

Revista UNILUS Ensino e Pesquisa

v. 5, n. 8, jan./jun. 2008

ISSN 1807-8850

Daniele Minguini Martins

danie.mmartins@hotmail.com

Luiz Henrique Gagliani

biogagliani@globo.com

*Centro Universitário Lusíada
(UNILUS)*

*Rua Armando Salles de
Oliveira, 150 – 11050-071 –
Santos/SP – Brasil*

(13) 3235-1311

IMPORTÂNCIA DA CITOMETRIA DE FLUXO NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS LEUCEMIAS

RESUMO

A citometria de fluxo, introduzida em meados do século XX, era uma técnica utilizada apenas em centros de pesquisas para obtenção de parâmetros básicos como tamanho e forma, porém os avanços tecnológicos e grandes descobertas, como por exemplo, a produção de anticorpos monoclonais, abriu um amplo espectro dentro da rotina laboratorial, podendo ser utilizada hoje em dia, em várias áreas de atuação do profissional biomédico, como por exemplo, hematologia, biologia molecular, microbiologia, reprodução assistida, entre outras. Atualmente a citometria de fluxo é uma técnica que permite uma análise multiparamétrica das células sanguíneas, isso se fez possível devido ao desenvolvimento dos anticorpos monoclonais e conjugação dos mesmos a fluorocromos, os quais contribuíram no entendimento das alterações fisiológicas que ocorrem durante a diferenciação e maturação de todos os componentes normais do sistema hematopoético, assim como daquelas que ocorrem durante o desenvolvimento de processos patológicos. A imunofenotipagem das células neoplásicas hematopoéticas pela citometria de fluxo, além de auxiliar no diagnóstico diferencial e direcionar a terapêutica utilizada, permitiu a classificação de um novo subtipo de LMA (Leucemia mieloide aguda), o M0, o qual só é diagnosticado por esta técnica. A imunofenotipagem permite também a caracterização de uma ou mais populações leucêmicas, através dos marcadores celulares, medindo a porcentagem de cada uma delas antes e depois da quimioterapia. Esse tipo de determinação se faz importante na detecção da doença residual mínima, isto é, quando há persistência de uma quantidade pequena de células blásticas resistentes ao tratamento. O reconhecimento, da célula doente que gerou todo o processo neoplásico é fundamental, pois uma vez definida a célula anômala, sua biologia, seu mecanismo leucemogênico, pode-se melhor conduzir o paciente. Para que sejam obtidas tais informações é necessário que vários métodos diagnósticos sejam combinados, obtendo assim um diagnóstico seguro e preciso dos tipos e subtipos de leucemias.

Palavras-chave: Citometria de fluxo. Anticorpos Monoclonais. Leucemias.

ABSTRACT

Flow cytometry, introduced in the 20th century, was a technique used only by specialized research centers as a mean of obtaining basic parameters such as size, shape. However, technological improvements and scientific breakthroughs, for example, the production of monoclonal antibodies, initiated a serie of changes in the laboratorial routine, that now can be used by biomedical professionals, as an example, hematology, molecular biology, microbiology, assisted reproduction and so on and so forth. Nowadays, flow cytometry is a technique that makes possible a multi-parametric analysis of blood cells, something that is possible because of the development of monoclonal antibodies and combination of them to fluorochromes, something that contributed to the process of understanding physiological changes that occur during the maturation and differentiation of all the normal elements of the hematopoietic system, similar to those that may occur during the development of pathological process. The Immunophenotyping of neoplastic hematopoietic cells by the flow cytometry not only helps the differential diagnosis and leads to the appropriate therapy but also contributes to the classification of a new subtype of Chronic myeloid leukemia (CML), the M0, that can only be diagnosed by this technique. The Immunophenotyping makes it possible to highlight more than one leukemia population, through cellular markers, measuring the percentage of all of them before and after the chemotherapy. This type of determination is of great importance to detect the minimal residual disease, when a small amount of blastic cells persists in the treatment. The recognition of the defective cell that triggered all the neoplastic process is vital, once the anomalous cell is determined, its biology and leukemogenic mechanism can be better managed by the patient. To gather all this information it is necessary to combine as many methods of diagnosis as possible to ensure a safe and precise diagnosis of the types and subtypes of leukemias.

Keywords: Flow cytometry. Monoclonal Antibodies. Leukemias.

1 INTRODUÇÃO

A leucemia é um conjunto de neoplasias malignas complexas e diferentes entre si originada a partir de células precursoras encontradas na medula óssea. O diagnóstico desse grupo de neoplasias é feito com base em vários parâmetros celulares, entre eles a imunofenotipagem. A utilização da imunofenotipagem nas leucemias resultou no reconhecimento de dois subtipos novos de LMA, cuja identificação não seria possível apenas pelos critérios morfológicos e citoquímicos e tornou-se importante também no reconhecimento das leucemias bifenotípicas.

Atualmente, demonstrar a importância da imunofenotipagem pela citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das leucemias, tem contribuído na orientação terapêutica, prognóstico e detecção da doença residual mínima dos pacientes. A imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma técnica rápida e multiparamétrica, permitindo que o diagnóstico diferencial seja obtido num curto espaço de tempo, tornando mais rápido o início do tratamento beneficiando o paciente.

A citometria de fluxo é uma técnica que permite através da imunofenotipagem, uma análise individual, rápida e multiparamétrica das células sanguíneas as informações obtidas correspondem a uma célula e não a valores médios da população total (LORENZI, 2003).

2 HISTÓRICO DA CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo, introduzida na metade do século XX, era uma técnica utilizada somente na contagem e análise do tamanho das células.

Em 1965, Fulwyler idealizou o primeiro aparelho que visava selecionar células específicas (cell sorter).

Em 1970, iniciou-se a era da separação de células ativadas por fluorescência (fluorescence activated cell sorting – FACS), graças ao aperfeiçoamento dos instrumentos utilizados, separação de células específicas e a introdução de combinações de sondas fluorescentes. Essa separação inicialmente era restrita à área de pesquisa.

Nas últimas duas décadas, a análise das células tornou-se o principal objetivo da citometria de fluxo, sendo hoje em dia uma técnica de uso rotineiro, não apenas na área de pesquisa como também na área clínica.

Em 1975, com a publicação de um estudo clássico feito por Köhler e Milstein sobre a produção de anticorpos monoclonais, com alta especificidade para alguns determinantes antigênicos encontrados tanto na superfície celular como intracitoplasmático e nucleares, foi determinante para o avanço da citometria de fluxo para o estágio atual (LORENZI, 2003).

3 IMUNOFENOTIPAGEM

A imunofenotipagem é uma técnica capaz de identificar antígenos presentes em diversos compartimentos celulares, tais como: superfície, citoplasma e núcleo (Fleury–Medicina Diagnóstica, 16/04/2006). A identificação desses antígenos pode ser realizada por dois métodos: imunocitoquímica ou imunofluorescência (ZAGO, 2001). Na imunocitoquímica os anticorpos encontram-se conjugados às enzimas, geralmente às

peroxidases e fosfatases alcalinas, e a interação antígeno-anticorpo é identificada através dos compostos cromáticos que são produzidos pela ação dessas enzimas sobre substratos específicos (ZAGO, 2001).

Na imunofluorescência os anticopos estão associados a fluorocromos que ao serem excitados por um feixe de luz, produzem luminescência. Nesse tipo de método, as células de interesse podem ser analisadas de duas maneiras: fixadas às lâminas (imunofluorescência in situ), ou em suspensão (citometria de fluxo) (ZAGO, 2001). Na citometria de fluxo, a identificação de populações celulares através da utilização de anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados com fluorocromos, ocorre devido à capacidade dos AcMo de reconhecer antígenos celulares específicos e interagir com os mesmos formando um complexo antígeno-anticorpo, que serão posteriormente reconhecidos pelo citômetro de fluxo de acordo com a presença e intensidade de luminescência produzida (MANUAL BD BIOSCIENCES, 2004).

A utilização de fluorocromos conjugados aos anticorpos monoclonais se faz necessária para que ocorra a identificação da ligação específica antígeno-anticorpo nas células da amostra analisada. As células marcadas com os anticorpos conjugados, ao passarem pelo laser do citômetro, os fluorocromos absorvem a luz incidente do laser e emitem um comprimento de onda maior do que o recebido, denominado, fluorescência (LORENZI, 2003). A citometria de fluxo permite uma análise qualitativa e quantitativa da expressão dos antígenos. Essa técnica é o método preferencial para imunofenotipagem das doenças hematológicas malignas, pois permite detectar a presença de vários antígenos numa mesma célula, e uma análise rápida de um grande número de células (ZAGO, 2001).

A imunofenotipagem pela citometria de fluxo pode caracterizar uma população de células normais, diferenciar populações anormais, definir o seu fenótipo, seu percentual na amostra em estudo e interpretar o resultado no contexto clínico e morfológico (OLIVEIRA, 2004).

A escolha dos anticorpos monoclonais utilizados para imunofenotipagem das doenças malignas hematopoéticas, é realizada de acordo com a hipótese diagnóstica que foi feita com base na clínica e na análise morfológica feita pelo hemograma. Normalmente é utilizada a associação de dois ou três anticorpos conjugados com fluorocromos diferentes nos testes realizados, para que ocorra a identificação de um ou mais antígenos celulares presentes, simultaneamente (ZAGO, 2001). A calibração do aparelho e obtenção de resultados confiáveis deve ser feita através da inclusão de controles negativos e positivos na sua rotina (ZAGO, 2001).

4 CITÔMETRO E SEUS SISTEMAS

O citômetro de fluxo analisa eletronicamente os sinais gerados pelas células em suspensão, quando as mesmas são interceptadas por um feixe de luz (laser) contendo comprimento de onda específico. A passagem da célula pelo laser promove uma dispersão de luz em todas as direções, em um padrão que dependerá do tamanho, forma e estrutura celular, e as moléculas marcadas com fluorocromo são excitadas e fluorescem. A dispersão é coletada por detectores e dividida por refletores para tubos fotomultiplicadores separados, os quais convertem os fótons emitidos ou resultantes do espalhamento, em pulsos eletrônicos que serão amplificados e digitalizados (FERREIRA, 2003).

Para que ocorra a análise celular pelo citômetro de fluxo é necessário que este seja composto pela combinação de quatro sistemas principais: sistema fluido, sistema óptico, sistema eletrônico e microcomputador. (ver figura 1) (LORENZI, 2003).

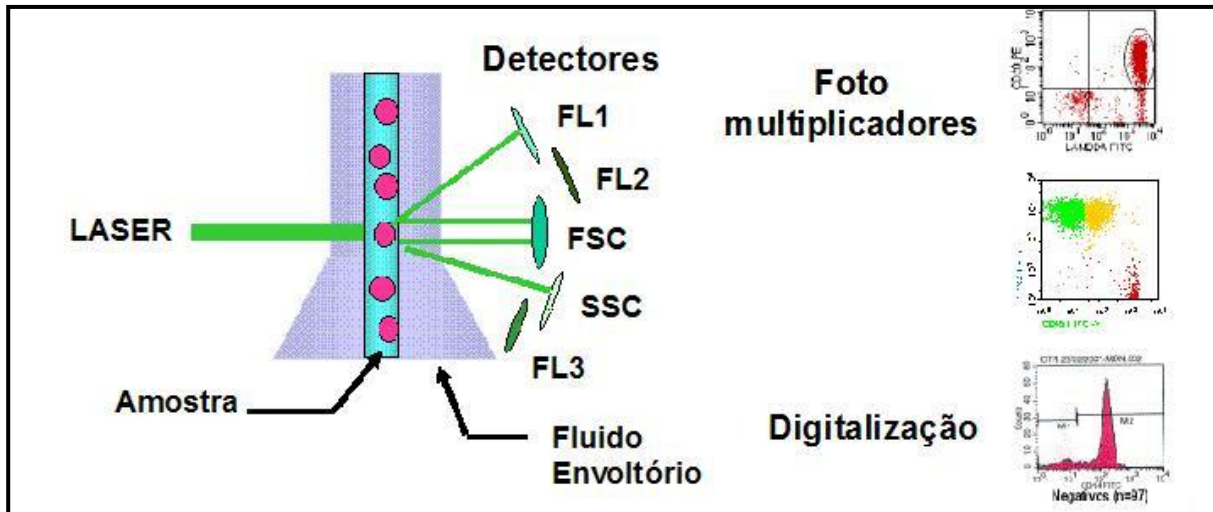


Figura 1 - Citômetro e seus sistemas.

4.1 SISTEMA FLUIDO

É responsável pela Introdução das células a serem estudadas circundadas por uma solução isotônica, alinhando-as em fila única e em um fluxo contínuo (LORENZI, 2003).

O sistema de fluidos é usado também para posicionar o fluxo da amostra, alinhando-o ao centro do feixe de laser, para que possa ocorrer a análise individual das células (MANUAL BD BIOSCIENCES, 2004).

Para garantir o alinhamento das células de modo que elas passem através de uma fonte de luz em fila única, utiliza-se um sistema de fluido pressurizado, que é constituído por dois jatos de fluido que alimentam a câmara de fluxo: o jato que contém a amostra e o que funciona em um envoltório cilíndrico (FERREIRA, 2001).

O jato que funciona como um envoltório cilíndrico flui continuamente, sendo controlado por pressão positiva. O fluido contendo as células é injetado sob pressão no centro do envoltório fluídico, para que as células sejam transportadas. O fluxo das células é controlado por um outro regulador de pressão, a fim de se evitar que mais de uma célula cruze o feixe de luz ao mesmo tempo (ver figura 2) (FERREIRA, 2001).

A câmara de fluxo conduz as células até o ponto de detecção, posteriormente essas células poderão ser separadas (pelo separador de células ativadas por fluorescência – FACS) ou enviadas ao sistema de esgoto (FERREIRA, 2001).

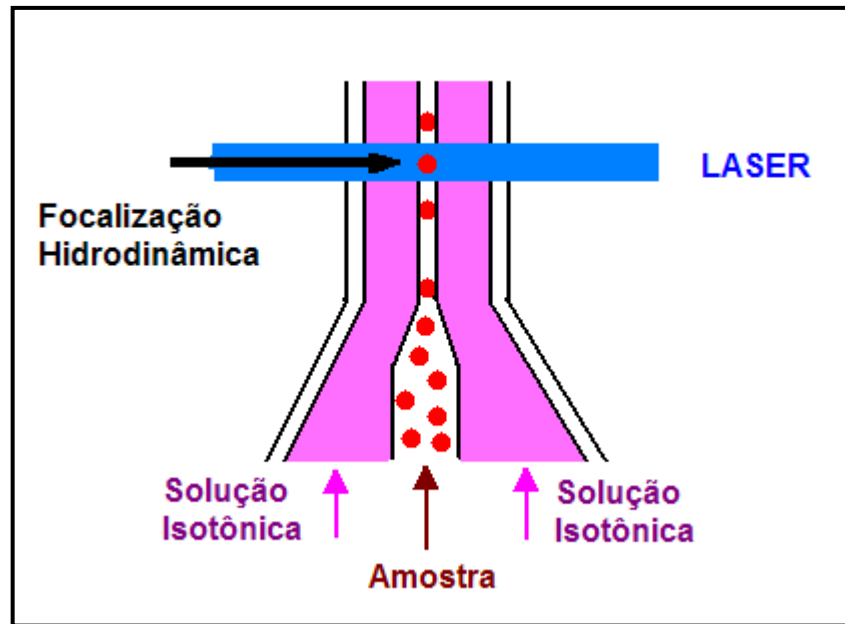


Figura 2 - Sistema Fluido.

4.2 SISTEMA ÓPTICO

O sistema óptico é responsável por gerar e coletar sinais de luz (MANUAL BD BIOSCIENCES, 2004). É composto de um laser como fonte de luz monocromática, o que irá permitir a emissão de diversos picos cujo comprimento de onda é específico e são capazes de produzir uma alta fluorescência e proporcionar uma baixa divergência dos sinais emitidos (LORENZI, 2003).

Sendo assim, os fluorocromos ou corantes que serão empregados devem ter uma compatibilidade com o laser do citômetro de fluxo (LORENZI, 2003).

O laser mais utilizado na área clínica, que produz um comprimento de onda de 488nm capaz de excitar quase todos os fluorocromos e corantes, é o de argônio. Com a utilização do laser obtemos informações sobre o tamanho, a granulosidade celular (complexidade interna) e a fluorescência (LORENZI, 2003).

O tamanho celular é obtido através da dispersão pra frente (forward scatter – FSC), que nada mais é do que o espalhamento frontal de luz coletada por lentes posicionadas em ângulos pequenos (1° a 20°) do ponto no qual o feixe de luz do laser cruza a célula (FERREIRA, 2003). Já a complexidade interna é analisada através da dispersão lateral (side scatter – SSC), a qual é medida pela dispersão de luz em um ângulo reto (90°) em relação ao feixe de luz do laser e ao fluxo celular (ver figura 3) (LORENZI, 2003)

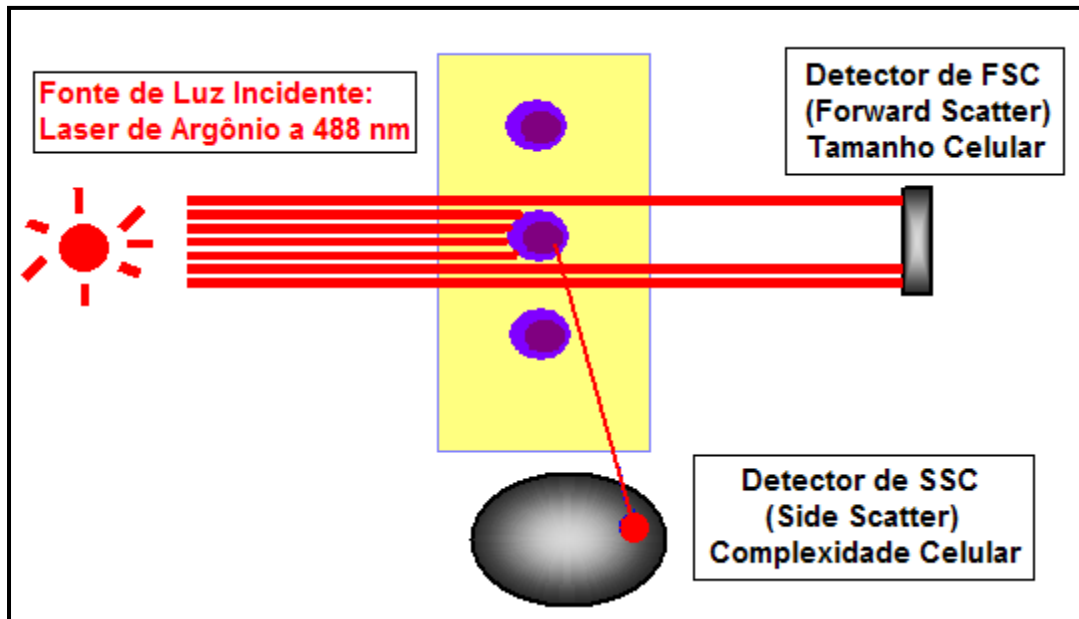


Figura 3 - Detecção da FSC e SSC.

A fluorescência é coletada por um sinal óptico especial o qual caracteriza apropriadamente as células, baseada na expressão de seus antígenos celulares (ver figura 4) (LORENZI, 2003).

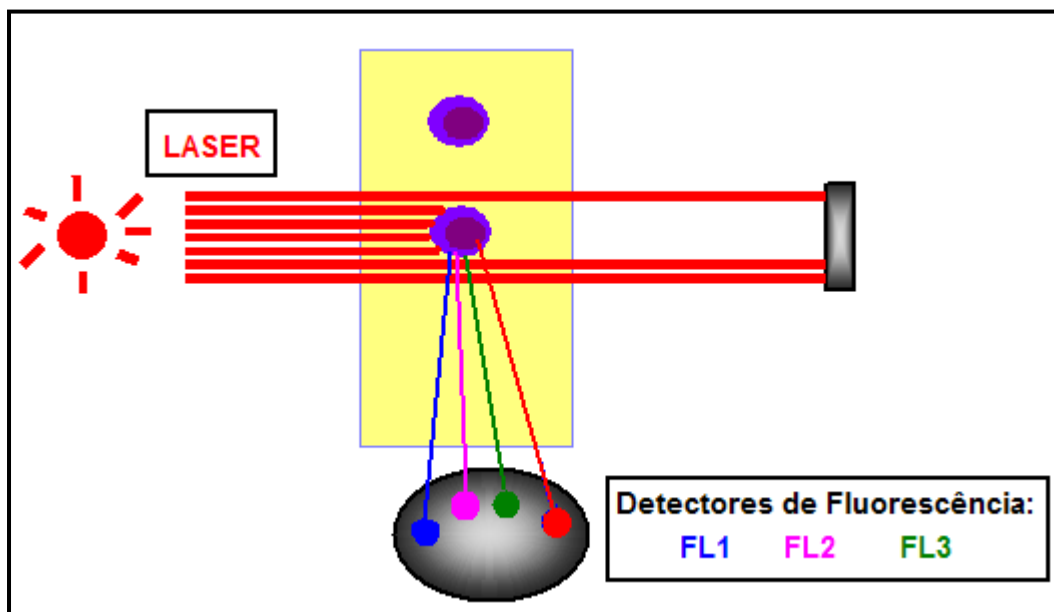


Figura 4 - Detectores de Fluorescência.

4.3 SISTEMA ELETRÔNICO

Com a incidência do feixe de luz e emissão de um sinal fluorescente pelo fluorocromo, foi necessário criar o sistema eletrônico, o qual é capaz de coletar e converter estes sinais em pulsos eletrônicos (LORENZI, 2003).

Os fotomultiplicadores são responsáveis pela conversão dos fótons resultantes do espalhamento em pulsos eletrônicos (FERREIRA, 2003).

Estes pulsos eletrônicos, para que ocorra a interpretação do usuário, serão digitalizados e transformados pelo sistema eletrônico, sendo em seguida enviados ao sistema de microcomputador (LORENZI, 2003).

4.4 MICROCOMPUTADOR

É um sistema que está acoplado ao citômetro de fluxo, capaz de controlar todas as operações instrumentais, armazenar, apresentar e analisar os dados coletados do sistema eletrônico. Para tais funções o microcomputador necessita de programas (softwares) especiais (LORENZI, 2003).

5 IMUNOFENOTIPAGEM NAS LEUCEMIAS

Para que seja realizado o estudo imunofenotípico é necessário obter previamente um conhecimento dos padrões normais de expressão antigênica das diferentes fases de maturação (ZAGO, 2001).

É sabido que durante o processo evolutivo das células hematopoéticas, dependendo do estágio de maturação, pode-se encontrar expressão de diferentes proteínas no citoplasma, membrana e núcleo (OLIVEIRA, 2004). Através da utilização de anticorpos monoclonais especificamente produzidos contra determinantes antigênicos organizados em grupos de diferenciação, denominados como CD (cluster differentiation) é possível caracterizar e diferenciar as populações de células normais das anormais, além de definir seu fenótipo e percentual das células anômalas na amostra (OLIVEIRA, 2004).

Para que haja a detecção da ligação antígeno/anticorpo, os anticorpos monoclonais são conjugados a substâncias fluorescentes (fluorocromos), as quais ao passarem pelo laser produzirão uma fluorescência detectada pelo citômetro de fluxo (LORENZI, 2003).

6 METODOLOGIA

Os materiais utilizados na imunofenotipagem pela citometria de fluxo são amostras de aspirados de medula óssea e sangue periférico. Entretanto outros materiais, como biópsias de medula óssea, gânglios ou tumores também podem ser analisados (OLIVEIRA, 2004). Para a análise, o material poderá ser coletado com EDTA ou heparina como anticoagulante e mantido em temperatura ambiente podendo ser analisado até 24 horas após a coleta (MANUAL DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997). É necessário promover a lise das hemácias utilizando cloreto de amônio, antes ou após a incubação com os anticorpos monoclonais (ZAGO, 2001). A marcação com anticorpos monoclonais pode ser realizada por duas técnicas: direta ou indireta. Na primeira são utilizados anticorpos monoclonais previamente conjugados com fluorocromos, já na segunda, tem a necessidade de realizar uma segunda incubação com anticorpos contra imunoglobulina de camundongo, os quais, deverão estar marcados com fluorocromo (ZAGO, 2001). Tendo em vista que é a porção Fab da imunoglobulina que proporciona especificidade ao anticorpo, é necessário que ocorra, em ambas as técnicas, o bloqueio da porção Fc, com a finalidade de que não haja ligação inespecífica da imunoglobulina (ZAGO, 2001).

Com intuito de reduzir os artefatos na análise, alguns autores recomendam fazer uma lavagem após incubação com os anticorpos monoclonais. Para que seja possível a pesquisa de antígenos intracitoplasmáticos por essa técnica, é necessário tratar as células com uma substância permeabilizadora de membrana citoplasmática celular, como por exemplo, solução tamponada de formaldeído (0,5 - 1,0%) antes de promover a incubação dos anticorpos (ZAGO, 2001). Uma vez que a suspensão de células tenha sido processada, é realizada então a análise multiparamétrica pelo citômetro de fluxo (ZAGO, 2001).

6.1 MARCADORES CELULARES

São antígenos específicos que podem estar presentes na membrana, citoplasma ou núcleo das células (ZAGO, 2001).

Existem vários tipos de marcadores, sendo alguns deles, específicos para determinada linhagem celular (OLIVEIRA, 2004).

Antígenos específicos para a linhagem mielóide: CD13, CD33, MPO, CD15, CD14, CD117, glicoforina-A, CD41, CD42b, CD61 e glicoforina A (LORENZI, 2003).

Antígenos específicos para a linhagem linfóide T: CD3, CD4, CD8, CD7, CD2, CD5, CD1a, TCR- $\alpha\beta$, TCR- $\gamma\delta$ (OLIVEIRA, 2004).

Antígenos específicos para a linhagem linfóide B: CD19, CD79a, CD22, CD20, CD103, CD138, IgG, IgA, IgD e IgM (cadeia pesada μ de imunoglobulina), cadeias leve kappa ou lambda (LORENZI, 2003).

Antígenos específicos para células NK: CD16, CD56, CD57 (OLIVEIRA, 2004).

Outros tipos de marcadores não guardam especificidade de linhagem, como CD38, HLA-DR, CD23, CD11c e CD25 (marcadores de ativação), CD71 e Ki67 (marcadores de proliferação), e para caracterizar populações de blastos são essenciais os marcadores de células precursoras, como é o caso do CD34, TdT e CD117. O CD10 e o FMC7, apesar de serem utilizados em painéis de diagnóstico de linfoproliferações B, não são específicos para tal linhagem (OLIVEIRA, 2004).

As células progenitoras totipotentes apresentam uma combinação antigênica CD34+, HLA-DR e CD38 negativos, sem apresentarem, ainda, outros antígenos de linhagem específicos (OLIVEIRA, 2004).

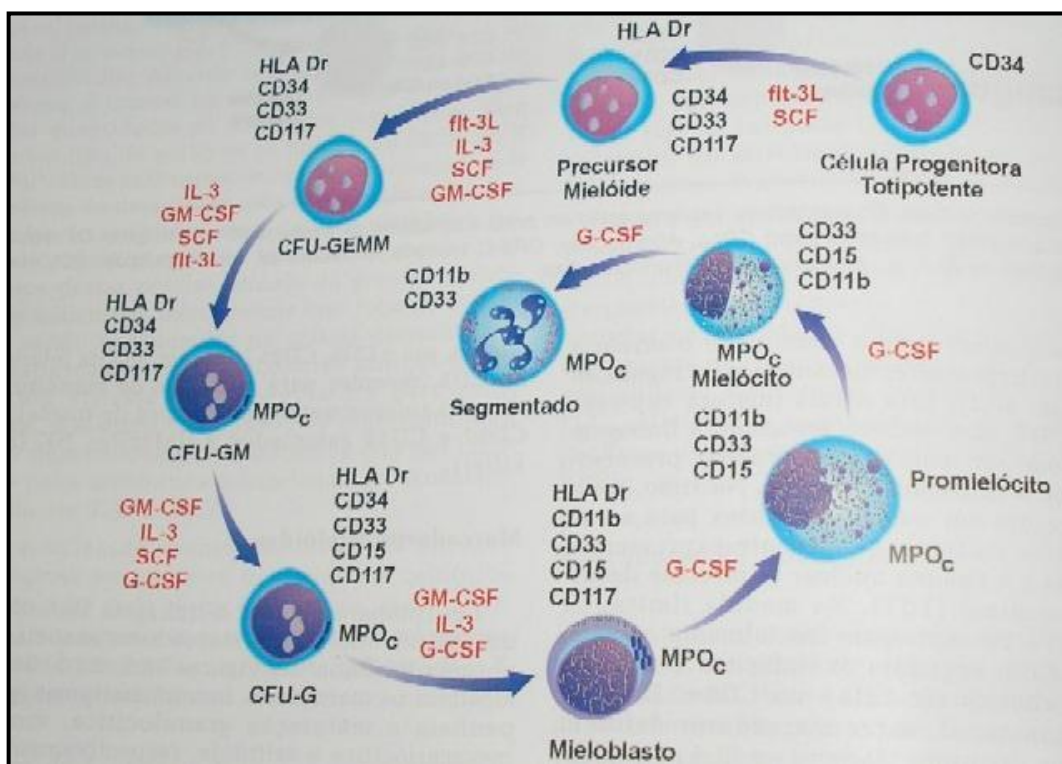
6.1.1 Marcadores de Linhagem Mielóide

Segundo, grupo europeu de classificação imunológica para as leucemias agudas (EGIL), as LMA são definidas pela expressão simultânea de pelo menos dois dos marcadores: MPO, CD13, CD33, CD65w e/ou CD117 (LORENZI, 2003).

Os marcadores CD33 e CD13 são considerados antígenos pan-mielóides, ou seja, encontram-se expressos em maior parte das células desta linhagem (ZAGO, 2001). Os blastos anômalos encontrados na linhagem mielóide podem co-expressar os antígenos linfóides TdT e/ou CD7 (OLIVEIRA, 2004). Dentro da

linhagem mielóide, existem marcadores de diferenciação granulocítica, monocítica, megacariocítica e eritrocítica (ZAGO, 2001).

- a) **Diferenciação Granulocítica:** Expressão dos marcadores de precursores CD34 e HLA-DR, além dos antígenos pan-mielóides MPO, CD13 e/ou CD33. Vale lembrar que os mieloblastos tipo III e promielócitos tendem a ter menos expressão de CD34 e HLA-DR. Nos primeiros momentos, quando mielócitos, há o aparecimento dos marcadores de superfície CD15 e CD11b (ver figura 4). Os segmentados maduros podem expressar: CD10, CD24, CD67 (OLIVEIRA, 2004).

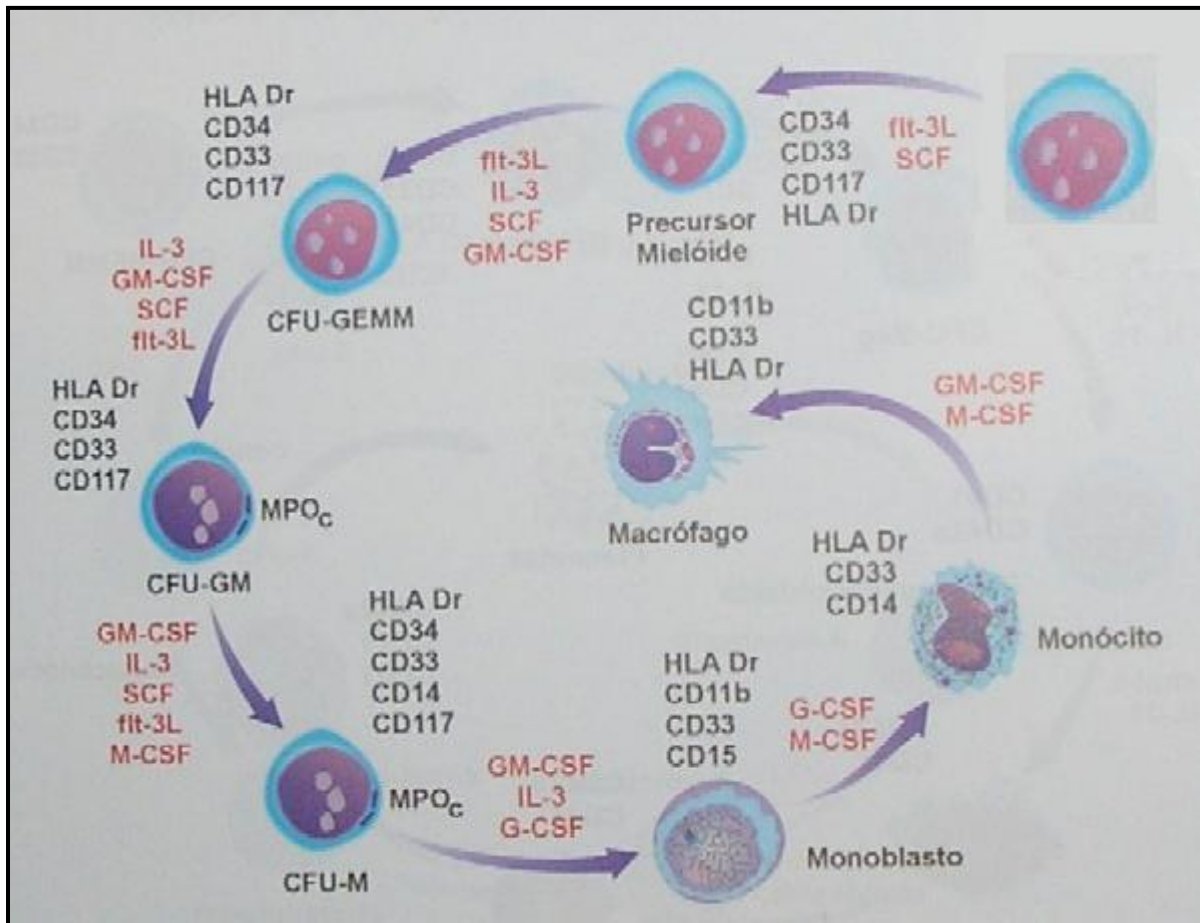


Fonte: ZAGO, 2001.

Figura 4 - Maturação Granulocítica²

- b) **Diferenciação Monocítica:** Os monoblastos expressam o antígeno monocítico CD14, bem como HLA-DR, CD34, CD13, e CD33 (ver figura 5). Dentro das leucemias monocíticas agudas, a expressão do CD117 está mais freqüentemente associada ao tipo M5a FAB. Monócitos maduros podem apresentar também outros antígenos, incluindo CD11, CD64, CD65w (OLIVEIRA, 2004).

² Os fatores de maturação estão representados em vermelho. Abreviações: CFU-GEMM, unidade formadora de colônia granulocítica/eritróide/monocítica/ megacariocítica; CFU-GM, unidade formadora de colônia granulocítica/monocítica; CFU-G, unidade formadora de colônia granulocítica

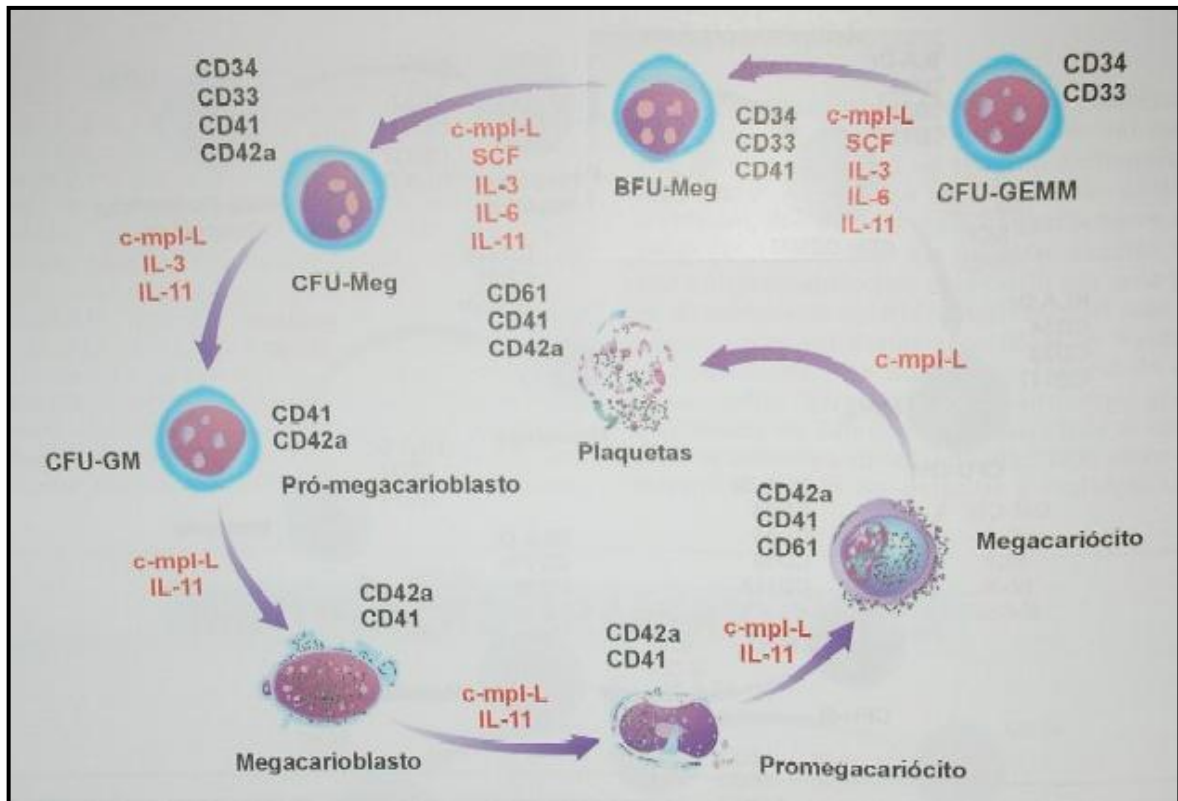


Fonte: ZAGO, 2001.

Figura 5 - Maturação Monocítica ³

- c) Diferenciação Megacariocítica: Dentre várias glicoproteínas associadas a plaquetas destaca-se a expressão de CD41a, CD41b, CD42a, CD42b, CD51, CD61 (ver figura 6). Na prática laboratorial, as leucemias da linhagem megacariocítica são caracterizadas por apresentar CD41+ e CD61+ (OLIVEIRA, 2004).

³ Os fatores de crescimento estão representados em vermelho. Abreviações: CFU-GEMM, unidade formadora de colônia granulocítica/eritróide/monocítica/ megacariocítica; CFU-GM, unidade formadora de colônia granulocítica/monocítica; CFU-M, unidade formadora de colônia monocítica.

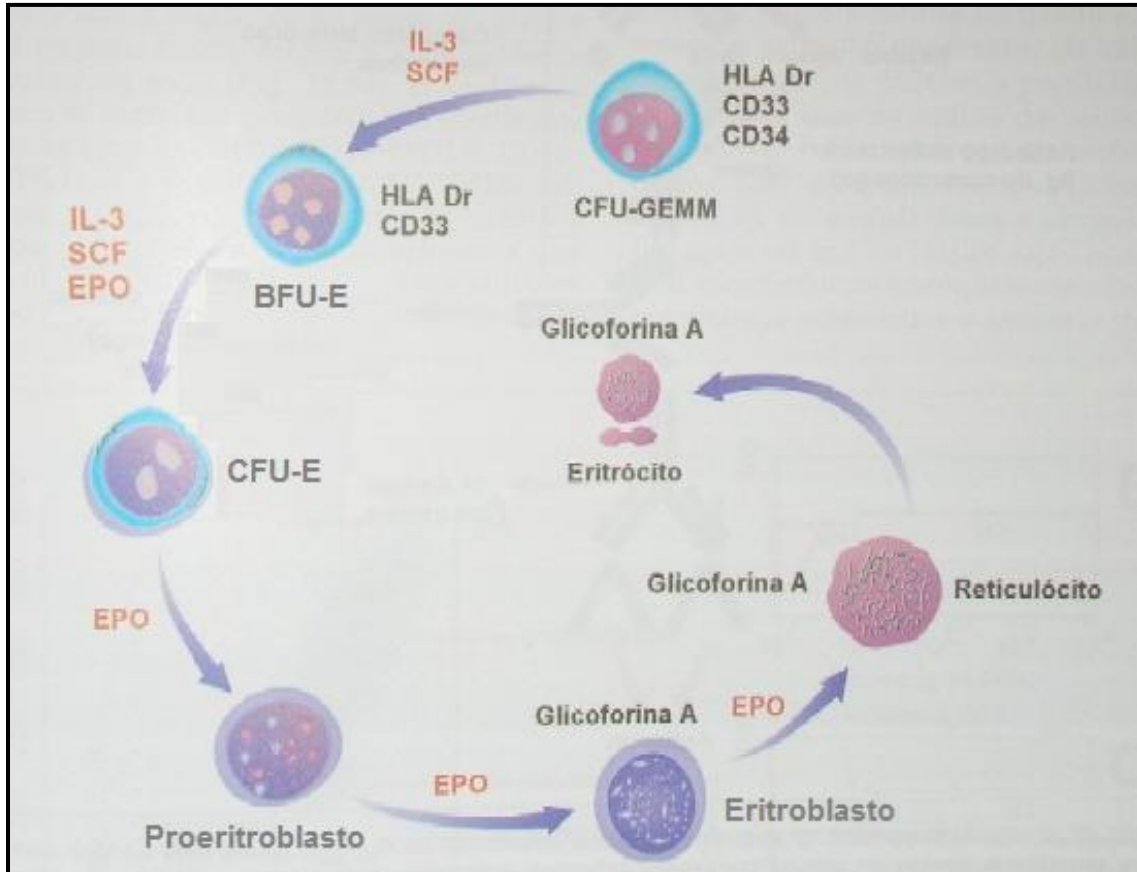


Fonte: ZAGO, 2001.

Figura 6 - Maturação Megacariocítica ¹

- d) Diferenciação Eritrocítica: A expressão de glicoforina-A (proteína de membrana eritróide) é bastante específica na identificação de célula da linhagem eritróide (ZAGO, 2001). Pode também ser utilizado na classificação os antígenos CD45 (antígeno comum de linfócitos) e CD71 (receptor de transferrina). A glicoforina-A tem a sua expressão mantida desde as fases relativamente iniciais até o final da maturação eritróide (ver figura 7). Os eritrócitos maduros são caracteristicamente glicoforina-A positivos, CD71 e CD45 negativos (OLIVEIRA, 2004).

¹ Os fatores de crescimento estão representados em vermelho. Abreviações: CFU-GEMM, unidade formadora de colônia granulocítica/eritróide/monocítica/ megacariocítica; BFU-Meg, unidade formadora de colônia tipo *burst* megacariocítica; CFU-Meg, unidade formadora de colônia megacariocítica.



Fonte: ZAGO, 2001.

Figura 7 - Maturação Eritróide²

6.1.2 Marcadores de Linhagem Linfóide

Assim como a linhagem mielóide apresenta diferenciação, a linhagem linfóide sofre diferenciação em Linfóide T e Linfóide B (ver figura 8) (ZAGO, 2001)

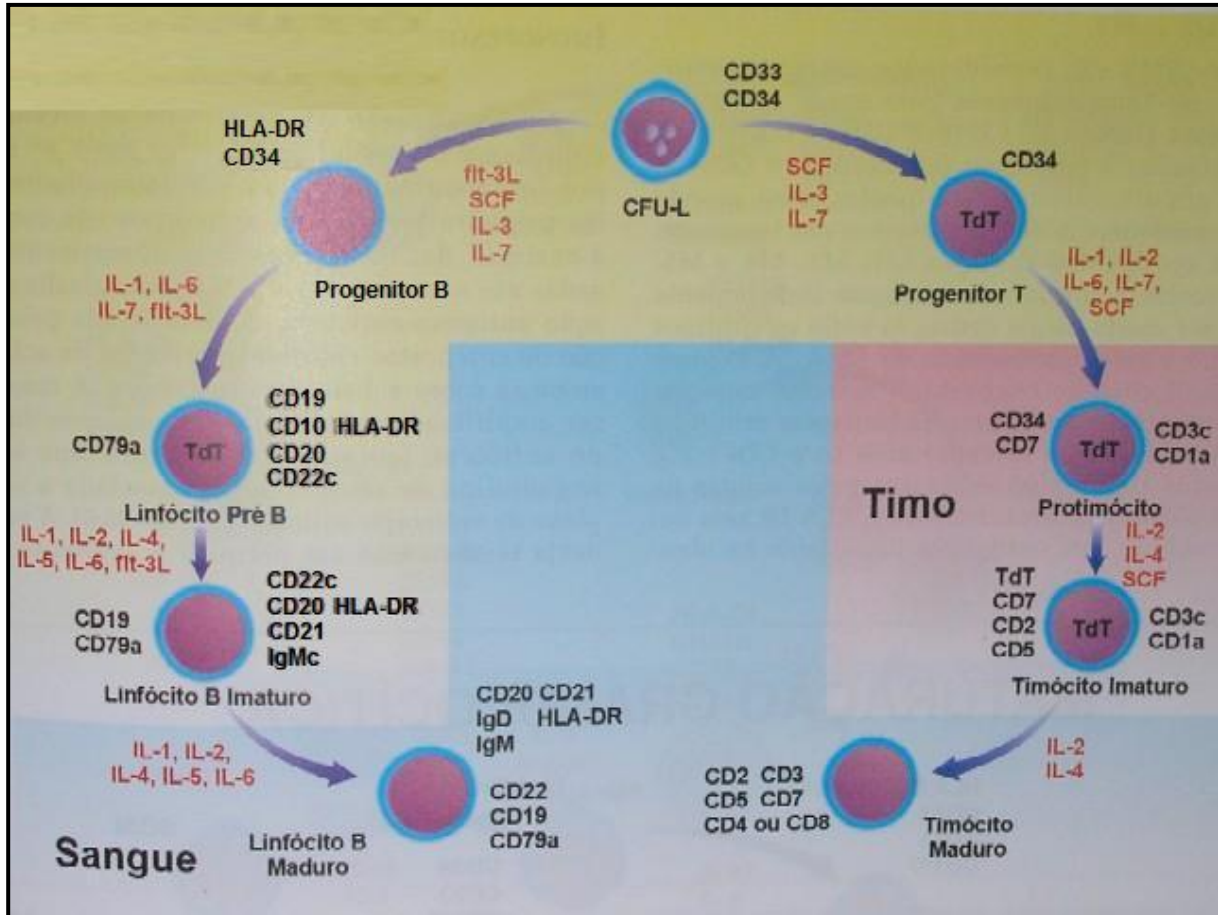
- a) Diferenciação Linfóide T: Apresentam como característica a expressão do HLA-DR, CD34 e TdT (terminal desoxinucleotidil transferase). As células mais primitivas reconhecidas são os protimócitos, caracterizados pela expressão inicial de TdT e CD7, depois adquirem o antígeno pan-T CD2 e CD3 (citoplasmático), que é o mais específico marcador de linhagem T. Segundo o grupo EGIL, a expressão isolada dos marcadores CD2 e/ou CD7, sem o CD3 de citoplasma ou membrana, não é suficiente para caracterizar o caso como LLA-T. Com o desenvolvimento maturativo intratímico, alguns antígenos começam a ser expressos, como é o caso do antígenos pan-T CD5, o antígeno comum dos timócitos CD1a, o T auxiliar CD4 e o T citotóxico / supressor CD8. Quando a célula T se torna madura deixará de expressar o antígeno TdT. Assim as células T

²Os fatores de crescimento estão representados em vermelho. Abreviações: CFU-GEMM, unidade formadora de colônia granulocítica/eritróide/monocítica/ megacariocítica; BFU-E, unidade formadora de colônia tipo burst eritróide; CFU-E, unidade formadora de colônia eritróide.

poderão ser encontradas sob três formas distintas: células T $\gamma\delta$ CD4-/CD8-; cel-T $\alpha\beta$ CD4+/CD8- (auxiliar); cel-T $\alpha\beta$ CD8+/CD4- (supressor/citotóxica) (OLIVEIRA, 2004).

b) Diferenciação Linfóide B: Tendo como base os estágios de maturação utilizados pelo grupo EGIL, os principais eventos de diferenciação B seriam:

- Fase pró-B: A célula progenitora TdT/HLA-DR+, passa a apresentar os antígenos CD19, e/ou CD79a, e/ou CD22 (pan-B, que permanecem expressos durante todo o processo maturativo B, apenas serão perdidos quando há diferenciação em plasmócitos) (OLIVEIRA, 2004).
 - Fase pré-pré-B: a aquisição do CD10 (antígeno da leucemia linfoblástica comum – cALLA) na superfície das células linfóides marca o início de diferenciação B. É nesse estágio que inicia o rearranjo da cadeia pesada de imunoglobulina e a expressão do CD10 coincide com o início do rearranjo dos genes dos receptores de imunoglobulinas. Há também a presença característica do antígeno CD20 (OLIVEIRA, 2004).
 - Fase pré-B: Nessa fase já ocorreu o rearranjo completo da cadeia pesada μ da imunoglobulina e ocorre o início do rearranjo das cadeias leves. A expressão da cadeia pesada μ no citoplasma caracteriza o estágio pré-B (OLIVEIRA, 2004).
 - Fase B madura: Com o rearranjo completo das cadeias leves, ocorre a união das cadeias leves e pesadas e assim começam a ser expressas na superfície celular. A enzima TdT é perdida pois já houve a formação da imunoglobulina e o CD10 também é perdido. Ainda expressam DR, CD19, CD20, CD22, CD40 e CDw78 de membrana. Segundo a EGIL esse estágio é o mais maduro da LLA e corresponde ao subtipo FAB L3 (OLIVEIRA, 2004).
-



Fonte: ZAGO, 2001.

Figura 8 - Maturação Linfocítica ³

6.2 ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos monoclonais são anticorpos purificados obtidos em laboratórios a partir de cultura de células, e apresentam uma especificidade definida, por esse motivo sua utilização vem sendo disseminada em técnicas que empregam anticorpos como sondas altamente específicas, como é o caso do citômetro de fluxo (ROITT, 2002). As células cultivadas são os plasmócitos. Cada plasmócito individual produz um único tipo de imunoglobulina que irá reconhecer um antígeno específico. Na medida que o plasmócito se divide, a linhagem de células descendentes continuarão a sintetizar os mesmos anticorpos específicos, sendo assim, para a imunofenotipagem das leucemias são cultivados plasmócitos com epítomos de vários CD característicos para as diversas classificações da doença (WIDMANN, 2002).

Cada CD pode ser representado por vários anticorpos monoclonais que reconhecem o mesmo antígeno, mas não necessariamente o mesmo epítipo, os quais são produzidos por diferentes clones de células (Fleury–Medicina Diagnóstica, 16/04/2006). A seleção dos anticorpos utilizados na fenotipagem das leucemias

³ Marcadores celulares estão representados em preto e os fatores de crescimento em vermelho. Abreviações: CFU-L, unidade formadora de colônia linfóide.

pode variar de Laboratório para Laboratório, mas devem sempre incluir anticorpos específicos para antígenos mielóides e linfóides que caracterizem os variados tipos de células maduras e imaturas (LabMED, 19/09/2006).

6.3 PAINÉIS DE MARCADORES

São combinações de anticorpos monoclonais usados para determinar o perfil imunofenotípico de populações celulares. É a base para a classificação imunológica das leucemias (OLIVEIRA, 2004). Existem dois tipos de painéis de marcadores: os de triagem e os específicos para as leucemias. Os painéis de triagem (ver quadro 1) devem constar os marcadores mais importantes para as diferentes linhagens juntamente com os marcadores de células precursoras (OLIVEIRA, 2004).

Antígenos com expressão não-específica de maturação:	
Antígenos pan-mielóides	CD13, CD33, CDw65, MPO
Antígenos pan-B	citCD22, CD19, citCD79a
Antígenos pan-T	citCD3, CD2, CD7, CD5
Antígenos associados com imaturidade:	TdT, CD34, HLA-DR
Antígenos com linhagem específica e expressão maturativo-dependente:	
Células mielóides	CD14, CD15, glicoforina A, CD41, CD61
Células B	CD20, CD23, FMC7, cadeia μ cit, Ig membrana
Células T	CD1a, CD4, CD8
Células NK	CD16, CD56, CD57

Fonte: OLIVEIRA, 2004.

Quadro 1 - Anticorpos frequentemente utilizados nas leucemias e suas linhagens.

Na montagem dos painéis para diagnóstico das leucemias podem ser utilizadas marcações simples (anticorpos monoclonais isolados por tubo), dupla (dois anticorpos monoclonais por tubo, em que um deverá ser necessariamente FITC e outro PE) (ver quadro 2 e 3) ou tripla (seguindo o mesmo raciocínio da marcação dupla) (OLIVEIRA, 2004).

Painel primário		
	FITC	PE
	CD45	CD3
	MPO	CD71
	citCD3	citCD22
	CD7	CD33
	CDw65	CD19
	HLA-DR	CD13
	IgM	CD10
Se IgM positiva:	Ig kappa	CD19
	Ig lambda	CD19

Fonte: OLIVEIRA, 2004.

Quadro 2 1- Painel primário em dupla marcação para leucemias agudas ⁷

Painel secundário para LMA		
	FITC	PE
	CD45	Glicoforina A
	CD14	CD15
	CD61	CD64
	CD34	CD117
	CDw65	CD56
	CD2	CD13
Se CD61+:	CD41	CD42b
Painel secundário para LLA linhagem B		
	CD34	CD22
	CD24	CD5
Painel secundário para LLA linhagem T		
	CD4	CD8
	CD2	CD1a
	CD34	CD5
Se CD3+:	TCR- $\gamma\delta$	TCR- $\alpha\beta$

Fonte: OLIVEIRA, 2004.

Quadro 3 - Painéis secundários em dupla marcação para as leucemias agudas ⁸

⁷ FITC (Fluoresceína) e PE (Ficoeritrina) são os fluorocromos utilizados para a realização da dupla marcação nos anticorpos monoclonais.

⁸ FITC (Fluoresceína) e PE (Ficoeritrina) são os fluorocromos utilizados para a realização da dupla marcação nos anticorpos monoclonais.

6.4 FLUOROCROMOS E GRÁFICOS

Os anticorpos monoclonais são conjugados com fluorocromos, os quais, ao serem excitados pela luz monocromática (*laser*), absorvem a luz incidente do laser e emitem um comprimento de onda maior, chamado de fluorescência (FERREIRA, 2001). Atualmente, as análises rotineiras são realizadas com dois anticorpos monoclonais marcados diretamente com diferentes fluorocromos. A análise simultânea com três ou quatro fluorocromos é realizada apenas nos grandes centros (LORENZI, 2003). Entre alguns tipos de fluorocromos (ver quadro 4), existem três substâncias fluorescentes mais usadas como conjugados dos anticorpos monoclonais (ver quadro 5) (OLIVEIRA, 2004).

Fluorocromos	Excitação Máxima (nm)	Emissão Máxima (nm)	Cor
Iodeto de propidium	488	620	Vermelho
Prot. peridin clorofila (PerCP)	488	670	Vermelho
Fluoresceína (FITC)	494	517	Verde
Ficoeritrina (PE)	495	576	Laranja
Rodamina (RDI)	545	575	Laranja
Texas red (Tx Red)	596	615	Vermelho
Ficocianina (PC)	620	655	Vermelho
Aloficocianina (AFC)	620	660	Vermelho
Cy5	633	670	Vermelho

Fonte: OLIVEIRA, 2004.

Quadro 4 - Comprimento de onda e cores dos fluorocromos ⁹

Fluorocromo	Abreviação	Coloração
Prot. peridin clorofila	Per CP	Vermelho – intenso
Fluoresceína	FITC	Verde
Ficoeritrina	PE	Alaranjado

Fonte: OLIVEIRA, 2004.

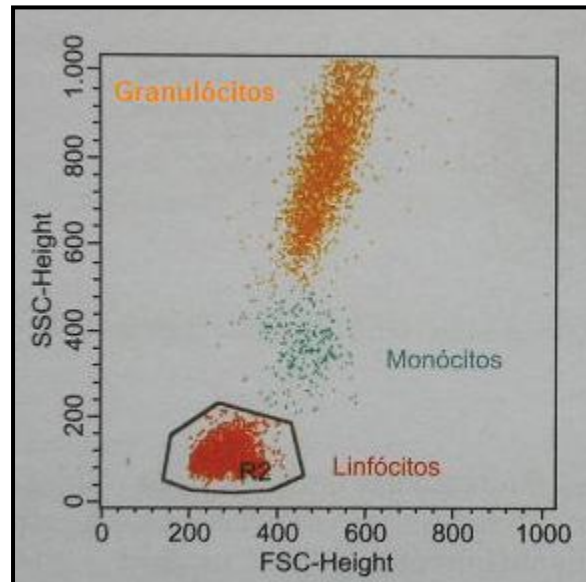
Quadro 5 - Fluorocromos mais utilizados na conjugação com AcMo ¹⁰

Os dados coletados pelo citômetro de fluxo são apresentados como histogramas, os quais serão interpretados e comparados a histograma – controle. É calculada a porcentagem de células marcadas em relação à contagem total de células. Vale ressaltar nessa etapa o papel da janela (*gate*). Essa janela criada em torno de um grupo de células com características semelhantes permite o isolamento e análise desse grupo.

⁹ Prot. peridin clorofila – Proteína peridin clorofila

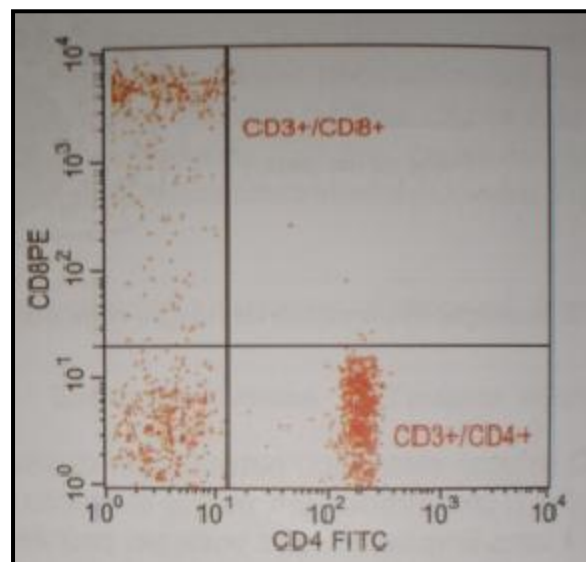
¹⁰ AcMo – Anticorpos monoclonais

Considerando-se o tamanho celular e a granulosidade citoplasmática, são discriminados três grupos distintos de células em amostra de sangue periférico: os linfócitos, os monócitos e os granulócitos (ver figura 9).



Fonte: LORENZI, 2003.

Figura 9 - Sangue periférico normal ¹¹



Fonte: LORENZI, 2003.

Figura 10 - Sangue periférico normal ¹²

¹¹ Ordenada (SSC) e abscissa (FSC) mostrando três distintas populações: linfócitos, monócitos e granulócitos. Janela eletrônica (*gate*) na região dos linfócitos.

¹² Análise da população linfocitária com tripla marcação CD3/CD4/CD8. Relação CD4/CD8 normal.

7 CONCLUSÃO

A imunofenotipagem por citometria de fluxo vem tornando o diagnóstico das leucemias mais preciso, detalhado e seguro proporcionando um início rápido e mais eficaz do tratamento. Além disso, com a introdução dessa técnica, houve o reconhecimento de dois novos subtipos de leucemias LMA-M0 e LMA – M7, os quais não seriam subdivididos por outras técnicas.

REFERÊNCIAS

FERREIRA, A. W.; AVILA, S. L. M. de. **Diagnostico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001.

FLEURY – Medicina Diagnóstica. Disponível em:

<http://www.fleury.com.br/htmls/manuais/manual_hemato/capitulo2.htm>. Acesso em: 16/04/2006.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil**: Tratado de Medicina Interna. 22. ed. São Paulo: Elsevier, 2005.

LabMED .Disponível em: <<http://www.labmed.pt/NotasTecnicas05.asp>>. Acesso em: 19/09/2006.

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia** - Propedêutica e Clínica. 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.

OLIVEIRA, R. A. G.; NETO, A. P. **Anemias e Leucemias**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2004.

ROITT, I; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2002.

SACHER, R. A.; MCPHERSON, R. A. **Widmann** – Interpretação Clínica dos Exames Laboratoriais. 11.ed. São Paulo: Manole, 2001.

VERRASTRO, T. et al. **Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

ZAGO, M. A. et al. **Hematologia**: Fundamentos e Prática. São Paulo: Atheneu, 2001.
