



## **A IMUNOFENOTIPAGEM NO DIAGNÓSTICO DA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.**

## **IMMUNOPHEOTYPE IN THE DIAGNOSIS OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA.**

GEOVANA CRISTINE DE ARAUJO SANTOS, GRADUADA EM BIOMEDICINA NA UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO – UNIGRANRIO/ GEOGRA959@GMAIL.COM/ ORCID:0000-0001-8484-6932<sup>1</sup>

NATÁLIA DE MORAIS CORDEIRO, DOUTORA EM FARMACOLOGIA PELA UFRJ, PROFESSORA DA ECS – UNIGRANRIO/ NATALIA.CORDEIRO@UNIGRANRIO.EDU.BR/ ORCID:0000-0002-7986-6514<sup>2</sup>

**DOI** [10.5281/zenodo.7447454](https://doi.org/10.5281/zenodo.7447454)

## RESUMO

Leucemias têm como característica principal a proliferação clonal acompanhada de bloqueio da maturação variável. A leucemia mieloide aguda, que será a forma mais abordada neste trabalho, tem como característica o descontrole no crescimento das células indiferenciadas, que são chamadas mieloblastos. A imunofenotipagem por citometria de fluxo, feita por uma combinação de padrões e intensidade da expressão de variados antígenos, melhora o rendimento diagnóstico na leucemia mieloide aguda (LMA) e é eficaz para atribuir linhagem dentre os tipos de leucemia. Trata-se de uma pesquisa bibliográfica, que destacará uma série de trabalhos que descrevem a leucemia, seus subtipos, focando em LMA e reafirmar a importância da atuação da imunofenotipagem no diagnóstico da leucemia mieloide aguda. CD13 foi o marcador de célula imatura principal expresso dentre os 3 estudos, seguido de CD33 e o marcador pan-leucocitário CD45. Cerca de 15% a 20% das leucemias na infância são do tipo mieloide, gerando uma incidência de 1 caso a cada 150.000 crianças e adolescentes, enquanto nos adultos, essa porcentagem é de 80%, inicialmente na faixa etária de 30 anos e com pico aos 64 anos de idade. Mais comum no sexo masculino. É pertinente concluir que os resultados da citometria de fluxo interpretados com a morfologia são complementares. As

avaliações dos parâmetros examinados neste trabalho, como idade na incidência, marcadores imunofenotípicos comuns, subtipos mais frequentes e fenótipos aberrantes podem ser melhorados, devendo ser levado em consideração em investigações futuras e isso requer maior duração de observação, focando na pesquisa de novos marcadores para o rápido diagnóstico (tipo e subtipo de LMA) e maior conhecimento dos fatores prognósticos, que afetam a resposta ao tratamento, sendo alguns: idade, anormalidades cromossômicas favoráveis e desfavoráveis, mutações genéticas, entre outros.

**Palavras-chave:** Leucemia mieloide aguda, imunofenotipagem, citometria de fluxo.

## ABSTRACT

Leukemias are characterized by clonal proliferation accompanied by blocking of variable maturation. Acute myeloid leukemia, which will be the most discussed form in this work, is characterized by the lack of control in the growth of undifferentiated cells, which are called myeloblasts. Flow cytometric immunophenotyping, performed by a combination of patterns and intensity of expression of various antigens, improves the diagnostic yield in acute myeloid leukemia (AML) and is effective in assigning lineage among types of leukemia. This is bibliographical research, which will highlight a series of works describing leukemia, its subtypes,

focusing on AML and reaffirming the importance of the role of immunophenotyping in the diagnosis of acute myeloid leukemia. CD13 was the main expressed immature cell marker among the 3 studies, followed by CD33 and CD45. About 15% to 20% of childhood leukemias are of the myeloid type, generating an incidence of 1 case per 150,000 children and adolescents, while in adults, this percentage is 80%, initially in the age group of 30 years and with a peak at 64 years of age. More common in males. It is pertinent to conclude that the flow cytometry results interpreted with morphology are complementary. The evaluations of the parameters examined in this work, such as age at incidence, common immunophenotypic markers, more frequent subtypes and aberrant phenotypes can be improved and should be taken into account in future investigations and this requires a longer observation period, focusing on the search for new markers for rapid diagnosis (type and subtype of AML) and greater knowledge of prognostic factors that affect the response to treatment, including: age, favorable and unfavorable chromosomal abnormalities, genetic mutations, among others.

Keywords: Acute myeloid leukemia, immunophenotyping, flow cytometry.

## INTRODUÇÃO

Os primeiros achados anatômicos e patológicos da leucemia foram fornecidos por um médico francês chamado Alfred Armand Louis Marie

Velpeau, através da análise sanguínea de um paciente de 63 anos e com isso ele reuniu seus achados e publicou um artigo no ano de 1827. Alfred François Donné, em 1839, publicou um caso de uma senhora com esplenomegalia e aumento dos níveis de “glóbulos mucosos”. Já John Hughes Bennett, se deparou com um caso semelhante com o aumento de órgãos e alteração na consistência e coloração sanguínea e descreveu o caso no *Jornal médico e cirúrgico de Edimburgo*, em 1845. Tais observações originaram o termo leucemia (leukämie) (LADINES-CASTRO et al., 2016)

Em 1869, a medula óssea começou a ser analisada no microscópio. Franz Ernst C. Neumann descobriu que a hematopoese acontece na medula óssea após estudar fragmentos ósseos. Supondo que o sangue se originava de um precursor comum, ele deu o nome de célula-tronco e também sugeriu que além de leucemias linfáticas e esplênicas, havia também uma leucemia originária da medula óssea, que chamou de leucemia mieloide (LADINES-CASTRO et al., 2016).

As leucemias têm como característica principal a proliferação clonal acompanhada de bloqueio da maturação variável, o que pode originar diferentes subtipos de leucemias (BETZ; HESS, 2010). As leucemias agudas são neoplasias hematológicas que tem como característica o descontrole na multiplicação, maturação e apoptose das células jovens, que são chamadas de blastos, na medula óssea e/ou sangue periférico.

Sua classificação está ligada ao tipo de linhagem afetada em mieloide ou linfoide, e evolução clínica em aguda ou crônica (ALLEGRA et al., 2016).

A leucemia mieloide aguda, que será a forma mais abordada neste trabalho, tem como característica o descontrole no crescimento das células indiferenciadas, que são chamadas mieloblastos (HAMERSCHLAK, 2008). Essa neoplasia ocasiona produção de células sanguíneas maduras normais de forma insuficiente, com substituição do tecido normal, consequentemente. Desse modo, a infiltração da medula é frequentemente acompanhada de neutropenia, anemia e plaquetopenia (SILVA et al., 2006). A incidência ocorre em homens a partir dos 30 anos (80%) e com sobrevida global entre 2 a 5 anos, com prognóstico desfavorável. O desenvolvimento da neoplasia está associado a mutações nos genes, denominados oncogenes, que possuem envolvimento na hematopoese, originando à proliferação de blastos mieloides leucêmicos onde a produção das demais linhagens celulares são suprimidas, com resultado em anemia, sangramentos, infecções recorrentes e falência da medula óssea. As mutações genéticas são identificadas em mais de 97% dos casos e muitas vezes na ausência de grande anormalidade cromossômica. Terapias curativas, incluindo quimioterapia intensiva e transplante de células-tronco halogênicas, são geralmente aplicáveis a uma minoria de pacientes que são mais jovens e em boa forma, enquanto a maioria dos indivíduos mais velhos exibe mau prognóstico e

sobrevivência (SHALLIS et al., 2019).

A heterogeneidade genética deste tipo de neoplasia hematológica faz com que as análises iniciais se tornem impraticáveis e que poderiam abranger genes diferentes que estão envolvidos e alterações desta doença, gerando dificuldades no diagnóstico, que implica diretamente no direcionamento da terapêutica. Contudo, ainda que exista uma crescente importância de características moleculares (translocações cromossômicas, como as de prognóstico favorável: t(15;17), t(8;21) e inv(16) e genéticas (mutações genéticas, como as de classe I: BCR-ABL, FLT3, RAS, c-Kit, PTPN11, NF1, TEL-PDGRβ) (DEOLINDA et al., 2011) na subclassificação das leucemias mieloides agudas, as análises imunofenotípicas e morfológicas são fundamentais para diagnóstico inicial destas patologias (PETERS; ANSARI, 2011).

**Figura 1:** classificação genética e molecular na LMA.

Favorável	t(15;17)(q22;q21)- <i>PML-RARA</i> - t(8;21)(q22;q22)- <i>RUNX1T1-RUNX1</i> inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)- <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado e sem <i>FLT3-ITD</i> (cariótipo normal)
Intermediário I	<i>CEBPA</i> mutado (cariótipo normal) <i>NPM1</i> mutado e com <i>FLT3-ITD</i> (cariótipo normal) <i>NPM1</i> selvagem e com <i>FLT3-ITD</i> (cariótipo normal) <i>NPM1</i> selvagem e sem <i>FLT3-ITD</i> (cariótipo normal)
Intermediário II	t(9;11)(p22;q23)- <i>MLL3-MLL</i> Anormalidades citogenéticas não favoráveis ou desfavoráveis
Desfavorável	inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.3)- <i>RPN1-EVI1</i> t(6;9)(p23;q34)- <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23)- rearranjo <i>MLL</i> -5/5q-, -7/7q- Cariótipo complexo

prognóstico se divide em favorável, intermediário I, intermediário II e desfavorável (DEOLINDA et al., 2011).

O Grupo Brasileiro de Citometria de Fluxo (GBCFLUX), que foi fundado em 2010 teve como

iniciativa promover avanços técnicos na citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) no Brasil, através da padronização dos painéis de triagem para leucemias agudas, onde está incluída a leucemia mieloide aguda, com o objetivo de gerar um custo-benefício para os serviços de diferentes modelos econômicos. No ano de 2015 ocorreu a padronização dos painéis que realizam a triagem das LMAs pelo GBCFLUX e também dos painéis de combinações alternativas, que tem grande importância na identificação das subclassificações de leucemias, subtipos raros, doença residual mínima assim como a sugestão da expressão de algumas anormalidades moleculares e citogenéticas para o prognóstico (IKOMA et al., 2014)

Os anticorpos inclusos no painel utilizado para o diagnosticar a LMA têm a capacidade de confirmar a imaturidade da população de blastos suspeita, atribuindo a linhagem e delineando o padrão de expressão antigênica aberrante que distingue os blastos neoplásicos de blastos progenitores normais. A atribuição precisa da linhagem é um componente crítico no diagnóstico de leucemia aguda. Por esta razão, a Bethesda International Consensus Conference recomenda que a avaliação inicial de uma nova leucemia aguda inclua a avaliação de marcadores mielomonocíticos e linfóides (CHEN; CHERIAN, 2017).

Os blastos se diferenciam de células mais maduras por expressarem marcadores de imaturidade e não

expressarem marcadores associado à maturação celular. Por exemplo, mieloblastos podem ser distinguidos de células mielóides em maturação por apresentarem marcadores de imaturidade como CD117, CD34 e ausência de marcadores de maturação como CD11b, CD15 e CD16 (REGO et al., 2003).

Há também uma molécula primária que compreende a linhagem mieloide, que aparece na célula progenitora CD34+HLADR+, a enzima intracitoplasmática chamada mieloperoxidase (MPO). As células que possuem ligação à diferenciação mieloide dependem de sinais que são enviados por fatores de crescimento hematopoiético no microambiente para tornarem-se monócitos ou granulócitos e depois neutrófilos, basófilos ou eosinófilos. CD33, CD13 e CD117 são 3 antígenos mielóides de diferenciação, considerados marcadores mais precoces e são observados na superfície dos blastos mielóides, sendo este último sujeito a desaparecer nos estágios imaturos de diferenciação. A linhagem mieloide é também sugerida pela expressão do antígeno CD15 (CHEN; CHERIAN, 2017).

Já a linhagem monocítica é sugerida pela expressão de antígenos, incluindo CD4, CD14, CD33 e CD64. A avaliação dos marcadores linfóides deve ser incluída na avaliação inicial da LMA para confirmar a atribuição de linhagem correta e para avaliar a expressão aberrante de um marcador não-linear em uma população de blastos mieloide

anormal. Uma vez que a linhagem é atribuída com segurança, uma avaliação abrangente dos antígenos expressos pela população de blastos deve ser feita para determinar como o imunofenótipo de blasto difere daquele de progenitores normais (CHEN; CHERIAN, 2017).

Na diferenciação dos subtipos, cada um possui marcadores específicos e o diagnóstico dos subtipos LMA-M0 (leucemia mieloblástica aguda indiferenciada) e LMA-M7 (leucemia megacarioblástica aguda, são essencialmente confirmados por imunofenotipagem (tabela 1). De acordo com o grupo de estudo franco-americano britânico (FAB), a leucemia mieloide aguda é classificada da seguinte forma (American Cancer Society, 2018):

Tabela 1: Classificação Franco-Britânica-Americana de leucemia mieloide aguda.

FAB	Nome
M0	Leucemia mieloblástica aguda indiferenciada
M1	Leucemia mieloblástica aguda com maturação mínima
M2	Leucemia mieloblástica aguda com maturação
M3	Leucemia promielocítica aguda
M4	Leucemia mielomonocítica aguda
M5	Leucemia monocítica aguda
M6	Leucemia eritróide aguda
M7	Leucemia megacarioblástica aguda

Os subtipos M0 a M5 se iniciam em formas imaturas dos glóbulos brancos. O subtipo M6 começa em formas muito imaturas dos glóbulos vermelhos, enquanto o M7 começa em formas

imaturas das células produtoras das plaquetas. Adaptado de American Cancer Society, 2018.

O subtipo LMA-M0 tem positividade para pelo menos um dos antígenos de linhagem mieloide CD33, CD13 e/ou CD11b. Já no subtipo LMA-M7, estão presentes frequentemente os marcadores da linhagem mieloide CD13 e CD33, e a confirmação do diagnóstico de LMA-M7 é definido pela positividade para os antígenos de linhagem megacariocítica CD41, CD42 e/ou CD61. Alguns casos podem ser HLA-DR negativo.

Para identificação dos outros subtipos, onde a imunofenotipagem atua como auxiliar, temos os seguintes marcadores: LMA-M1: presença de, pelo menos, 3 marcadores, entre eles: CD13, CD33, CD34, CD7, CD4, CD11b e o HLA-DR. LMA-M2: achado imunofenotípico característico é presença dos antígenos de linhagem linfoide (CD19) ou linhagem NK (CD56) associados a CD33 e CD34. LMA-M3: blastos com grande autofluorescência e marcadores mieloides CD13 e CD33 positivos. Antígenos CD34, HLA-DR e CD14 negativos caracteristicamente. LMA-M4: marcação de por antígeno de linhagem mieloide positiva para CD13 e CD33 e também de linhagem monocítica CD14, CD15 e CD11b. Tem como característica a expressão anômala do antígeno linfoide CD2. LMA-M5: presença de população blástica com relação tamanho/grânulo maior que na LMA M0 como característica imunofenotípica (MARTINS; FALCÃO, 2000). LMA-M6: diferenciação

eritróide, é geralmente CD45 negativa, expressão de CD 71 e glicoforina positiva. No entanto, a morfologia e contagem de blastos contribuem sobremaneira para a conclusão diagnóstica.

**Tabela 2:** Marcadores imunofenotípicos de acordo com cada subtipo.

Subtipos	Marcadores e características
M0	CD13, CD33, CD11b
M1	
M2	CD19 ou CD56 + CD33 e CD34
M3	CD13 e CD3; CD34, HLADR, CD14 negativos.
M4	CD13 e CD33 + CD14, CD15 e CD11b
M5	Relação FSC x SSC maior que em M0.
M6	CD45 negativo; CD71 + glicoforina positivos
M7	CD13, CD33 + CD41, CD42 ou CD61 positivos.

Prevalência de marcadores por subtipo da LMA. Todos estes marcadores são demonstrados na tabela 2.

Portanto, pode-se afirmar que ainda que a análise individual da imunofenotipagem não seja determinante para diagnosticar todos os tipos e subtipos de leucemia, porém é uma ferramenta adjuvante poderosa no delineamento da superfície celular e marcadores citoplasmáticos na LMA-M0 e LMA-M7 (MARTINS e FALCÃO, 2000).

Este estudo visa descrever a leucemia aguda e a leucemogênese, revisar os marcadores imunofenotípicos comuns e subtipos

predominantes. Além de relatar a utilização da imunofenotipagem como método essencial e auxiliar para confirmação diagnóstica e melhor direcionamento terapêutico do paciente.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Esta revisão destacará uma série de trabalhos recentes que descrevem a atuação e importância da imunofenotipagem no diagnóstico da leucemia mieloide aguda. Trata-se de uma pesquisa bibliográfica, onde foram buscados artigos contendo informações sobre história da leucemia, leucemogênese, o uso da imunofenotipagem com foco em leucemia mieloide aguda, os marcadores imunofenotípicos de cada subtipo da LMA e dados experimentais de diagnósticos. Os artigos utilizados foram publicados entre a entre os anos de 2008 a 2020.

As palavras-chave utilizadas foram: leucemia mieloide aguda, imunofenotipagem, citometria de fluxo.

## RESULTADOS

A imunofenotipagem por citometria de fluxo pode distinguir de forma confiável a leucemia linfóide e mieloide, em especial a leucemia mieloide aguda, sendo complemento útil para a morfologia e citoquímica, o que é crucial para seu tratamento (RASHED et al., 2016).

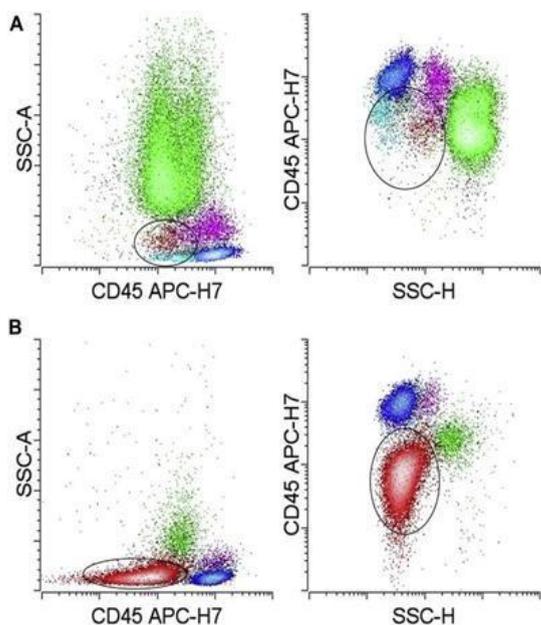
As amostras normalmente avaliadas por citometria de fluxo para envolvimento por LMA incluem sangue periférico e medula óssea. Os blastos mielóides expandidos em LMA são frequentemente reconhecidos pela primeira vez em

uma seleção de blastos, definido por marcadores de precursores hematopoiéticos, versus complexidade intracelular (ângulo de dispersão lateral, SSC - side scatter) e também um segundo portão considerando o tamanho da célula (ângulo de dispersão frontal, FSC - forward scatter) versus SSC (NORONHA et al.,2001).

No entanto, várias outras populações se enquadram no “blast gate” além dos blastos, incluindo basófilos, células dendríticas plasmocitoides, células mieloides hipogranulares e células monocíticas iniciais. Portanto, marcadores adicionais são necessários para diferenciar os blastos de outras populações na porta de blastos (CHEN; CHERIAN, 2017). Um exemplo de “gating” é o uso de CD45 versus SSC, que permite a separação de várias populações hematopoiéticas. Laboratórios diferentes exibem CD45 versus SSC de maneiras diferentes, com duas abordagens comuns sendo mostrar SSC no eixo y em uma escala linear, enquanto exibe CD45 no eixo x em uma escala logarítmica (esquerda), ou mostrar CD45 eixo y em uma escala logarítmica enquanto mostra SSC no eixo x em uma escala logarítmica (direita). Ambos os métodos fornecem informações semelhantes e funcionam bem para separar populações relevantes. A figura 2 (A) demonstra citometria de fluxo (CMF) de medula óssea normal. O CD45 é expresso com intensidade crescente nas células hematopoiéticas à medida que amadurecem, enquanto o SSC é aumentado

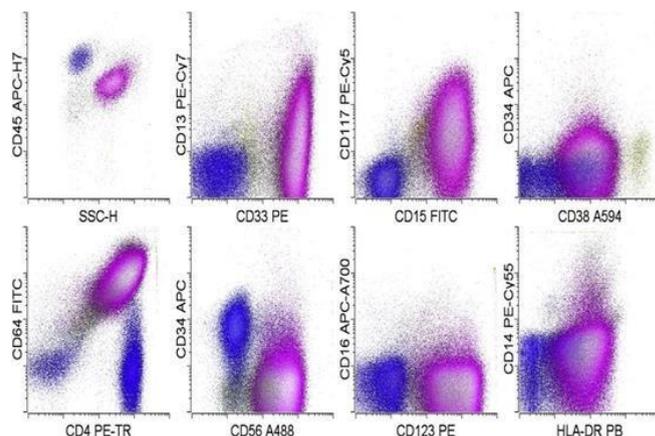
nas células com citoplasma mais complexo. A combinação desses parâmetros permite a separação de linfócitos (em azul), hematogônios (em aqua), monócitos (em rosa), granulócitos (em verde) e blastos mieloides (em vermelho). Usando CD45 versus SSC, pode-se observar uma diferenciação das populações hematopoiéticas, definida por CD45 versus SSC (CHEN; CHERIAN, 2017).

Na figura 2 (B), a citometria de fluxo do sangue periférico demonstra uma população de blastos mieloide expandida (de cor vermelha; 67,3% dos glóbulos brancos) na porta de blastos definida por CD45 versus SSC. Os blastos mieloides neoplásicos tipicamente têm SSC intermediário com expressão de CD45 mais baixa do que as populações hematopoiéticas maduras e geralmente se enquadram na porta de blastos definida por CD45 versus SSC (oval). As células neutrofílicas (verdes) são raras nesta amostra e mostram SSC aberrantemente diminuído (CHEN; CHERIAN 2017).



**Figura 2:** Citometria de fluxo em amostra de medula normal e leucêmica. Comparativo da citometria de fluxo em sangue de medula normal, onde os blastos mieloides se apresentam em pequena escala e sangue de medula indicam leucemia mieloide aguda, onde os blastos representam 67,3% dos glóbulos brancos. Fonte: CHEN e CHERIAN, 2017.

As células monocíticas imaturas são tipicamente caracterizadas pela expressão de altos níveis de CD4, CD33, CD64 e HLA-DR, com CD15 intermediário e CD13 variável, muitas vezes baixo. Em contraste com as células monocíticas mais maduras, monoblastos e promonócitos geralmente têm CD14 baixo a ausente. Os monoblastos/promonócitos (de cor rosa; 76,7% dos glóbulos brancos) mostrados na figura 2, na medula óssea são caracterizados por aumento de SSC e expressão de CD4, CD13, CD15, CD33 (brilhante), CD38, CD56, CD64, CD117, CD123 e HLA-DR sem CD14, CD16 ou CD34. As células linfoides reativas de fundo são mostradas em azul (CHEN e CHERIAN, 2017).



**Figura 3:** Comparação da expressão de CD45 versus SSC e outros marcadores, Leucemia mieloide aguda com diferenciação monocítica. Os monoblastos/ promonócitos (rosa colorido; 76,7% dos glóbulos brancos) na medula óssea são caracterizados por aumento de SSC e expressão de CD4, CD13, CD15, CD33 (brilhante), CD38, CD56, CD64, CD117, CD123 e HLA-DR sem CD14, CD16 ou CD34. Fonte: CHEN e CHERIAN, 2017.

A pesquisa de NORONHA et al., 2011 realizada no Centro de Referência em Oncologia em São Luiz, no Maranhão, incluiu primeiramente 73 adultos e crianças diagnosticados entre 2008 e 2011. Três pacientes foram excluídos, sendo estes os que se recusaram a participar ou cujos responsáveis legais não permitiram sua participação (n = 1) e os casos de leucemia mieloide crônica em crise blástica (n = 2), resultando em 70 participantes. O diagnóstico foi feito com base em hemograma completo, esfregaço de aspirado de medula óssea e imunofenotipagem por citometria de fluxo. O esfregaço da medula óssea foi realizado por meio da contagem diferencial de 500 células coradas com May- Grünwald-Giemsa e a conclusão diagnóstica foi dada quando a contagem de blastos na

medula óssea era maior que 20%. A LMA foi classificada de acordo com os critérios franco-

americano-britânicos (FAB). As amostras de sangue periférico (n = 12) ou medula óssea (n = 58) foram coletadas em EDTA para imunofenotipagem e processadas em até quatro horas após a coleta.

No diagnóstico imunofenotípico, foi adicionado as amostras 2 ou 3 anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo e foram direcionados a antígenos de células mieloides, sendo eles: CD13, CD33, CD117 e mieloperoxidase (MPO), monócitos (CD14 e CD64), pan-leucócitos de linhagem não específica (CD45) e células precursoras (CD34, antígeno leucocitário humano-DR (HLA-DR). A tabela 3 mostra a divisão dos subtipos de leucemia aguda encontrado, divididas entre adultos e crianças.

Tipo de leucemia	Casos (n=70)	Crianças (n=48-68,6%)	Adultos (n=22-31,4%)
Leucemia linfoblástica aguda	42 (60%)	37 (77,1%)	5 (22,8%)
Leucemia mieloide aguda	26 (37,1%)	9 (18,7%)	17 (77,3%)
Leucemia bifotónica aguda	2 (2,9%)	2 (4,2%)	

**Tabela 3:** Frequência de cada tipo de leucemia aguda de acordo com a idade, Dos 70 casos, a LMA foi presente em 26 pacientes, sendo mais frequente em 17 adultos e 9 crianças. Adaptado de NORONHA et al., 2011.

A distribuição da LMA segundo os critérios da FAB revelou que o subtipo de LMA M4 (3/9; 33,4%) foi o que mais ocorreu em crianças. Nos adultos, o subtipo predominante foi LMA-M0

(5/17; 29,4%). Entre os marcadores usados para caracterizar a LMA, CD117 e CD13 exibiram as maiores taxas de positividade (100%), seguidos por CD33 (96,1%). MPO apresentou taxa de positividade de 73,9%, enquanto CD14 e CD64 apresentaram taxas de positividade de 29,1% e 33,3%, respectivamente. Os marcadores de células imaturas CD34, HLA-DR e CD117 apresentaram taxas de positividade de 69,2%, 63% e 100% respectivamente. Dos cinco casos diagnosticados com AML-M3, apenas um expressou CD34 e nenhum expressou HLA-DR. CD45 foi expresso em 92,3% dos casos. Os pacientes adultos apresentavam mediana de idade de 35 anos (variação: 19-67 anos), enquanto a mediana das crianças era de 8 anos (variação: 1-15 anos). Os marcadores de células imaturas CD34, HLA-DR e CD117 apresentaram taxas de positividade de 69,2%, 63% e 100% respectivamente.

Entre os anos de 2015 e 2016 foi realizado um estudo por Rashed et al., no departamento de hematologia da Bangabandhu Sheikh Mujib Medical University (BSMMU), Dhaka Medical College & Hospital (DMCH), Sir Salimullah Medical College and Mitford Hospital (SSMC & MH) e National Institute of Cancer Research and Hospital (NICRH). 70 pacientes foram atendidos, que haviam sido diagnosticados recentemente com leucemia. Foram coletados 2 ml de aspirado de medula óssea de 29 pacientes e 2 ml de sangue periférico de 41, todos em tubos de

EDTA. Todos os espécimes foram obtidos e preparados para exame morfológico usando técnicas padrão. Os esfregaços foram secos ao ar e corados por coloração de Leishman seguido de microscopia óptica. A imunofenotipagem utilizou estratégia de bloqueio, com uso de pontos de expressão CD45 versus o espelhamento lateral (SCC) e também por expressão direta (FSC). Para células mieloides, foram utilizados os seguintes marcadores: CD13, CD33, CD117, CD14, CD15, CD64 e MPO. Qualquer marcador antigênico foi considerado positivo se 20% ou mais de células blásticas reagisse com o anticorpo. Os dados foram armazenados em computador, através de um software chamado Statistical Package of Social Science (SPSS).

Entre os casos, 64 (91,4%) puderam ser caracterizados por citometria de fluxo (CMF), sendo 31 casos (48,4%) de leucemia mieloide aguda conforme mostra a tabela 4. Os outros 6 casos (8,6%) permaneceram indeterminados, pois a população de células blásticas era <20%.

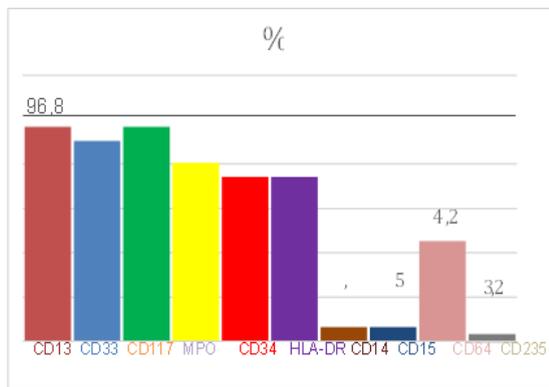
Tipo de leucemia aguda	Casos (N)	%	Subtipos	Casos (N)	%
Leucemia mieloblástica aguda (LMA)	31	48,2	N. A	N. A	N. A
Leucemia linfoblástica aguda (LLA)	31	48,2	LLA-B	21	67,7
Leucemia aguda de fenótipo	2	3,12	LLA-T B+Mi e	10 1 1	32,3 50 50

misto (LAFM)			B+T		
--------------	--	--	-----	--	--

**Tabela 4:** Divisão de casos de leucemia aguda (LA), 64 casos puderam ser caracterizados pela imunofenotipagem, sendo 31 (48,2%) como LMA. Adaptado de RASHED et al., 2016.

Entre os casos de LMA, foi encontrada a maior taxa de expressão para CD13 e CD117 (96,8%) seguido por 90,3% para CD33. MPO foi positivo em 80,6% dos casos. Marcadores de imaturidade HLA-DR e CD34 foram encontrados em 74,2% dos casos. Entre os casos de LMA, 2/31 (6,5%) foram CD34 e HLA-DR negativos e ambos foram provisoriamente diagnosticados como leucemia promielocítica aguda (LPMA) por citometria de fluxo. De 64 casos, 90,6 (58) casos apresentaram concordância, incluindo concordância completa e parcial.

Dos 31 pacientes com LMA, 8 (25,8%) estavam na faixa de idade ≥18 anos, o maior número de pacientes (11= 35,5%) estavam com idade entre a 40 anos, 8 (25,8%) estavam na faixa de 41 a 60 anos e os últimos 4 (12,9%) estavam na faixa de 61 a 80 anos sendo o menor número. A citometria de fluxo atribuiu linhagem a 64 casos de 70. Entre os 64 casos, 31 (48,4%) casos eram leucemia mieloblástica aguda (LMA). De acordo com a figura 4, marcadores encontrados.



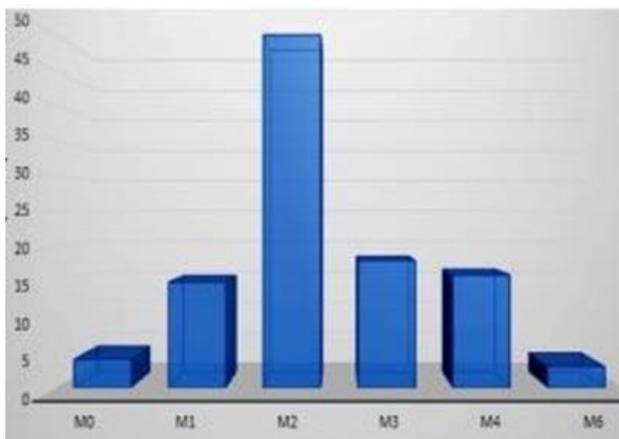
**Figura 4:** Padrão imunofenotípico de leucemia mieloblástica aguda. Imunofenótipos expressos na leucemia mieloblástica aguda em medula e sangue periférico. Adaptado de RASHED et al., 2016.

Já no estudo realizado por BASHARAT et al., 2017, no departamento de Hematologia do Army Medical College, em colaboração com o Departamento de Imunologia do Instituto de Patologia das Forças Armadas para caracterização imunofenotípica de casos diagnosticados recentemente de LMA, realizou uma correlação com esses achados morfológicos. Cento e seis pacientes de ambos os sexos e todas as faixas etárias com diagnóstico de leucemia mieloide aguda foram incluídos no estudo. Hemogramas e exame de medula óssea foram realizados e avaliados microscopicamente quanto à porcentagem de blastos e morfologia. A imunofenotipagem foi realizada por citometria de fluxo usando painel padrão em amostras de sangue periférico ou medula óssea. Os antígenos de superfície e citoplasmáticos de interesse são demonstrados na tabela 5 e foram analisados e correlacionados com os achados morfológicos. CD45 apresentou positividade média de 70,42%

e sem variações significativas entre os subtipos. HLA-DR foi expresso em 51,49% de todos os casos de LMA. A positividade mais forte foi vista em LMA-M0 (75%) e mais fraca positividade em LMA-M3 (12%). CD34 mostrou positividade média de 38% entre todos os subtipos, sendo o mais forte em LMA-M0 (74%) e mais fraco visto em LMA-M6 (1,33%). CD33 mostrou positividade média de 67%, sendo o mais forte em LMA-M4 (87%) e mais fraco em LMA-M6 (30%). CD13 foi estudado entre a população de blastos com positividade média de 56,7% entre todos os subtipos com positividade mais forte em LMA-M4 (71,8%) e mais fraca em LMA-M6 (22%). A expressão de CD7 foi positiva em LMA-M1, M2, M3 e M6, mais frequentemente expressa em LMA-M2. CD14 foi expressa somente em LMA-M4.

**Tabela 5:** Distribuição dos diferentes marcadores entre os diferentes subtipos de LMA. Porcentagem de imunofenótipos expressos em cada subtipo de LMA. Adaptado de BASHARAT et al, 2019.

Conforme mostra a figura 4, LMA-M2 foi o subtipo mais frequente constituindo 49 casos, seguidos por LMA-M3 (n = 18), LMA-M4 (n=16), LMA- M1 (n=15), LMA-M0 (n=4) e por último, o menos comum sendo LMA-M6 (n = 3).



**Figura 4:** Frequência de subtipos de LMA por imunofenotipagem. Dos 106 casos analisados, LMA-M2 foi o subtipo mais frequente constituindo 49 casos (47,2%) seguidos por LMA-M3 (n = 18, 17%). O menos comum sendo LMA-M6 (n = 3, 2,8%). Fonte: BASHARAT et al., 2017.

A taxa de concordância entre morfologia e citometria de fluxo (CMF) é observada em 102 (90%) casos com intervalo de confiança de 95% no estudo. Enquanto a discordância parcial foi observada em 4 casos (3,77%) onde a linhagem foi corretamente identificada com diferença na definição de apenas subtipos. Os antígenos mais comumente expressos foram CD13, CD33, CD45 e HLA-DR. Quase todos os blastos expressaram CD45 sem diferença notável entre os subtipos de LMA. A positividade média para CD13 entre todos os subtipos de AML foi de 57% e para CD33 foi de 67%. Expressões aberrantes de CD7 foi expresso em 26,4% dos casos, sendo mais frequente em LMA-M2 e CD19 foram expressas em 1,1% de todos os casos, respectivamente.

## DISCUSSÃO

O sistema de classificação para leucemias agudas baseava-se exclusivamente na

citomorfologia. Em 2008, a Classificação de Tumores de Tecidos Hematopoiéticos e Linfoides da Organização Mundial da Saúde incorporou a imunofenotipagem no diagnóstico da LMA, sendo classificada assim pela presença de no mínimo 20% de mieloblastos em sangue periférico ou medula óssea. Essa classificação atualizada reconhece 19 subtipos de LMA que além das características citoquímicas e citológicas, inclui também características imunofenotípicas e citogenéticas. Para a imunofenotipagem de leucemia, a citometria de fluxo é o método mais preferido e conveniente, pois um grande número de células pode ser avaliado com precisão em um período muito curto de tempo (RASHED et al., 2016).

Nos estudos de BASHARAT et al., a LMA infantil compreendeu 27,3% dos casos, enquanto a LMA adulta compreendeu 72%, sendo semelhantes aos estudos de Ahmad et al., com 20% de casos pediátricos e 86,4% de casos em adultos. No estudo de RASHED et al., todos os pacientes eram adultos, com variação de idade de 21 a 60 anos. Já no estudo de NORONHA et al., LMA ocorreu em 9 crianças (18,7%) e 17 adultos (77,3%).

Os estudos mostraram que a incidência se dá com maior frequência em adultos, estando de acordo com a literatura (ESTEY et al., 2006). A idade dos pacientes obteve variação de 1 a 80 anos, com média de 31 a 35 anos, e sendo observada com mais frequência em pacientes acima de 50 anos, concordando com o estudo de HARANI et al., 2005. Em outros estudos, como o de OSMAN et

al., 2015, mostra a média de idade de 35 a 47 anos. Na análise de divisão dos subtipos mais frequentes, foi observado que no estudo de BASHARAT et al. teve predominância do subtipo LMA-M2 (47,2%) semelhante ao estudo feito por GHOSH et al., 2003, seguido por LMA-M3 (17%). Já no estudo de NORONHA et al., foi observado a predominância do subtipo LMA-M0 (29,4%) seguido de LMA-M2 e LMA-M3 (23,5%). RASHED et al. não fizeram divisão de predominância em subtipos FAB. Segundo REGO et al., 2003, diz que a distribuição dos subtipos FAB é irregular, apresentando grandes variações geográficas, possivelmente em decorrência de fatores étnicos e ambientais.

Entre os marcadores usados para caracterizar a LMA, CD13 e CD117 expressaram maiores taxas de positividade nos estudos de RASHED (96,8%) e NORONHA (100% e 96,1%, respectivamente) com resultados semelhantes aos estudos de MUKDAE et al., 2011 (100% e 95%) e GRIMWADE et al., 2001 (100% e 73%). MPO (mieloperoxidase) teve expressão de 73,9% no estudo de NORONHA et al., e 80,6% no estudo de RASHED et al. Nos três estudos, o marcador monocítico CD13 teve predominância em 96,1% (NORONHA et al.,) 90,3% (RASHED et al.,) 67% (BASHARAT et al.) dos casos. MPO e CD117 não demonstraram expressão significativa no estudo de BASHARAT et al., tendo feito seu uso de forma limitada no estudo.

Os marcadores de células imaturas CD34 e

HLADR foram expressos nos estudos de RASHED et al (74,2% e) BASHARAT et al (38% e 51,49%) e NORONHA et al (69,2% e 63%), apresentando resultados semelhantes entre si. CD45 foi utilizado nos estudos de BASHARAT e NORONHA, tendo 70,4% e 92,3%, de expressão em todos os casos, respectivamente. Este marcador não foi utilizado no estudo de RASHED.

A concordância completa entre os resultados da citomorfologia e citometria de fluxo nos estudos de RASHED foi de 92,8%. Já nos achados de BASHARAT, foi observada concordância completa em 90% dos casos. NORONHA não realizou comparativo de resultados de morfologia e imunofenotipagem.

Por fim o fenótipo aberrante (expressão anormal de um antígeno de uma determinada linhagem em outra linhagem) mais frequente foi o CD7, confirmando os achados de ZHENG et al., 2008, seguido por CD19. A expressão de CD7 na LMA está correlacionada com menor incidência de remissão completa. De acordo com BELURKAR et al., a expressão de antígenos associados a linfoides, exceto CD7, em blastos de LMA carecem de significado prognóstico na LMA.

## CONCLUSÃO

De acordo com os estudos observados, pode-se concluir que a imunofenotipagem por citometria de fluxo, feita por uma combinação de padrões e intensidade da expressão do antígeno, melhora o rendimento diagnóstico na

LMA e é eficaz para atribuir linhagem dentre os tipos de leucemia. CD13 foi o marcador de célula imatura principal expresso dentre os 3 estudos, seguido de CD33 e CD45. Com relação a concordância da imunofenotipagem e morfologia, a média foi de aproximadamente 90%. É pertinente concluir que os resultados da citometria de fluxo interpretados com a morfologia são complementares.

As avaliações dos parâmetros examinados neste trabalho, como idade na incidência, marcadores imunofenotípicos comuns, subtipos mais frequentes e fenótipos aberrantes podem ser melhorados, devendo ser levado em consideração em investigações futuras e isso requerem maior duração de observação, focando na pesquisa de novos marcadores para o melhor prognóstico da doença.

## REFERÊNCIAS

ALLEGRA, Carmen J. et al. Extended RAS Gene Mutation Testing in Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion Update 2015. *Journal of Clinical Oncology*, v. 34, n. 2, p. 179–185, 10 Jan. 2016.

BELURKAR, Sushma et al. Correlation of morphologic and cytochemical diagnosis with flowcytometric analysis in acute leukemia. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v. 9, n. 1, p.

71–79, 1 Jan. 2013.

BETZ, Bryan L; HESS, Jay L. Acute Myeloid Leukemia Diagnosis in the 21st Century. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 134, n. 10, p. 1427–1433, 1 out. 2010.

CHEN, Xueyan; CHERIAN, Sindhu. Acute Myeloid Leukemia Immunophenotyping by Flow Cytometric Analysis. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 37, n. 4, p. 753–769, dez. 2017.

DA SILVA, D. F. Leucemia Mielóide Aguda Drielly Fernandes da Silva 2º Turma de Hematologia Avançada. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/hematologia/serie\\_branca/leucemias\\_linfomas\\_mieloma/leucemias/9-Leucemia-mieloide-aguda.pdf](https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/hematologia/serie_branca/leucemias_linfomas_mieloma/leucemias/9-Leucemia-mieloide-aguda.pdf)>.

DEOLINDA, E. et al. Alterações citogenéticas e moleculares em leucemia mieloide aguda: revisão e descrição de casos Molecular and cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia: review and case studies. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/eins/a/chqJryffN3gNnchwwkL7Fpn/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em: 10 set. 2021.

DE KOUCHKOVSKY, I.; ABDUL-HAY, M. “Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update.” *Blood Cancer Journal*, v. 6, n. 7, p. e441–e441, Jul. 2016.

ESTEY, Elihu; DÖHNER, H. Hartmut. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*, v. 368, n. 9550, p. 1894–1907, Nov. 2006.

GHOSH, S. et al. Haematologic and immunophenotypic profile of acute myeloid leukemia: an experience of Tata Memorial Hospital. *Indian Journal of Cancer*, v. 40, n. 2, p. 71–76, 1 abr. 2003.

GRIMWADE, D. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*, v. 98, n. 5, p. 1312–1320, 1 set. 2001.

HAMERSCHLAK, Nelson. Leucemia: fatores prognósticos e genética. *Jornal de Pediatria*, v. 84, n. 4, p. S52–S57, 1 ago. 2008.

HARANI, Mahadev S. et al. Frequency of fab subtypes in acute myeloid leukemia patients at Aga Khan University Hospital Karachi. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad: JAMC*, v. 17, n. 1, p. 26–29, 1 Jan. 2005.

HASAN, Milena et al. Semi-automated and standardized cytometric procedures for multi-panel and multi-parametric whole blood immunophenotyping. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, v. 157, n. 2, p. 261–276, 1 abr. 2015.

IKOMA, Maura R. V. et al. First proposed panels on acute leukemia for four-color immunophenotyping by flow cytometry from the Brazilian group of flow cytometry-GBCFLUX. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, v. 88, n. 3, p. 194–203, 19 abr. 2014.

LADINES-CASTRO, W. et al. Morphology of

leukaemias. *Revista Médica del Hospital General de México*, v. 79, n. 2, p. 107–113, abr. 2016.

MARTINS, S. L. R.; FALCÃO, R. P. A importância da imunofenotipagem na Leucemia Mieloide Aguda. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 46, n. 1, p. 57–62, mar. 2000.

MELO, Márcio. Leucemias e linfomas, atlas do Sangue Periférico, 2008, editora: LMP

NORONHA, Elda Pereira et al. Immunophenotypic characterization of acute leukemia at a public oncology reference center in Maranhão, northeastern Brazil. *Sao Paulo Medical Journal*, v. 129, n. 6, p. 392–401, Dez. 2011.

OSMAN, Ihsan M. et al. Flowcytometric Immunophenotypic Characterization of Acute Myeloid Leukemia (AML) in Sudan. *International Journal of Hematological Disorders*, v. 2, n. 1, p. 10–17, 23 Jan. 2015.

PETERS, John M.; ANSARI, M. Qasim. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 135, n. 1, p. 44–54, 1 Jan. 2011.

RASHED, Asif et al. Flow Cytometric Immunophenotyping of Acute Leukaemia in Adult and Its Comparison with Cytomorphology. *Original Research Article*, v. 157, n. 5, 2018.

REGO, M. F. N. et al. Acute leukemias in Piauí: comparison with features observed in other regions of Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, v. 36, n. 3, p.

331–337, 1 mar. 2003.

SAQIB Qayyum, Ahmad; RIZWAN, Yusuf; SHAMAILA, Burney. Frequency of various types of leukaemias diagnosed at PAF hospital mianwali.

pesquisa.bvsalud.org, v. 65, n. 5, p. 474–477, 2015.

SHALLIS, Rory M. et al. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Reviews*, v. 36, p. 70–87, jul. 2019.

SILVA, Grazielle C. da et al. Diagnóstico laboratorial das leucemias mieloides agudas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 42, n. 2, p. 77–84, 1 abr. 2006.

SOCIETY, A. C. Acute Myeloid Leukemia (AML) Subtypes and Prognostic Factors. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/detection-diagnosis-staging/how-classified.html>>. Acesso em: 18 set. 2021.

STRICKLAND, Stephen A.; MOHAN, Sanjay R.; SAVONA, Michael R. Unfavorable-risk acute myeloid leukemia dissected. *Current Opinion in Hematology*, v. 23, n. 2, p. 144–149, 1 mar. 2016.

ZHENG, Jine et al. A correlation study of immunophenotypic, cytogenetic, and clinical features of 180 AML patients in China. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, v. 74, n. 1, p. 25–29, 1 jan. 2008.