



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - CEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

LUCAS BATISTA FERREIRA

PERFIL HEMATOLÓGICO, IMUNOFENOTÍPICO E CITOGENÉTICO DE PACIENTES
COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA)

BRASÍLIA

2022

LUCAS BATISTA FERREIRA

**PERFIL HEMATOLÓGICO, IMUNOFENOTÍPICO E CITOGENÉTICO DE PACIENTES
COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA)**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientação: Milton Rego de Paula Júnior

BRASÍLIA

2022

RESUMO

As leucemias são definidas conforme o tipo celular envolvido e o nível de maturação destas células. Na Leucemia Linfóide Aguda (LLA) destacam-se as alterações no crescimento e na proliferação das células linfóides. Os indivíduos acometidos por esse câncer apresentam número elevado de células jovens indiferenciadas, chamadas de blastos. Nas LLAs o diagnóstico tem início com a suspeita do quadro clínico e com avaliação de amostras sanguíneas, oriundas da circulação periférica e da medula óssea. Apesar da caracterização morfológica ser bom fundamento para o diagnóstico, existem técnicas adicionais, como: imunofenotipagem, avaliação citogenética e técnicas de genética molecular, que são essenciais e, em determinados casos, ferramentas complementares obrigatórias. Esta pesquisa analisa as características hematológicas, citogenéticas e imunofenotípicas de pacientes diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda (LLA) e atendidos em hospital público de atenção terciária, referência em Brasília-DF. A análise, descritiva simples e retrospectiva foi feita com os prontuários dos pacientes atendidos nesta instituição. As variáveis analisadas foram: sexo, idade, aspectos clínicos e resultados de exames que auxiliem na identificação do perfil hematológico, imunofenotípico e citogenético. O perfil hematológico dos pacientes evidenciou uma prevalência de LLA-B (61,0%), enquanto que o principal relato citogenético referido foi a presença do cromossomo *Philadelphia* nestes pacientes (25,0%). Ainda, a caracterização imunofenotípica está de acordo com a literatura para os perfis dos diferentes subtipos de LLA. Através desses resultados, espera-se que o entendimento da importância de uma caracterização hematológica, citogenética e imunofenotípica das Leucemias Linfóides Agudas direcione os profissionais da saúde ao desenho mais adequado de uma terapêutica eficiente para cada caso particular.

Palavras-chave: leucemia, leucemia linfóide, análise citogenética, imunofenotipagem.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
OBJETIVOS	6
1.1 Objetivo Geral	6
1.2 Objetivos Específicos	6
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
3 MÉTODO	7
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	11
REFERÊNCIAS	12

1 INTRODUÇÃO

As leucemias são definidas conforme o tipo celular envolvido e o nível de maturação destas células. De acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa para novos casos de leucemia durante o período de 2018 e 2019, no Brasil, foi de 5.940 casos em homens e 4.860 em mulheres. O câncer pediátrico representa entre 0,5% e 3% de todas as neoplasias na maioria das populações. Em geral, a incidência total de tumores malignos na infância é maior no sexo masculino (INCA, 2017).

Na Leucemia Linfóide Aguda (LLA) destacam-se as alterações no crescimento e na proliferação das células linfóides. Os indivíduos acometidos por esse câncer apresentam número elevado de células jovens indiferenciadas, chamadas de blastos. Esta doença caracteriza-se, também, por sinais e sintomas comuns, tais como: anemia, maior susceptibilidade à infecções e hemorragias (DIAS *et al.*, 2016).

A LLA pode ocorrer em qualquer idade, mas sua incidência é maior entre crianças de 2 a 5 anos (numa porcentagem de 70%), diminuindo entre adolescentes e adultos jovens (entre os quais a incidência das leucemias agudas é de 20%), voltando a crescer após os 60 anos de idade. O prognóstico da LLA é determinado pela idade, pelo imunofenótipo e pelas alterações citogenéticas (ACS, 2021). Segundo classificação do grupo *French American British* (FAB), as LLAs encontram-se divididas em três subtipos morfológicos – L1, L2 e L3, que são definidos com base em características morfológicas das células, como: diâmetro celular, morfologia do núcleo, número e protuberância de nucléolos, e quantidade e alguns aspectos específicos relativos do citoplasma.

Acredita-se que a LLA decorre da transformação maligna de células progenitoras linfocíticas tanto da linhagem B, quanto da linhagem T. O acúmulo de linfoblastos na medula óssea ou em locais extramedulares tipifica a doença. As células linfoblásticas B e T leucêmicas apresentam antígenos de superfície que são muito característicos à evolução de suas respectivas linhagens. Geralmente, a célula precursora B leucêmica expressa CD10, CD19 e CD34 na superfície da membrana, em conjunto com a desoxinucleotidil-transferase terminal (TdT). Enquanto que, a célula precursora T leucêmica comumente apresenta CD2, CD3, CD7, CD34 e TdT (TEMBHARE *et al.*, 2020).

OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Analisar as características hematológicas, citogenéticas e imunofenotípicas de pacientes diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda (LLA) e atendidos em hospital público de atenção terciária, referência em Brasília-DF.

1.2 Objetivos Específicos

Caracterizar alterações hematológicas específicas (níveis de hemoglobina, leucócitos e plaquetas) nos pacientes diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda (LLA);

Analisar os marcadores imunofenotípicos, bem como relacionar as alterações citogenéticas encontradas com os fatores de prognóstico para esses pacientes;

Nortear a terapêutica e determinar o prognóstico para os diferentes subtipos de LLA, estratificando os pacientes acometidos e tornando o diagnóstico mais rápido e preciso.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Aprimoramentos em tecnologia e o tratamento precoce favorecem a chance de cura dos pacientes com LLA, que atualmente – devido aos avanços da medicina – têm uma perspectiva alta de aproximadamente 90%. Contudo, a dificuldade de acesso em alguns países (dentre eles o Brasil), para aqueles que dependem do sistema de saúde público, a exames diagnósticos, gera obstáculos que postergam o diagnóstico preciso de LLA. Esta, por sua vez, é muitas vezes confundida com outras doenças, devido a alguns sinais e sintomas em comum (NEHMY *et al.*, 2011; GUERRA *et al.*, 2015).

Nas LLAs o diagnóstico tem início com a suspeita do quadro clínico e com avaliação de amostras sanguíneas, oriundas da circulação periférica e da medula óssea. Apesar da caracterização morfológica ser bom fundamento para o diagnóstico, existem técnicas adicionais, como: imunofenotipagem, avaliação citogenética e técnicas de genética molecular, que são essenciais e, em determinados casos, ferramentas complementares obrigatórias (SILVEIRA; ARRAES, 2008; AZEVEDO, 2013).

O avanço no conhecimento da biologia celular tumoral, a introdução de novas técnicas de imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular, bem como a melhora nos tratamentos de suporte têm mostrado resultados animadores na remissão desse câncer e provendo um aumento na sobrevida dos pacientes, tanto em relação aos eventos leucêmicos quanto à uma sobrevida global da LLA. Ainda, o avanço introduzido na padronização dos protocolos terapêuticos, bem como o uso de esquemas combinados de drogas têm sido determinantes para o declínio da mortalidade por leucemias (KANTARJIAN, *et al.*, 2020).

3 MÉTODO

A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário de Brasília (CEP-CEUB) e, além disso, obteve aprovação em Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do IGESDF – instituição coparticipante desta pesquisa (Certificado de Apresentação de Apreciação Ética - CAAE: 55525522.8.3001.8153).

Este é um estudo transversal, retrospectivo, de análise descritiva simples. Para avaliação estatística dos dados apurados, foram utilizados softwares estatísticos, e as análises são demonstradas em gráficos e tabelas comparativos, e testes para evidenciar igualdade ou diferença quanto às variáveis numéricas, comparadas duas-a-duas, ou entre variáveis numéricas e categóricas. Os resultados obtidos são apresentados de forma descritiva e qualitativa.

Para obtenção dos dados, foram analisados prontuários dos pacientes diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda (LLA), atendidos em hospital público terciário, de Brasília-DF. Toda a amostragem provém dos pacientes desta Instituição e todos os pacientes admitidos nesta pesquisa são maiores de 18 anos de idade, excluindo-se aqueles que apresentem quaisquer outra(s) comorbidade(s) hematológica(s) que não a LLA.

As variáveis analisadas foram: sexo, idade, aspectos clínicos e resultados de exames que auxiliem na identificação do perfil hematológico, imunofenotípico e citogenético. Na avaliação estatística dos dados apurados, foram calculadas as frequências e médias relativas à distribuição de cada variável numérica na população amostral.

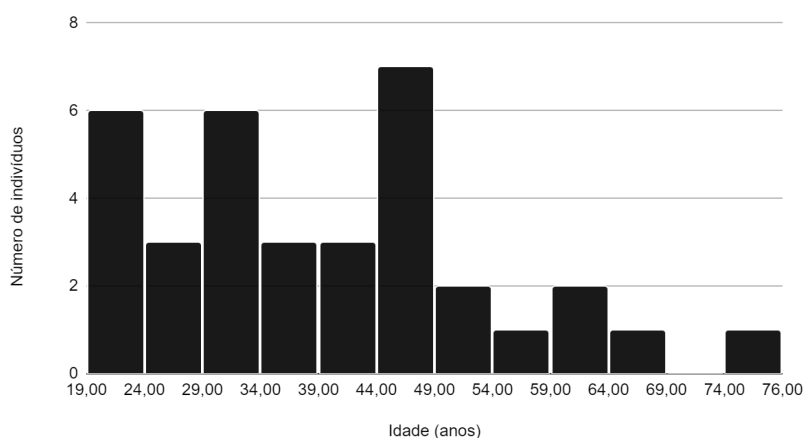
Para que fosse extinguido o risco de extravasamento dos dados obtidos, os nomes dos pacientes foram omitidos dos pesquisadores, pela Instituição coparticipante (Instituto de Gestão Estratégica de Saúde do Distrito Federal - IGESDF) e, dessa forma, os pacientes tiveram suas identidades totalmente preservadas e os dados fornecidos restringem-se à utilização apenas nesta pesquisa. Esta decisão cumpre a Resolução do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde, nº 466/2012, que assegura o respeito à dignidade humana e confere especial proteção aos participantes das pesquisas científicas que envolvem seres humanos.

Como benefícios à comunidade científica e à sociedade, foram avaliados os métodos utilizados para o diagnóstico da doença, possibilitando futuras conclusões, discussões e análises críticas dos resultados, contribuindo para uma reflexão sobre a necessidade de novos estudos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram recebidos 44 prontuários e, destes, 36 foram selecionados para análise, pois 8 possuíam algum(ns) do(s) critério(s) de exclusão supracitados. Dentre os pacientes analisados, 18 são do sexo masculino (50,0%) e 18 do sexo feminino (50,0%). Ainda, os pacientes apresentavam entre os 19 e 76 anos de idade, com média de idade de 39,9 anos e desvio padrão igual a 15,5 (Gráfico 1).

Gráfico 1. Perfil demográfico dos pacientes com LLA.



Quanto às características hematológicas, 22 (61,0%) pacientes possuíam LLA com alteração nos linfócitos do tipo B comum, outros 2 (5,6%) em linfócitos pró-B e 2 (5,6%) com leucemia de fenótipo ambíguo, com células do tipo B e da linhagem mieloide. Outros 8 (22,2%) pacientes apresentaram LLA do tipo T e foram apresentados dois casos particulares: 1 (2,8%) paciente com LLA não especificada, e outro (2,8%) com LLA bifenotípica (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil hematológico das leucemias dos pacientes de hospital terciário do DF.

<i>Tipos de Leucemia Linfóide Aguda (LLA)</i>	Número de indivíduos
LLA Bifenotípica	1
LLA Fenótipo Ambíguo	2
LLA pró-B	2
LLA-B	22
LLA-T	8
LLA*	1

*Tipo de leucemia não especificado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Um único paciente teve relatados em prontuário outros parâmetros hematológicos. A saber, teve dosados os níveis de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e alguns componentes da série leucocitária do hemograma, como neutrófilos e linfócitos, bem como o nível de plaquetas. Tal escassez de dados não permite uma análise comparativa ou qualquer caracterização das LLAs de um modo geral, podendo tratar-se de um caso isolado.

Em relação aos aspectos citogenéticos, 9 (25,0%) pacientes foram descritos com o cromossomo *Philadelphia* – translocação dos cromossomos 9 e 22 t(9;22) – positivo e outros 8 (22,2%) sem a presença deste oncogene (Tabela 2). Tais dados acordam com o que descreveu Fadel (2014), de que cerca de 30% dos pacientes adultos acometidos pela LLA apresentam o gene BCR/ABL, gerado dessa anormalidade cromossômica.

Tabela 2. Detecção da translocação dos cromossomos 9 e 22 (cromossomo *Philadelphia*) em pacientes com LLA de hospital terciário do DF.

<i>Cromossomo Philadelphia t(9;22)</i> Número de indivíduos	
Detectado	9
Não detectado	8

Fonte: Elaborada pelo autor.

A pesquisa de proteínas associadas ao gene – p190, p210 p230 – ocorreu em 5 casos, com 2 (5,6%) pacientes tendo detectada a primeira e outros 2 (5,6%) a segunda. Cabe ressaltar que a variante p210 (p210BCR/ABL) está normalmente associada à fases crônicas da leucemia, mas nos prontuários apresentados foram relatadas em pacientes com LLA-B.

Quanto às pesquisas em cariótipo, 3 pacientes tiveram alterações encontradas. Dentre estes, 2 (5,6%) apresentaram 47 cromossomos, com uma paciente do sexo feminino tendo relatada uma trissomia do cromossomo 13, sem maiores detalhes. Entretanto, como a trissomia deste cromossomo caracteriza Síndrome de Patau – doença rara, grave e de baixa sobrevida para portadores da anormalidade genética – acredita-se que a paciente apresentava trissomia do 13 em mosaico, não sendo possível estabelecer qual o seu fenótipo e/ou correlação da aneuploidia e LLA, conforme relata a literatura (BENÍCIO *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2004).

Ainda, 1 (2,8%) outro paciente apresentava cariótipo com 55 a 59 cromossomos na cultura de células analisada, sendo estas anomalias: +X, +2, +3, +6, +8, +14, +15, +18, +19, +20, +21, +mar1, +mar2 (cromossomos marcadores que não puderam ser caracterizados). Na literatura, os principais marcadores associados à LLA são aneuploidias estruturais, como as deleções e translocações (FLEURY, 2022). Por fim, outras anomalias foram pesquisadas: t(12;21), t(4;11) e t(1;19), mas nenhuma alteração foi detectada.

Na análise imunofenotípica, os principais marcadores encontrados foram CD34, CD45, CD19 e CD20, além da desoxinucleotidil-transferase terminal - TdT (pacientes com LLA-B) e CD3, CD4 e CD34 para os pacientes com LLA-T. Tais resultados estão de acordo com a literatura (TEMBHARE *et al.*, 2020).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para identificação, diagnóstico e prognóstico da Leucemia Linfóide Aguda, devem ser utilizados diversos critérios, como o hematológico, análise citogenética e a imunofenotipagem. Esta abordagem permite aos profissionais da saúde um desenho mais adequado de uma terapêutica eficiente para cada caso particular.

Entretanto, faz-se necessário tornar possível e plausível ao sistema público de saúde o acesso a essa tríade analítica, para que todos os pacientes acometidos com LLA tenham o melhor tratamento à disposição. Ainda, futuras pesquisas podem elucidar a correlação entre uma melhor caracterização dos subtipos de LLA e um melhor prognóstico/cura dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- ACS (American Cancer Society) **Cancer Facts and Figures 2021**. American Cancer Society, 2021. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2021/cancer-facts-and-figures-2021.pdf>: Acesso em: 02 maio 2021.
- AZEVEDO, M. R. A. **Hematologia basica e diagnostico laboratorial**, 5a. Ed. - Rio de Janeiro: Revinter, 2013.
- BENÍCIO, R. O. A. *et al.* Relato de caso: Trissomia do cromossomo 13 em mosaico. **Neonatologia em Ação**, Brasília, 2018. Disponível em: <http://paulomargotto.com.br/relato-de-caso-trissomia-do-cromossomo-13-em-mosaico/>. Acesso em: 14 set. 2022.
- BRASIL. Resolução no 466, de 12 de dezembro de 2012. Dispõe sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 jun. 2013. Disponível em: <http://bit.ly/1mTMIS3> Acesso em: 15 de Agosto de 2021.
- CHEN, M. *et al.* Trisomy 13 mosaicism: study of serial cytogenetic changes in a case from early pregnancy to infancy. **Prenatal Diagnosis**, Charlottesville, v. 24, n. 2, p. 137-143, fev. 2004. Disponível em: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/toc/10970223/2004/24/2>. Acesso em: 14 set. 2022.
- CONDOLUCI A., *et al.* International prognostic score for asymptomatic early-stage chronic lymphocytic leukemia. **Blood** 135 (21): 1859-1869, Ago. 2020 Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/135/21/1859/454292/International-prognostic-score-for-asymptomatic>. Acesso em : 02 maio 2021.
- DANTAS, G. K. S. *et al.* Diagnóstico Diferencial da Leucemia Linfóide Aguda em Pacientes Infante-Juvenis. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n. 2, p. 3 – 18, Dez. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v13i2.1877>. Acessado em: 10 ago. 2021.
- DIAS, P. P.; SILVA, A. D. S.; OLIVEIRA, J. S. A. Mortalidade Infantil por Leucemia Linfóide nas Regiões do Brasil. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde**, Natal-RN, v. 6, n. 1, p. 11 – 21, Ago.2016. Disponível em <https://periodicos.ufrn.br/reb/article/view/9693>, Acesso em 3 out. 2021.
- FADEL, A. P. Investigação Laboratorial de Leucemia Linfóide Aguda. **Academia de Ciência e Tecnologia**. São Paulo, 2014. Disponível em: http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/revista_virtual/hematologia/artap_fadel.pdf. Acesso em: 14 set. 2022.
- FLEURY. A citogenética clássica e molecular em Hematologia. **Fleury Medicina e Saúde**, 2022. Disponível em:

<https://www.fleury.com.br/medico/manuais-diagnosticos/hematologia-manual/citogenetica-classica-molecular>. Acesso em: 14 set. 2022.

GUERRA, R. D. O. *et al.* Diagnóstico temprano de leucemia aguda em niños y adolescentes. **Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría**, La Paz, v. 54, n. 2, p. 110 – 115. 2015.

Disponível em:

http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-06752015000200010.

Acesso em: 03 out.2021.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Estimativa 2018/2019: incidência de câncer no Brasil: Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: **INCA**, 2017. Disponível em:

<https://www.inca.gov.br/estimativa/taxas-ajustadas/leucemias/> Acesso em: 05 mai. 2021.

KANTARJIAN, H. *et al.* Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. **The New England journal of medicine** - vol. 376, p.836-847, Mar. 2017. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1609783>. Acesso em 05 ago. 2021. DOI: 10.1056/NEJMoa1609783.

NEHMY, R. M. Q. *et al.* A perspectiva dos pais sobre a obtenção do diagnóstico de leucemia linfóide aguda em crianças e adolescentes: uma experiência no Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife, v. 11, n. 3, p. 293 – 299, jul./ set. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbsmi/a/kVPS4cQ8vDvC9YGPrTGhGBH/?lang=pt>. Acesso em 06 set. 2021.

SILVEIRA, N. A.; ARRAES, S. M. A. A. A Imunofenotipagem no Diagnóstico Diferencial das Leucemias Agudas: Uma Revisão. **Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar**, Paraná, v.12, n. 1, p. 5 – 14. Nov. 2008. Disponível em:

<https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/19208>. Acesso em: 30 ago. 2021.

STABER, P. B. *et al.* Consensus criteria for diagnosis, staging, and treatment response assessment of T-cell prolymphocytic leukemia. **Blood** vol. 134,14, p.1132-1146, Oct. 2019.

Disponível em:

<https://ashpublications.org/blood/article/134/14/1132/374897/Consensus-criteria-for-diagnosis-staging-and>. Acesso em: 04 set. 2021.

TEMBHARE, P. R. *et al.* A High-Sensitivity 10-Color Flow Cytometric Minimal Residual Disease Assay in B-Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma Can Easily Achieve the Sensitivity of 2-in-10⁶ and Is Superior to Standard Minimal Residual Disease Assay: A Study of 622 Patients. **Cytometry. Part B, Clinical cytometry** vol. 98,1, Janeiro, 2020: 57-67. doi:10.1002/cyto.b.21831.