvalho WB. Terapêutica Prática Pediátrica 2000;1251-5.
3. KOTILO, P. N. Flow cytometric analysis in diagnostic hematology. In: RODAK, B. F. *Diagnostic Hematology*. Saunders Company, 1995
4. Gleissner B, Goekbuget N, Rieder H, et al. acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a distinct high-risk subgroup of adult ALL associated with a high frequency of MLL aberrations results of the german multicenter trials for adult ALL (GMALL). *Blood*. {Multicenter Study}. 2005 Dec 15: 106 (13): 4054-6.
5. Racke FK, Borowitz MJ. Precursors B-and T- cell Neoplasms In: Jaffe ES, Harris NL, Vardiman JW, Campo E, Arber DA, editors. *Hematopathology*. Philadelphia: Saunders/ Elsevier: 2011. P. 629-38
6. Sack U, Tárnok A, Rothe G. *Cellular Diagnostics. Basic Principles, Methods and Clinical Applications of Flow Cytometry*. Karger: 2009. 738p.
- 6..HENRY, John Bernard. *Diagnósticos clínicos e tratamentos por método laboratoriais*. 19ª edição, São Paulo: editora Manole, 1999.
7. Trapani S, Grisolia F, Simonini G, Calabri GB, Falcini F. Incidence of occult cancer in children presenting with musculoskeletal symptoms: A 10- year survey in a pediatric rheumatology unit. *Semin Arthritis Rheum*. 2000;29:348-59.
7. Cabral DA, Tucker LB. Malignancies in children who initially present with rheumatic complaints. *J Pediatr*. 1999;134:53-7.
8. Kebriaei P, Anastasi J, Larson, RA. Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and classification. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2003; 15: 597-21.
9. Quixabeira VBL, Saddi VA. A importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. *RBAC*, vol. 40(3): 199-202, 2008.
10. W SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004 Aug;4(8):648-55. Sack U, Tárnok A, Rothe G. *Cellular*

Diagnostics. Basic Principles, Methods and Clinical Applications of Flow Cytometry. Karger: 2009. 738p. Shapiro HM. Practical Flow Cytometry. 4th ed. Wiley-Liss; 2003. 736 p.

11. Vaz AJ, Takei K, Bueno EC. Imunoensaios: Fundamentos e Aplicações. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

12. Pullen J, Shuster JJ, Link M, Borowitz M, Amylon M, Carroll AJ, et al. Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphocytic leukemia (ALL), as compared to those with B-precursor ALL. A Pediatric Oncology Group (POG) study. *Leukemia*. 1999;13:1696–707.

12. Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, Hubeek I, van Drunen E, Beverloo HB, et al. TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;96:1094–6.

13. Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemias. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:118–45.