

A INFLUÊNCIA DA CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS LEUCEMIAS LINFOIDES

THE INFLUENCE OF IMMUNOPHENOTYPING BY FLOW CYTOMETRY ON LYMPHOID LEUKEMIAS

Reinan Sena da Costa¹

Luciana Souza de Aragão-França²

Larissa Rolim Borges-Paluch³

Helena Mariana Pitanguiera Teixeira⁴

Ana Paula Castro Melo⁵

As leucemias linfoides podem ser classificadas em leucemia linfoblástica aguda - LLA ou leucemia linfocítica crônica - LLC, do tipo T ou B. O objetivo do estudo foi determinar os principais marcadores imunológicos e os avanços da imunofenotipagem por citometria de fluxo (ICF). Realizou-se uma revisão descritiva nos bancos e bases de dados da *PubMed/Medline*, *SciELO*, *CAPES*, *BVS*, *ScienceDirect*, e nos sites do MS (DATASUS), INCA MedicinaNet do período de 2008-2016. Os principais marcadores descritos para diagnóstico da LLA-T são CD1a, CD2, *TCRαβ*, *TCRγδ*, CD3 Cit/Sm e para LLA-B CD10, CD19, CD20, CD22c, CD79a/b, *Kappa* ou *Lambda* e IgM. Na LLC-T os marcadores CD4, CD7, CD8, CD3, TCR alfa/beta, CD1a foram mais apontados, os CD23, CD20, CD19, CD22 (fraco), CD10, CD79b (fraco ou ausente), FMC7 (fraco ou ausente) são mais utilizados para determinar a LLC-B. Conclui-se desta revisão que a ICF apresenta alta especificidade, sensibilidade, resultados rápidos e precisos no diagnóstico da LLA e LLC.

Palavras-chave: Leucemia. Imunofenotipagem. Diagnóstico.

Lymphoid leukemia can be classified in acute lymphocytic leukemia (ALL) or chronic lymphocytic leukemia (CLL) of type T or B. The objective of this review was to determine the main immunologic markers and the advances of the immunophenotyping by flow cytometry (IFC). A descriptive review was carried out comprising the period of 2008 to 2016 in the following data-bases: PubMed/Medline, SciELO, CAPES, BVS, ScienceDirect, and in the sites of MS (DATASUS), INCA MedicinaNet. The most frequently used markers for ALL-T diagnosis were CD1a, CD2, TCRαβ, TCRγδ, CD3 Cit/Sm and for ALL-B CD10, CD19, CD20, CD22c, CD79a/b, Kappa or Lambda and IgM. In the case of CLL-T the most frequent markers were CD4, CD7, CD8, CD3, alpha TCR/beta, CD1a. The CD23, CD20, CD19, CD22 (weak), CD10, CD79b (weak or absent), FMC7 (weak or absent) were more used to determine the CLL-B. We might conclude that the IFC presents high specificity, sensitivity, fast and accurate results in ALL and CLL diagnosis.

Keywords: Leukemia. Immunophenotyping. Diagnosis.

¹Biomédico Habilitado em Análises Clínicas e Imagenologia da Faculdade Maria Milza (FAMAM). reinansena84@hotmail.com, <http://lattes.cnpq.br/9435691713736413>

²Graduação em Ciências Biológicas Modalidade Médica da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Mestrado em Imunologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Doutorado em Biotecnologia em saúde e medicina investigativa da Fundação Gonçalo Muniz (FIOCRUZ- BA), Pesquisador I - Centro de Biotecnologia e Terapia Celular - CBTC, Hospital São Rafael. luaragao@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/0017250972110423>

³Doutorado, Mestrado e Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Docente do Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente da FAMAM. larissapaluch@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/7311866858164682>

⁴Bacharel em Biotecnologia – UFBA, Mestranda em Imunologia – PPGIm. <http://lattes.cnpq.br/9273586038997316>

⁵Bióloga da Universidade Católica de Salvador (UCSAL), Mestre em Biotecnologia-(UEFS/FIOCRUZ), doutoranda em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia (UFBA) Docente da FAMAM. a.p.melo@hotmail.com, <http://lattes.cnpq.br/7313392574776536>

INTRODUÇÃO

A medula óssea é um importante tecido hematopoietico responsável pelo desenvolvimento das células sanguíneas. Fisiologicamente sua produção é controlada por um sistema de divisão celular, no entanto, quando defeituoso perde o controle e gera a produção anormal das células sanguíneas, podendo acarretar quadros leucêmicos (SANTOS et al., 2014).

A leucemia é uma neoplasia hematológica classificada em mielóide ou linfóide, dependendo da linhagem acometida, podendo ser aguda ou crônica. As leucemias são caracterizadas principalmente pela presença de blastos ou clones de células progenitoras anormais que condicionam aumento desregulado na medula óssea e substituição de células normais na corrente sanguínea (SILVA; ZANDONADE; ZOUAIN-FIGUEIREDO, 2014). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas de câncer para 2012-2013 foram de mais de 518.510 novos casos, e estimou-se que no Brasil seria de aproximadamente 8.510 (BRASIL, 20104). No entanto, a realidade superou esse dado, sendo registradas 149.858 novas internações de pacientes com leucemias no país para o período (DATASUS, 2015).

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é um distúrbio maligno das células progenitoras das linhagens linfóides. É subdividida em tipo T e tipo B e tem como característica principal o aumento das células jovens estagnadas em um dos estágios da maturação celular. Os principais indicativos são elevações no número de blastos na medula óssea e sangue periférico, prejuízo na produção das hemácias, plaquetas e glóbulos brancos maduros (HAMERSCHLAK, 2008).

A LLA cursa, geralmente, com anemia normocítica/normocrômica, neutropenia, plaquetopenia e aumento no número de blastos, o mielograma apresenta células jovens difusas. Corresponde entre 75% a 80% das leucemias agudas na infância (entre 2 a 5 anos de idade) e 20% a 25% nos adultos. Entretanto, as crianças apresentam uma maior taxa de sobrevida (MICHEL, 2008). As crianças do sexo masculino e indivíduos com ataxia-telangiectasia, trissomia do cromossomo 21, síndrome de Bloom e neurofibromatose tipo I tem maior probabilidade de adquirirem LLA (HAMERSCHLAK, 2012; BRASIL, 2014;).

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é uma neoplasia que apresenta malignidade e afeta as células maduras da linhagem linfóide (GARCÍA-

CANDEL et al., 2012). É uma doença heterogênea com aumento gradativo do número de linfócitos no sangue periférico e órgãos do sistema imunológico. É considerada a leucemia mais vista pelos hematologistas e sua prevalência aumenta com a idade. Apresenta baixa incidência em indivíduos <50 anos e maior incidência acima dos 70 anos (2:1) (BYRD, 2015).

A etiologia da LCC até o presente momento não está totalmente definida, pois não foi demonstrada relação direta com radiações e poucos casos apresentaram relação com o meio ambiente, vírus ou agentes tóxicos (GARCÍA-MARCO et al., 2013). Alguns pacientes podem ser assintomáticos e não precisar de tratamento, enquanto outros podem evoluir com sinais e sintomas agressivos antes ou após o diagnóstico (OLIVEIRA et al., 2015).

O diagnóstico e classificação da LLA ou LLC pode ser feito por um conjunto de marcadores imunológicos expressos durante seu estágio de maturação, denominados CDs (*cluster of differentiation*) (PIER, 2008; CHIARETTI; ZINI; BASSAN, 2014; VAN DONGEN; ORFAO, 2014; SUKUMARAN et al., 2015).

O diagnóstico é baseado na análise por imunofenotipagem por citometria de fluxo (ICF) de amostras de sangue periférico (SP) e medula óssea (MO) com blastos acima de 20% para determinar o tipo celular e a classificação do tipo de leucemia desenvolvida (SANTOS et al., 2014). Entretanto, o grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) sugere que o quadro leucêmico seja determinado quando forem encontrados mais de 30% de blastos em SP ou MO (BRASIL, 2014).

O aumento significativo no número de pessoas acometidas por leucemias torna o controle dessa neoplasia um desafio para a saúde pública, com gastos expressivos em diagnóstico e tratamento. Em função disso, este trabalho objetivou compreender a etiopatogenia das leucemias linfóides, determinar seus principais marcadores imunológicos e os avanços da ICF para o diagnóstico diferencial e avaliar a eficiência dos resultados dos exames imunohematológicos obtidos por imunofenotipagem e outras técnicas.

METODOLOGIA

O presente estudo caracteriza-se como uma revisão de literatura do tipo descritiva, envolvendo o diagnóstico diferencial das leucemias linfóides através da CF. A busca foi realizada utilizando os seguintes descritores e suas combinações:

“neoplasia hematológica”, “imunofenotipagem”, “leucemia”, “leucemia linfocítica crônica”, “leucemia linfoblástica aguda T ou B”, “leucemia linfocítica crônica T ou B”, “leucemia linfocítica”, “diagnóstico da leucemia”, “marcadores imunológicos”, “CDs”, “sistema de lasers”, “citometria de fluxo”, “diagnósticos das leucemias linfoides”, “citogenéticas”, “citogenética convencional”, “citogenética molecular”.

Foi realizado um levantamento de artigos nos bancos e bases de dados da PubMed/Medline (*National Library of Medicine*), biblioteca eletrônica *Scientific Electronic Library Online (SciELO)*, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Biblioteca Virtual em saúde (BVS) e *ScienceDirect* referente a ICF para diagnóstico das leucemias linfocíticas. Além disso, foram consultados os sites do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil (DATASUS) e do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para obtenção de informações epidemiológicas.

De acordo com os critérios de inclusão, foram utilizados artigos de ensaios experimentais (humanos ou animais) ou clínicos, revisões de literatura ou relatos de caso, em língua inglesa, portuguesa ou espanhola, artigos disponíveis *on-line* na íntegra e publicados no período de 2008 a 2016. Os critérios de exclusão foram aplicados em artigos que contemplaram apenas outros tipos de câncer hematológico (leucemia mielóide ou linfomas). Foram avaliados criticamente os dados obtidos, síntese dos principais CDs, comparação dos resultados dos exames da ICF com os demais métodos utilizados, baseados em evidências e descritas as limitações das técnicas.

Foram encontrados mais de 50 artigos publicados, dos quais 30 destacaram os principais exames para o diagnóstico diferencial da leucemia linfóide. Após a análise de cada artigo, ficou clara a importância das técnicas empregadas para a classificação, prognóstico e monitoramento da doença.

Diagnóstico das Leucemias de Origem Linfóide

Para investigação da doença são utilizados exames hematológicos (hemograma, leucograma, plaquetograma, esfregaço sanguíneo e medular), citogenética, biologia molecular e a imunofenotipagem por citometria de fluxo (SILVEIRA;ARRAES, 2012).

Os exames hematológicos apontam os primeiros achados para suspeita das doenças e

sinalizam eventos importantes, como por exemplo presença ou ausência de leucocitose, linfocitose, neutropenia ou plaquetopenia (BEZERRA et al., 2011).

O profissional, ao analisar o esfregaço sanguíneo e/ou medular deverá fazer uma descrição das características morfológicas das células observadas, indicando se há presença de blastos granulares ou agranulares. Essa descrição é importante para que o médico hematologista solicite exames mais específicos. Mesmo sendo acessível, simples e rápido, o hemograma não é suficiente para determinação da leucemia linfóide. A determinação requer então de exames complementares de citogenética e imunofenotipagem para o diagnóstico diferencial e definitivo (SANTOS et al., 2014).

As técnicas mais usadas para determinar o padrão genético das leucemias são: citogenética convencional, citogenética molecular (FISH: hibridização fluorescente *in situ*; CGH: hibridização genômica comparativa), além dos métodos de biologia molecular (*Southern blotting*, PCR) e outras (CRAMER; HALLEK, 2011; QUIXABEIRA; SADDI, 2008).

As análises citogenéticas são preconizadas pela OMS para confirmação das leucemias. Através delas pode ser analisado o prognóstico e a estratégia para o tratamento da doença. A citogenética é importante para determinar o genótipo das amostras com suspeitas de leucemia e fornece várias informações, tais como: confirmação do diagnóstico, informação sobre a classificação e estadiamento da doença, clonalidade celular, evidências da linhagem celular do clone leucêmico, indicação dos mecanismos de leucemogênese, demonstração de fatores etiológicos implicados no processo neoplásico e monitoramento de transplante medular (CRAMER; HALLEK, 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

Geralmente cerca de 80% das leucemias agudas apresentam anormalidades e sua determinação é fundamental para a estratégia do tratamento. As alterações cromossômicas e aquelas associadas a alterações de expressão gênica são as duas principais categorias genéticas estudadas nas leucemias através da citogenética (QUIXABEIRA; SADDI, 2008).

A citogenética convencional ainda é uma das principais técnicas utilizadas para determinação das anormalidades cromossômicas das células hematopoiéticas, permitindo a análise global do cariótipo com informações genômicas importantes relacionadas à deleção, inserção ou translocação dos cromossomos (OLIVEIRA et al., 2015).

As desvantagens estão relacionadas ao uso do material retirado diretamente da medula óssea, tornando uma técnica indiretamente invasiva. Por outro lado, o material colhido deve estar em processo de metáfase e é importante que os cromossomos alcancem o máximo de condensação e alinhamento; caso contrário é difícil à visualização das anormalidades (SANTOS et al., 2014).

Cerca de 80% das alterações citogenéticas presentes na LLC podem ser identificadas pela técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH). Essa técnica é utilizada para a análise das anormalidades genéticas moleculares e tem papel importante nas classificações das leucemias linfoides. A análise tem valor no prognóstico e na decisão terapêutica do paciente. Por tanto, recomenda-se que a citogenética seja realizada antes e depois do tratamento. Apresenta vantagens quando comparada a citogenética convencional, apresentando uma maior sensibilidade; no entanto, é uma técnica com custo relativamente elevado (CRAMER; HALLEK, 2011).

Os avanços e a importância da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico da leucemia linfóide

Após o advento da citometria de fluxo, ocorreu uma melhora considerável na identificação e análise das estruturas biológicas. A incorporação dos diversos hardwares e softwares para estudar e analisar melhor a natureza celular, bem como o desenvolvimento de lasers cada vez mais sofisticados, produção de sondas fluorescentes e reagentes, automação, geração de sinais digitais mais claros têm permitido com precisão a análise da região intra e extracitoplasmática das células, assim como a caracterização mais adequada dos eventos imunológicos e moleculares que determinam os estados de saúde e doença (SANTOS et al., 2014).

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é um método diagnóstico de extrema importância,

porque permite diferenciação dos clones leucêmicos através das características fenotípicas, sendo indispensável para o entendimento, tratamento, prognóstico e acompanhamento da doença, pois eleva a precisão do diagnóstico para 99% dos casos suspeitos (SILVEIRA; ARRAES, 2012; REGO; SANTOS, 2009).

Para a realização da técnica da ICF é necessário um painel de anticorpos monoclonais criados a partir da suspeita diagnóstica dos especialistas no intuito de analisar qualitativamente e quantitativamente as populações e características celulares. Segundo Chiaretti, Zini e Bassan (2014), a ICF tornou-se um importante procedimento padrão para determinação das leucemias devido a sua alta sensibilidade e especificidade.

As evidências apontam que a imunofenotipagem por citometria de fluxo complementa os achados do estudo anatomopatológico/imunohistoquímico, permitindo um diagnóstico hematopatológico rápido e preciso das doenças linfoproliferativas. Bezerra et al. (2011), a fim de evidenciar e correlacionar a imunofenotipagem por citometria de fluxo ao exame de anatomia patológica de doenças linfoproliferativas, avaliou 157 amostras de biopsias e punções aspirativas de gânglios ou nódulos de 142 pacientes durante 10 anos (1999-2009). As concordâncias entre os resultados das duas técnicas alcançaram 81%..

Os resultados apontados pela citometria de fluxo situaram essa técnica como uma das melhores para estudos imunohematológicos, tornando a imunofenotipagem mais específica e sensível na classificação e monitoramento das leucemias (SILVEIRA; ARRAES, 2012).

As características imunofenotípicas e morfológicas são importantes fatores para o diagnóstico da leucemia, pois determinam a classificação dos linfócitos em tipo B ou T e seus subtipos, utilizando os marcadores descritos nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1. Principais marcadores imunológicos das leucemias linfoblástica aguda e linfocítica crônica de células B.

Legenda: LLA-B - Leucemia Linfoblástica Aguda -B; LLC-B - Leucemia Linfocítica Crônica -B; TdT-

MARCADORES IMUNOLÓGICOS DAS LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS E LINFOCÍTICAS DE CÉLULAS B					
LLA	CDs	Autor (es)	LLC	CDs	Autor (es)
	CD10, CD19 CD20, D79a	Pier, 2008; Chiaretti; Z ini; Bassan, 2014 2014; Reichard et al., 2011		CD5 CD23 CD19 CD20(fraco)	Pier, 2008; García-Candel et al., 2012; Kern et al., 2012; Lopes, 2010 Pier, 2008, García-Candel et al., 2012; Kern et al., 2012; Lopes, 2010
	CD22c	Pier, 2008; Chiaretti; Z ini; Bassan, 2014 ; Reichard et al., 2011	L	HLA-DR	Lopes, 2010
L	TdT+	Pier, 2008; Reichard et al., 2011	L	CD22 (fraco)	Pier, 2008; García-Candel et al., 2012
L			C	CD11c	Pier, 2008; García-Candel et al.,2012
A			B	FMC7(fraco ou ausente)	Pier, 2008; García-Candel et al., 2012
B	CD24	Chiaretti; Zini; Bassan, 2014		CD25 CD10	Pier, 2008
	CD34, CD45 Kappa ou Lambda sup	Reichard et al., 2011		CD79b (fraco ou ausente) TdT, CD24	Pier, 2008; García-Candel et al.,2012; Kern et al., 2012 Iwamoto et al., 2011
	IgM	Lopes, 2010		Kappa ou lambda	Lopes, 2010; García-Candel et al., 2012
	CD13	Sakumaran et al., 2015			

desoxinucleotidil-transferase, cit- citoplasmático

MARCADORES IMUNOLÓGICOS DAS LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS E LINFOCÍTICAS DE CÉLULAS T					
LLA	CDs	Autor (es)	LLC	CDs	Autor (es)
L	CD3 cit/sm	Chiaretti; Zini; Bassan, 2014; Van Dongen; Orfao, 2014; Michel, 2008; Pier, 2008; Sukumaran et al., 2015		CD3 CD4 CD7 CD8, TCR alfa e beta CD1a CD103 CD14, FMC 7	Lopes, 2010
	CD2	Van Dongen; Orfao, 2014			
L			L		
A	CD5	Chiaretti; Zini; Bassan, 2014; Van Dongen; Orfao, 2014	C	CD5 CD10, TdT	Souto, 2011
T	CD34	Souto, 2011	T		
	CD1a, CD4, CD8, CD10, CD33, CD44 CD45, D117 CD45RA CD56 CD99 HLADR TCR $\alpha\beta$ TCR $\beta\gamma$ TCR $\gamma\delta$, TdTNu	Van Dongen; Orfao, 2014			

Legenda: LLA-T - Leucemia Linfoblástica Aguda - T; LLC-T - Leucemia Linfocítica Crônica - T.

O Quadro 1 apresenta uma síntese dos principais marcadores utilizados para o diagnóstico da leucemia de células B. Esses achados remetem à criação de painéis de anticorpos monoclonais para o diagnóstico por imunofenotipagem dessa neoplasia. Todavia, a presença de CDs (CD5+, CD19+, CD23+, CD20 fraco, CD79b fraco ou ausente), imunoglobulina de superfície monoclonal cadeia leve *Kappa* e *Lambda* fraca são importantes achados (GARCÍA-CANDEL et al., 2012; KERN et al., 2012). A monoclonalidade de linfócitos que apresentam CD5 na ausência de marcadores T (CD19, CD20, CD22, CD79b e IgS) é sugestivo de LLC-B (REGO; SANTOS, 2009).

ALLA-B apresenta marcadores característicos (CD19, CD79a, CD10, *HLA-DR* e *TdT*) que devem ser considerados na investigação da doença, podendo ser também acrescentados ao painel de investigação os CD20 e CD22. No entanto, nota-se que o CD5+, CD23+, na presença de IgM e IgD *low* e na ausência de marcadores de linfócitos T, são importantes para a investigação diferencial desse tipo de leucemia (LOPES, 2010). Para Craig e Foon (2008), o marcador CD5+ deve ser associado a outro marcador (p.e. CD10), devido a sua expressão em células B normais.

Iwamoto et al. (2011) utilizaram a citometria de fluxo para avaliar a expressão de antígenos em crianças com leucemia linfoblástica aguda em um grupo de 1.774 crianças. Foi observado que os marcadores CD3Cit e CD7 apresentaram positividade para todos os casos. Do total, foram encontrados 87% na LLA-B e 13% na LLA-T. Os antígenos CD2, CD5 e TdT corresponderam a 80% das LLA-T.

Muitos autores têm demonstrado através de seus trabalhos a importância da identificação dos principais marcadores na determinação das leucemias. Lopes (2010) e Souto (2011) observaram marcadores que podem definir a LLC-T. Esses marcadores estão descritos no Quadro 2.

O estudo liderado por Van Dongen et al. (2014) para determinar a LLA-T encontrou marcadores que podem ser úteis para o seu diagnóstico e classificação (Quadro 2). Esses marcadores fazem parte do painel para determinação da LLA-T criado pelo grupo Euroflow, atualmente referência para os casos de neoplasias hematológicas da linhagem T. O marcador CD2 faz parte do grupo de marcadores para LLA-T e é considerado um marcador de células imaturas (PIER, 2008; VAN DONGEN et al., 2014), especificamente está presente em células leucêmicas da LLA-Pré-T (CHIARETTI; ZINI;

BASSAN, 2014). No entanto, apenas sua positividade não define o diagnóstico, sendo necessário associá-lo a outros marcadores (p.e. CD7) para confirmação.

O CD3Cit/Sm é apontado como um importante marcador para investigação das leucemias de células T (SUKUMARAN et al., 2015; LOPES, 2010). O CD3 Cit/Sm é um marcador que pode ser utilizados na quantificação de blastos T, sobre tudo a sua utilização deve estar associada ao marcador CD7, pois as células NK também o expressam.

Larson (2010) aprova o CD3 cit/Sm para fazer parte do painel de marcadores controle na determinação da leucemia mielóide aguda (LMA), uma vez que esses marcadores são próprios dos linfócitos T, permitindo assim a imunofenotipagem correta da amostra. Por fim, o CD3 cit/Sm foi inserido no painel de marcadores validados pelo grupo *EuroFlow*, orientado por Van Dongen e Orfao (2012) para diagnóstico da LLA-T.

O CD3 citoplasmático foi incluído no painel de marcadores para o diagnóstico das LLA-T, pois demonstrou positividade para 10 casos (1 caso de B/T e 9 casos de T/mielóide) dos 506 casos de leucemias submetidos a imunofenotipagem (SUKUMARAN et al., 2015). Por sua vez, o CD5 está presente na maioria das células imaturas e é utilizado em painéis para classificação das leucemias da linhagem linfóide, porém, sua expressão não é específica das células T. Contudo, outros blastos (p.e. NK) também expressam esse marcador.

Segundo Rego e Santos (2009), o CD45 é bastante utilizado na imunofenotipagem visto que os blastos apresentam baixa expressão desse marcador. No entanto, CD34 apresenta-se com alta intensidade, assim é utilizado como marcador de células imaturas, porém não faz parte do painel do grupo *Euroflow* para investigação da LLA-T.

Os principais marcadores imunológicos das células da linhagem B que permitem diagnóstico e classificação da LLA-B são *HLA-DR*, *TdT*, CD10, CD19, CD20, CD21 e CD22c (imunocitoplasmático), CD34, CD79 e IgS (imunoglobulina de superfície) *Kappa* ou *Lambda* (Quadro 2). Para que o caso seja definido como de linhagem B, é preciso que sejam encontrados os marcadores CD19 e CD79a. Com esses achados as leucemias linfoblásticas agudas de tipo B podem ser subclassificadas em leucemia linfoblástica aguda Pró-B, leucemia linfoblástica aguda tipo comum, leucemia linfoblástica aguda Pré-B ou leucemia linfoblástica aguda B - maduro (MICHEL, 2008).

Vantagens e desvantagens da citometria de fluxo

Para Craig e Foon (2008), a citometria de fluxo se tornou uma ferramenta de grande importância para a imunofenotipagem nessas últimas décadas e ressalta a importância dos profissionais possuírem conhecimentos elevados sobre as características das linhagens celulares em estudo.

Segundo Silveira e Arraes (2012), dentre as vantagens apresentadas pela imunofenotipagem por citometria de fluxo, a mais notada é sua ampla

aplicação para diagnóstico e pesquisa.

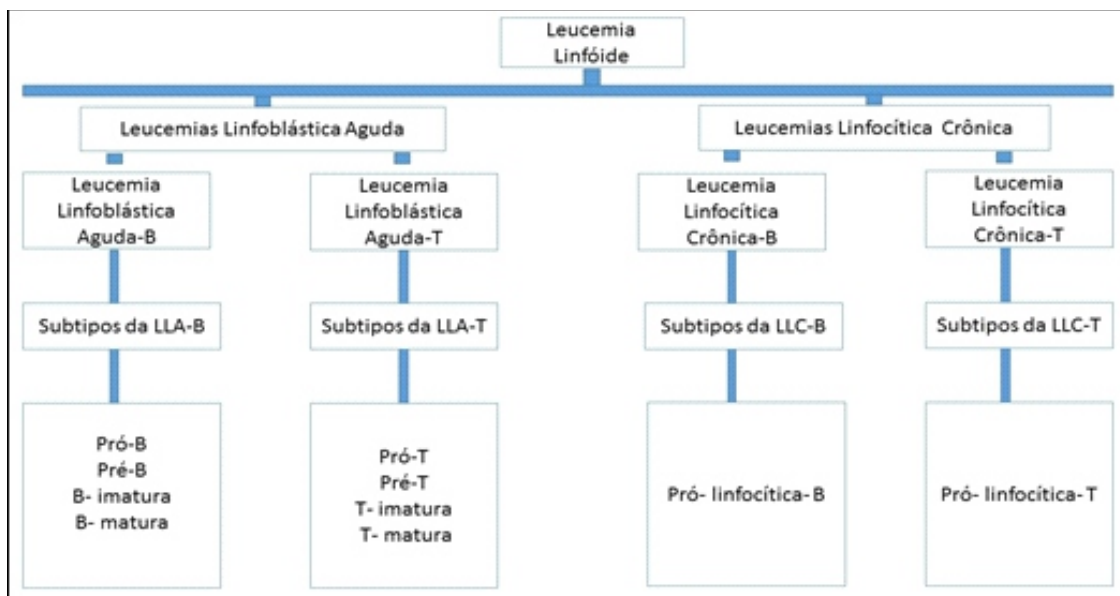
Um dos grandes desafios é padronizar os protocolos entre os laboratórios e tornar a interpretação do exame menos confuso. A Tabela 1 faz uma breve comparação entre as principais vantagens e desvantagens da imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétricas.

Através da imunofenotipagem foi possível determinar e classificar as leucemias (Figura 1) uma vez que não há diferenças na morfologia de linfócitos T e B, por isso ela é uma vantagem sobre a análise de lâminas ou técnicas convencionais.

Tabela 1. Principais vantagens e desvantagens da técnica ICF.

Imunofenotipagem Por Citometria De Fluxo	
Vantagens	Desvantagens
Análise diferencial de células normais e anormais em MO ou SP.	Variabilidade das expressões antigênicas.
Análise heterogênea e clonalidade das células malignas.	Perda celular.
Análise multiparamétricas das amostras em único tubo.	Material a fresco.
Alto grau de especificidade e sensibilidade.	Número considerável de células neoplásicas.
Detecção simultânea de marcadores múltiplos em população de células distintas.	Manter as células em suspensão.
Identificação objetiva de antígenos mutados co-expressos.	Encontrar profissionais treinados.
Resultados rápidos.	Custo elevado.

Figura 1. Representação esquemática da leucemia linfóide - tipos e subtipos.



Fonte: adaptado BRASIL (2014). Legenda: LLA-T: Leucemia linfoblástica Aguda-T; LLA-B: Leucemia linfoblástica Aguda-B; LLC-B: Leucemia Linfocítica Crônica-B; LLC-T: Leucemia Linfocítica Crônica-T.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O avanço técnico-científico no diagnóstico das doenças imunohematológicas é perceptível e sem dúvida a imunofenotipagem por citometria de fluxo transformou o padrão do diagnóstico das leucemias.

A etiopatogenia da leucemia linfóide ainda não está completamente elucidada. Entretanto, fatores ambientais, genéticos, físicos, químicos, biológicos e infecções por alguns tipos de vírus podem desencadear esse tipo de neoplasia.

A literatura mostra que o painel para fenotipagem das células leucêmicas varia entre os laboratórios e que o entendimento da fisiopatologia da doença é fundamental. No entanto, alguns marcadores são essenciais para determinação da linhagem leucêmica envolvida. Os marcadores CD1a, CD2, *TCR $\alpha\beta$* , *TCR $\gamma\delta$* , CD3 Cit/Sm definem LLA-T, enquanto CD10, CD19, CD20, CD22c, CD79a/b, *Kappa* ou *Lambda* e *IgM* determinam LLA-B.

Para LLC-T, os marcadores CD4, CD7, CD8, CD3, TCR alfa/beta, CD1a, foram os mais indicados, enquanto que para a LLC-B foram os: CD23, CD20, CD19, CD22 (fraco), CD10, CD79b (fraco ou ausente), FMC7 (fraco ou ausente).

Há a necessidade de mais estudos sobre esta técnica que contribuam significativamente para sua expansão no Brasil. Assim, deve-se avaliar a importância da inserção desta técnica nos centros de oncologia imunohematológica para o diagnóstico rápido e preciso das leucemias linfóides.

REFERÊNCIAS

BEZERRA, A. M. P. S. *et al.* Correlation between flow cytometry and histologic findings: ten year experience in the investigation of lymphoproliferative diseases. **Einstein**, v. 9, n. 2, p. 151-159, 2011. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1679-45082011000200151&script=sci_arttext&lng=pt Acesso em: 09 set. 2016

BRASIL. Instituto Nacional De Câncer (INCA). **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Ministério da Saúde. RJ, mar. 2014. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecaner/site/home/leucemia/definicao2/>>. Acesso em: 19 set. 2015.

BYRD, J. C. Introduction to a series of reviews on chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, Washington, v. 126, n. 4, p. 427-427, 2015. Disponível em

<http://www.bloodjournal.org/content/126/4/427?ssoc-checked=true>

Acesso em: 04 nov. 2016

CHIARETTI, S.; ZINI, G.; BASSAN, R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, Oct. 2014. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4235437/>

Acesso em: 25 out. 2016

CRAMER, P.; HALLEK, M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia- what do we need to know? **Nature Reviews Clinical Oncology** 2011;8(1): 38-47.

Disponível em <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2010.167>

Acesso em: 05 out. 2016

CRAIG, F. E. Foon K. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms: Review article. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 3941-3967, 2008.

Disponível em <http://www.bloodjournal.org/content/111/8/3941.short>

Acesso em: 14 mar. 2016

DATASUS/Ministerio da Saúde – MS. INFORMAÇÕES DE SAÚDE. SISTEMA DE INFORMAÇÕES HOSPITALARES DO SUS (SIH/SUS). **Índice de Morbidade Hospitalar do SUS por Local de Internação- Brasil**. 2015. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>>. Acesso em: 06 set. 2015.

GARCÍA-MARCO, J.A. et al. National guidelines for the management of patients with chronic lymphocytic leukemia. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia and Grupo Español de Leucemia Linfocítica Crónica. **MedClin (Barc)**. Vol.8, nº1, p.141-175, 2013. Disponível em <http://europepmc.org/abstract/med/23830547>

Acesso em: 16 set. 2016.

GARCÍA-CANDEL, F. et al. Protocolo diagnóstico de las linfocitosis agudas y crónicas. **Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, Murcia, v.11(21), p.1317-1320, 2012. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541212704560>

Acesso em: 10 jun. 2016

HAMERSCHLAK, N. As leucemias no Brasil. **Onco&**, São Paulo, p. 20-23, nov/dez. 2012.

HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.84, n.4, p. 52-57, 2008. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0021-75572008000500008&script=sci_arttext Acesso em: 15 jul. 2016

IWAMOTO, S. et al. Flow cytometric analysis of de novo acute lymphoblastic leukemia in childhood: report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. **International Journal of Hematology**, Tsu, Mie, v. 94, n. 2, p. 185-192, jul. 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12185-011-0900-1>. Acesso em 1 jul. 2016

KERN, W. et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis is closely related to chronic lymphocytic leukaemia and may be better classified as early-stage CLL. **British Journal of Haematology**, v. 157, n. 1, p. 86-96, nov. 2012. Disponível em <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2141.2011.09010.x> Acesso em 31 jul. 2016

LARSON, R. A. **Acute leukemia**. ACP Medicine, Chicago, p. 1-19, 2010. Disponível em: http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/5686/leucemia_aguda_%E2%80%93richard_a_larson.htm . Acesso em 10 junho 2015

LOPES, M. C. A. **Emprego da citometria de fluxo na avaliação do perfil imunofenotípico de pacientes com leucemia linfocítica crônica**. Resumo Tese de Doutorado, Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 32, n. 4, p. 337–338, mai. 2010.

MICHEL, G. Leucemia linfoblástica aguda del niño y del adolescente: clínica y tratamiento. EMC (Elsevier Masson Sas) - **Pediatría**, Paris, v.43, n.4, p.1-11, 2008. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1245178908702166>. Acesso em 18 nov. 2016

OLIVEIRA, A. C. et al. Prospective study of prognostic factors in asymptomatic patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia-like lymphocytosis: the cut-off of $11 \times 10^9/L$ monoclonal lymphocytes better identifies subgroups with different outcomes. **Annals of Hematology**, Barcelona, v. 94, n. 4, p. 627-632, nov. 2015. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25471173> Acesso em 19 nov. 2016

PIER, M. G. Imunofenotipagem das leucemias. **Anais da Academia de Ciências e Tecnologia de São José do Rio Preto**, São José do Rio Preto, SP, jun. 2008. Disponível em

http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/revista_virtual/imunologia/imuno08.pdf. Acesso em 10 ago 2015

QUIXABEIRA, V. B. L.; SADDI, V. A. A Importância da Imunofenotipagem e da Citogenética no Diagnóstico das Leucemias: Uma Revisão da Literatura. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 3, p. 199-202, jul. 2008. Disponível em <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=541903&indexSearch=ID>. Acesso em 4 jan 2016

REGO, E. M.; SANTOS, G. A. S. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** Ribeirão Preto, n. 55 16, p. 1-8, jul. 2009. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-84842009000500016&script=sci_abstract&tlng=pt Acesso em 14 mar 2016

REICHARD, K.K; KANG H, R. S. Pediatric B-lymphoblastic leukemia with RUNX1 amplification: clinicopathologic study of eight cases. **ModPathol.** v. 24, p.1606-1611, 2011. Disponível em <https://www.nature.com/articles/modpathol2011118> Acesso em 15 mai 2016

SANTOS, A.M. et al. In: BERTHO, A. L, GRIPP, B. G Coord. **Citometria de fluxo: imunofenotipagem e avaliação de células citotóxicas na resposta a patógenos**. Curso de Verão, 2014, Ministério da Saúde/ Fundação Oswaldo Cruz/ Instituto Oswaldo Cruz, Jan. 2014.

SILVA, F. F.; ZANDONADE, E.; ZOUAIN-FIGUEIREDO, G. P. Analysis of childhood leukemia mortality trends in Brazil, from 1980 to 2010. **Jornal de Pediatria**, Vitória, v. 90, n. 6, p. 587–592, jun. 2014. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0021-75572014000600587&script=sci_arttext&tlng=pt Acesso em 25 ago 2016

SILVEIRA, N. A.; ARRAES, S. M. A. A. A imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: uma revisão. **Arquivos do Mudi**, Maringá, v. 12, n. 1, p. 5-14, jun. 2012. Disponível em <http://eduem.uem.br/laboratorio/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/19208> Acesso em 05 dez 2016

SOUTO, E. X. Fundamentos da Citometria de Fluxo. Congresso Brasileiro de Patologia Clínica. Medicina Laboratorial- ciência e sustentabilidade. Centro Sul, Florianópolis, ago. 2011.

SUKUMARAN, R. et al. Flow cytometric analysis of Mixed phenotype acute leukemia: Experience from a tertiary oncology center. **Indian J Pathol Microbiol**; 58:181-6; Apr, 2015. Disponível em <http://www.ijpmonline.org/article.asp?issn=0377-4929;year=2015;volume=58;issue=2;epage=181;epage=186;aui=Sukumaran>. Acesso em 06 fev 2016

VAN DONGEN, J. J. M., ORFAO, A. Flexibility of the EuroFlow Concept. Argentinian EuroFlow Workshop, Buenos Aires, p. 27-29, Aug. 2014. Disponível em <https://www.nature.com/articles/leu2012121>
Acesso em 06 abr 2016