



CENTRO UNIVERSITÁRIO BRASILEIRO – UNIBRA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

HELENA JOSEFA DA SILVA NETA
RUBYA LAIS ALEXANDRE VICENTE DA SILVA
LARISSA LUANE RODRIGUES DE SOUZA

**IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO
NO DIAGNÓSTICO DAS LEUCEMIAS AGUDAS**

RECIFE

2022

HELENA JOSEFA DA SILVA NETA
RUBYA LAIS ALEXANDRE VICENTE DA SILVA
LARISSA LUANE RODRIGUES DE SOUZA

**IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DAS
LEUCEMIAS AGUDAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Disciplina TCC II do curso de Biomedicina do
Centro Universitário Brasileiro – UNIBRA, como
parte dos requisitos para conclusão do curso.

Professor Orientador(a): Dr. Luiz da Silva Maia
Neto

RECIFE

2022

Ficha catalográfica elaborada pela
bibliotecária: Dayane Apolinário, CRB4- 1745.

S586i Silva, Rubya Lais Alexandre Vicente da
Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo no Diagnóstico das
Leucemias Agudas / Rubya Lais Alexandre Vicente da Silva, Helena
Josefa da Silva Neta, Larissa Luane Rodrigues de Souza. Recife: O Autor,
2022.

50 p.

Orientador(a): Dr. Luiz da Silva Maia Neto.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro Universitário
Brasileiro – UNIBRA. Bacharelado em Biomedicina, 2022.

Inclui Referências.

1. Leucemia. 2. Mieloide. 3. Linfóide. 4. Imunofenotipagem. 5.
Citometria. I. Silva Neta, Helena Josefa da. II. Souza, Larissa Luane
Rodrigues de. III. Centro Universitário Brasileiro - UNIBRA. IV. Título.

CDU: 616-071

Dedicamos esse trabalho para todos que estão em tratamento para remissão da leucemia, que sempre possa haver esperança para os dias melhores.

AGRADECIMENTOS

Helena: Primeiramente quero agradecer a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse não somente nestes anos como universitária, mas também em todos os momentos de dificuldade quais pensei que não iria conseguir passar. Agradeço à todos, minha família, namorado e amigos que com seu incentivo me fizeram chegar a conclusão de meu curso e início de uma nova carreira. Vocês desempenharam um papel importante no meu crescimento e vão ter para sempre minha eterna gratidão.

Larissa: Primeiramente a Deus, por me ajudar a ultrapassar todos os obstáculos que foram entrando no caminho ao longo do curso.

A minha família, pelo apoio e vibração a cada etapa que foi concluída.

Aos professores que ao longo desses anos foram de extrema importância para o aprendizado e capacitação que mostraram durante o período do curso.

Rubya: Agradeço à Deus pela benção da minha primeira graduação, por ter me dado forças para lutar pelo meu melhor.

A Helena e Larissa, minhas companheiras de TCC com quem compartilhei o tema, preocupações, mas também esperança de que tudo daria certo.

Aos amigos e familiares que são os pilares que me mantêm sempre erguida.

Aos professores pelos ensinamentos passado nas aulas, onde em cada período e disciplina foram acrescentados aprendizados imensuráveis.

Ao meu namorado Everton por estar sempre ao meu lado e ter me ajudado das formas que podia na realização desse trabalho.

RESUMO

As leucemias agudas são neoplasias malignas que consiste na proliferação de células leucocitárias imaturas no sangue e medula, e são classificadas de acordo com sua linhagem: Mieloide ou Linfoide. A confirmação inicial da doença é feita pelo hemograma, com o acúmulo de mais de 20% de blastos no sangue periférico, mas outros exames são necessários para haver a identificação correta. Dito isso, o objetivo desse trabalho é expor um método de identificação, que incluem anticorpos (CD's) que serão específicos para os antígenos das células leucêmicas, havendo assim uma definição precisa quanto ao tipo da leucemia. Foram utilizados métodos através de revisão bibliográfica se baseando em artigos científicos disponibilizados em sites, revistas e livros como: Scientific Electronic Library Online (SciELO), INCA, Google acadêmico, repositório institucional da Fiocruz etc. Conclui-se que a determinação da linhagem e sua classificação é necessária para encaminhar o paciente a um tratamento preciso, aumentando assim as chances de uma remissão da doença.

Palavras chaves: Leucemia linfoide; Leucemia mieloide; Imunofenotipagem; Citometria; Diagnóstico

ABSTRATC

Acute leukemias are malignant neoplasms that consist of the proliferation of immature leukocyte cells in the blood and marrow, and are classified according to their lineage: Myeloid or Lymphoid. The initial confirmation of the disease is made by the blood count, with the accumulation of more than 20% of blasts in the peripheral blood, but other tests are necessary for the correct identification. That said, the objective of this work is to expose a method of identification, which include antibodies (CD's) that will be specific for leukemia cell antigens, thus having a precise definition as to the type of leukemia. Methods were used through bibliographic review based on scientific articles available on websites, magazines and books such as: Scientific Electronic Library Online (SciELO), INCA, Google academic, institutional repository of Fiocruz etc. The determination of the lineage and its classification is necessary to refer the patient to an accurate treatment, thus increasing the chances of a remission of the disease.

Keywords: Lymphoid leukemia; Myeloid leukemia; immunophenotyping; cytometry; diagnosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diferenciação da célula tronco pluripotente.....	15
Figura 2- Células do subtipo LMA-M0.....	20
Figura 3- Células do subtipo LMA-M1.....	21
Figura 4- Células do subtipo LMA-M2.....	21
Figura 5- Células do subtipo LMA-M3.....	22
Figura 6- Células do subtipo LMA-M4.....	23
Figura 7- Células do subtipo LMA-M5.....	24
Figura 8- Células do subtipo LMA-M7.....	25
Figura 9- Sistema fluido do citometro.....	29
Figura 10 –Fotodetectores e emissão dos lasers.....	30
Figura 11- Tipos de gráficos.....	32
Figura 12- Amostra de paciente saudável.....	33
Figura 13- Paciente portador de LLA-B.....	34
Figura 14- Paciente portador de LMA-M7.....	35
Figura 15- Paciente portador de LLA-T.....	36
Figura 16- Paciente portador de LMA-M3.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tabela de classificação FAB da Leucemia linfoide aguda.....	18
Tabela 2- tabela de classificação da LLA-B com anormalidades geneticas.....	19
Tabela 3- tabela de Classificação EGIL.....	19
Tabela 4- tabela de imunofenotipagem da LMA.....	26
Tabela 5- tabela de perfil imunofenotipico das leucemias linfoides.....	27
Tabela 6- Tabela de fluorocromos.....	31
Tabela 7- Tabela de resultados.....	39

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 objetivo geral.....	14
2.2 objetivo específico	14
3 REFERENCIAL TEORICO.....	15
3.1 Hematopoese e diferenciação celular.....	15
3.2 Leucemias agudas.....	16
3.2.1 <i>Leucemia linfoide aguda</i>	16
3.2.1.1 aspectos clínicos	17
3.2.1.2 Hemograma.....	17
3.2.1.3 Mielograma.....	17
3.2.1.4 Classificação dos linfoblastos.....	18
3.2.2 <i>Leucemia mieloide aguda</i>	20
3.2.2.1 Leucemia Mielóide Aguda- Indiferenciada (LMA-MO).....	20
3.2.2.2 Leucemia Mieloide Aguda-Mieloblastíca (LMA-M1).....	21
3.2.2.3 Leucemia Mieloide Aguda-Mieloblastíca com maturação (LMA-M2).....	21
3.2.2.4 Leucemia Mieloide Aguda-Mieloblastíca com maturação Variante (LMA-M2v).....	22
3.2.2.5 Leucemia Mieloide Aguda-Promielocítica hipergranular (LMA-M3).....	22
3.2.2.6 Leucemia Mieloide Aguda-Promielocítica Hipogranular Variante (LMA-M3v).....	22
3.2.2.7 Leucemia Mieloide Aguda-Mielomonocítica (LMA-M4).....	23

3.2.2.8 Leucemia Mieloide Aguda-Mielomonocítica com eosinofilia(LMA-M4eo).....	23
3.2.2.9 Leucemia Mieloide Aguda-monoblastica sem maturação(LMA-M5a).....	24
3.2.2.10 Leucemia Mieloide Aguda-Monocítica com Maturação (LMA-M5b).....	24
3.2.2.11 Leucemia Mieloide Aguda-Eritroleucemia (LMA-M6).....	25
3.2.2.12 Leucemia Mieloide Aguda-Megarioblastica (LMA-M7).....	25
3.3 Imunofenotipagem.....	26
3.4 citometria de fluxo.....	26
3.2.1 <i>Sistemas do citometro.....</i>	28
3.4.2 <i>Tipos de Gráficos</i>	32
3.4.3 <i>Análise dos dados em diferentes linhagens.....</i>	33
4 DELINEAMENTO METODOLOGICO	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERENCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

A leucemia aguda é uma doença progressiva dividida em duas categorias: linfocítica e mielocítica, onde uma é mais comum em crianças e a outra é rara na infância. No Brasil, os casos de doenças malignas em crianças por leucemia aguda é de 95 a 98%, sendo elas 80% linfocíticas (SILVEIRA; ARRAES, 2008).

Geralmente, o diagnóstico da leucemia mieloide aguda (LMA) baseia-se na avaliação do sangue periférico e da medula óssea, em alguns casos são incluídas técnicas adicionais, como imunofenotipagem com citometria de fluxo (SILVA, 2006). A citometria de fluxo é um poderoso instrumento de análise e conta de aspectos celulares. As células analisadas determinam o fenótipo das leucemias e ajuda a definir o prognóstico através de anticorpos marcados por corantes fluorescentes (RAVEL, 1997). A estrutura mais acessível ao procedimento é a superfície da célula, mas podemos avaliar também outras estruturas como citoplasma e núcleo. A fácil detecção de uma enorme quantidade de diferentes proteínas de superfície as torna especial, elas são usadas para várias funções de adesão, ligação de fatores de crescimento ou quimosinas. Por outro lado, a avaliação de antígenos intracelulares permite a identificação de moléculas associadas a enzimas que são alvos potenciais de terapia por drogas (VASCONCELOS, 2007).

Paralelamente foram obtidos fatos referentes a idade e sexo dos portadores da leucemia. Dos 38 pacientes analisados, 23 eram do sexo masculino e 15 do sexo feminino, sendo constatado um maior número na faixa etária adulta. Com relação aos dados clínicos a imunofenotipagem demonstrou um perfil característico de LMA com expressão de CD13/CD33 em todos os casos, o CD34 na maioria dos casos. Portanto, buscou-se reunir dados com o propósito de responder a problemática de questão da importância da imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das LMA (CRISPIM, 2000).

A partir destas considerações clínicas, o CD14 foi reativo nas leucemias monocíticas, sendo observado negativamente aos antígenos linfóides como CD19, CD10 e CD3. Foi notado também uma correlação direta entre a citomorfologia e a classificação FAB, havendo um predomínio do tipo de mielo monocítico LMA M4 que correspondeu a 41,7% dos casos. Estes dados comprovam não somente a importância da imunofenotipagem no diagnóstico das LMA como também no acompanhamento das neoplasias (CRISPIM, 2000). Nos últimos anos, essa técnica é o mecanismo mais relevante em analisar o perfil de expressão molecular nas células, determinando suas características visuais através da imunomarcagem de antígenos de superfície celular. Com isso, ela auxilia fortemente na execução de diagnósticos clínicos (BORGES, 2020).

O atual capítulo aborda as considerações iniciais a respeito do tema deste trabalho, ou seja, apresenta a proposta de trabalho de demonstrar o funcionamento do citômetro e citar marcadores específicos para identificação de células leucêmicas quanto a sua origem e diferenciação, trazendo também informações de como ele pode contribuir no âmbito acadêmico e social.

Os seguintes capítulos destacam-se as vantagens da utilização da citometria de fluxo no diagnóstico das leucemias. Sua técnica tem uma vasta verificação de número de células em pouco espaço de tempo, sendo capaz de fazer a identificação da heterogeneidade presente na amostra. Além disso, também faz uma abordagem de quão avançado estamos no momento em relação a tecnologia que cada vez mais tem se destacado e facilitado nas pesquisas de doenças sanguíneas.

Dessa forma, o estudo desse procedimento e suas aplicações na determinação do diagnóstico é de grande importância para diferenciação dos marcadores, auxiliando no manejo clínico dos pacientes.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

- Identificação da Leucemia aguda de diferentes linhagens celulares por meio da citometria de fluxo

2.2 Objetivo específico

- Demonstrar o funcionamento do citômetro.
- Citar marcadores específicos para identificação de células leucêmicas quanto a sua origem e diferenciação.
- Pautar as características de diferentes tipos de leucemias agudas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Hematopoese e diferenciação da linhagem celular

A formação dos componentes sanguíneos de um indivíduo se inicia nas primeiras semanas após a fecundação, as células tronco hematopoiéticas (CTH) se localizam no saco vitelino até o segundo mês de vida e são capazes de originar apenas eritrócitos. Até o sétimo mês os principais órgãos se tornam o fígado e baço, que podem continuar a produção até duas semanas após nascimento. Depois da fase fetal a medula passa a ser o único órgão hematopoiético, que no adulto é confinado apenas no interior de ossos centrais e ossos longos, onde lá as células serão maturadas, diferenciadas e liberadas na circulação (HOFFBRAND ; MOSS, 2013).

Para ocorrer a maturação de uma CTH é importante que haja uma exposição a um microambiente e fatores de crescimento, esses fatores são glicoproteínas liberadas por células estromas e tem funções de estímulos proliferativos e diferenciativos, juntamente com a possibilidade de estimular a produção de outros fatores (**Figura 1**). Para cada linhagem ocorre um processo de maturação distinto, na mielopoese a IL-3 e GM-CFS atua na diferenciação da célula precursora, enquanto a G-CFS e M-CFS distingue a formação das células granulocíticas e monocíticas maduras. Na linfopoese as interleucinas são as principais reguladoras, sendo IL-7 e IL-6 precursores da maturação da linhagem dos linfócitos B enquanto os linfócitos T são maturados no timo com precursores CD's (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

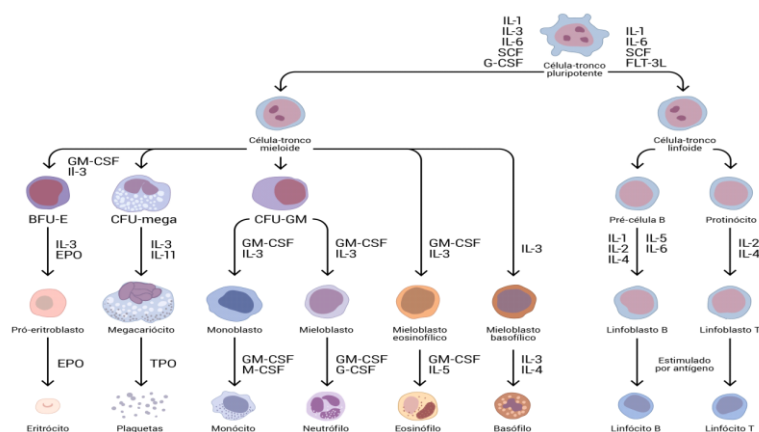


Figura 1- Diferenciação da célula tronco pluripotente (Fonte: MedicinaNET- abordagem aos pacientes com distúrbios hematológicos benignos, 2019)

3.2 Leucemias agudas

A leucemia é uma neoplasia dos leucócitos, que se baseia na proliferação de células imaturas na medula e corrente sanguínea por conta de mutações em seus genes. Existem vários tipos de leucemia, sendo as principais : Aguda e crônica, e da linhagem mieloide e linfoide (INCA, 2022).

As LA são doenças agressivas onde uma mutação ocorre na célula tronco ou em progenitores primitivos, e essa mutação resulta no aumento da velocidade de produção da célula cancerígena, diminuição da apoptose e bloqueio na diferenciação celular, que causam o acúmulo de blastos (HOFFBRAND; MOSS, 2011). Mesmo sendo de origem desconhecida, existem causas secundárias que podem ocasionar na neoplasia como radiações, substâncias químicas e fármacos, fatores genéticos e vírus oncogênicos como o HTLV-1 (SILVA; PILGER, Et.al, 2006).

Nas Doenças genéticas como síndrome de down, síndrome de bloom, anemia de falconi entre outras, existe uma incidência neoplásica maior(HOFFBRAND, 2018).

3.2.1 Leucemia linfoide aguda

A leucemia linfoide aguda constitui cerca de 80% de predominância em idade pediátrica, com incidência maior em 5 anos de idade, e existem casos também após os 40 anos onde a predominância é da linhagem celular B (HOFFBRAND, 2018). Em mais da metade dos pacientes pediátricos é possível detectar mutações genéticas como a causa da LLA, de acordo com Mullinghan existem em média 6 alterações no DNA de uma criança com leucemia. O fator genético tem alta intensidade vista que: LLA tem associação com translocações cromossômicas, o risco de um integrante da família desenvolver a neoplasia é maior (LASSALETTA, 2016).

3.2.1.1 Aspectos clínicos

As manifestações da LLA se apresentam devido à falta de células normais, que impede um funcionamento corporal ideal, e comum fadiga, dor óssea, diferentes graus de anemia, neutropenia, infiltração de blastos nos tecidos e sangramentos. Pode ocorrer aumento dos gânglios e inflamação nos testículos (CAVALCANTE, ET.al, 2017).

A infiltração no sistema nervoso central pode levar ao quadro de neuroleucemia ,onde se assemelha com meningite e pode haver paralisia de nervos cranianos. Para uma investigação complementar, existem os exames imunofenotípicos, morfológico, citogenético e molecular (LORENZI,2019).

3.2.1.2 Hemograma

No hemograma, na série vermelha pode ser encontrado anemias normocíticas e normocromicas com baixa contagem de reticulócitos, o nível de hemoglobina (Hb) em 80% dos casos é inferior a 10g/dl. Encontra- se também plaquetopenia com valores menores que 150.000/mm³ , leucócitos normais ou baixos, com blastos raros ou ausentes, porém em paciente com leucocitose pode ser numeroso (FARIAS; CASTRO, 2004) e (HILARIO; HILARIO, 2021).

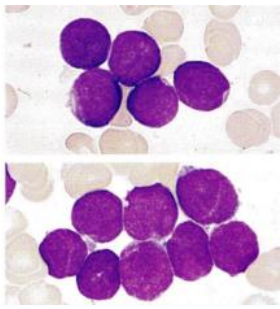
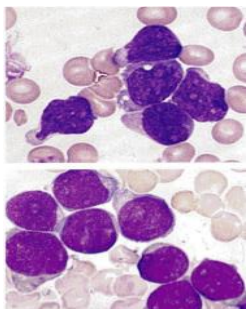
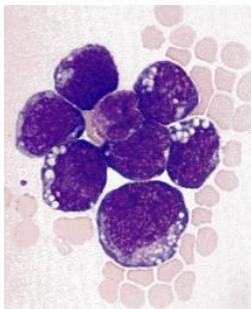
3.2.1.3 Mielograma

Na análise da punção da medula óssea, normalmente retirada do osso íliaco ou esterno, e de grande importância para a classificação da leucemia que é feito de acordo com a quantidade e morfologia dos blastos. É notável a hiper celularidade de linfoblastos e substituição do tecido adiposo por percursoros mielóide, eritroides e megacariócitos ficam escassos (HILARIO; HILARIO, 2021).

3.2.1.4 Classificação dos linfoblastos

As células leucêmicas geralmente não apresentam granulação em seu citoplasma, e a basófila citoplasmática é variada. A classificação da LLA foi desenvolvida pelo grupo Franco-americano-britânico (FAB) e varia de acordo com os atributos celulares dos blastos e são classificados em: L1, L2 e L3 (**tabela 1**) (FADEL, 2010).

Tabela 1- Classificação FAB da LLA

Classificação morfológica FAB da Leucemia linfóide aguda			
Aspectos morfológicos	L1	L2	L3
			
<i>Díâmetro celular</i>	Predominância de células pequenas, homogêneas	Grandes, heterogêneas	Grandes, heterogêneas
<i>Cromatina nuclear</i>	Fina ou aglomerada	Fina	Fina
<i>Forma do núcleo</i>	Regular, pode apresentar fendas ou indentação	irregular, podendo apresentar fendas ou indentação	Regular, redondo ou oval
<i>Nucléolos</i>	Indistintos ou não visíveis	Um ou mais por célula, grande e proeminente	Um ou mais por célula, grande e proeminente
<i>Quantidade de citoplasma</i>	escassa	Moderadamente abundante	Moderadamente abundante
<i>Basofilia citoplasmática</i>	Ligeira	Ligeira	Evidente
<i>Vacúolos citoplasmáticos</i>	Variáveis	Variáveis	Evidente

(Fonte: FARIAS. M, CASTRO. S, 2004)

Existe também a classificação pela OMS (**tabela 2**) que classifica a LA de acordo com as anomalias genéticas. A linhagem linfóide B conta com vários subtipos, e sua identificação correta é de extrema importância para a escolha do tratamento.

Tabela 2- Classificação de Ila-B com anormalidades genéticas

Leucemia/Linfoma linfoblástico B
Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes
<ul style="list-style-type: none"> • Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL 1 • Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com t(v;11q23); rearranjo MLL • Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com t(12;21)(p13;q22) TEL-AML 1(ETV6-RUNX1) • Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com hiperdiploidia • Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com hipodiploidia • Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com t(5;14)(q31;q32) IL3-IGH • Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1

(fonte: ZAGO, 2013)

A classificação do grupo EGIL (European Group for Immunophenotyping Leukemias) vem sendo mais utilizada, por inclui o perfil imunofenótipo e os aspectos morfológicos das células (**tabela 3**). As LLA-B são divididas por estágio de maturação (B-I/ Pró-B, B-II/ comum, B-III/Pré-B e B-IV/ célula B madura) progredindo crescentemente do imaturo ao maduro, sendo a B-II o subtipo mais comum (SILVA, 2009).

Tabela 3- Classificação EGIL

Classificação EGIL	
B-I (Pró-B)	Pré-T (imaturo)
B-II (Comum)	T intermediário
B-III (Pré-B)	T medular (maduro)
B-IV (Células B maduras)	

(Fonte: SILVA, 2009)

As LLAs da linhagem T estão presente em cerca de 25% dos adultos e 15% em crianças onde no sexo masculino ocorre maior predominância. São divididas em três grupos ,que são definidos de acordo com antígenos encontrado: LLA Pré-T, T intermediário e T medular (FARIAS; CASTRO, 2004).

3.2.2 LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

A leucemia mieloide aguda (LMA) é um grupo de doenças clonais do tecido hematopoético, que se caracteriza pela multiplicação anormal de células progenitoras da linhagem mieloide (mieloblastos), ocasionando produção insuficiente de células sanguíneas maduras normais, com conseqüente substituição do tecido normal. Desse modo, a infiltração da medula é frequentemente acompanhada de neutropenia, anemia e plaquetopenia (SILVA; et.al, 2006).

O acúmulo de células imaturas no tecido impede o funcionamento normal do corpo ocasionando mudanças quantitativas e qualitativas nas linhagens celulares. O tipo de classificação mieloide se dá pela fase celular que as células se deparam. Os sistemas mais utilizados para classificar a LMA são a da FAB que contém características morfológicas e da organização mundial de saúde (OMS), que insere morfológica, genética e análises clínica e citométricas (CRUZ, 2018).

3.2.2.1 Leucemia Mielóide Aguda- Indiferenciada (LMA-M0)

É um tipo de Leucemia rara, que é provocada pela infiltração da medula óssea por meio das células blásticas. Ela costuma ser chamada de indiferenciada porque possui um nível inferior no grau de diferenciação. Possui blastos pequenos com cromatina frouxa, nucléolo explícito, citoplasma agranular não apresenta a presença de bastonetes de Auer. É frequentemente confundida com os blastos da Leucemia linfóide aguda LLA-L2, e são negativos ao teste citotóxicos MPO. É diagnosticado pela imunofenotipagem quando se detecta a presença de um antígeno que possui linhagem mieloide (MELO, 2008).

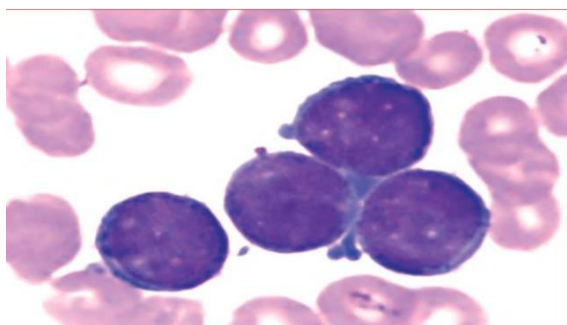


Figura 2- Células do subtipo LMA-M0. (Fonte: MELO,2008)

3.2.2.2 Leucemia Mieloide Aguda- Mieloblastíca (LMA-M1)

Em alguns casos desse subtipo é possível observar os blastos com bastonetes de Auer e uma alta positividade para MPO, já em outros casos os blastos podem trazer uma lembrança dos linfoblastos que nesse caso seria de linhagem linfóide e não mieloide podendo serem confundidos. a imunofenotipagem detecta o diagnóstico como positivo quando se tem a presença de ao menos 3 tipos diferentes de marcadores, como por exemplo CD11b, CD34, CD13 entre outros tipos (BRAGA,2019).

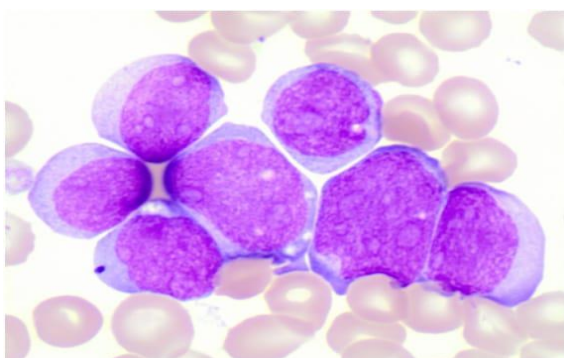


Figura 3- Células do subtipo LMA-M1 (Fonte: Portallabcursos.com)

3.2.2.3 Leucemia Mieloide Aguda- Mieloblastíca com maturação (LMA-M2)

É um subtipo que possui cerca de 30% da sua composição de células blasticas presentes na medula óssea. Caracterizado por possuir blastos grandes, presença de bastonete de Auer, citoplasma basofílico e possui grânulos azirofilicos. Os eosinófilos estão aumentados, porém não apresentam nenhuma anormalidade, nesse caso os blastos serão positivos para CD33, CD65w, CD13, e anti-mpo. Possui também antígenos de linhagem linfóides (CD19) (MARTINS; FALCÃO, 2000).

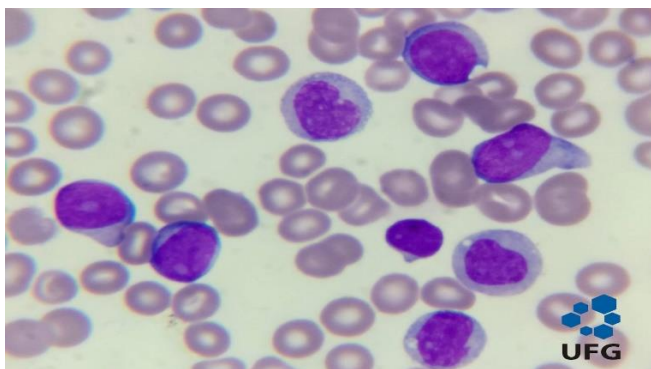


Figura 4- Células do subtipo LMA-M2 (Fonte: hematologia.farmacia.ufg.br)

3.2.2.4 Leucemia Mieloide Aguda- Mieloblastíca com maturação Variante (LMA-M2v)

Possuí uma morfologia diferente do subtipo LMA-M2, já que nesse caso os blastos são grandes, citoplasma maior e possui granulação azurofílas, em alguns casos a granulação pode ser tão elevada que se mostra um Pseudo-Chedi-Ak-Higashi, tem a presença de bastonetes de Auer. Ocorre com maior frequência em paciência que possuem a síndrome de down, apresenta alguns marcadores tumorais de linhagem linfoide de CD19 e CD56. É muito comum ter a presença de promielocitos, mielocitos e granulócitos maduros com diferentes graus de displasia e disgranulopese (MELO, 2008).

3.2.2.5 Leucemia Mieloide Aguda- Promielocítica hipergranular (LMA-M3)

Corresponde cerca de 15% de casos da LMA, tem uma morfologia com promielocitos incomuns, núcleo diferente e seu citoplasma possui bastante granulação. Em alguns dos casos foi observado uma locomoção de cromossomos (15 e 17). Nesse subtipo da LMA são observadas outras duas variações, LMA-M3 hipergranular e LMA-M3 hiporgranular ou também conhecida como variante (SAGRILLO, 2004).

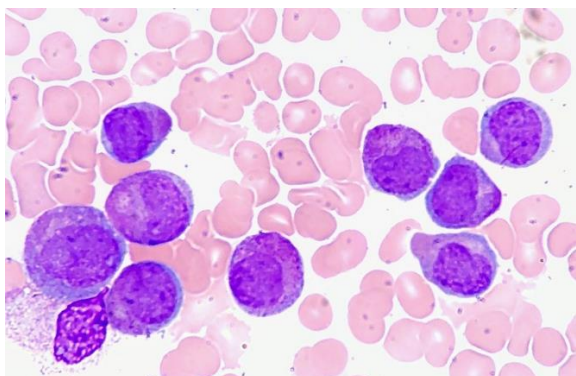


Figura 5- Células do subtipo LMA-M3 (Fonte: www.konsultasyon.net)

3.2.2.6 Leucemia Mieloide Aguda- Promielocítica Hiporgranular Variante (LMA-M3v)

A LMA-M3v é diagnóstica através de blastos citomorfologicos, associado a imunofenotipagem acaba esclarecendo alguns casos que talvez o resultado ainda seja duvidoso. Na LMA-M3 hiporgranular é observado uma elevação nas

quantidades dos leucócitos, são encontrados também blastos e promielocitos com bastante granulação. Na LMA-M3v o número de leucócitos é elevado, porém a célula que tem predominância é o promielocito, núcleo bilobular e citoplasma limpo ou com poucos grânulos aparente. Possuem marcadores mieloides CD15 E CD13 (LUSIS; et al, 1993).

3.2.2.7 Leucemia Mieloide Aguda- Mielomonocítica (LMA-M4)

São encontrados diferenciação das células leucemias que seriam as mielocíticas e as monocíticas. É um dos subtipo mais comuns da LMA que corresponde a 20% dos casos. Hiperplasia gengival se vê presente em 10% dos pacientes que foram diagnosticados com a M4. seu diagnóstico pode ser feito pela presença dos marcadores CD14 e CD11 (SOUZA,1998).

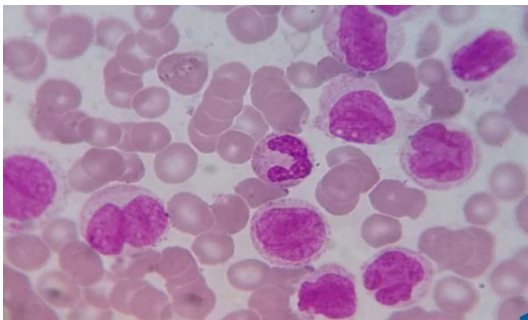


Figura 6 - Células do subtipo LMA-M4 (Fonte: hematologia.farmacia.ufg.br)

3.2.2.8 Leucemia Mieloide Aguda- Mielomonocítica com eosinofilia (LMA-M4eo)

Caracterizado por possuir parte monocítico sendo 20% e 80% são de células blasticas que compõe a medula óssea sendo superior a mais de 5000 monocitos do sangue periférico, aumentando o número dos eosinófilos presentes. Os blastos podem ter a presença do bastonete de Auer, já no estado morfológico com a presença de eosinófilos mostram estágios diferentes de maturação (SOUZA,1998).

3.2.2.9 Leucemia Mieloide Aguda- monoblastica sem maturação (LMA-M5a)

Definida pelo aparecimento de monoblastos, monócitos e promielocitos em cerca de mais de 80% das células não eritroides que estão presentes na medula óssea, que também consequentemente são responsáveis pelo valor superior na leucometria do sangue periférico. Ocorre uma diferença no citoplasma da LMA-M5a do LMA-M5b, no caso da LMA-M5a o citoplasma é agranulócito já no subtipo LMA-M5b pode conter grânulos presente no citoplasma. O núcleo é redondo com a cromatina frouxa, exibindo um ou mais nucléolos proeminentes, é mais difícil ocorrer a aparição de bastonetes de Auer. Ocorre um envolvimento extracelular como lesões cutâneas, doenças no sistema nervoso pode ocorrer também tumores no intestino (MELO, 2008).

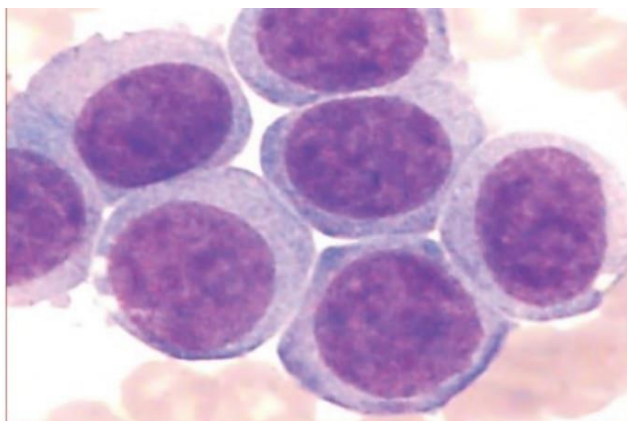


Figura 7- Células do subtipo LMA-M5 (Fonte: MELO, 2008)

3.2.2.10 Leucemia Mieloide Aguda- Monocítica com Maturação (LMA-M5b)

Determinada pela presença de células monocitárias anômalos. Os monoblastos estão em menor quantidade no sangue periférico do que na LMA-M5a, porém na medula óssea é maior que 80% das células. A leucometria também é bem superior, o que significa que ocorreu um mal prognóstico. A imunofenotipagem detecta positividade de CD33, negatividade de CD13 e CD34 e fraca positividade de CD4 que estão presentes em alguns antígenos. Na área citoquímica cerca de 80% das células leucemias são positivos em alfa-nae e alfa-nbe (MELO, 2008).

3.2.2.11 Leucemia Mieloide Aguda- Eritroleucemia (LMA-M6)

Sendo mais frequente em homens tem como característica apresentar mais da metade de eritroblastos presentes na células da medula óssea. Contendo também uma elevada quantidade de mieloblastos. Com formas nucleares atípicas na imunofenotipagem é positivo para células de linha mieloides CD13 e CD33 no caso das células eritrocitárias são visualizados pela glicoforina e possui positividade para MPO (BRAGA,2019).

3.2.2.12 Leucemia Mieloide Aguda- Megarioblastica (LMA-M7)

É um subtipo da LMA que foi caracterizado como classificação FAB a pouco tempo. Tem como origem megarioblastos que é bem confundido com a mielofibrose. É uma leucemia que acomete mais crianças que possuem síndrome de down podendo confundir com a leucemia linfóides aguda mais especificamente a L2(LLA-L2). A imunofenotipagem é uma grande aliada para o diagnóstico podendo identificar marcadores leucemicos mieloides (CD33, CD13) Além da imunofenotipagem a área citocimica as análises laboratoriais e essencial para diagnóstico preciso desse subtipo (FARIAS; BIERMANH, 2007).

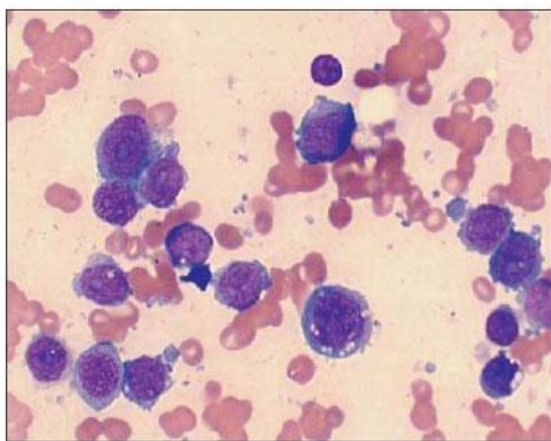


Figura 8- Células do subtipo LMA-M7 (Fonte: FARIAS; BIERMANH, 2007)

3.3 IMUNOFENOTIPAGEM

A imunofenotipagem tem se tornado uma ferramenta importante no diagnóstico de doenças malignas hematológicas. Ela é uma técnica especializada em classificar as leucemias, detectando antígenos citoplasmáticos e nuclear, expressos por células leucêmicas. A caracterização de LA por imunofenotipagem também é particularmente útil quando a morfologia é de difícil interpretação, identificando subtipos específicos de leucemias não reconhecidos por critérios morfológicos (SILVEIRA; ARRAIS, 2008).

Existe um painel de marcadores específicos que classificam grupos de linhagem e evidenciam o melhor tratamento, medicação e grau de maturação das células neoplásicas. O exame utiliza-se da citometria de fluxo, onde ocorre a leitura da reação dos anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos. Os marcadores mais utilizados para a linhagem mieloide são: CD13, CD33, CD65, MPO, CD11c, CD14, CD15, CD36, CD235a, CD41,CD61,CD42, CD34, 10 H-antígeno, CD117, HLA-DR e TdT. **(tabela 4).** (CHIEZA, 2017).

Tabela 4- Classificação da imunofenotipagem da LMA.

Classificação da imunofenotipagem da LMA					
Marcadores	LMA/M0/M1/M2	LMA-M3	LMA-M4/M5a/M5b	LMA-M6	LMA-M7
CD13/CD33	++	++	++	+	++
CD65	±/+/++	+	++	±	±
MPO	-/+/++	++	++	+	-
CD11c	- ou ±	-	++	-	-
CD14	-	-	+ / + / ++	-	-
CD15	± / ± / ++	±	-	-	-
CD36	-	-	+	++	+
H-antígeno	-	-	-	++	+
CD235a					
(Glicoforina A)	-	-	-	+	-
CD41/CD61	-	-	-	-	++

CD42	-	-	-	-	+
CD34	+++/>+	±	±/+/±	+	++
CD117	++	+	+	+	+
HLA-DR	+++/>+	-	++	+	++
TdT	+	±	+	+	±

(fonte: CHIESA,2017)

Cerca de 95% das LMAs reagem com anticorpos CD13, CD33 e CD117; estes são usados para diferenciar LMA de LLA que são expressos em todos os subtipos da linhagem mieloide. Para a leucemia de linhagem linfóide (**tabela 5**) são utilizados os seguintes marcadores: HLA-DR, TdT, CD19, CD22(c), CD10, CD20, cμ, Smlg, CD7, CD2, CD3(c), CD1a, CD3, CD4 E CD8 (CHIESA, 2017) e (FARIAS; BIERMANN, 2007).

Tabela 5- Perfil imunofenotípico das leucemias linfóides

Perfil imunofenotípico das leucemias linfóides							
Linhagem B					Linhagem T		
Marcador	Pró-B	comum	Pré-B	B	Pré-T	Intermediário	T
HLA-DR	+	+	+	+	+/-	-	-
TdT	+	+	+	+/-	+	+	+
CD19	+	+	+	+	-	-	-
CD22(c)	+/-	+	+	+	-	-	-
CD10(Calla)	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
CD20	-	+/-	+	+	-	-	-
cμ	-	-	+	-	-	-	-
Smlg	-	-	-	+	-	-	-
CD7	-	-	-	-	+	+	+
CD2	-	-	-	-	-	+	+
CD3(c)	-	-	-	-	+/-	+	+
CD1a	-	-	-	-	-	+/-	-
CD3	-	-	-	-	-	-	+
CD4/CD8	-	-	-	-	-	+/-	+

(Fonte:CHIESA, 2017)

O CD45 é um marcador expresso em blastos leucêmicos com moderada intensidade, onde sua presença descarta outras neoplasias não hematológicas como neuroblastoma e carcinoma. CD41, CD42 e CD61 são marcadores de linhagem megacariocita, muito presente na LMA-M7. Já como marcadores de imaturidade se destacam CD34, CD38, e HLA-DR (SILVA, 2020).

3.4 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma tecnologia que vem sendo bastante utilizada em laboratórios e em áreas de pesquisa, tendo como função medir o parâmetro e analisar as células onde passam simultaneamente por um feixe de luz, sendo medido seu tamanho e identificando a complexidade interna celular. Uma das vantagens dessa técnica é a verificação de um grande número de células em pouco espaço de tempo, sendo capaz de fazer a identificação da heterogeneidade presente na amostra (COSTA, 2020).

Em relação a amostragem utilizada, é comum ser utilizado o sangue, cultura de células, liquor, medula óssea e órgão e/ou tecidos. Para a utilização do sangue total (EDTA), é necessário métodos de processamento distintos que tem o intuito de lisar as hemácias, pois a sua presença pode atrapalhar a identificação da amostra, alterando seus resultados e podendo causar entupimento no equipamento. Já células mononucleadas do sangue periférico são submetidas a centrifugação em gradiente de sedimentação. Com a lise das hemácias as únicas células a serem analisadas serão os linfócitos, monócitos e os granulócitos (CARVALHO; RIBEIRO; NOGUEIRO, 2010).

3.4.1 Sistemas na citometria de fluxo

O sistema fluídico é onde ocorre a introdução da amostra por um fluxo contínuo que é induzida por uma solução salina, que promove um alinhamento celular por diferença de pressão onde após serem organizadas, serão analisadas pelo feixe luminoso (**Figura 9**) (TEVA; MORAES, 2009).

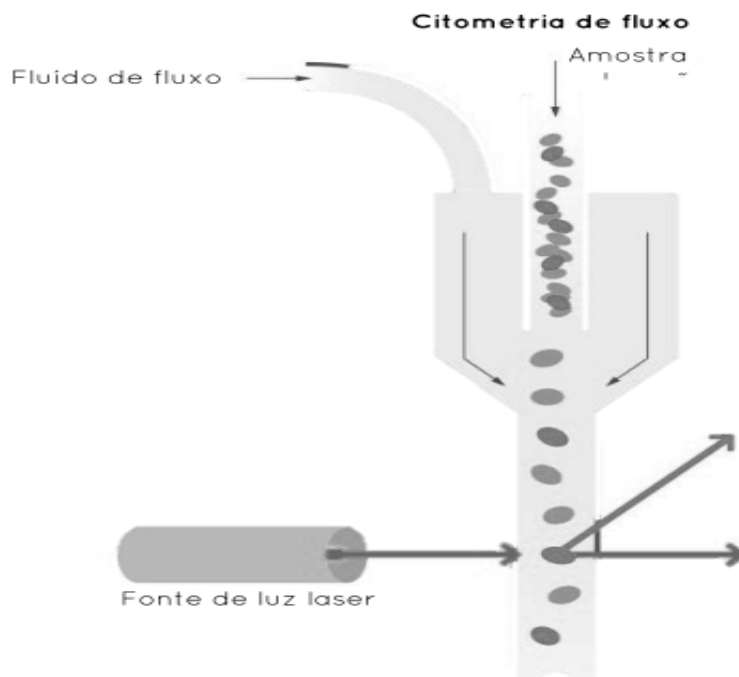


Figura 9- sistema fluido do citometro (fonte: *bionexus.com.br*)

O laser mais utilizado no sistema óptico é de argônio, onde seu comprimento de onda é de 488nm e tem muita eficiência em excitar a maioria dos fluorocromos. O espectro da luz pode ser subdividido em cores como violeta, azul, verde, amarelo, laranja e vermelho. Entretanto a luz violeta possui um comprimento de onda mais curto e com maior energia, diferente da luz vermelha que possui um comprimento de onda mais longo e com menor energia. Essas características são o ponto central da tecnologia utilizada no sistema óptico da citometria de fluxo (LORENZI, 2019) e (COSTA, 2020). A célula ao entrar em contato com o laser irá sofrer refração, que vai ser o determinante para medir seu tamanho e granulosidade celular. Quanto maior o seu tamanho, maior será o FSC (Forward light scatter), já o SSC (side light scatter) medirá a granulosidade e complexidade interna (ZAGO, 2013).

A luz refratada (SSC) e a emitida pelos fluorocromos são captadas e direcionadas para filtros com propriedades que permitem a passagem de certos comprimentos de onda e os direciona aos fotodetectores (PMTs). O uso de marcadores fluorescentes conjugados com anticorpos é utilizado para identificação e sinalização colorimétrica, ele pode ser de marcação direta, que é quando o anticorpo de detecção já está conjugado com o fluorocromo ou indireta, onde inicialmente as

células não são marcadas e posteriormente é incorporado um segundo anticorpo devidamente marcado para se ligar (**Figura 10**) (CARVALHO; RIBEIRO, 2010).

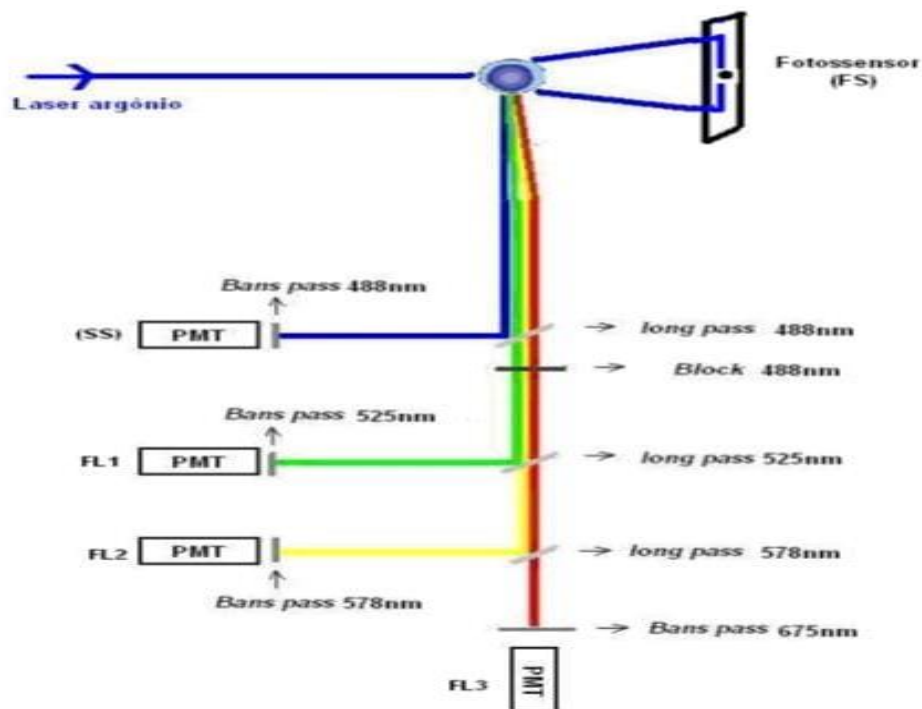


figura 10- fotodetectores e emissão dos lasers (Fonte:CARVALHO; RIBEIRO;NOGUEIRA, 2010)

Fluorocromo é um componente de uma molécula que faz com que esta seja fluorescente, essa molécula absorverá energia de um comprimento de onda específico e emitirá em outro comprimento de onda maior. Esse processo é chamado de excitação e emissão. A emissão segue a excitação de forma extremamente rápida e é conhecida como fluorescência. O objetivo de um marcador fluorescente conjugados aos anticorpos monoclonais é que ocorra a identificação da ligação específica antígeno- anticorpo nas células da amostra analisada. Quando o primeiro fluorocromo é excitado, sua energia é transferida para o segundo fluoróforo, ativando-o e produzindo a emissão de fluorescência ainda maior do que a emitida somente pelo primeiro. Na tabela abaixo (**tabela 6**), segue alguns dos principais fluoróforos utilizados em CF (COSTA, 2020).

Tabela 6- fluorocromos

Fluoroforo	Laser	Pico de emissão
<i>Pacific blue</i>	405	455
<i>Brillante violet 510</i>	405	510
<i>Krome Orange</i>	405	528
<i>Alexa fluor 488</i>	488	519
<i>FITC</i>	488	519
<i>PE</i>	488/532/561	578
<i>ECD</i>	488/532/561	613
<i>PE-TexasRed</i>	488/532/561	615
<i>PerCP</i>	488	678
<i>PerCP/Cy5.5</i>	488	695
<i>PE/Cy7</i>	488/532/561	785
<i>APC</i>	633/638	661
<i>Alexa fluor 647</i>	633/638	668
<i>Alexa fluor 700</i>	633/638	719
<i>APC/Cy7</i>	633/638	785

(Fonte: COSTA, 2020)

Etapa eletrônica para a luz ser detectada e transformada em dados é preciso ter fotodetectores (PMTs), que são sensores e identificam fótons de luz. A partir do momento que uma partícula passa através do feixe se origina um pulso de sinal no que se transforma em um gráfico de acordo com suas características, com proporções apropriadas ao pico que foi gerado sendo feito uma conversão representado por softwares (SANTOS; RENZETTI; ET.al, 2018).

3.4.2 Gráficos

Para a análise dos dados coletados, é necessário a montagem de gráficos específicos para a leitura desejada. A análise se baseia, inicialmente na identificação das populações quanto a tamanho e granularidade, selecionados no software para os eixos x e y (CARVALHO; RIBEIRO; NOGUEIRA, 2010).

Quanto aos gráficos, existem quatro tipos principais para representação : histograma, dot plot, density plot e contour plot. O histograma é monoparamétrico e nele se avalia a intensidade de emissão de apenas um fluorocromo, onde no eixo Y é o número de vezes que o evento foi captado e no X a intensidade de expressão. O dot plot representa dois parâmetros simultâneos sendo dividido em quadrantes (Q). Já o density e contour plot são também biparamétrico onde as áreas mais densas apresentam maior quantidade de partículas (**figura 11**) (COSTA,2020).

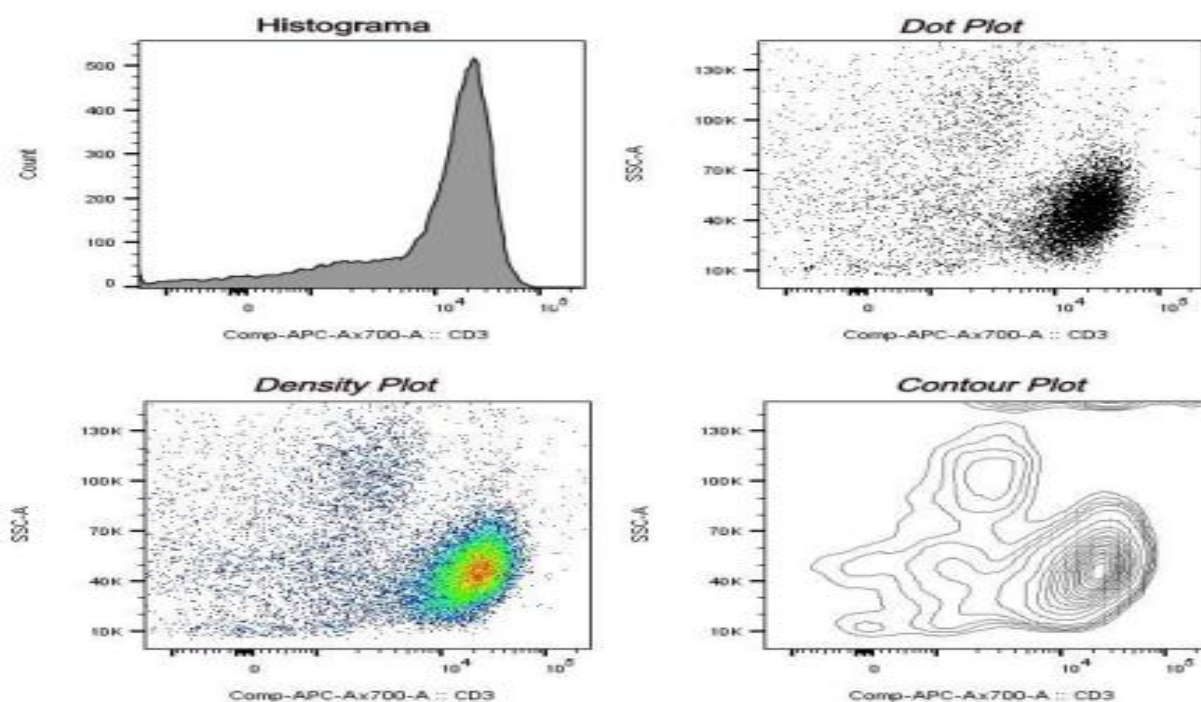


Figura 11- tipos de gráficos (Fonte: COSTA, 2020)

3.4.3 Análise de dados em diferentes linhagens

Após a análise do material, as informações são transformadas em dados e serão vistas nos gráficos dot plot, onde cada cor é de uma população de célula distinta, onde cada qual terá um quantitativo distinto.

Figura 12- A) amostra de medula de paciente saudável, onde a presença de blastos é mínima e B) amostra leucêmica com blastos expressos por CD45 em vermelho. (fonte: CHEN e CHERIAN, 2017)

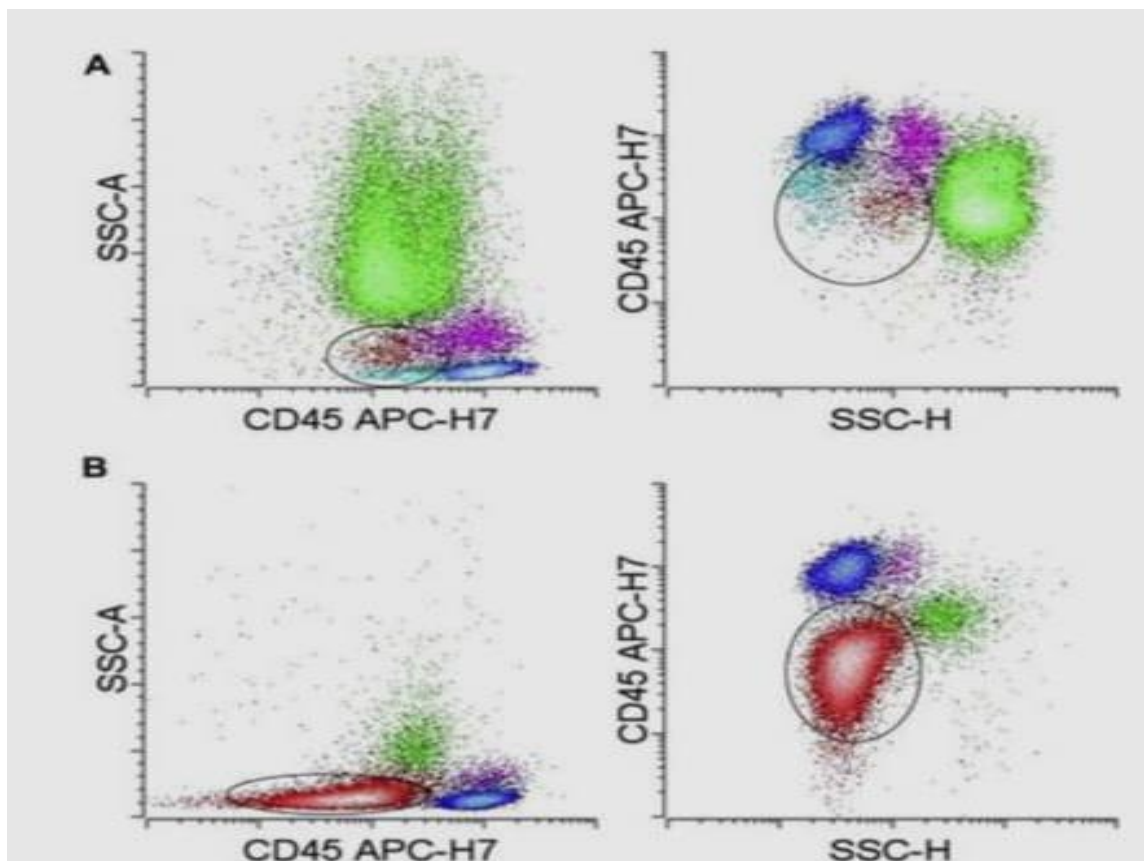
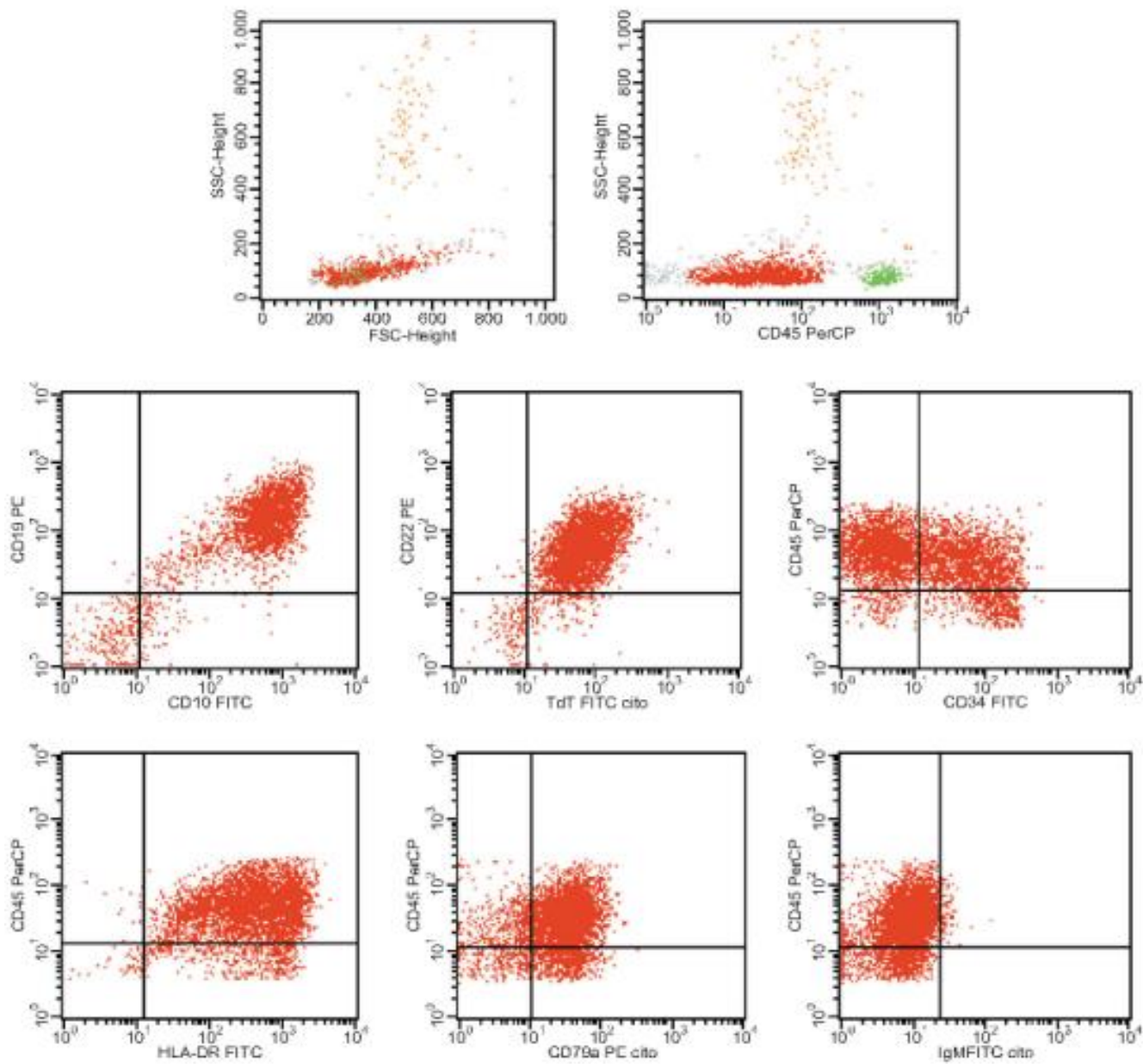
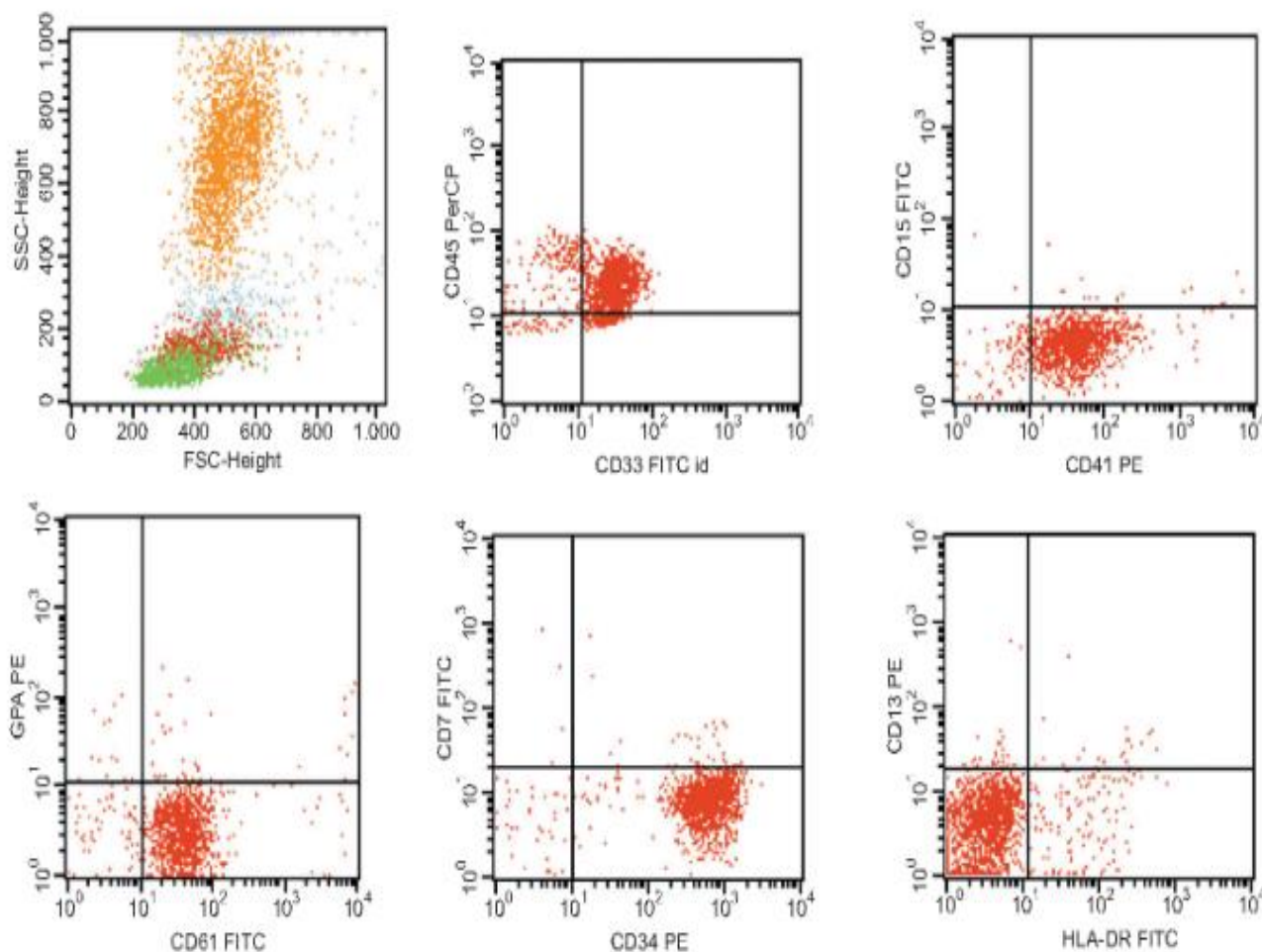


Figura 13- Paciente portador de LLA de células B (BIII). Imunofenotipagem nas células blásticas (CD45/SSC) confirmando a leucemia, e com positividade para anti- TdT, HLA-DR, CD19, CD10, CD22, CD79a e negatividade para IgM intracitoplasmática. Cerca de 40% das células blásticas foram positivas para CD34.



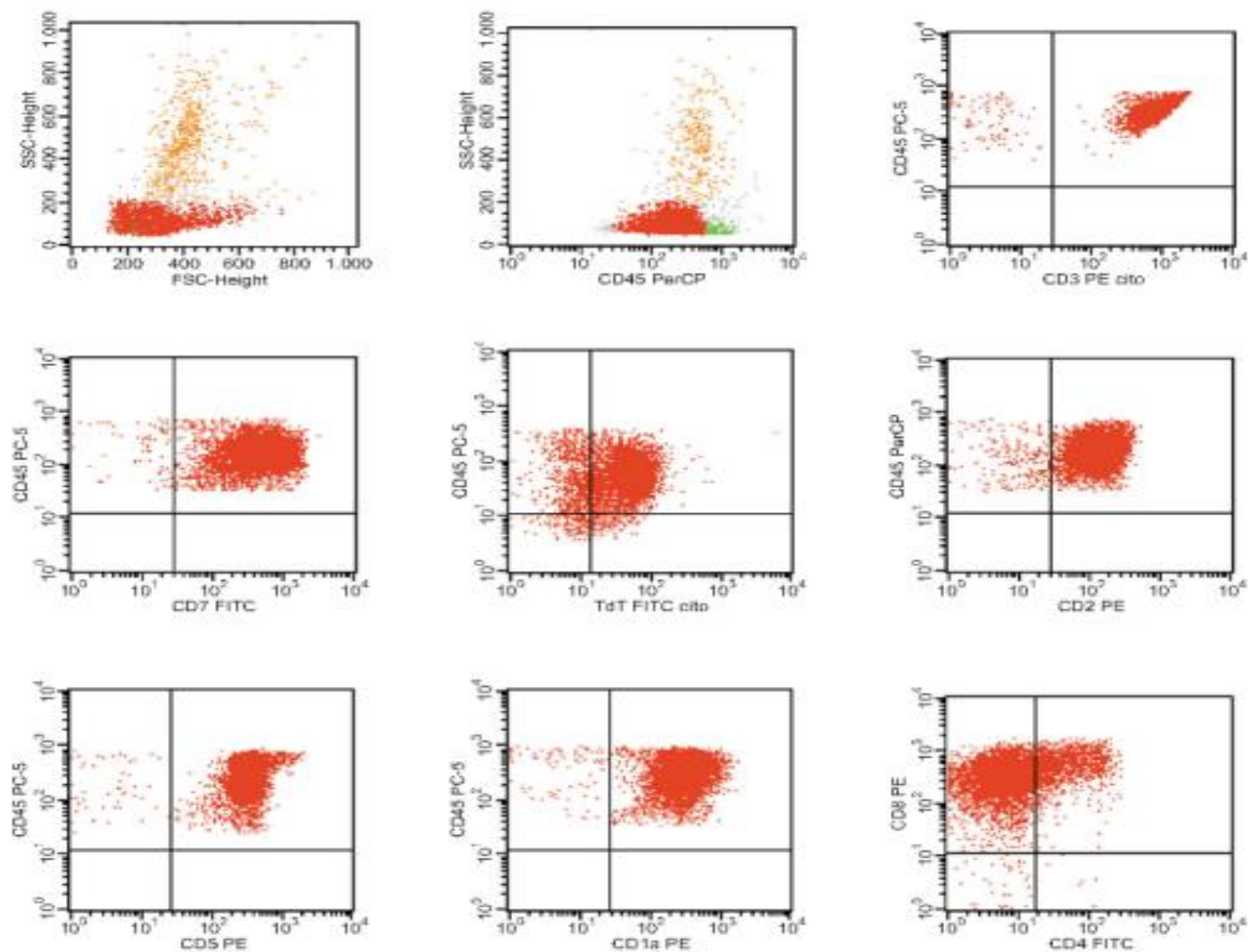
(fonte:LORENZI, 2019)

Figura 14- Paciente portador de LMA-M7. Células blásticas positivas para CD33, CD41 e CD61 que são marcadores de linhagem megacariócita. Expressão de CD34(marcador de imaturidade) e negatividade para CD13, HLA-DR e CD235a(antiglicoforina A).



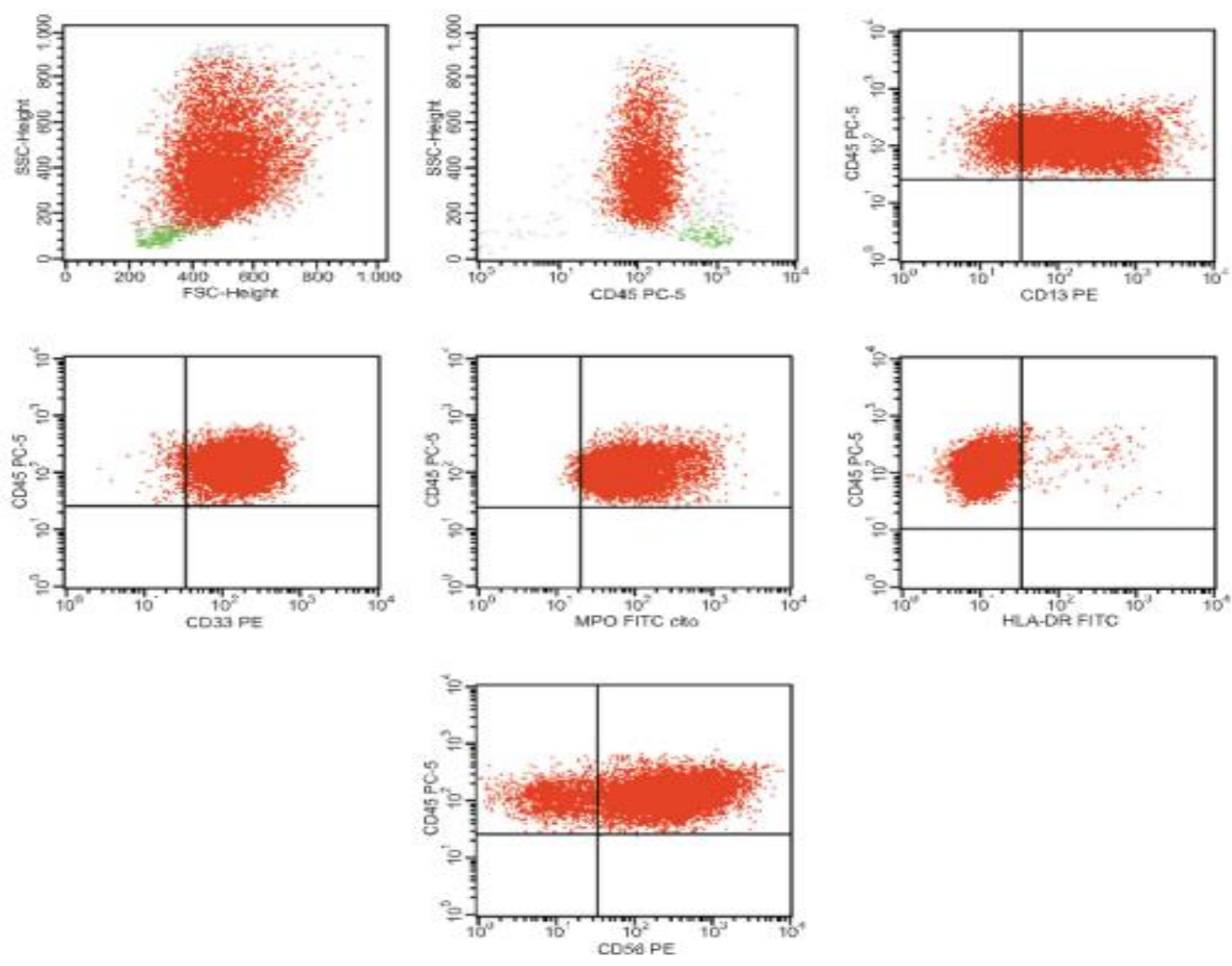
(fonte:LORENZI, 2019)

Figura 15- Paciente portador de LLA de células T (TIII). Imunofenótipagem nas células blásticas (CD45/SSC) com positividade CD3 intracitoplasmático, CD7, anti- TdT, CD2, CD5, CD1a, e CD8. Análise também mostra presença de pequena superpopulação tumoral com dupla positividade para CD4/CD8.



(fonte:LORENZI, 2019)

Figura 10- Paciente portador de LMA-M3. Células blásticas positivas para CD13, CD33 e anti-MPO. Expressão de CD56 e negatividade para HLA-DR.



(fonte:LORENZI, 2019)

4. DELINEAMENTO METODOLOGICO

Este estudo se baseou em uma estratégia de pesquisa qualitativa, de caráter descritivo, tomando como ponto de partida dados numéricos e em seguida efetuado a interpretação e análise desses dados. Com base em artigos científicos datados entre 2000 e 2021 a pesquisa bibliográfica foi realizada através de revistas, livros e sites como: Scielo, google acadêmico, Repositório institucional da fiocruz, INCA, utilizando de palavras chaves : Leucemias agudas, citometria de fluxo, imunofenotipagem .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho foi fundamentado em 31 artigos diferentes, mas para os resultados e discussão foram selecionados 8 artigos que mais condizem com a temática discutida.

Tabela 7- Resultados

Título	Citação	Ano	Objetivo	Resultado
Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda	LEITE; Et.al	2007	Descrever características clínico-laboratoriais, determinar taxas de resposta ao tratamento e identificar fatores de risco que influenciaram na sobrevida de pacientes pediátricos com leucemia linfóide aguda (LLA)	Foi encontrada uma discreta relação quanto ao sexo, sendo masculino predominante, presença de 19% do fenótipo LLA-T em pacientes maiores de 10 anos. mediana de idade ao diagnóstico de oito anos, Quanto a leucometria paciente com valor menor que 50.000mm ³ apresentaram melhor prognóstico
Análise morfológica, imunofenotípica e molecular na identificação da leucemia megacariocítica aguda (LLAM7)	FARIAS ; BIERM ANN	2007	Apresentar a técnica de imunofenotipagem como diferencial no diagnóstico da linhagem megacariocítica	A LMA-M7 pode não expressar os CDs13 e 33, que são anticorpos de alta especificidade para linhagem mieloide. A LMA-M7 requer a expressão de antígenos da linhagem megacariocítica CD41a, CD42b, CD61 ou antígenos relacionados ao fator VIII. Na trissomia do cromossomo 21(síndrome de down) as chances de se desenvolver LMA-M7 são vinte vezes maior, por conta da expressão do gene GATA1

				<p>aumentada, esse gene desempenha um papel essencial na diferenciação da linhagem eritroide e megacariocítica</p>
<p>ESTUDOS DO DIAGNÓSTICO, CLASSIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DAS LEUCEMIAS LINFOIDE AGUDA NO RIO GRANDE DO NORTE PELA TECNOLOGIA DE IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO</p>	SILVA	2020	<p>Determinar o perfil imunofenotípico pela CF em 88 pacientes com LLA (linhagem B ou T) diagnosticados no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro Dalton Cunha – HEMONORTE, do estado do Rio Grande do Norte, Brasil.</p>	<p>A faixa etária dos pacientes variou de 1 mês a 84 anos, com mediana de 13 anos sendo 62,5% do sexo masculino. A cepa observada mais frequente foi a B e o subtipo mais evidente foi a LLA Pré-B Comum. Dentre os marcadores celulares avaliados, os mais expressos na linhagem B foram CD19, CD10 e cCD79a e os antígenos mais expressos na linhagem T foram CD3, CD7, CD5 e CD2. Uma pequena porcentagem (6,8%) eram células T duplamente positivas</p>

<p>Leucemia mielóide aguda na criança: experiência de 15 anos em uma única instituição</p>	<p>VIANA. M, et al.</p>	<p>2003</p>	<p>Analisar a influência dos fatores idade, gênero, leucometria inicial e classificação dos blastos na indução da remissão</p>	<p>Dos 83 pacientes admitidos, 46 eram do sexo masculino (55,4%) e 37 do feminino(44,6%). As Crianças abaixo de seis anos de idade tiveram prognóstico significativamente pior. Gênero, leucometria inicial não influenciaram o prognóstico .Na contagem de leucócitos 26 pacientes ficaram abaixo de 10.000/mm³, 28 entre 10.000 /mm³ e 50.000 /mm³ , 16 ficaram entre 50.000 e 100.000/mm³ e 12 acima de 100.000/mm. Quanto ao diagnostico a partir da morfologia dos blasto, ficou distribuído: : M0, duas crianças (2%); M1, onze (13%); M2, vinte e nove (35%); M3, dezoito (22%); M4, oito (10%); M5, seis (7%) e M6, quatro (5%)..</p>
<p>Avaliação dos marcadores celulares por citometria de fluxo em pacientes com leucemia mieloide aguda</p>	<p>VASCO NCELO S</p>	<p>2010</p>	<p>Diagnosticar casos de LMAs com base na imunofenotipagem e classificação morfológica pelos critérios do grupo Franco Americano e Britânico (FAB).</p>	<p>Foram investigados 179 pacientes onde 92 (51,4%) eram do sexo feminino e 87 (48,6%) do sexo masculino, com faixa etária de 41 a 65 anos. Em relação a sintomatologia clinica a esplenomegalia esteve presente em 147 casos (82,1%), seguida pela hepatomegalia com 132 casos (73,7%). Fenômenos hemorrágicos e trombocitopenia foram observados em 55 casos</p>

				<p>(30,7%). De acordo com a classificação FAB se obteve o seguinte resultado: 2 casos (1,1%) LMA-M0, 40 casos (22,3%) LMA-M1, 60 casos (33,5%) LMA-M2, 22 casos (12,3%) LMA-M3, 10 casos (5,6%) LMA-M4, 13 (7,3%) LMA-M5, 06 (3,4%) LMA-M6 e 1 caso (0,6%) de LMA-M7. Observou-se à presença do antígeno CD7 nos casos de LMA-M1 e M2, seguido pelo CD4 nos casos de LMA-M4 e M5. Outros marcadores linfoides mostraram-se presentes com menor frequência</p>
<p>A imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: Uma revisão</p>	<p>SILVEIRA; ARRAGES</p>	<p>2008</p>	<p>Caracterizar os diferentes anticorpos da LLA com foco no subtipo T</p>	<p>A LLA-T tem pior prognóstico em comparação a LLA-B na infância. Os marcadores mais utilizados no subtipo T são CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 e CD8. Em características morfológicas celulares as LLA são classificadas em L1, L2 e L3.</p>

<p>A importância da imunofenotipagem na leucemia mielóide aguda</p>	<p>MARTINS; FALCÃO; O.R</p>	<p>2000</p>	<p>Descoberta de novos subtipos da LMA, cuja identificação não era possível apenas pelos critérios morfológicos e citoquímicos</p>	<p>A LMA-M0 morfologicamente assemelham-se aos blastos linfóides L2, também obtém reação negativa na citoquímica para mieloperoxidase (MPO), já por citometria foi diferenciada com antígenos de linhagem mielóide CD33, CD13 e/ou CD11b e antígenos de linhagem linfóide geralmente são negativos. Já a LMA-M7, pela morfologia e análises citoquímicas pode ser confundida com as leucemias linfóides agudas e também com a LMA-M0, mas sua diferenciação se confirma pela positividade para os antígenos de linhagem megacariocítica CD41 (complexo glicoprotéico IIb/IIIa), CD42 (glicoproteína Ib) e/ou CD61 (glicoproteína IIIa)</p>
<p>Imunofenotipagem no diagnóstico da leucemia mielóide aguda</p>	<p>SANTOS</p>	<p>2021</p>	<p>Caracterização imunofenotípica de casos de LMA</p>	<p>No estudo realizado por BASHARAT et al., 2017, com 106 pacientes visou as características imunofenotípicas nos casos de LMA, foram usados os anticorpos: CD45 e HLA-DR expresso em 70% dos pacientes com positividade mais forte na LMA-M0(75%) e mais fraca na LMA-M3(12%). CD34 foi expresso em 38% dos pacientes, sendo LMA-</p>

				<p>M0(74%) e LMA-M6 (1,33%). CD33 presente em 67% dos casos, com maior e menor positividade respectivamente em LMA-M4(87%) E LMA-M6(30%). CD13 relatado em 56,7% dos pacientes, com LMA-M4 (71,8%) e LMA-M6 (22%). CD7 expresso em 26,4% dos casos, sendo frequentemente expresso na população M1, M2, M3 e M6 sendo positividade forte na LMA-M2. E CD14 pouco expressa, apenas na linhagem M4</p> <p>Quando a quantidade de pacientes por fenótipo ficou : M0(4), M1(15), M2(49), M3(19), M4(16), M6(3)</p>
--	--	--	--	--

Em seus estudos VIANA (2003) avaliou parâmetros e validou o predomínio de pacientes do sexo masculino e que crianças com menos de 6 anos de idade tiveram o pior prognóstico onde a leucometria não influenciou nos resultados. LEITE(2007) discorda e apresentou em sua pesquisa que os pacientes que tinham uma leucometria menor que 500.000mm tiveram um prognóstico mais positivo

Na pesquisa de VASCONCELOS (2010) foi observado a presença da expressão de antígenos CD7 nos subtipos M1 e M2, e CD4 nos casos de LMA-M4 e M5. Já quanto a classificação das LMA o subtipo mais comum foi LMA-M2. Os resultados de SANTOS(2021) se igualam com o do autor anterior quanto ao número de casos de cada subtipo, sendo acrescentado informações sobre as expressões de antígenos CD34 (LMA-M0), CD33 (LMA-M4), CD13 (LMA-M4).

FARIAS (2007) e MARTINS (2000) concluíram que para a identificação da LMA-M7 se faz necessário o uso de marcadores da linhagem megacariocítica pela

citometria pois reações citoquímicas podem dar negativas, levando assim a um falso resultado. E FARIAS (2007) ainda acrescenta que pacientes com síndrome de down tem maiores chances de desenvolver esse subtipo por conta do gene GATA1 alterado, sendo ele responsável pela diferenciação da linhagem megacariocítica e eritróide.

SILVA(2020) determinou quanto a Leucemia Linfóide aguda que o subtipo mais comum é o Pré-B (calla) onde os antígenos mais expressos nessa linhagem foram o CD19, CD10 e cCD79a. SILVEIRA; ARRAES(2008) focam na Leucemia de células T, e confirmam que em crianças tem o pior prognóstico se comparado com adultos e quanto a marcadores são comumente utilizados CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 e CD8 para identificação dessa linhagem.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A colaboração da imunofenotipagem no diagnóstico das leucemias agudas está bem estabelecida como uma ferramenta importante no diagnóstico hematopatológico, permitindo a definição correta da linhagem celular em cerca de 98% dos casos auxiliando na escolha dos regimes terapêuticos , contribuindo também para uniformização de escolha dos painéis de marcadores a serem utilizados. Vários resultados apontam que essa técnica apresenta resultados rápidos e preciso. Assim, pode ser usada nos grandes centros de oncologia para análises de marcadores imunológicos e sua confirmação

REFERÊNCIAS

1. BIGARDI, BIANCA CHIESA. A IMPORTÂNCIA DA IMUNOFENOTIPAGEM NO DIAGNÓSTICO DAS LEUCEMIAS, COM DESTAQUE PARA A LEUCEMIA BIFENOTÍPICA. **Monografia (Pós-graduação em Hematologia clínica, laboratorial e banco de sangue)–Academia de Ciências Tecnologia, São José do Rio Preto, 2017.**
2. Borges, Rayssa Geovanna Pereira. **A importância da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico e monitoramento das leucemias linfóides agudas.** Trabalho de conclusão de curso. 2020.
3. CAVALCANTE, M. S.; SANTANA ROSA, I. S.; TORRES, F. **Leucemia linfóide aguda e seus principais conceitos.** Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 151–164, 2017.
4. COSTA, Rodrigo. **Introdução a Citometria de Fluxo.** 1.ed. Curitiba: Independently Published, 2020
5. CRISPIM, J. C. DE O. et al. **Avaliação imunológica da leucemia mielóide aguda através da citometria de fluxo.** Rev. bras. anal. clin, p. 73–79, 2000
6. FADEL, A. paula. **Investigação Laboratorial de LLA .** AC&T Científica, São paulo, 2010.
7. FARIAS, M. Granero; CASTRO, Simone. M , **Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial [online]. 2004, v. 40, n. 2 , p. 91-98
8. FARIAS, Mariela G.; BIERMANN, Maristela B. **Análise morfológica, imunofenotípica e molecular na identificação da leucemia megacariocítica aguda.** *Bras. hematol. hemater*, ed. 29, 2007, p. 387-393.
9. FLORENCE, L. Livro - **Laboratório Clínico - Aplicações Clínicas Dos Dados Laboratoriais** - Ravel. Disponível em: <<https://www.livrariaflorence.com.br/produto/livro-laboratorio-clinico-aplicacoes-clinicas-dos-dados-laboratoriais-ravel-134426>>. Acesso em: 22 nov. 2022.

10. HILARIO, FRANCO. W.; HILARIO, L. **Principais alterações hematológicas da Leucemia Linfocítica Aguda (LLA)** . Perspectivas Experimentais e Clínicas, Inovações Biomédicas e Educação em Saúde (PECIBES), v. 7, n. 1, p. 13-17, 1 jul 2021.
11. HOFFBRAND, A; MOSS. P, **Fundamentos da hematologia**. 7 Edição, Artmed, 2013.
12. LASSALETTA, A. **Leucemia linfoblástica aguda**. pediatria integral, Barcelona, Volume XX, p 380-388, jul-ago 2016.
13. LEITE, Edinalva P. ; MUNIZ, Maria tereza C. **Fatores prognosticos em crianças e adolescentes com leucemia linfoide aguda**. Bras. saúde matern. infant, recife, ed.7, 2007, p. 413-421.
14. LORENZI, therezinha F. **Manual de Hematologia propedêutica e clinica**. 4. ed. Rio de janeiro: guanabara koogan, 2019.
15. Lusi, M. K., et al. **Leucemia M3 variante: aspectos clínicos e diagnósticos**. Rev. Assoc. Med. Bras 1993, 224-8.
16. MARTINS, S. L. R.; FALCÃO, Roberto Passetto. **A importância da imunofenotipagem na leucemia mielóide aguda**. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 46, p. 57-62, 2000.
17. Martins, S. L. R; Falcão. R , **A importância da imunofenotipagem na leucemia mielóide aguda**. Revista da Associação Médica Brasileira 46, 2000, pg57-62.
18. MELO, Márcio. **Leucemia e Linfomas Atlas do Sangue Periférico**. 2.ed. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2008.
19. ORTEGA, M. alfredo, ORTEGA, M luisa, BARRIENTOS, J Vicente. **Leucemia linfoblástica aguda**. Medicina Interna de México, Mexico, v. 23, p.27-32, fev 2007.
20. Sagrillo, Michele Rorato. **Leucemia promielocítica aguda**, 2004.

21. SANTOS, Alessandro M. ; RENZETTI, Alinne rangel . **Citometria de Fluxo: Fundamentos e aplicações na pesquisa científica**. Instituto Oswaldo cruz. 2018.
22. SANTOS, Geovana cristine de araujo; CORDEIRO, Natalia de morais. **A Imunofenotipagem no diagnóstico da leucemia mieloide aguda**. Revista brasileira de biomedicina, ed. 1, 2021, p. 27-43, jun/dez.
23. SILVA, Alessandra Suelen Jardim da. **Estudos do diagnóstico, classificação e avaliação prognóstica das Leucemias Linfóide Aguda no Rio Grande do Norte pela tecnologia de imunofenotipagem por citometria de fluxo**. 2020. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020.
24. Silva, G. C. et al. **Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas** • J Bras Patol Med Lab • v. 42 • n. 2 • p. 77-84 • abril 2006
25. SILVEIRA, N. A.; ARRAES, S. M. A. A. **A imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: Uma revisão**. Arquivos do Mudi, v. 12, n. 1, p. 5-14, 19 nov. 2012.
26. Souza, Tatiana Francisca. **LMA: apresentação de 59 casos entre o período de janeiro de 1995 a dezembro de 1997 no Hospital Governador Celso Ramos**, 1998.49
27. TEVA, Antonio; MORAES, Aurea maria lage de; Et.al. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde**. Rio de janeiro: IOC, v.4, 2009.
28. Vasconcelos, Dewton de Moraes. **Análise de marcadores intracelulares por citometria de fluxo nas leucemias**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2007, v. 29, n. 2, pp. 105-106.
29. Vasconcelos, Roberto C. **Avaliação dos marcadores celulares por citometria de fluxo em pacientes com leucemia mieloide aguda**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia [online]. 2010, v. 32, n. 3

30. VIANA, Marcos B. ; CUNHA, Keyla C. et.al **Leucemia mieloide aguda na criança: experiencia de 15 anos em uma única instituição** . Jornal de pediatria, v. 79, 2003, n. 6
31. ZAGO, M; FALCÃO, R; PASQUINI. R , **Tratado de hematologia**. 1 Edição, São Paulo: Atheneu, 2013