

UNIVERSIDADE CESUMAR - UNICESUMAR
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ABORDAGEM SOBRE AS LEUCEMIAS E
O PAPEL DA IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO NO
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

ANA PAULA SANTOS FRANÇA DA SILVA
GUILHERME DE SOUZA CABRAL

MARINGÁ – PR
2020

Ana Paula Santos França Da Silva
Guilherme De Souza Cabral

**ABORDAGEM SOBRE AS LEUCEMIAS E
O PAPEL DA IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO NO
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

Artigo apresentado ao curso de graduação em Biomedicina da Universidade Cesumar – UNICESUMAR como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel(a) em Biomedicina, sob a orientação do Prof.^a Esp. Michelli Gouveia Ramos.

MARINGÁ – PR
2020

FOLHA DE APROVAÇÃO

**ANA PAULA SANTOS FRANÇA DA SILVA
GUILHERME DE SOUZA CABRAL**

ABORDAGEM SOBRE AS LEUCEMIAS E O PAPEL DA IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Artigo apresentado ao curso de graduação em Biomedicina da Universidade Cesumar – UNICESUMAR como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel(a) em Biomedicina, sob a orientação da Prof.^a Esp. Michelli Gouveia Ramos.

Aprovado em: 07 de novembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA



Esp. Michelli Gouveia Ramos - Unicesumar



Msc. Jessica Zironi Caitano - Unicesumar



Dr. Rogerio Ap. Minini dos Santos - Unicesumar

ABORDAGEM SOBRE AS LEUCEMIAS E O PAPEL DA IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Ana Paula Santos França Da Silva

Guilherme De Souza Cabral

RESUMO

A hematopoese é o processo que corresponde à formação das células hematológicas. No entanto, erros nessa etapa podem resultar na formação de células incapazes de exercer suas funções, desencadeando, por exemplo, um quadro leucêmico. As leucemias são classificadas de acordo com a linhagem celular acometida e a intensidade da instalação. Um dos exames para diagnóstico de leucemia é a técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo, sendo considerado padrão-ouro em alguns casos, por apresentar uma alta sensibilidade e especificidade em seu resultado, principalmente por identificar a linhagem celular acometida por meio da expressão de marcadores específicos de superfície. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar e compreender os diferentes tipos de leucemias, determinando os marcadores de superfície expressos pelas células leucêmicas, a importância do diagnóstico diferencial por intermédio da imunofenotipagem, pelo método de citometria de fluxo, além de determinar seus avanços e avaliar a eficácia dos resultados nos exames imunohematológicos obtidos por essa técnica. Os achados deste estudo mostraram que as leucemias acometem várias idades e que a sua etiologia ainda é desconhecida, acreditando-se que os principais fatores de risco são ambientais e genéticos. Torna-se visível que a técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo é atualmente a melhor forma de diagnosticar a doença principalmente quando a morfologia é de difícil interpretação. Diante do exposto, recomenda-se o uso da citometria de fluxo para classificar os diferentes tipos de células sanguíneas em pacientes com suspeita de doenças hematológicas.

Palavras-chave: Antígenos de neoplasias. Hematopoese. Neoplasias hematológicas.

APPROACH ON LEUKEMIAS AND THE ROLE OF FLOW CYTOMETRY IMMUNOPHENOTYPING IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS

ABSTRACT

Hematopoiesis is the process that corresponds to the formation of hematological cells that have numerous functions within the organism. But errors at this stage can result in the formation of cells unable to perform their functions, triggering, for example, a leukemic picture and thus damaging vital organs. The leukemias are classified according to the affected cell lineage and the intensity of the installation. One of the exams for leukemia diagnosis is the immunophenotyping technique by flow cytometry, being considered gold standard, for presenting a high sensitivity and specificity in its result, mainly for identifying the affected cell lineage through the expression of specific surface markers. Therefore, the objective of this work was to analyze and understand the different types of leukemia, determining its surface markers the importance of differential diagnosis by means of immunophenotyping using the flow cytometry method, in addition to determining its advances and evaluating the effectiveness of the results in immunohematological examinations obtained by this technique. The results showed that leukemia affects several ages and that its etiology is still unknown, the main risk factors being believed to be environmental and genetic. It is concluded that the technique of immunophenotyping by flow cytometry is currently the best way to diagnose the disease, especially when the morphology is difficult to interpret. Based on the data, the use of flow cytometry is recommended to classify the different types of blood cells in patients with suspected hematological diseases.

Keywords: Neoplastic antigens. Hematopoese. Hematological neoplasms.

1 INTRODUÇÃO

A hematopoese é um processo complexo e hierarquizado para produção, para proliferação, para maturação e para morte das células hematológicas. Inicia-se seu desenvolvimento na fase intrauterina, especificamente nas ilhotas sanguíneas, no saco vitelínico por volta da 3ª semana de gestação e, posteriormente, durante a vida fetal, no fígado, iniciando-se na 9ª até a 24ª semana, sendo esses órgãos temporários, até ser iniciada a calcificação óssea e após a 24ª semana, a medula óssea passa a ser responsável por esse processo. As células hematopoiéticas são originadas a partir de um precursor comum pluripotente, e, assim, originam precursores linfóides e mielóides.^{1,2}

Em estado fisiológico, as células sanguíneas são produzidas e responsáveis por inúmeras funções, tais como transportam gases e nutrientes, participam da regulação térmica e da defesa contra agentes patogênicos. No entanto, anomalias nesses processos podem produzir células sanguíneas incapazes de exercer suas funções adequadamente, como é o caso dos processos leucêmicos, nos quais as células produzidas apresentam incapacidade funcional, e, como consequências, podem desencadear doenças secundárias.³

As leucemias se definem como um grupo heterogêneo de neoplasias que danificam as células-tronco hematopoiéticas, ou seja, levam à formação de um clone maligno que perde o controle da divisão celular, afetando a sua maturação ou a apoptose dessa célula, com capacidade de adentrar outros tecidos e, assim, prejudicar órgãos como o fígado, o baço, os linfonodos, as meninges, o cérebro ou a pele.⁵

Existem vários tipos de leucemias, classificadas conforme a célula de origem e seu grau de maturação. Dessa forma, há uma classificação das leucemias em quatro categorias primárias: 1) leucemia mielóide aguda ou crônica: afeta todas as células leucocitárias, precursores de eritrócitos e plaquetas, com exceção dos linfócitos; e 2) leucemia linfóide: afeta apenas a linhagem linfóide, sendo os linfoblastos, pró-linfócitos e linfócitos, na forma aguda ou crônica,⁴ e, apesar da sua etiologia não ser totalmente desvendada, estudos mostram que parte dessa anomalia está associada a fatores ambientais e/ou hereditários.²

As leucemias agudas são definidas por terem uma produção acelerada das células leucocitárias imaturas, não apresentando a capacidade de maturação e de diferenciação. Essas células são incapazes de desenvolver suas funções e, por esse motivo, a doença se agrava em um curto período de tempo, as linfóides, acometendo principalmente crianças, e a mielóide, que afeta mais adultos. Já as leucemias crônicas são definidas pela proliferação

acelerada de células leucocitárias que apresentam capacidade de maturação e de diferenciação no início da doença, e, portanto, têm funções normais, em exceção na LLC, que os linfócitos B podem levar a uma anemia hemolítica. Por estarem um grau maior de maturação, a descoberta dessa anomalia ocorre em exames de rotina, como o hemograma, com a presença de sintomas brandos, agravando-se lentamente, sendo adultos e idosos os principais acometidos.^{6,7}

A evidenciação de alterações nas células sanguíneas durante o diagnóstico de leucemia é uma condição importante para o prognóstico e para o tratamento. O hemograma é um dos exames iniciais que sugerem um quadro leucêmico, mas é preciso confirmá-lo com outros exames mais específicos, os quais dão detalhes sobre as células acometidas.⁸ Dentre os exames para confirmação dessa doença, existem: 1) avaliação citológica: analisa a morfologia das células tanto do sangue quanto do aspirado de medula óssea; 2) citoquímica: revela características específicas da célula através da adição de reagentes; 3) imunofenotipagem: exame padrão-ouro que determina os marcadores de superfície dos leucócitos, sendo de grande importância por diferenciar os tipos de leucemias (exceto para LMC); 4) citogenética: análise das alterações cromossômicas; e 5) biologia molecular: análise da sequência genética.^{3,6,7,9}

A imunofenotipagem, realizada com a técnica de citometria de fluxo, apresenta inúmeras vantagens se comparadas à microscopia. A imunofenotipagem é um exame rápido, sensível e específico por analisar vários parâmetros para identificação de características heterogêneas das células investigadas, por meio do princípio de utilização de anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos que reconhecem moléculas celulares específicas a partir da excitação por uma radiação a laser, fazendo com que emita um comprimento de onda (cor), que é detectado por um sensor capaz de converter em representações gráficas detalhadas a intensidade da fluorescência emitida pelo fluorocromo e, assim, fornecer as características fenotípicas das células.^{10,11,12}

As células leucocitárias apresentam na sua superfície proteínas de membrana que as diferem de outras células, sendo expressas em diversas fases de maturação. Dessa forma, torna-se possível a identificação da linhagem celular e do estágio de desenvolvimento em que a célula se encontra, permitindo que sejam utilizadas como marcadores de superfície celular, diferenciando-se células normais de anormais. Nas células leucêmicas, têm-se características que são comuns em células normais, mas estão bloqueadas em algum estágio de maturação e misturam determinantes antigênicos de linhagens celulares, mudando a expressão gênica. Nesse caso, apresentam fenótipos diferentes dos normais, os quais podem ser detectados por

meio da imunofenotipagem, pelo método de citometria de fluxo, permitindo a diferenciação das células com alterações e dando seguimento a um tratamento específico para o paciente.^{10,12,13,14}

Como existem vários marcadores de superfície, é importante antes que seja realizada uma hipótese diagnóstica das possíveis células acometidas. Isso é feito a partir de uma análise morfológica no hemograma para escolha dos anticorpos monoclonais a serem utilizados no diagnóstico diferencial, identificando-se, desse modo, simultaneamente as características fenotípicas a partir dos antígenos celulares presentes durante a análise.^{8,15}

Considerando todos os fatos supracitados, torna-se importante um estudo para conhecer as leucemias e seu diagnóstico padrão-ouro. Dessa forma, o presente trabalho objetivou analisar e compreender os diferentes tipos de leucemias, determinando seus marcadores de superfície e a importância do diagnóstico diferencial por meio da imunofenotipagem, pelo método de citometria de fluxo, além de determinar seus avanços e avaliar a eficácia dos resultados nos exames imunohematológicos obtidos por essa técnica.

2 METODOLOGIA

Para elaboração desta revisão bibliográfica, realizaram-se pesquisas de literaturas científicas em periódicos no idioma português, selecionados por temas no *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), na *National Library of Medicine* (PUBMED), na Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS BRASIL), na Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações (BDTS) e nos repositórios de instituições de ensino, além de dados estatísticos pesquisados no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil (DATASUS) e no Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), utilizando como critério de busca os descritores e as suas associações: “leucemia”, “leucemia mielóide”, “leucemia linfóide”, “linfócitos T e B”, “neoplasia hematológica”, “leucemia aguda”, “leucemia crônica”, “diagnósticos da leucemia”, “imunofenotipagem”, “citometria de fluxo”, “marcadores de superfície”, “tratamentos de leucemia” e outros termos pertinentes a temática.

Como critério de inclusão foram selecionados artigos nos últimos cinco anos (2015 a 2020), em língua portuguesa. Os critérios de exclusão foram aplicados em artigos que não preencheram os requisitos de inclusão, analisados por títulos e resumos, e artigos duplicados

que se repetem nas bases de dados, além de excluídas publicações que contemplem apenas outros tipos de neoplasias hematológicas. Os artigos que atenderam aos critérios de inclusão foram lidos na íntegra.

3 APRESENTAÇÃO DOS DADOS (RESULTADOS)

As leucemias, exceto na LLC, são grupos de doenças que surgem de uma propagação neoplásica de células precursoras hematopoiéticas na medula óssea, que se extravasam para o sangue periférico, sendo observadas em grande número.¹⁶ As leucemias são rotuladas conforme o tipo celular envolvido e o grau de maturação das células, ocorrendo em duas linhagens: mielóide e linfoide, com desenvolvimento na forma aguda e crônica.^{4,16}

3.1 CLASSIFICAÇÃO DAS LEUCEMIAS

3.1.1 Leucemia linfoide aguda (LLA)

A leucemia linfoide aguda (LLA) é uma doença de progressão rápida, caracterizada pela produção exacerbada de blastos leucêmicos originados de células T ou B. O principal público acometido são crianças e adolescentes na faixa etária de 0 a 14 anos (75 a 80% dos casos), em uma frequência de 1:25.000, com maior incidência em crianças de 1 a 5 anos.¹⁷ No mundo, são diagnosticadas anualmente em torno de 75.000 novos casos de LLA em crianças, tornando-se a terceira causa de mortes nesse grupo. Estudos de prevalência e incidência mostram que pessoas negras são mais raras de serem acometidas por esse tipo de leucemia, predominando em indivíduos brancos e do sexo masculino.^{17,18}

A etiologia ainda permanece incerta, contudo, pesquisas mostram a influência de condições epidemiológicas importantes que a torna uma doença com várias origens, acreditando-se que, após o ataque de Hiroshima e Nagasaki, os efeitos da irradiação acarretaram no aumento dessa doença no Japão. Outras prováveis causas são fatores ambientais, tais como exposição a agentes químicos, radiação ionizante, radioterapia e quimioterapia, e também fatores genéticos associados, imunológicos e exposição a alguns vírus e drogas antineoplásicas.^{18,19} O tabagismo passivo em crianças e com pais fumantes pode ocasionar neoplasias.²⁰

A classificação da LLA é baseada em características das células acometidas, sendo a mais utilizada a classificação do grupo Franco-Americano-Britânico (FAB), que baseia-se em critérios morfológicos e citoquímicos dos blastos de três formas:²¹

- L1: células pequenas, com morfologia regular, homogêneas, sem nucléolos, relação núcleo-citoplasma alta;
- L2: células de tamanhos variáveis, heterogêneas, têm nucléolos grandes e visíveis, podendo apresentar irregularidade no contorno;
- L3: células grandes, basofilia citoplasmática, apresentam imunofenótipo B, é considerada uma forma mais agravante da patologia e apresenta forma leucêmica do linfócito de Burkitt.

Posteriormente à classificação do FAB, utilizaram-se critérios imunofenotípicos, e o *European Group Immunological Classification of Leukemias (EGIL)* propôs a utilização de um score e o grau de especificidade de certos marcadores de superfície para classificar a LLA em subtipos de linhagem celular T ou B.¹⁸

3.1.2 Leucemia mielóide aguda (LMA)

A leucemia mielóide aguda (LMA) se caracteriza na produção anormal de células imaturas de linhagem mielóide, ocasionando bloqueio nas células maduras hematopoiéticas. Essa doença acomete principalmente adultos e idosos (correspondendo a 80% dos casos confirmados), apresentando uma incidência maior com o aumento da idade e sendo desenvolvida principalmente a partir dos 65 anos, raramente antes dos 45 anos. Torna-se variável o seu prognóstico por depender da idade e da condição física do paciente.²²

Existem alguns fatores de risco conhecidos que influenciam na etiologia dessa doença, como a exposição prévia à radiação ionizante ou a agentes alquilantes, ao benzeno e aos derivados de petróleo, além de tabagismo, idade e gênero. Outro fator são as instabilidades cromossômicas, que causam distúrbios hereditário, como a anemia de Fanconi e também anomalias genéticas congênitas como a trissomia do 21 e síndrome de Klinefelter.²³

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), classifica-se a LMA por meio de, principalmente, anormalidades citogenéticas e genética molecular, que apresentam alterações específicas (Quadro 1).

Quadro 1 – Classificação da LMA de acordo com a OMS

CLASSIFICAÇÃO	DEFINIÇÃO
LMA com anormalidades genéticas recorrentes	São translocações cromossômicas ou mutações genéticas específicas, que não necessitam mais que 20% de blastos acumulados na medula. Apresentam melhor prognóstico.
LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia	São alterações mielodisplásicas em mais de 50% das células de pelo menos duas linhagens, e têm pior prognóstico.
Neoplasias mielóides relacionadas ao tratamento	Surgem em pacientes que foram anteriormente tratados com etoposide ou agentes alquilantes. Apresentam pobre resposta aos tratamentos.
LMA não especificada	Não apresenta anormalidades específicas. Representa 30% dos casos.
Sarcoma mielóide	É um tumor sólido composto por blastos mielóides.
Proliferação mielóides relacionadas à trissomia do 21	Podem gerar duas variantes: (a) LMA e (b) mielopoese anormal transitória.

Fonte: Pinheiro.²⁴

Para se estabelecer um prognóstico para o paciente com LMA são necessárias outras informações, tais como: subtipo da leucemia, idade e resultados de exames laboratoriais (por exemplo, o cariótipo). Atualmente, o principal sistema de classificação de estadiamento das LMA é o Franco-Americano-Britânico (FAB), que subdivide a LMA em M0 a M7 com base no tipo e maturidade da célula que a leucemia desenvolve (Quadro 2). Os subtipos M0 a M5 se iniciam em formas imaturas dos leucócitos, o subtipo M6 começa em formas muito imaturas dos eritrócitos, enquanto o M7 começa em formas imaturas das células produtoras das plaquetas.²⁴

Quadro 2 – Classificação de estadiamento das LMA de acordo com o FAB

CLASSIFICAÇÃO FAB	NOME DA LEUCEMIA
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.
M4 eos	Leucemia mielomonocítica aguda com eosinofilia.
M5	Leucemia monocítica aguda.
M6	Leucemia eritróide aguda.
M7	Leucemia megacarioblástica aguda.

Fonte: Pinheiro.²⁴

3.1.3 Leucemia linfoide crônica (LLC)

A leucemia linfoide crônica (LLC) é uma doença na qual ocorre a proliferação de linfócitos B monoclonais e, em raros casos, em linfócitos T, que não têm funcionalidade e se acumulam na medula óssea, no sangue periférico, nos linfonodos e no baço, podendo desencadear uma desregulação de outros órgãos.⁸ Acomete principalmente pacientes idosos (com média de 70 anos) do sexo masculino, e o avanço da idade pode resultar em um aumento exponencial na sua incidência. Dentre as leucemias linfoides, é a mais comum, e a segunda mais comum das leucemias.²⁵ A LLC tem uma clínica variável, necessitando de uma observação periódica nos acometidos antes mesmo de iniciar o tratamento. Por ser considerada uma doença de progressão lenta, pacientes assintomáticos podem vir a realizar tratamento apenas quando surgirem os sintomas.²⁶

Como a maioria das leucemias, na LLC, a sua etiologia permanece desconhecida, mas sabe-se que predisposições genéticas podem estar relacionadas a essa doença.²⁷

3.1.4 Leucemia mielóide crônica (LMC)

A leucemia mielóide crônica (LMC) é caracterizada por uma proliferação anormal de granulócitos e de trombócitos em todos os graus de maturação da linhagem mielóide. É, portanto, uma doença de progressão lenta, e os pacientes no início são assintomáticos.²⁸ A incidência dessa doença é de 1,5:100.000 habitantes, acometendo principalmente adultos, discretamente do sexo masculino, com faixa etária de 40 a 50 anos, sendo raro em menores de 20 anos.²⁹

A etiologia da LMC ainda é desconhecida, mas alguns fatores predisponentes são a exposição a derivados de benzeno e à radiação ionizante. Em torno de 95% dos pacientes com LMC apresentam uma anomalia genética conhecida como cromossomo Philadelphia, situação em que ocorre uma translocação entre os cromossomos 9 e 22, acarretando no aparecimento e no crescimento de tumores.^{29,31}

A classificação da LMC ocorre por meio da sua evolução em três fases: na fase crônica, cerca de 20 a 40% dos pacientes são assintomáticos, ocorrendo uma proliferação clonal maciça das células granulocíticas com capacidade de diferenciação e, por isso, acaba sendo uma doença facilmente controlada. Na fase acelerada, as células neoplásicas perdem a capacidade de diferenciação, dificultando o controle da doença. Na crise blástica, existe uma conversão da LMC para um quadro parecido ao da LMA, caracterizada pela perda da maturação e da diferenciação das células granulocíticas por células imaturas (blastos), comprometendo as linhagens mielóide e linfóide. Essa é uma das principais causas de morte da LMC.^{30,32}

3.2 MARCADORES CELULARES

Os marcadores celulares são antígenos específicos que podem se situar na membrana, no citoplasma ou no núcleo das células, sendo específicos para cada linhagem celular diferente. O Quadro 3 apresenta os principais antígenos específicos de cada linhagem celular.

Quadro 3 – Abordagem dos achados fenotípicos peculiares para identificação da linhagem celular acometida

LINHAGEM CELULAR	ANTÍGENOS ESPECÍFICOS
Células mielóides	MPO, CD13, CD14, CD15, CD33, CD41, CD42b, CD61, CD117 e glicoforina A.
Células de linfócito T	CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, TCR- $\alpha\beta$ e TCR- $\gamma\delta$.
Células de linfócito B	CD19, CD20, CD22, CD79a, CD103, CD138, IgA, IgD, IgG e IgM.
Células NK (<i>Natural Killer</i>)	CD16, CD56 e CD57.
Outros tipos de marcadores não específicos	CD10, CD11c, CD23, CD25 (marcadores de ativação), CD38, CD71, Ki67 (marcadores de proliferação), HLA-DR. Os marcadores CD34, TdT e CD117 são usados para identificação de células imaturas (blastos).

Fonte: Martins e Gagliani,¹⁵ Rego e Santos.³³

3.3 IMUNOFENOTIPAGEM

Existem muitas técnicas que permitem obter dados relevantes para a classificação de diferentes doenças hematológicas e para a monitorização de sua terapia, mas nem todas são aplicáveis em determinadas doenças, haja vista que não focam na especificação de subpopulações celulares. Uma técnica que se tornou importante no diagnóstico de leucemias é a imunofenotipagem, capaz de detectar antígenos presentes na superfície, no citoplasma e/ou no núcleo de diversas células sanguíneas. Para realização dessa técnica, podem ser utilizados dois métodos: imunocitoquímica ou imunofluorescência.^{12,34}

Na imunocitoquímica, acontece uma associação entre anticorpos com os conjugados às enzimas, sendo essa interação antígeno-anticorpo detectada por meio de compostos cromáticos que são produzidos devido à ação dessas enzimas frente a substratos específicos. Na imunofluorescência, ocorre a produção de luminescência, quando os anticorpos estão agregados a fluorocromos e excitados por um feixe de luz, sendo analisados *in situ* (fixadas às lâminas) ou em suspensão (citometria de fluxo). No método de citometria de fluxo, a classificação das células ocorre com a utilização de anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados com fluorocromos, devido à propriedade dos AcMo de formar um complexo antígeno-anticorpo quando são reconhecidos por antígenos específicos. Dessa forma, o citômetro de fluxo reconhece esse encontro e o grau de intensidade da luminescência produzida.^{12,35}

3.4 CITÔMETRO E SEUS SISTEMAS

A análise do citômetro de fluxo ocorre de forma eletrônica, e seus sinais são gerados pelas células em suspensão, quando essas são excitadas por feixe de luz (laser) contendo um comprimento de onda específica.³⁶ Quando a célula marcada com fluorocromo passa pelo laser, ocorre uma dispersão da luz em todas as direções e dessa forma ocorre uma excitação que permite com que essas células floresçam. A dispersão dessa luz é coletada pelos detectores e dividida por refletores para tubos fotomultiplicadores separados, os quais convertem os fótons emitidos ou resultados do espalhamento em pulsos eletrônicos, que serão amplificados e digitalizados.¹²

O citômetro de fluxo tem quatro sistemas principais que permitem a análise celular: sistema fluido, sistema óptico, sistema eletrônico e microcomputador.

O sistema fluido consiste em introduzir as células a serem estudadas por meio de uma solução isotônica para que ocorra um alinhamento em fila único e um fluxo contínuo,

principalmente alinhando à amostra no centro do feixe de laser, para que ocorra análise de célula por célula. O sistema óptico é responsável por produzir e coletar sinais de luz, além de ser composto por um laser como fonte de luz monocromática, o que permite a emissão de diversos picos cujo comprimento de onda é específico e capaz de produzir uma alta fluorescência, que proporciona uma baixa divergência dos sinais emitidos. O sistema eletrônico é responsável por coletar e converter a fluorescência gerada em pulsos eletrônicos, os quais são digitalizados e enviados ao sistema de microcomputador, que controla todas as operações instrumentais, armazena, apresenta e analisa os dados coletados do sistema eletrônico. Em decorrência disso, esse microcomputador precisa de programas (*softwares*) especiais.³⁷

3.5 AVANÇOS, IMPORTÂNCIA, VANTAGENS E DESVANTAGENS DA IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA

Posterior à criação da citometria de fluxo, ocorreu uma melhora significativa na identificação e na análise das estruturas celulares. Com o avanço da tecnologia, diversos *hardwares* e *softwares* foram criados e aperfeiçoados para melhorar a análise celular, o que permite uma caracterização mais adequada dos eventos imunológicos e moleculares que determinam a progressão da doença.

A citometria de fluxo permitiu diferenciar os clones leucêmicos com base em características fenotípicas, fazendo com que se tenha uma precisão no diagnóstico para 99% dos casos suspeitos. Para realização dessa técnica, necessita-se de um painel de anticorpos monoclonais, que são criados especificamente a partir da suspeita diagnóstica para analisar tanto quantitativamente quanto qualitativamente.

A imunofenotipagem por citometria de fluxo tornou-se padrão-ouro para determinação das leucemias devido à sua alta sensibilidade e especificidade. Além disso, é uma técnica que complementa os achados do estudo anatopatológico/imunohistoquímico, permitindo um diagnóstico hematológico rápido e preciso das doenças sanguíneas proliferativas.³³

Diversos autores evidenciam que a citometria de fluxo se tornou uma ferramenta de grande importância para imunofenotipagem nessas últimas décadas, e, por isso, necessita de profissionais com um conhecimento mais avançado sobre as características das linhagens celulares. Uma grande vantagem da imunofenotipagem por citometria de fluxo é a aplicação para diagnóstico e pesquisa, contudo, ainda é um desafio a padronização de protocolos entre os

laboratórios para que a interpretação dos exames seja menos confusa. O Quadro 1 apresenta as vantagens e as desvantagens dessa técnica.

Quadro 4 – Vantagens e desvantagens da imunofenotipagem por citometria de fluxo

Vantagens	Desvantagens
Análise diferencial de células normais e anormais na medula óssea ou no sangue periférico.	Variabilidade das expressões antigênicas.
Análise heterogênea e clonalidade das células malignas.	Perda celular.
Análise multiparamétricas das amostras em único tubo.	Material a fresco.
Alto grau de especificidade e sensibilidade.	Número considerável de células neoplásica.
Deteção simultânea de marcadores múltiplos em população de células distintas.	Manter as células em suspensão.
Identificação objetiva de antígenos multados coexpressos.	Encontrar profissionais capacitados.
Resultados rápidos.	Custo elevado.

Fonte: Rego e Santos.³³

4 CONCLUSÃO

Os achados deste estudo mostraram que a leucemia é uma doença que acomete vários grupos com diferentes faixas etárias cuja etiologia não é conhecida, acreditando-se que os principais fatores de risco são os ambientais e/ou genéticos. Muitos autores mencionam técnicas capazes de identificar e de classificar os diferentes tipos de leucemia, sendo visível que a imunofenotipagem por citometria de fluxo se tornou essencial no diagnóstico dessa doença, principalmente quando a morfologia é de difícil interpretação.

Atualmente, como a tecnologia se tornou de fácil acesso, muitos avanços no diagnóstico de leucemia são notáveis, e um rápido diagnóstico faz com se tenham altas chances de prognóstico e de tratamento. Nos tempos em que a imunofenotipagem por citometria de fluxo não existia, o diagnóstico não era tão sensível e específico, sem contar a demora até que se descobrisse a doença. Muitos óbitos poderiam ter sido revertidos caso já existisse essa tecnologia.

Diante do exposto, recomenda-se o uso da citometria de fluxo para classificar os diferentes tipos de células sanguíneas em pacientes com suspeita de doenças hematológicas. Vale ressaltar que, para o diagnóstico da leucemia mielóide crônica, a pesquisa do cromossomo Ph é de extrema importância.

5 REFERÊNCIAS

1. Melo RCC. Investigação funcional de CXCR7 na hematopoese normal e leucêmica. (Dissertação de Doutorado). Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2016.
2. Silva JS. Descrição da hematopoiese clonal de potencial indeterminado como diagnóstico diferencial para pacientes hematológicos. Distrito Federal: Universidade de Brasília; 2017. Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina.
3. Costa RS. Diagnóstico diferencial das leucemias linfóides através da imunofenotipagem por citometria de fluxo: revisão. Governador Mangabeira: Faculdade Maria Milza; 2016. Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina.
4. Moraes ES, Mello MSC, Nogueira FAM, Otero UB, Carvalho FN. Análise de indivíduos com leucemia: limitações do sistema de vigilância de câncer. Revista Ciência & Saúde Coletiva. 2017; 22(10):3321-3332.
5. Brutus JN, Carmo EJ, Soares GM. Diagnósticos da leucemia linfóide aguda: uma revisão de literatura. Boletim informativo unimotrisaúde em sociogerontologia. 2019; 14(8):1-19.
6. Santos PCJL. Hematologia - Métodos e Interpretação - Série Análises Clínicas e Toxicológicas. 1.ed. São Paulo, São Paulo: Editora Roca; 2013.
7. Lira A. O. Métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico da leucemia linfóide crônica: uma revisão. Brazilian Journal of Health Review. 2019; 2(4):2847-2917.
8. Oliveira FAS. Análise da alteração de índices de hemograma de pacientes com leucemia linfóide crônica: uma revisão. Cuité: Universidade Federal de Campina Grande; 2018. Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia.
9. Santana AMO. Leucemia promielocítica aguda: do diagnóstico precoce ao tratamento. Distrito Federal: Universidade de Brasília; 2019. Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina.
10. Costa RS, Aragão-França LS, Borges-Paluch, Melo APC. A influência da citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das leucemias linfóides. Revista Textura. 2018; 11(20):21-31.

11. Doro LH. Uso da técnica de citometria de fluxo na avaliação imunotoxicológica de amostras de roedores e humanos. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2018. Trabalho de Conclusão de Curso em Especialista em Vigilância Sanitária.
12. Souza AA, Pedrazzani FS. Importância do painel de screening de imunofenotipagem por citometria de fluxo para o diagnóstico de leucemias agudas. *Revista Inova Saúde*. 2019; 9(1):155-175.
13. Pereira ATCR. Leucemia mieloide aguda na criança: do diagnóstico ao prognóstico. (Dissertação de Mestrado). Porto, Portugal: Universidade do Porto; 2016.
14. Rocha JMC. Estudo comparativo da detecção de Doença Residual Mínima pelas técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e reação em cadeia da polimerase, em crianças e adolescentes com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda. (Dissertação de Doutorado). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2017.
15. Martins DM, Gagliani LH. Importância da citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das leucemias. *Revista UNILUS Ensino e Pesquisa*. 2008; 5(8):5-22.
16. Avelino KYPS. Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos baseados em nanoestruturas para o diagnóstico ultrasensível do oncogene quimérico BCR/ABL. (Dissertação de Mestrado). Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2017.
17. Vieira AF, Neves B, Tonelli SR. Perfil epidemiológico da leucemia linfóide nas regiões do Brasil. *Revista UNILUS Ensino e Pesquisa*. 2017;14(37):130-145.
18. Teixeira ACVS. Leucemia linfóide aguda em pacientes infantil. Distrito Federal: Centro Universitário de Brasília; 2017. Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina.
19. Giusti GNN. Sequenciamento de alto desempenho para quantificação da doença residual mínima em leucemia linfóide aguda. (Dissertação de Mestrado). Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2019.
20. Ribeiro FAC, Moraes MKR, Caixeta JCM, Silva JN, Lima AS, Parreira SLS, et al. Percepção dos pais a respeito do tabagismo passivo na saúde de seus filhos: um estudo etnográfico. *Revista Paulista de Pediatria*. 2015; 33(4): 394-399.
21. Cavalcante MS, Rosa ISS, Torres F. Leucemia linfóide aguda e seus principais conceitos. *Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente*. 2017; 8(2):151-164.
22. Barsaglini, RA, Soares BBNS. Impactos de adoecimento de longa duração: experiência de adultos jovens com Leucemia Mieloide Aguda. *Revista de Ciência & Saúde Coletiva*. 2018; 23(2):399-408.
23. Oliveira MJS. Revisão sistemática sobre fatores de risco para Leucemia Mieloide Aguda. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2014. Trabalho de Conclusão de Curso em Medicina.

24. Pinheiro MLA. Citogenética no diagnóstico da Leucemia Linfocítica Aguda em crianças - uma revisão de literatura. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2018. Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina.
25. Silva MC. Estudo de citocinas, imunofenotipagem, aberrações cromossômicas e da vitamina D em pacientes com diagnóstico de leucemia linfóide crônica atípica. (Dissertação de Doutorado). Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2016.
26. Caldato TC, Alves JCP. Terapia celular no tratamento da leucemia mieloide crônica. *Revista Saúde UniToledo*. 2019; 3(2):50-61.
27. Alves CV. Leucemia linfocítica crônica - fisiopatologia, diagnóstico e abordagens terapêuticas. (Dissertação de Mestrado). Lisboa, Portugal: Universidade de Lisboa; 2017.
28. Ribeiro BF. Avaliação do papel dos genes 15-LOX-2 e PAR-4 na leucemia mieloide crônica e sua relação com os mecanismos de resistência aos inibidores de tirosinoquinase. (Dissertação de Doutorado). Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2019.
29. Sossela FR, Zoppas BCA, Weber LP. Leucemia Mieloide Crônica: aspectos clínicos, diagnóstico e principais alterações observadas no hemograma. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 2017; 49(2):127-130.
30. Bosi GR. Leucemia mieloide crônica: expansão de células Natural Killer de pacientes refratários ou intolerantes aos inibidores de tirosino quinase. (Dissertação de Mestrado). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2017.
31. Lago C, Petroni TF. Fisiopatologia e diagnóstico da leucemia mieloide crônica. *Revista Saúde UniToledo*. 2017; 1(1):121-133.
32. Vieira THM. Análise dos nichos da medula óssea na Leucemia Mieloide Crônica. (Dissertação de Mestrado). Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2019.
33. Rego EM, Santos GAS. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2009; 31(5):367-374.
34. Helman R, Santos FPS, Simões B, Atta EH, Callera F, Dobbin JA, et al. Leucemia mieloide aguda: atualidade brasileira de diagnóstico e tratamento. *Einstein*. 2011; 9(2):179-183.
35. Stonoga LC, Stroparo E. Leucemia mieloide aguda - genética molecular e mutações - revisão. *Revista Eletrônica Biociências, Biotecnologia e Saúde*. 2018; 1(20):70-76.
36. Barros CP, Pires RPS, Freitas MQ. Uso da citometria de fluxo como uma metodologia emergente para avaliar a viabilidade celular probiótica. *Revista Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente*. 2020; 1(9):43-67.

37. Brito HCD, Anai LA, Santana AE. O uso do ensaio multiplex baseados em bead na medicina veterinária. *Revista Investigação*. 2016; 15(4):12-18.

ANEXOS



ANEXO 1 - DECLARAÇÃO REVISÃO LÍNGUA PORTUGUESA

Eu, Douglas Corrêa da Rosa, professor de Língua Portuguesa, declaro, para os devidos fins e efeitos, e para fazer prova junto à Coordenação do curso de Biomedicina da **Universidade Cesumar – UNICESUMAR**, que realizei a correção gramatical do Trabalho de Conclusão de Curso, intitulado **ABORDAGEM SOBRE AS LEUCEMIAS E O PAPEL DA IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**, de autoria de **ANA PAULA SANTOS FRANÇA DA SILVA** e **GUILHERME DE SOUZA CABRAL**.

Por ser verdade, firmo a presente declaração.

Maringá, 09 de dezembro de 2020.

Douglas Corrêa da Rosa

Graduado em Letras Português-Italiano, Mestre e Doutor em Letras.



ANEXO 2 - FORMULÁRIO DE SOLICITAÇÃO DE FICHA CATALOGRÁFICA

Dados do solicitante

Nome Completo	GUILHERME DE SOUZA CABRAL
E-mail	GCABRAL@ALUNOS.UNICESUMAR.EDU.BR
Telefone Celular	(44) 99869-8730
Curso	BIOMEDICINA

Dados do documento - TCC

Título completo	ABORDAGEM SOBRE AS LEUCEMIAS E O PAPEL DA IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL					
Orientador (a)	Michelli Gouveia Ramos					
Co-orientador (a)*						
Número total de páginas	19					
Ano da defesa	2020					
Palavras-Chaves atribuídas pelo Autor (três)	Antígenos de neoplasias. Hematopoese. Neoplasias hematológicas.					
Possui ilustração? *	Tabelas	Sim () Não (X)	Quadros	Sim () Não (X)	Figuras	Sim () Não (X)

* Preencher somente se houver

DECLARAÇÃO DE INEXISTÊNCIA DE PLÁGIO

(Prática ilegal de apropriar-se da obra de terceiros sem autorização e sem a referência devida)

TÍTULO DE TRABALHO: **ABORDAGEM SOBRE AS LEUCEMIAS E O PAPEL DA IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

Eu Michelli Gouveia Ramos declaro que, com exceção das citações diretas e indiretas claramente indicadas e referenciadas, este trabalho foi escrito por mim e, portanto, não contém plágio. Eu estou consciente que a utilização de material de terceiros incluindo uso de paráfrase sem a devida indicação das fontes será considerado plágio, e estará sujeito a processos administrativos da Unicesumar e sanções legais.

Por ser verdade, firmo a presente declaração.

Maringá, 08 de dezembro de 2020.



Nome e/ou assinatura do autor (a)