

A IMPORTÂNCIA DA IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DAS LEUCEMIAS

THE IMPORTANCE OF IMMUNOPHENOTYPING BY FLOW CYTOMETRY IN THE DIAGNOSIS OF LEUKEMIA

Alan Pereira Pontes^{I*}, Anderson Felix dos Santos^{II}, Mysrayn Yargo de Freitas Araújo Reis^{III},

Eduardo Uchôa Guerra Barbosa^{IV}, Carolina Uchôa Guerra Barbosa de Lima^V

Resumo. O diagnóstico preciso feito o mais precocemente possível é de suma importância para definir o prognóstico e tratamento adequado da leucemia. Nos últimos anos, novos critérios para o diagnóstico e monitoramento das leucemias são formulados, por sua vez, a citometria de fluxo tornou-se padrão ouro para esses fins, uma vez que sua análise é feita através dos antígenos presentes nas células, conferindo maior especificidade e precisão que a análise citomorfológica. O presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão integrativa sobre a importância da imunofenotipagem por citometria de fluxo para o diagnóstico diferencial dos tipos de leucemia. Durante a pesquisa, foram utilizados os operadores booleanos "AND" e "OR" com os seguintes descritores: leucemia aguda; leucemia crônica; citometria de fluxo e imunofenotipagem nas bases de dados do Pubmed, LILACS, SCIELO, Google Acadêmico e livros pertinentes ao tema publicados entre 2013 e 2023 que entornavam a seguinte pergunta norteadora: "Qual a importância da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico das leucemias e quais são os principais marcadores presentes em cada tipo de leucemia?". Como resultados, foram obtidos diversos imunofenótipos identificados pela imunofenotipagem apresentados de acordo com o tipo e subtipo de leucemia. O CD13 e CD33, por exemplo, foram os principais marcadores presentes na leucemia mieloide aguda, sendo então definidos como um dos principais marcadores para selecionar células da linhagem mieloide. Na LLA de células B também obteve dois marcadores importantes para definir a linhagem celular, CD19 e CD22. Portanto, concluiu-se que a imunofenotipagem é um exame de extrema eficácia para o diagnóstico preciso das leucemias, visto que a análise citomorfológica das células nem sempre é precisa e conclusiva, diferente da imunofenotipagem que possui alta precisão e especificidade por identificar o antígeno presente na célula cancerosa.

Palavras-Chave: Antígeno; Medula óssea; Tumor.

Abstract. Accurate diagnosis made as early as possible is of paramount importance in defining the prognosis and appropriate treatment of leukemia. In recent years, new criteria have been formulated for the diagnosis and monitoring of leukemia, and flow cytometry has become the gold standard for these purposes since its analysis is carried out using the antigens present in the cells, providing greater specificity and precision than cytomorphological analysis. The aim of this study was to carry out an integrative review of the importance of immunophenotyping by flow cytometry for the differential diagnosis of types of leukemia. During the search, the Boolean operators "AND" and "OR" were used with the following descriptors: acute leukemia; chronic leukemia; flow cytometry and immunophenotyping in the Pubmed, LILACS, SCIELO, Google Scholar databases and books pertinent to the topic published between 2013 and 2023 that addressed the following guiding question: "What is the importance of immunophenotyping by flow cytometry in the diagnosis of leukemia and what are the main markers present in each type of leukemia?". The results showed different immunophenotypes identified by immunophenotyping, presented according to the type and subtype of leukemia. CD13 and CD33, for example, were two of the main markers present in acute myeloid leukemia and were, therefore, defined as the main markers for selecting cells of the myeloid lineage. In B-cell ALL, two important markers for defining the cell lineage were also obtained: CD19 and CD22. It was therefore concluded that immunophenotyping is an extremely important test for the precise diagnosis of leukemia since the cytomorphological analysis of cells is not always precise and conclusive, unlike immunophenotyping, which has high precision and specificity for identifying the antigen present in the cancer cell.

Keywords: Antigen; Bone Marrow; Tumor.

*^I Farmacêutico graduado pela Faculdade de Enfermagem Nova Esperança
alan2001pereira@gmail.com

CEP: 58068050 João Pessoa, Brasil
ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-6115-4619>

^{II} Docente da Faculdade de Enfermagem Nova Esperança – PB,
CEP: 50670901, João Pessoa/PB, Brasil,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6622-3934>.

^{III} Docente da Faculdade de Enfermagem Nova Esperança – PB
CEP: 58429500, João Pessoa/PB, Brasil
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3919-985X>.

^{IV} Discente de Medicina da Faculdade Nova Esperança – PB
CEP: 58046-088, João Pessoa/PB, Brasil,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6818-7604>.

^V Docente da Faculdade de Enfermagem Nova Esperança – PB
CEP: 58064000, João Pessoa/PB, Brasil
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9703-3156>.

INTRODUÇÃO

A medula óssea (MO) é o órgão responsável pela produção das células hematopoiéticas, tais como: neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos e eritrócitos. Essas células são originadas e maturadas na MO, exceto os infócitos T que amadurecem no timo. Essas células imaturas são chamadas de blastos e todo esse processo de maturação e proliferação é chamado de hematopoiese. A presença de células imaturas na corrente sanguínea indica que há algum problema na MO, podendo ser causada por uma simples infecção ou até patologias mais graves como o câncer. Quando o câncer é originado na MO, é chamado de leucemia, uma vez que, é caracterizado pela proliferação exagerada de leucócitos disfuncionais¹.

No Brasil, as neoplasias hematológicas são a segunda principal causa da morte de crianças². A leucemia pode ser dividida, primariamente, entre leucemia mieloide e leucemia linfóide³. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), define-se leucemia como uma doença maligna dos glóbulos brancos, geralmente, de origem desconhecida. Tem como principal característica o acúmulo de células doentes na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais⁴.

A Citometria de Fluxo (CF) é uma metodologia capaz de medir simultaneamente múltiplos parâmetros de partículas ou células individuais em suspensão, por meio de um sistema de fluxo contínuo. No citometro, a dispersão da luz emitida em diversos ângulos por essas partículas pode distinguir diferenças de tamanho e complexidade, que são captadas por detectores forward light scatter (FSC) e side light scatter (SSC). Além disso, a presença de detectores de fluorescência no citômetro possibilita a realização da técnica de imunofenotipagem por CF, permitindo a identificação de uma variedade de antígenos celulares, por meio da emissão de luz por fluorocromos acoplados a anticorpos monoclonais específicos⁵.

A CF tornou-se um método analítico padrão ouro no diagnóstico e monitoramento das leucemias por possuir alta sensibilidade e especificidade, permitindo a identificação e classificação da linhagem acometida por meio de marcadores de superfície específicos, no entanto, mesmo sendo um exame tão importante, não é tão conhecido pelo público da saúde⁶. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo, realizar uma revisão integrativa sobre a importância da imunofenotipagem por citometria de fluxo para o diagnóstico diferencial dos tipos de leucemia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a busca de dados seguindo rigorosamente os critérios metodológicos, foram selecionados um total de 16 trabalhos que se encaixam nos padrões exigidos nos anos de 2013 até 2023. Durante a coleta de dados, a grande maioria de trabalhos que abordavam a imunofenotipagem por citometria de fluxo foram encontrados no Google Acadêmico, sendo a maior parte de trabalhos publicados entre os anos de 2016

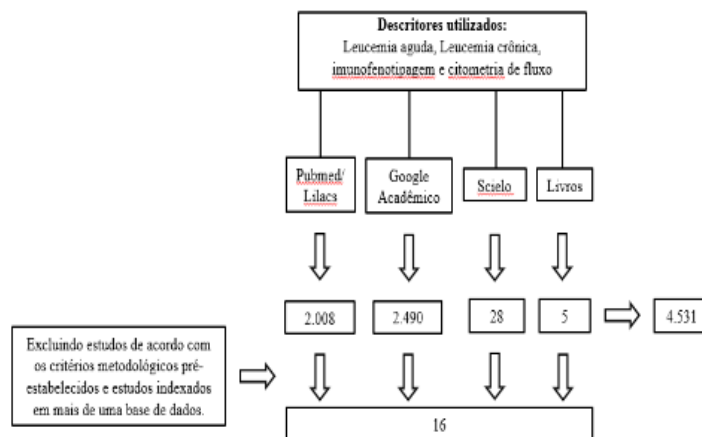


FIGURA 2: Trabalhos selecionados

Todos os estudos indexados foram organizados com o título, revista, ano de publicação e resultados, o que possibilitou alcançar maior entendimento dos trabalhos, sendo estes dispostos no Quadro 1.

Título	Revista e ano	Objetivo	Resultados
Diagnóstico diferencial de leucemia por imunofenotipagem	Research, Society and Development, 2022	Explicar sobre a importância do diagnóstico diferencial pelo método de imunofenotipagem e como ele é realizado	É de suma importância o tempo que o diagnóstico da leucemia é realizado, isso vai interferir em todo o tratamento e prognóstico e o principal método que deve ser utilizado é a imunofenotipagem.
Métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico da leucemia linfóide crônica: uma revisão.	Brazilian Journal of Health Review, 2019.	Descrever aspectos gerais da LLC e abordar os métodos laboratoriais que podem ser realizados e utilizados para um diagnóstico eficaz da doença.	A confirmação da linhagem e do estágio de maturação em que estas células estão é feita por meio da imunofenotipagem por citometria de fluxo, que revela o perfil fenotípico das células hematopoiéticas anormais.
A imunofenotipagem no diagnóstico e monitoramento da leucemia mieloide aguda	Revista Brasileira de Biomedicina, 2021	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	LMA-M0: CD13, CD33, CD11b; M1: CD13, CD33, CD34, CD7, CD4, CD11b e o HLA-DR; M2: CD19 ou CD56 + CD33 e CD34; M3: CD13e CD3; CD34, HLA-DR, CD14 negativos; M4: CD13e CD33 + CD14, CD15e CD11b; M5: presença de população blástica com relação tamanho/grânulo maior que na LMA M0; M6: CD45 negativo; CD71+glicoforina positivo; M7: CD13, CD33 +CD41, CD42 ou CD61 positivos
Métodos diagnósticos da leucemia mieloide aguda	ACT: Academia de Ciências e Tecnologia, 2020	O objetivo do artigo é divulgar as formas de diagnóstico laboratorial para a detecção da Leucemia Mieloide Aguda	LMA-M0: CD13 ou CD33 e CD34; LMA-M1: CD13 e 33; LMA-M2: CD13 e CD33; LMA-M3: CD13 e CD33; LMA-M4: CD13, CD14, CD15, CD11b; LMA-M5: CD14, CD11b e CD15; LMA-M6: Glicoforina A; LMA-M7: CD 41.
Leucemia linfóide aguda e seus principais conceitos	Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente Ariquemes, 2017	Apresentar sua forma de manifestação, diagnóstico, tratamento associado, com intuito de esclarecimento e contribuição dos estudos sobre leucemia linfóide aguda	pró-B (B-I): HLA-DR, TdT, CD34, CD19 e CD22. (B-II): CD10, que tem grande influência positiva no prognóstico, CD22, CD19 ou CD20. A LLA do tipo pré-B (B-III) apresenta cadeia μ citoplasmática, com a inclusão de CD19, CD20 e CD10. A B-IV expressa além dos marcadores anteriores, imunoglobulinas de superfície.

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados dos estudos selecionados, assim como em Abreu (2021), classificaram a leucemia como um acúmulo de células malignas na medula óssea (MO), divididas em quatro principais tipos: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia linfóide crônica (LLC). Para Awelino (2019), ambos os tipos de leucemia são capazes de acometer todas as faixas etárias, sendo as leucemias mieloides mais comuns em pacientes de 40 a 80 anos, enquanto a leucemia linfóide é a mais comum em crianças e adolescentes, no entanto, muitos estudos, assim como em Melo (2020), especificam que apenas a LLA é mais comum em crianças.

Guimarães (2022) relata que é imprescindível que o diagnóstico de leucemia seja feito rapidamente e de forma adequada, porque vai interferir na definição do prognóstico e escolha do tratamento. Portanto, Santos (2019) cita que as técnicas de citogenética, imunofenotipagem e genética molecular são a tríade de diagnóstico das leucemias, identificando e definindo o tipo celular da doença.

Souza (2019) complementa que a imunofenotipagem, realizada pela técnica de citometria de fluxo (CMF), é útil tanto no diagnóstico como na classificação, prognóstico e monitoramento das leucemias através da caracterização fenotípica das células leucêmicas, pois é um método multiparamétrico que utiliza anticorpos monoclonais (AcMo) marcados com fluorocromos para analisar os padrões de expressão de antígenos (CDs – do inglês, clusters designations) em populações celulares de interesse.

Para Silva (2016), a LMA é uma neoplasia maligna dos glóbulos brancos resultante de uma mutação, em que algumas das células de linhagem mieloide não conseguem atingir seu estágio final de maturação, permanecendo na forma de blastos. Com isso, as células leucêmicas se proliferam, acometendo a MO e prejudicando a produção das demais células. As células neoplásicas que caem na corrente sanguínea podem se alojar em outros tecidos. A LMA é subdividida em sete tipos diferentes, esses são: LMA-M0 (Leucemia mieloide com mínima diferenciação); LMA-M1 (Leucemia mieloide sem maturação); LMA-M2 (Leucemia mieloide aguda com maturação); LMA-M3 (Leucemia mieloide promielocítica aguda); LMA-M4 (Leucemia mielomonocítica aguda); LMA-M5 (Leucemia monocítica aguda); LMA-M6 (Leucemia eritróide aguda); LMA-M7 (Leucemia megacariocítica aguda), conforme é descrito em Souza (2019). Cada um desses tipos de LMA possui um grupo de antígenos específicos. O quadro 2 mostra quais são os principais marcadores das LMAs e foi construído de acordo com os dados comparados de Tresso (2015), Silva (2017), Melo (2020) e Santos (2021).

QUADRO 2: Antígenos presentes nas LMAs.

SUBTIPO	MARCADORES
M0	CD13, CD33, CD11b ou CD34
M1	MPO, CD13, CD33, CD117, HLA-DR ou CD11b
M2	CD13, CD33, CD34, MPO, CD117, CD19 e CD56.
M3	MPO, CD13, CD33
M4	CD13 e CD33, CD14, CD15 e CD11b
M5	CD13, CD33, MPO, CD14 e CD15
M6	CD13, CD33, MPO, CD71, HLA-DR e Glicoforina A
M7	CD13, CD33, CD41, CD42 e CD61

Após a colheita dos principais marcadores presentes nas LMAs, de acordo com os trabalhos selecionados, pode-se observar boa correlação entre os marcadores apresentados. A principal dissimetria dos dados foi na presença de antígenos da linhagem linfóide na LMA-M2, descrita em Santos (2021). Vale salientar a importância da identificação dos antígenos CD13 e CD33, uma vez que são os principais marcadores da linhagem mieloide e estão presentes em todas as classificações de LMAs.

A LMC é uma neoplasia clonal com presença de todos os tipos celulares, com predomínio de células mieloides maduras disfuncionais. E possui três fases: Fase crônica, fase acelerada e crise blástica. Essa última é o estado mais crítico da doença onde ocorre uma evolução de LMC para LMA¹¹.

Durante a pesquisa, notou-se que praticamente não há estudos sobre a imunofenotipagem na LMC, em consequência do diagnóstico dessa doença se dar pela identificação do cromossomo philadelphia (Ph) e/ou do gene BCR-ABL. Até que um estudo publicado pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC) em 2020, informou que a imunofenotipagem é usada na LMC somente em caso de crise blástica e os critérios imunofenotípicos permanecem os mesmos que na LMA.

A Leucemia linfóide aguda (LLA) é uma leucemia de linhagem linfocitária onde as células não atingem seu estágio final de maturação, permanecendo no estágio de blastos. A LLA é subdividida em LLA-B, LLA B-I, LLA B-II, LLA B-III e LLA B-IV, em casos de células B e LLA-T e LLA pré-T no caso de células T. O quadro 3 foi formulado com base nos dados contidos em Zago (2013), Cavalcante (2017) e Silva (2017).

QUADRO 3: Antígenos presentes nas LLA.

SUBTIPOS	MARCADORES
LLA-B	CD-19, CD22 ou CD79
LLA B-I	DE19, CD22, CD79a, HLA-DR e TdT
LLA B-II	CD19, CD22, CD24, CD79a e CD10
LLA B-III	CD19, CD22, CD24, CD79a e Ig c
LLA B-IV	CD19, CD22, CD24, CD79a e Ig s
LLA-T	CD3, CD7, CD2, CD1a, CD5, CD4, CD1a ou CD8
LLA pré-T	CD3 e CD7

Fonte: Zago (2013), Cavalcante (2017) e Silva (2017)

Ainda houve certa discordância apenas sobre os marcadores nas LLAs de células T, visto que para Cavalcante (2021), no subtipo pré-T há o predomínio de antígenos CD3, CD7, CD2, CD5 e TdT, e na LLA-T observa-se CD3, CD2, CD1, CD4 e CD8. Mas nos trabalhos de Zago (2013) e Silva (2017), os marcadores para essas LLAs foram exatamente idênticos, ou seja, na LLA-T: CD3, CD7, CD2, CD1a, CD5, CD4 ou CD8 e na LLA pré-T CD3 e CD7 com os demais marcadores negativos. Devido a repetibilidade dos marcadores em ambos trabalhos, priorizou-se mantê-los no quadro 3.

A LLC é definida por Vieira (2017) como uma leucemia que ocorre de maneira lenta, e progride de forma assintomática, mas com o avanço da doença, a proliferação celular torna-se acelerada e agressiva. Os tipos de LLCs e seus marcadores são definidos por Zago (2013), Silva (2016) e Silva (2017) no quadro 4. Vale notabilizar que não houve diferenças significativas nos marcadores apresentados durante a comparação dos dados.

QUADRO 4: Antígenos presentes nas LLCs.

SUBTIPOS	MARCADORES
LLC B	CD19, CD20, CD24, CD23 e CD24
LLC T	CD2, CD3, CD4, CD5 e CD7

Fonte: Zago (2013), Silva (2016) e Silva (2017)

Salienta-se, que durante a busca por trabalhos e análise dos mesmos, enfrentou-se grande carência em estudos que abordassem os imunofenótipos presentes nas LMCs e LLCs, sendo os trabalhos que abordavam os marcadores nas leucemias agudas mais comuns.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é de suma importância para o diagnóstico preciso das leucemias, uma vez que identifica os antígenos presentes nas células de interesse através de anticorpos monoclonais que se ligam aos marcadores presentes nas células. Os diferentes tipos de leucemias possuem subtipos que podem ser classificados de acordo com os marcadores apresentados. As LMAs, por exemplo, apresentam positividade para dois principais marcadores, o CD13 e CD33, presentes em todos os subtipos de LMAs. Esses marcadores podem ser usados para selecionar células da linhagem mieloide quando há suspeita de leucemia desta linhagem.

Não só sobre LMA, mas o trabalho também conseguiu evidenciar os principais marcadores presentes nas LLAs e LLCs, exceto na LMC, pois o diagnóstico permanece sendo através da identificação do cromossomo Ph e/ou do gene BCR-ABL.

Vale destacar que durante a busca de dados houve certa carência de estudos publicados na língua portuguesa sobre os imunofenótipos identificados em cada tipo de leucemia, o que serviu de motivação para o presente trabalho em consolidar o máximo de informações pertinentes ao tema a fim de acumulá-las em um único trabalho. Diante do exposto, observa-se que a imunofenotipagem por citometria de fluxo tem ganhado destaque e relevância pela precisão e especificidade oferecida. Esse exame tem várias vantagens, como identificar as células cancerígenas, classificar os subtipos de leucemias e acompanhar o tratamento, além de poder detectar recaídas da doença. Outrossim, não é só utilizado na hematologia, mas também na citogenética, microbiologia, parasitologia, oceanografia, produção de medicamentos.

Para um estudo futuro, pretende-se abordar de forma mais acurada sobre a imunofenotipagem por citometria de fluxo, abordando sobre fluorocromos e a análises de dados, dentre outros assuntos que sejam voltados ao tema de forma lúcida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. TRATADO DE HEMATOLOGIA, 1º Edição São Paulo: ATHENEU, 2013.
2. Vieira AF, Neves B, Tonelli SR. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA LEUCEMIA LINFOIDE NAS REGIÕES DO BRASIL. Campinas: Revista UNILUS Ensino e Pesquisa, 2017; 37(14): 130-143.
3. Awelino JF, Aguera RG, Romanichen FMDF. FATORES EPIDEMIOLÓGICOS DAS LEUCEMIAS LINFOIDE E MIELOIDE. Maringá: Revista UNINGÁ, 2019; 56(3): 9-19. doi: 10.46311/2318-0579.56.eUJ2810.
4. Leucemia. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Disponível em: <https://www.gov.br/inca/ptbr/assuntos/cancer/tipos/leucemia>. Acesso em: 04/06/2022
5. Ehlert LR, Silva CL, Grando AC. A importância da citometria de fluxo no diagnóstico e monitoramento da hemoglobinúria paroxística noturna. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 2021; 57: 1-8. doi: 10.5935/1676-2444.20210019.
6. Guimarães LC, Fazenda J. Diagnóstico diferencial de leucemia por imunofenotipagem. *Taubaté: Research, Society and Development*, 2022; 11(14): e485111436754. doi: 10.33448/rsd-v11i14.36754.
7. Abreu GM, Sousa SC, Gomes EV. Leucemia Linfóide e Mieloide: Uma breve revisão narrativa. *Curitiba: Brazilian Journal of Development*, 2021; 7(8): 80666-681. doi: 10.34117/bjdv7n8-333.
8. Melo MAW, Silveira CM. LABORATÓRIO DE HEMATOLOGIA: Teorias, técnicas e atlas, 2º Edição. Rio de Janeiro: Rubio, 2020.
9. Santos MMF, Jesus GP, Ferreira LP, França RF. LEUCEMIA MIELOIDE, AGUDA E CRÔNICA: DIAGNÓSTICO E POSSÍVEIS TRATAMENTOS. *Teresinha: Revista Saúde em Foco*, 2019; Edição nº 11: 279-294.
10. Souza AA, Pedrazzani FS. IMPORTANCIA DO PAPEL DE SCREENING DE IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO PARA O DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS AGUDAS. *Criciúma: Revista Inova Saúde*, 2019; 9(1): 155-75. doi: 10.18616/inova.v9i1.3041
11. Silva PH, Comar SR, Merlin JC, Alves HB, Henneberg R, Stingham S. T. *Hematologia Laboratorial*, 1º Edição. Porto Alegre: Artmed, 2016.
12. Tresso M. METODOS DIAGNOSTICOS DA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA. São José do Rio Preto: ACT: Acadêmia de Ciências e Tecnologia, 2015.
13. Silva AM, Neto LMR. HEMATOLOGIA: Métodos e interpretação, 1º Edição. São Paulo: Roca, 2017
14. Santos GCA, Cordeiro NM. A IMUNOFENOTIPAGEM NO DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA. Rio de Janeiro: *Revista Brasileira de Biomedicina*, 2021; 1(1): 27-43. doi:

15. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS DA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA DO ADULTO. CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2020/pcdt_leucemiamieloidecronicadulto_cp_02_2020.pdf. Acesso em: 02/2020
16. Cavalcante MS, Rosa ISS, Torres F. LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA E SEUS PRINCIPAIS CONCEITOS. Ariquemes: Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente. Ariquemes, 2017; 8(2):151-164. doi: 10.31072/rcf.v8i2.578.