

10 ✓
ACY TELLES DE SOUZA QUIXADA

IMUNOFENOTIPAGEM NO DIAGNÓSTICO DAS HEMOPATIAS MALIGNAS

FORTALEZA - CEARÁ

1993

ACY TELLES DE SOUZA QUIXADÁ

IMUNOFENOTIPAGEM NO DIAGNÓSTICO DAS HEMOPATIAS MALIGNAS

Trabalho apresentado como requisito
final ao VII Curso de Especialização
em Hematologia e Hemoterapia.

Universidade Federal do Ceará

FORTALEZA - CEARÁ

1993

A meus pais Francisco Gerardo e Diva.

Ao meu esposo Paulo Roberto.

A meus filhos Raquel e Marcelo.

Pelas infindáveis horas de estudo roubadas ao seu convívio.

"Há duas fontes perenes de alegria pura: o bem realizado e o dever cumprido".

E. Girão

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Dr. Francisco Dário da Rocha Filho pela presteza na elucidação das dúvidas e disponibilidade na orientação deste trabalho.

A Dra. Alana Jocelina Montenegro de Castro pelos conhecimentos transmitidos e estímulo à elaboração desta pesquisa.

Ao Dr. José Murilo Martins pelo aprofundamento de meus conhecimentos.

A Dra. Clara Bastos Eloy pelo encorajamento à continuação deste estudo.

Aos amigos do curso que partilharam comigo a divisão de tantas responsabilidades.

Aos profissionais do Hemoce pela colaboração no decorrer deste ano.

Aos pacientes, razão de nosso labor.

A Dra. Maria Zélia Petrola Jorge Bezerra a quem devo minha formação básica e a admiração pela especialidade.

Í N D I C E

RESUMO.....	1
1 - INTRODUÇÃO.....	2
2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Histórico.....	5
2.2 Perfil Imunológico da Diferenciação Normal.....	5
2.2.1 Linfócitos T.....	6
2.2.2 Linfócitos B.....	6
2.2.3 Células Mielóides, Monocíticas Eritrói- des e Megacariócitos.....	7
2.3 Perfil Imunológico da Diferenciação Leucêmica.....	7
2.4 Doença Residual Mínima.....	8
2.5 Leucemia Aguda Bifenotípica.....	9
2.6 Recidivas.....	10
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Pacientes e Amostras.....	11
3.2 Preparação e Armazenamento das Amostras.....	11
3.3 Fixação das Lâminas.....	11
3.4 Anticorpos Monoclonais.....	12
3.5 Técnica.....	12
4 - RESULTADOS.....	14

5 - DISCUSSÃO.....	15
6 - CONCLUSÃO.....	18
7 - SUMMARY.....	20
8 - ANEXOS.....	21
Anexo 1 - Gráficos e Tabelas.....	22
Anexo 2 - Documentação Fotográfica.....	29
9 - BIBLIOGRAFIA.....	36

IMUNOFENOTIPAGEM NO DIAGNÓSTICO DAS HEMOPATIAS MALIGNAS*

Acy Telles de Souza Quixadá**

O estudo imunológico dos leucócitos em amostras do sangue periférico e medula óssea tomou lugar de destaque no diagnóstico das hemopatias malignas. Tentamos neste trabalho estabelecer a classificação imunológica de 25 novos casos de leucemia diagnosticados em bases morfológicas no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC). Um painel de anticorpos monoclonais foi usado para identificar os marcadores de superfície das células neoplásicas através da técnica APAAP (fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina).

Em dez dos nossos casos (40%) conseguimos detectar o imunofenótipo característico. Os blastos exibiram antígenos linfóides, mielóides ou mistos. Em um destes pacientes obtivemos resultados conflitantes quando comparados à caracterização morfológica. As possíveis causas para a ausência de reação nos outros experimentos são comentadas.

* Trabalho apresentado como requisito final ao VII Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia.

** Médica do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará - HEMOCE.

1 - INTRODUÇÃO

As neoplasias hematológicas representam o tipo mais comum de câncer na criança e são responsáveis por 5% de todas as neoplasmas no adulto. Estes tumores são divididos em três grandes grupos: leucemias, linfomas e mielomas.

As leucemias são originadas das células progenitoras totipotenciais ("stem cells") na medula óssea e na grande maioria dos pacientes se estendem ao sangue periférico e outros tecidos. Os linfomas surgem nos linfonodos, baço ou estruturas linfóides do trato gastrointestinal, pele, osso, sistema nervoso central e outros órgãos.

O vocábulo leucemia originalmente "*Weisses Blut*" (sangue branco) foi introduzido por Virchow devido ao acúmulo de células da linhagem branca encontrado em um paciente portador de Leucemia Mielóide Crônica em 1845. Apesar de termo consagrado pelo uso, aproximadamente metade dos casos de leucose aguda apresenta leucometria normal ou abaixo da média.

As leucemias são divididas em dois grupos usando como critérios a evolução aguda ou crônica destas doenças. No entanto do ponto de vista biológico as leucemias são de origem central (agudas) ou do compartimento de células progenitoras, e de origem periférica (crônicas) oriundas de células em estágios maturativos tardios (28).

As primeiras tentativas do uso de regimes quimioterápicos para o tratamento de pacientes portadores de leucose aguda indicaram que alguns tipos de leucemia pertenciam a grupos diferentes no tocante aos aspectos biológicos e prognósticos. Este fato comprovou a necessidade do uso de classificação e nomenclatura próprias para este tipo de doença.

A classificação FAB, desenvolvida por um grupo cooperativo de sete hematologistas de nacionalidade francesa, americana e britânica, propôs definições para as leucemias agudas (dividindo-as em linfoblásticas e mielóides) e para as leucemias crônicas de células T e B (2, 3, 4). O trabalho do grupo serviu de pedra fundamental aos estudos posteriores uniformizando o sistema de classificação das leucemias com grande reprodutibilidade em todo o mundo.

Segundo Drexler e colaboradores (10) um ponto crítico da classificação FAB é a falta de significado prognóstico relacionada aos subtipos mielóides e linfóides L1 e L2, existindo apenas consenso acerca da má evolução da LLA-L3.

Os métodos atuais de diagnóstico e classificação das neoplasias hematológicas incluem: exame morfológico da célula predominante, imunofenotipagem e análise citogenética (14, 15).

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

Um avanço importante na subclassificação das leucemias foi o reconhecimento dos antígenos presentes nos diferentes leucócitos através de anticorpos monoclonais específicos. Estes antígenos de superfície (marcadores imunológicos) são componentes do fenótipo celular e são estruturas particulares de cada célula. A origem da imunofenotipagem moderna vem dos anos 60-70 quando foi documentada a expressão da imunoglobulina de superfície membranar (SmIg) como marcador de linfócitos B e a formação de rosetas de eritrócitos de carneiro com linfócitos T.

O impacto de maior importância na sistematização da imunofenotipagem ocorreu quando houve a amplificação da produção de reagentes específicos obtida pela tecnologia do hibridoma desenvolvida por Kohler e Milstein em 1975 (7,10).

Existem duas técnicas principais para a visualização de antígenos celulares (de superfície membranar ou intracitoplasmáticos): (I) Imunofluorescência - que utiliza a microscopia fluorescente ou o citômetro de fluxo para análise e (II) Imunohistoquímica - que emprega o método da imunoperoxidase ou da fosfatase alcalina e a microscopia ótica comum.

Na literatura o método mais citado é o da fluorescência.

Cada um destes métodos apresenta qualidades e inconvenientes. No método imunoenzimático podem ser enumeradas como vantagens: o tamanho reduzido da amostra necessária para o exame; o uso de esfregaços convencionais de sangue e medula óssea; a conservação das lâminas por período prolongado; a possibilidade de correlação com a morfologia celular além da maior sensibilidade da técnica.

Na imunofluorescência destacam-se a rapidez do método, a avaliação quantitativa e a informatização dos dados (7, 10, 11, 12, 23).

A técnica APAAP passou a ser utilizada de rotina em 1983 tendo sido descrita inicialmente por Erber et al.

Stross e colaboradores (30) apresentam método semi-automatizado de utilização da técnica APAAP ("*Alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase*") que tem por finalidade básica a diminuição do tempo necessário para o procedimento além da redução dos custos.

Um estudo realizado por Burgess et al (6) comprova a aplicabilidade da técnica APAAP através de coloração dupla, demonstrando sua vantagem na revelação de mais de um antígeno na mesma preparação localizados em diferentes compartimentos da mesma célula.

Está bem estabelecido que as células blásticas nas leucemias e linfomas refletem características de seus precursores normais na medula óssea e timo (21) uma vez que representam a expansão clonal de uma célula congelada em determinado estágio de sua diferenciação.

2.2 Perfil Imunológico da Diferenciação Normal

Mudanças imunológicas acompanham o desenvolvimento hematopoético normal. Estas alterações ocorrem na superfície

celular, no citoplasma e no núcleo e podem ser resumidas nas figuras 1, 2 e 3.

2.2.1 Linfócitos T

O marcador mais precoce das células T é o antígeno CD7 o qual é continuamente expresso através da diferenciação da célula T fato que o qualifica como marcador "pan-T".

A expressão do antígeno CD3 na superfície celular é precedida por sua ocorrência no citoplasma: característica única dos linfócitos T. Os marcadores específicos ou altamente associados à linhagem T são CD1, CD2 (responsável pela formação de rosetas com hemácias de carneiro), CD3, CD4, CD5, CD7 e CD8.

O TdT é uma enzima nuclear que catalisa a polimerização de desoxinucleotídeos e não é específico de linhagem mas antes um indicador de maturidade celular.

O HLA-DR também está presente em outras linhagens e sugere estágio de imaturidade ou ativação das células T.

2.2.2 Linfócitos B

A detecção da imunoglobulina de superfície membranar (SmIg) é o achado característico das células B. Entretanto como isto somente ocorre por volta da metade do processo de diferenciação do linfócito B o antígeno CD19 é o escolhido como marcador "pan-B".

O componente do último estágio de diferenciação da célula B, o plasmócito, é negativo para CD19 bem como para outros marcadores da linhagem B: CD10, CD20, CD21, CD22 e SmIg, dispondo de perfil próprio com expressão do CD38 e

PCA-1. O TdT e HLA-DR novamente definem estágio maturativo das células B. Enquanto o HLA-DR é encontrado em quase toda a duração do processo de maturação, exceto no plasmócito, a expressão do TdT está restrita aos estágios imaturos.

As moléculas CD10, CD22, SmIg, CD20 e CD21 são expressas sequencialmente na superfície das células B. Em analogia ao antígeno CD3 nos linfócitos T o determinante CD22 é inicialmente encontrado no citoplasma e em seguida na superfície celular: achado característico das células B.

2.2.3 Células Mielóides, Monocíticas Eritróides e Megacariócitos

O CD13/CD33, CD14, a glicoforina A e o CD41/CD42 são marcadores específicos para as células mielóides, monocíticas, eritróides e megacariócitos.

Não há neste caso mudanças importantes correlacionadas ao decurso da diferenciação.

..

2.3 Perfil Imunológico da Diferenciação Leucêmica

O uso de um painel selecionado de anticorpos monoclonais através de métodos imunocitológicos nos permite estabelecer o perfil ontogênico do processo neoplásico.

A distinção entre células imaturas de linhagem linfóide e mielóide é o objetivo inicial.

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é dividida em duas categorias baseado em suas características imunofenotípicas: LLA-T e LLA não T.

Para a diferenciação de células jovens de origem linfóide os monoclonais CD7 e CD3 utilizados caracterizam a origem T ("pan T"). As LLA primitivas ou pré-T são TdT, CD3 e CD7 positivas e expressam fracamente a molécula CD5.

As LLA nulas (que são de origem B muito primitivas) correspondem a células CD10 negativas e HLA-DR positivas.

As LLA de origem B se dividem em comum, com o fenótipo HLA-DR, CD10, CD22, CD19 e TdT; as pré-B onde a cadeia "mi" presente no citoplasma adiciona-se ao perfil anterior e as LLA-B onde desaparecem o CD10 e a imunoglobulina citoplasmática para dar lugar a SmIg positivo (16, 17, 20, 21).

No caso das leucemias não linfocíticas o auxílio da marcação imunológica é de menor valia no tocante ao aspecto prognóstico (19).

A leucemia mielóide aguda subtipo M0 (LMA-M0) que apresenta mínima diferenciação mielóide não pode ser diagnosticada apenas em bases morfológicas uma vez que seus blastos se assemelham aos da LLA (usualmente LLA-L2). A negatividade dos marcadores linfóides é consistente com o diagnóstico de LMA e a evidência de diferenciação mielóide é fornecida nestes casos pelo CD13 e/ou CD33 (5,8) sendo o CD13 mais sensível à detecção através das técnicas de imunocitoquímica (imunoperoxidase ou APAAP).

Outro objetivo básico da classificação imunológica é a identificação da origem T ou B das leucemias crônicas.

2.4 Doença Residual Mínima

Outra aplicação da imunofenotipagem é a detecção da doença residual mínima. Um dos mais importantes marcadores para o contexto da definição de doença residual mínima é o

TdT que pode ser pesquisado através de marcação dupla com anticorpos direcionados para antígenos intracitoplasmáticos e de superfície.

Apesar das células leucêmicas apresentarem expressões moleculares comparáveis a células normais a frequência excessiva destas células fora de sua topografia habitual é indicativa da presença de processo maligno monoclonal. A frequência de TdT em células normais é de $< 0,4\%$ no sangue periférico e de 5% em células da medula óssea.

Falini et al (13) demonstram que os anticorpos que melhor definem a doença residual mínima na tricoleucemia são CD45 e CD20.

Em muitos casos a percentagem de células residuais detectada com o painel de anticorpos monoclonais é semelhante à obtida através do exame morfológico e citoquímico das amostras porém existe vantagem evidente na quantificação de células residuais em exames de medula óssea hipo ou hiperce-lulares.

2.5 Leucemia Aguda Bifenotípica

A coexistência de blastos de diferentes linhagens foi reconhecida há vários anos durante a agudização da leucemia mielóide crônica.

A imunofenotipagem permite a comprovação de uma população blástica mista ou mais frequentemente a co-expressão de antígenos mielóides e linfóides B ou T na mesma célula neoplásica (8).

2.6 Recidivas

Na fase de recidiva das leucemias agudas não é frequente encontrar alteração fenotípica de vulto embora o fato já tenha sido descrito. Na maioria das vezes ocorre permuta da linhagem B a T sendo possível a mudança de linfóide para mielóide ou o inverso (22,24).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes e Amostras

De julho de 1992 a fevereiro de 1993, 25 pacientes (02 crianças e 23 adultos, com idades variando de 03 a 63 anos) diagnosticados como portadores de neoplasia hematológica "de novo" foram incluídos neste estudo. Foram coletadas amostras de sangue periférico e medula óssea sendo que em um dos casos foi estudado também material obtido através de aspirado ganglionar.

3.2 Preparação e Armazenamento das Amostras

Distensões sangüíneas foram preparadas segundo as normas técnicas tendo-se o cuidado de evitar esfregaços grossos.

Os esfregaços permaneceram à temperatura ambiente durante o intervalo de duas horas quando então foram enrolados, um a um, em folha de alumínio e conservados a -20°C.

3.3 Fixação das Lâminas

Todas as amostras foram fixadas em solução 1:1 acetona/metanol durante dois minutos. Antes de desenroladas as

lâminas foram conservadas no papel de alumínio até atingir a temperatura ambiente.

3.4 Anticorpos Monoclonais

Foram utilizados anticorpos monoclonais (DAKOPATTS) CD4, CD5, CD8, CD10, CD14, CD19, CD33, CD45, queratina e vimentina na diluição de 1:10.

A imunoglobulina anti-camundongo foi empregada na diluição de 1:25 enquanto os complexos APAAP foram aplicados após diluição de 1:50.

3.5 Técnica

Estágios de incubação no método APAAP.

1. Incubação com anticorpo monoclonal primário - 30 minutos.
2. Incubação com a imunoglobulina de coelho anti-camundongo (anticorpo secundário) - 30 minutos.
3. Incubação com imuno-complexos de fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina - APAAP (anticorpo terciário - substância marcadora) - 30 minutos.
4. Repetição da incubação com o segundo reagente - 10 minutos.
5. Repetição da incubação com o terceiro reagente - 10 minutos.
6. Incubação com o substrato (substância reveladora).

7. Contra-coloração em hematoxilina.

8. Montagem com lamínula em meio de Apathy.

O diagrama esquemático da técnica empregada está ilustrado na figura 4.

As lâminas foram lavadas entre um reagente e outro com tampão TRIS pH 7,6 havendo sempre o cuidado de evitar o ressecamento do esfregaço.

O substrato foi preparado dissolvendo-se 2mg no naphtol AS-MX (Sigma N4875) em 0,2ml de dimetilformamida e 9,8ml de tampão TRIS pH 8,2 além de 20mg de levamisole (Sigma L9756). Imediatamente antes do uso foi adicionado o Fast Red Salt (10 mg). O levamisole foi acrescentado, com o objetivo de inibir a fosfatase alcalina endógena.

Em todos os testes haviam lâminas controle (quando possível negativo e positivo).

Em nosso estudo tomamos como base o painel de anticorpos monoclonais demonstrado na tabela 01.

4 - RESULTADOS

As células positivas para o antígeno pesquisado são facilmente identificadas no aumento de 100X sendo visualizada nítida marcação do contorno celular de tonalidade vermelha. Em nosso trabalho obtivemos resultados positivos em 10 dos 25 pacientes estudados (40%).

Um marcador imunológico é considerado positivo quando expresso em mais de 20% da população blástica (1).

Foram confirmados 01 caso de leucemia bi-fenotípica, 04 casos de leucemia mielóide aguda (um dos quais possivelmente LMA-M7), 03 casos de leucemia linfocítica aguda (02 de origem B e 01 de origem T) e 01 caso de tricoleucemia. Um de nossos pacientes obteve resultado imunofenotípico conflitante com o diagnóstico morfológico. A morfologia entretanto apresentou discordância entre os observadores habituais e o paciente obteve o diagnóstico final de linfoma.

Os dados positivos foram resumidos na Tabela 02.

Tivemos dificuldades e limitações em nosso estudo por se tratar de método ainda não rotineiro em nossa enfermaria do Hospital Universitário Walter Cantídio além de quantidade não satisfatória de anticorpos monoclonais. Podemos citar ainda a necessidade de habilidade técnica para o desenvolvimento do método.

5 - DISCUSSÃO

As classificações morfológicas são baseadas em julgamentos individuais e interpretações, existindo vantagem óbvia do método imunológico em relação à objetividade e reprodutibilidade do exame.

Dados disponíveis na literatura discorrem sobre a permanência de até sete dias do material colhido à temperatura ambiente (11, 12, 23). Observamos entretanto que a viabilidade de nosso material dependia de pequeno intervalo até o congelamento face a alta temperatura local. Após os primeiros insucessos determinamos precisamente o tempo de duas horas após a coleta da amostra para o congelamento.

Os antígenos leucocitários diferem em sua susceptibilidade à desnaturação com a fixação. Um dos mais sensíveis sendo o CD10, (antígeno comum da leucemia linfocítica aguda). Desta forma deve ser avaliado caso a caso quando primar pela preservação antigênica ou pela integridade (morfologia) celular. Uma variedade de fixadores pode ser utilizado sendo a acetona pura a ideal para a conservação dos determinantes antigênicos e misturas contendo a formalina apropriadas para resguardar detalhes morfológicos (23).

A identificação imunológica de casos de leucemias com blastos muito imaturos é de grande valor no diagnóstico diferencial entre LLA-L2 da classificação FAB e LMA M1-M0. Anticorpos monoclonais para as glicoproteínas plaquetárias (CD41, CD42, CD61) selam o diagnóstico das leucemias megacarioblásticas (27).

Em nosso estudo não pudemos concluir a identificação imunológica (no caso de número 3) por falta dos anticorpos acima citados em nosso painel.

A leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T) engloba 15 a 25% de todos os casos de LLA. Ela afeta mais homens que mulheres e é caracterizada pela presença de massa mediastinal, infiltrado extra hematopoético, altas contagens leucocitárias além de baixa incidência de anemia e trombocitopenia. Outra característica da doença é uma evolução marcada por menores sobrevivência e taxa de remissão completa (18, 24, 26, 29). Nosso quinto caso apresenta CD5 positivo, CD10 negativo, obteve contagem leucocitária inicial de 178×10^9 leucócitos/l e não alcançou a remissão completa com o esquema quimioterápico proposto, comprovando os dados da literatura.

A leucemia de células cabeludas (retículo-endoteliose leucêmica) é caracterizada pela invasão da medula óssea e baço por células mononucleares com projeções vilosas citoplasmáticas. Estas células usualmente contêm uma isoenzima da fosfatase ácida (isoenzima 5) que é resistente ao tartarato, fato que caracteriza sua citoquímica. Os marcadores de superfície desta leucose crônica são os de proliferação monoclonal de linfócitos B (CD19, CD20, CD22, HLA-DR) e ainda um antígeno habitualmente presente nos linfócitos T ativados o CD25 ou receptor da interleucina 2 (15, 25). Nosso caso de número 9 ilustra os dados acima.

Behm e colaboradores (1) concluem em seu trabalho a associação de prognóstico favorável com a ausência do marcador antigênico CD45 (antígeno comum leucocitário) nas células blásticas de crianças com LLA.

Nosso último paciente (nº 10) apresentou marcação negativa para o antígeno citado além de positividade para o CD19 exibindo desta forma dois fatores imunológicos de boa evolução.

Vale ressaltar que a identificação imunológica da natureza e origem da célula blástica apesar de sua importância evidente tem limites precisos na análise multifatorial em relação ao diagnóstico e prognóstico das leucemias. Devem ser considerados também a morfologia, citoquímica e cariótipo além de outras variáveis como idade, sexo, contagem inicial de leucócitos, resposta terapêutica etc.

Também não está restrito ao diagnóstico das neoplasias hematológicas o papel dos anticorpos monoclonais. A técnica APAAP pode ser utilizada em cortes histológicos com parafina aumentando sobremaneira a abrangência do exame (31).

Outro exemplo é o estudo de Christopoulos et al (9) onde foi concluído através de método imunoenzimático com anticorpos monoclonais, o envolvimento da trombospondina plaquetária (proteína citoadesiva presente nos grânulos alfa) no conhecido fenômeno do satelitismo plaquetário que ocorre "in vitro" em distensões de sangue anticoagulado com EDTA.

6 - CONCLUSÃO

A definição dos subtipos das leucemias é de grande valor para o seguimento clínico da doença visto que alguns imunofenótipos estão correlacionados com má resposta terapêutica e evolução desfavorável. Algumas formas de leucemia como a LMA-M0, LMA-M1 e leucemias bifenotípicas não poderiam ser reconhecidas sem o auxílio da classificação imunológica.

Deve ser ressaltado também o valor da imunofenotipagem na identificação da doença residual mínima e sua importância nos estudos epidemiológicos. Vale salientar entretanto que como qualquer método diagnóstico, deve ser analisado em conjunto com os dados clínicos e fazer parte de um grupo de fatores que incluem ainda idade, sexo, raça, leucometria inicial, nível de desidrogenase láctica, índice mitótico e cariótipo para o estabelecimento do prognóstico global da patologia.

Dados publicados na literatura internacional evidenciam que cerca de 90% dos casos de leucemia podem ter seu imunofenótipo estabelecido sem equívoco (10). Infelizmente nosso estudo não reproduz estes resultados.

Citamos como possíveis causas das discordâncias encontradas a pequena experiência no manuseio da técnica, a alta temperatura local e o uso de painel restrito de anticorpos monoclonais.

Não encerramos porém, com o término do curso de especialização, o espírito de pesquisa semeado durante o mesmo. Daremos continuidade ao trabalho ora interrompido na intenção de obter a caracterização imunológica de cada caso de leucose aguda como exame de rotina em nossa enfermaria.

7 - SUMMARY

The immunological analysis of white cells in blood and bone-marrow samples has come to play a central part in the diagnosis of human hematological malignancies.

We attempted to establish the immunological classification of 25 new cases of leukemia diagnosed on morphological grounds in the University Hospital.

A panel of monoclonal antibodies was used to identify surface markers of the neoplastic cells by the alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase (APAAP) technique.

In ten cases (40%) we found the characteristic immunophenotype. The blast cells showed lymphoid, myeloid or mixed antigens. In one of these patients we obtained conflicting results when compared with the morphological assessment.

The possible reasons for the lack of reaction in the other assays are discussed.

8 - ANEXOS

ANEXO 1 - GRÁFICOS E TABELAS

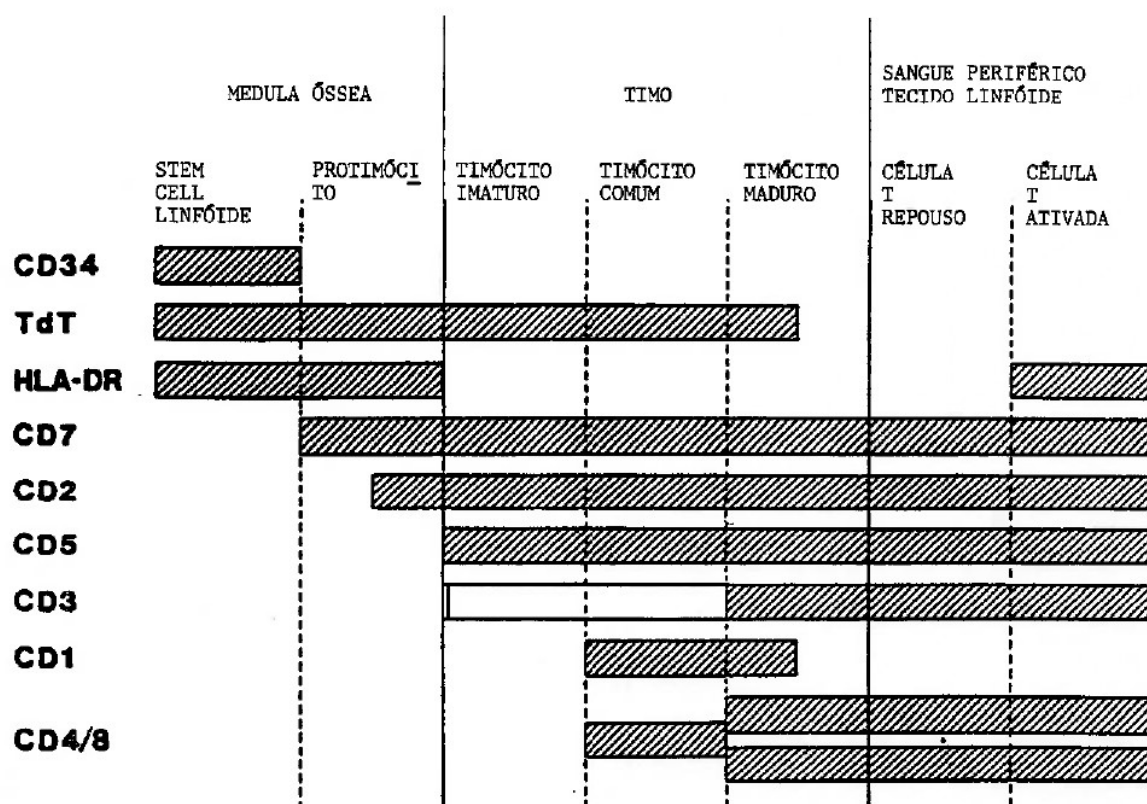


Figura 1 - Perfil imunológico durante a diferenciação do linfócito T. Todos os antígenos exceto o TdT (enzima nuclear) e o CD3 citoplasmático (barra aberta) são detectados na superfície celular.

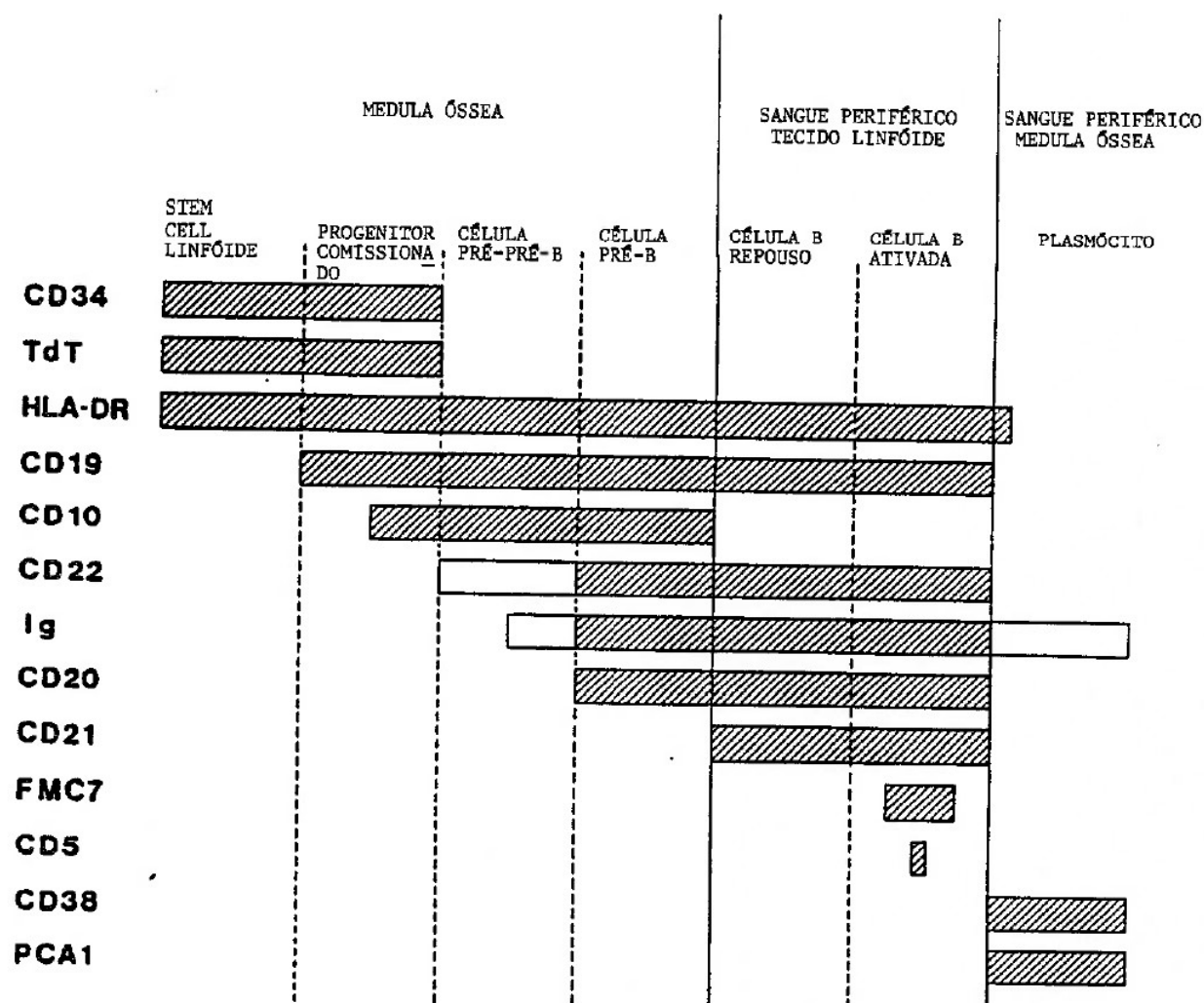


Figura 2 - Perfil imunológico durante a diferenciação do linfócito B. Todos os antígenos exceto o TdT e o CD22/Ig citoplasmáticos (barras abertas) são marcadores da superfície celular.

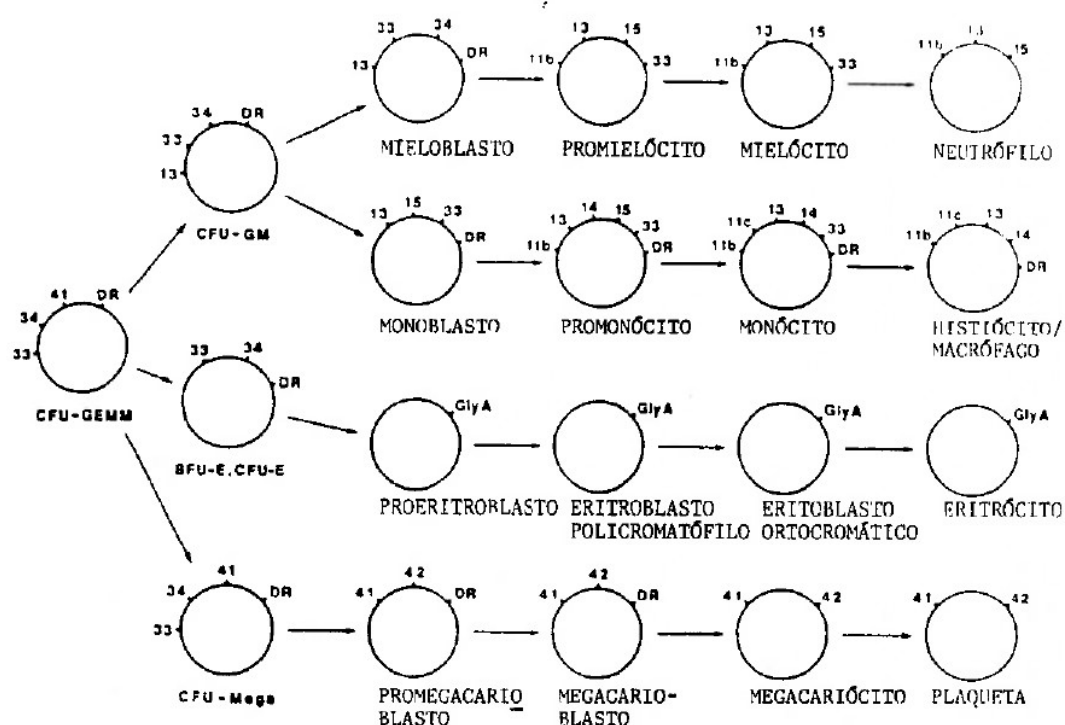


Figura 3 - Perfil imunológico durante a diferenciação mono-mielóide, eritróide e megacariocítica. A distribuição dos antígenos de superfície é identificada nas células precursoras e progênie. CFU-GEMM - stem cell multipotente; CFU-GM, BFU-E/CFU-E, CFU-MEGA - células comissionadas. A figura indica os antígenos numerados através da nomenclatura CD (cluster of differentiation - grupos de diferenciação).

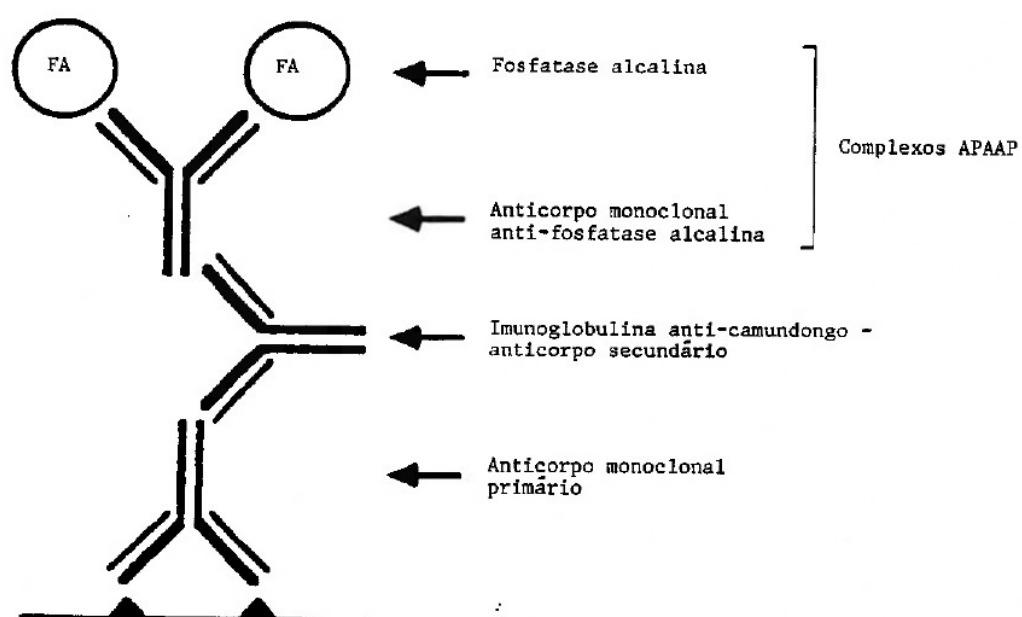


Figura 4 - Diagrama esquemático da técnica APAAP (fosfatase alcalina anti fosfatase alcalina).

TABELA 01 - Classificação imunofenotípica das leucemias agudas.

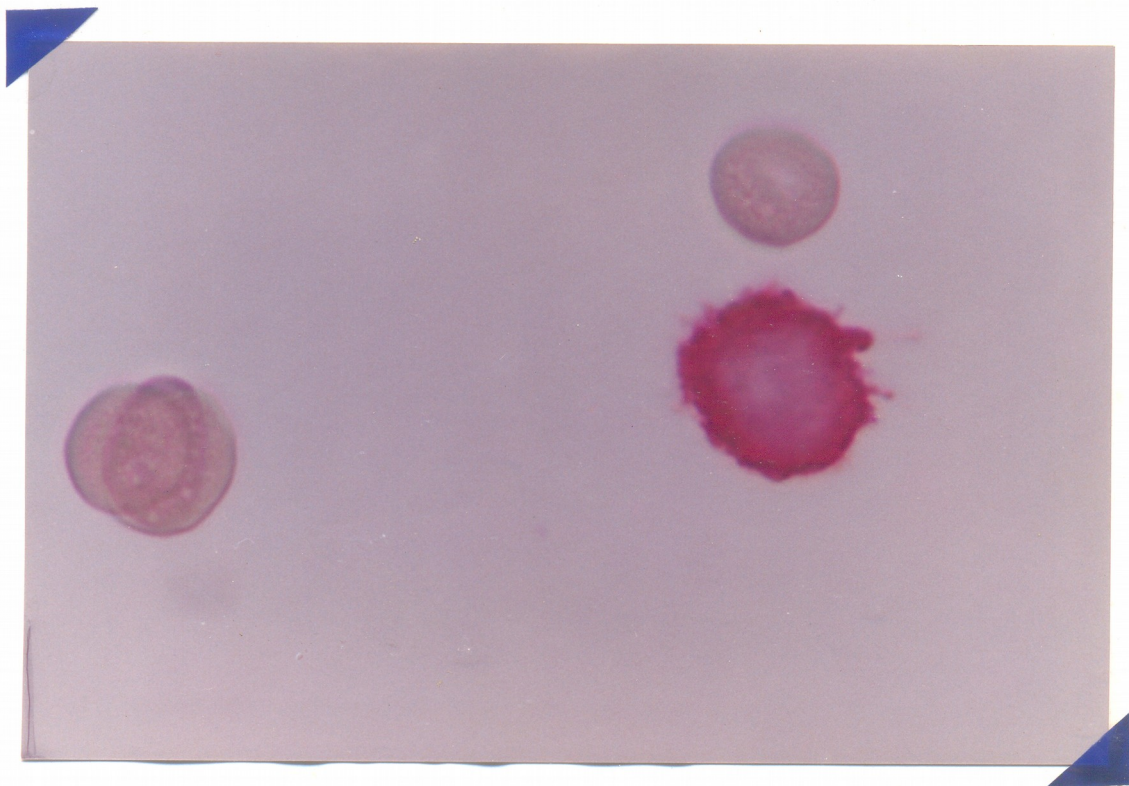
TIPO	MARCADORES LINFÓIDES	MARCADORES MIELÓIDES
LLA-pre-pre-B	Dr, CD19	negativos
LLA-pre-B	Dr, CD19, CD10	negativos
LLA-B	Dr, CD19, CD10, CD20, CD22, IgS	negativos
LLA-pre-T	CD7	negativos
LLA-T	CD7, CD5, CD2	negativos
LMA-M1 a M5	negativos	Dr, CD33, CD34, CD9, CD13, CD14, CD15
LMA-M6	negativos	Glicoforina A.
LMA-M7	negativos	CD41, CD42
Bifenotípicas	positivos	positivos

CD: Cluster of differentiation, cada número corresponde a um determinado antígeno de diferenciação leucocitária, presente em determinadas células em dado momento da diferenciação. Sua presença na superfície da célula leucêmica é um dado importante para a classificação (Foon e Todd, 1986).

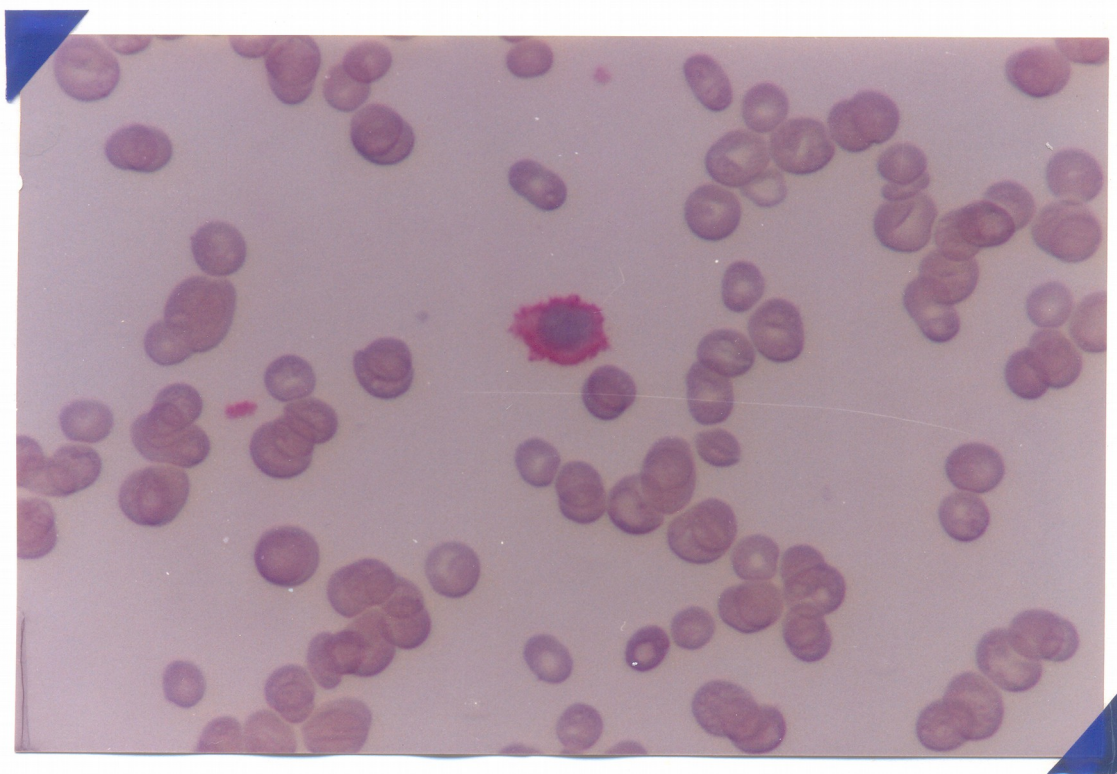
TABELA 02 - Reatividade dos blastos com anticorpos monoclonais (ACMO) LNH - Linfoma não Hodgkin.
 LMC/CB - Leucemia mielóide crônica/crise blástica. LMA - Leucemia mielóide aguda. LLA -
 Leucemia Linfocítica aguda - CD - cluster of differentiation. NR - não realizado.

CASO	IDADE/SEXO	DOENÇA DE BASE	% BLASTO AMOSTRA TESTADA	REATIVIDADE COM ACMO				
				CÉLULA T	CÉLULA B	MIELÓIDE	MONÓCITO	MISCELÂNEA
1	22/M	LNH	60%	NR	CD19 -	CD33 -	CD14 -	CD10 - CD45 +
2	31/M	LMC/CB	80%	CD5 -	CD19 -	CD33 +	NR	CD10 - CD45 +
3	23/F	LMA M7?	40%	CD5 -	CD19 -	CD33 -	CD14 -	CD10 - CD45 -
4	52/F	LMA M2	70%	NR	CD19 -	CD33 +	CD14 -	CD10 - NR
5	19/M	LLA-T	95%	CD5 +	CD19 -	CD33 -	NR	CD10 - NR
6	63/F	LMA M4	75%	CD5 -	NR	CD33 +	CD14 +	CD10 - NR
7	16/F	LMA M2	45%	NR	CD19 -	CD33 +	CD14 -	NR NR
8	29/M	Tricoleucemia	94%	CD5 -	CD19 +	CD33 -	NR	NR NR
9	37/M	LLA	85%	CD5 -	CD19 +	CD33 -	NR	CD10 + NR
10	8/M	LLA	80%	NR	CD19 +	CD33 -	NR	NR CD45 -

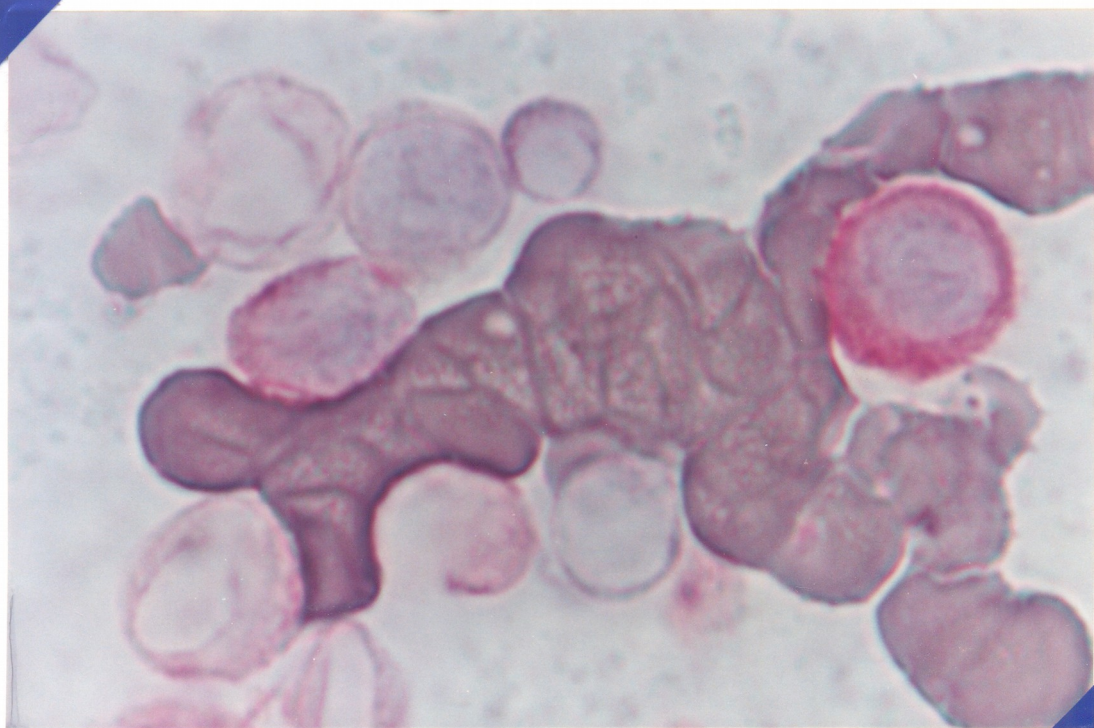
ANEXO 2 - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA



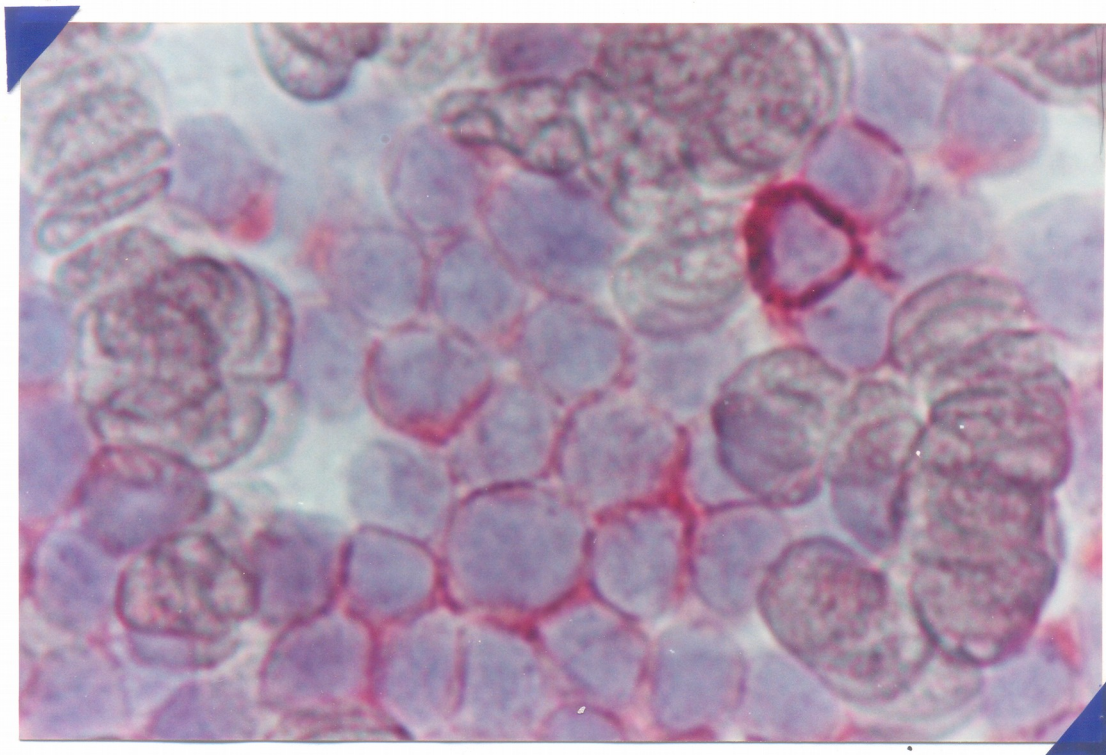
Fotografia 1 - Caso de número 8. Tricoleucemia. Célula neoplásica exibindo marcação com o CD19 onde observamos as vilosidades peculiares. Campo fotografado com aumento de 1000X



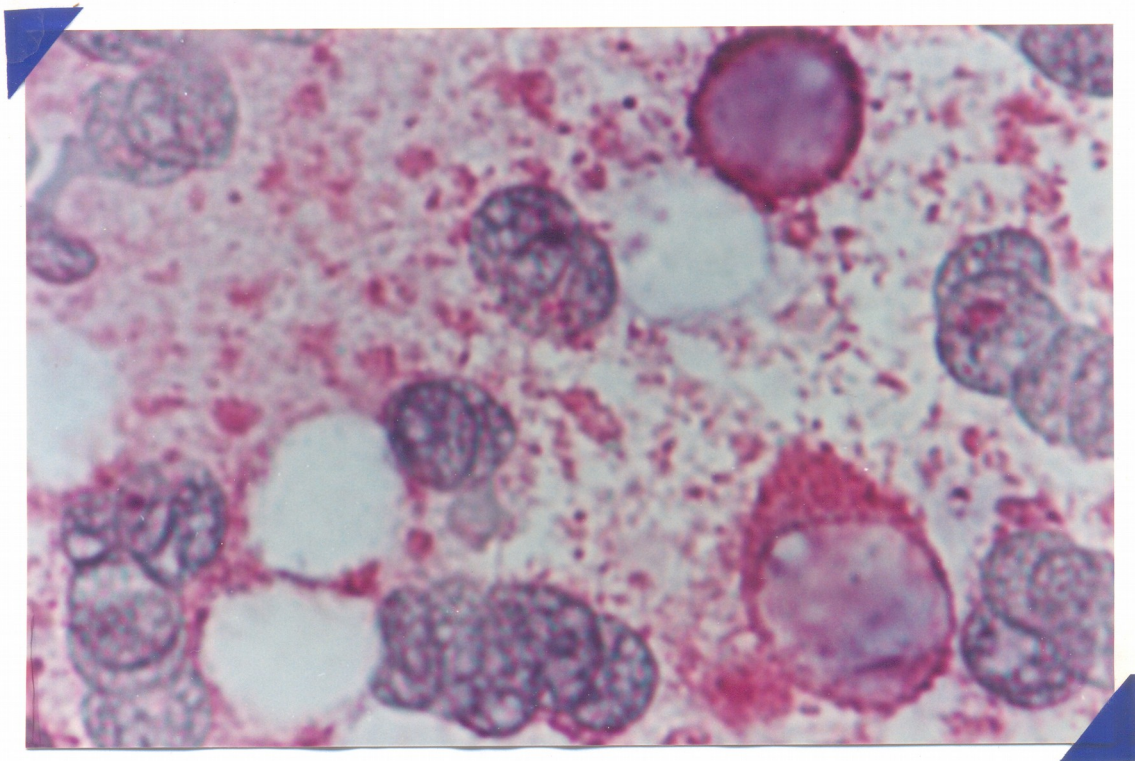
Fotografia 2 - Mesmo caso anterior. Campo fotografado com aumento de 100X



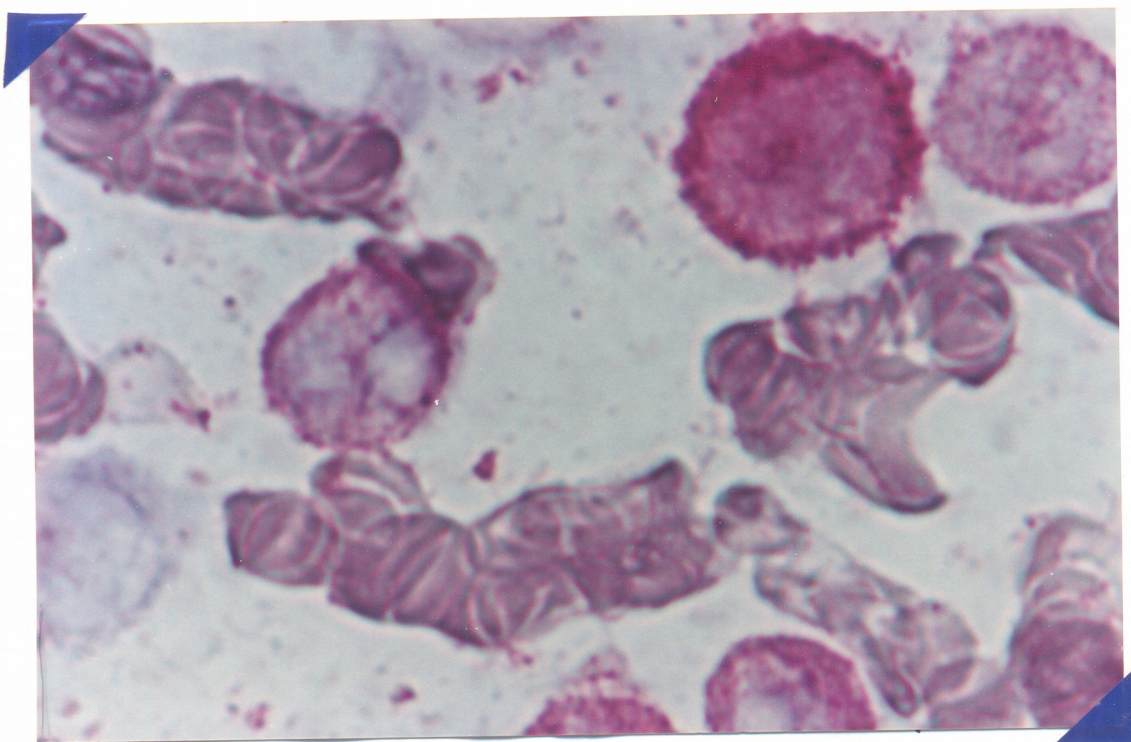
Fotografia 3 - Caso de número 6. Leucemia mielóide aguda subtipo M4. Evidenciamos um blasto com nítida marcação pelo CD14, alguns blastos com fraca reação e outros negativos ao anticorpo testado. Campo fotografado com aumento de 1000X.



Fotografia 4 - Caso de número 5. Leucemia linfocítica aguda T. Infiltração medular maciça com blastos marcados pelo CD5. Campo fotografado com aumento de 400x.



Fotografia 5 - Caso de número 2. Leucemia mielóide crônica - crise blástica. Blastos marcados pelo CD33. Campo fotografado com aumento de 1000X.



Fotografia 6 - Mesmo caso anterior. Marcação exibida com o CD45. Campo fotografado com aumento de 1000X.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEHM, F.G. et al. Lack of CD45 antigen on blast cells in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with chromosomal hyperdiploidy and other favorable prognostic features. Blood v. 79, n.4, p. 1011-1016, fev., 1992.
2. BENNETT, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias: French-American-British Cooperative Group. Brit J. Haematol, v. 33, p. 451-458, 1976.
3. BENNETT, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T. et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. Ann Int. Medicine, v. 103, n. 4, p. 620-625, out., 1985.
4. BENNETT, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T. et al. Proposals for the classification of cronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. J. Clin Pathol. v. 42, p. 567-584, 1989.
5. BENNETT, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T. et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0). Brit J. Haematol, v. 78, p. 325-329, 1991.

6. BURGESS, R. et al. Two-colour immunoenzymatic technique using sequential staining by APAAP to evaluate two cell antigens. J. Clin. Pathol., v. 45, p. 206-209, 1992.
7. CASTRO, R.M. Leucemias - Imunofenotipagem na definição de subtipos. Publicação Fund. Maria Cecília Souto Vidigal, p. 35-41, julho, 1992.
8. CATOVSKY, D., MATUTES, E., BUCCHERI, V. et al. A classification of acute leukaemia for the 1990s. Ann Hematol., v. 62, p. 16-21, 1991.
9. CHRISTOPOULOS, C., MATTOCK, C. Platelet satellitism and alpha granule proteins. J. Clin. Pathol., v. 44, p. 788-789, 1991.
10. DREXLER, H.G., GIGNAC, S.M., MINOWADA, J. Routine immunophenotyping of acute leukaemias. Blut, v. 57, n. 6, p. 327-339, dez., 1988.
11. ERBER, W.N., PINCHING, A.J., MASON, D.Y. Immunocytochemical detection of T and B cell populations in routine blood smears. The Lancet, p. 1042-1045, 1984.
12. ERBER, W.N., MYNHEER, L.C., MASON, D.Y. APAAP labelling of blood and bone-marrow samples for phenotyping leukaemia. The Lancet, p. 761-765, apr., 1986.
13. FALINI, B. et al. Selection of a panel of monoclonal antibodies for monitoring residual disease in peripheral blood and bone marrow of interferon-treated hairy cell leukaemia patients. Brit. J. Haematol., v.76, n.4, p. 460-468, dez., 1990.

14. First MIC Cooperative Study Group. Morphologic, Immunologic, and Cytogenetic (MIC) Working Classification of acute Lymphoblastic leukemias. Cancer Genet Cytogenet, v. 23, n.3, p. 189-197, nov., 1985.
15. FOON, K.A., TODD, R.F. III. Immunologic Classification of leukemia and lymphoma. Blood, v. 68, n.1, p. 1-31, jul, 1986.
16. FREDMAN, A.S., NADLER, L.M. Cell surface markers in hematologic malignancies. Seminars in Oncology, v. 14, n.2, p. 193-212, jun., 1987.
17. FREDMAN, A.S., NADLER, L.M. Immunologic markers in Non-Hodgkin lymphoma. Hematol./Oncol. Clin. of N. Amer., v. 5, n. 5, p. 871-889, out., 1991.
18. GÓMEZ, E. et al. Heterogeity of T cell lymphoblastic leukaemias. J. Clin. Pathol., v. 44, p. 628-631, 1991.
19. HAKAMI, N., MONZON, C.M. Acute nonlymphocytic leukemia in children. Hematol/Oncol. Clin. of N. Amer., v. 1, n. 4, p. 567-575, dez., 1987.
20. HAYHOE, F.G.J. Classification of acute leukaemias. Blood Reviews, v. 2, p. 186-193, 1988.
21. JANOSSY, G., CAMPANA, D. Monoclonal antibodies in the diagnosis of acute leukemias. In: Catovsky, D. Methods in Hematology - The Leukemic Cell. 2ª ed. Churchill Livingstone: Edinburgh, 1991, cap. 6, p. 168-195.
22. MARTÍN, A., CASARES, A.S., RODRÍGUEZ, J.M. Cambio citomorfologico y de inmunofenotipo en recaída de leucemia aguda. Sangre, v. 36, n. 6, p. 516-517, dez., 1991.

23. MASON, D.Y., ERBER, W.N. Immunocytochemical labelling of leukemia samples with monoclonal antibodies by the APAAP procedure. In: CATOVSKY, D. Methods in Hematology - The Leukemic Cell. 2^a ed. Churchill. Livingstone: Edinburgh, 1991. cap. 7, p. 196-214.
24. MONTES, M.J. et al. Cambios fenotipos en un caso de LLA-T. Sangre, v. 37, n. 1, p. 77-78, fev. 1992.
25. NAEIM, F. Leukemias and lymphomas. In: _____. Pathology of Bone Marrow. New York: Igaku-Shoin, 1992. cap. 6, p. 141-131.
26. ORTEGA, J.J. Factores prognosticos en las leucemias agudas del niño. Sangre, v. 36, n.s. 3, p. 97-107, nov., 1991.
27. POMBO DE OLIVEIRA, M.S. et al. Cytochemical profile of megakaryoblastic leukaemia: a study with cytochemical methods, monoclonal antibodies, and ultrastructural cytochemistry. J. Clin Pathol, v. 40, n. 6, p. 663-669, jun., 1987.
28. POMBO DE OLIVEIRA, M.S., QUINTANA, I.Z., LAMOSA, A.N. Leucemias e marcadores celulares. Oncologia Atual, v. 2, n. 6, p. 237-244, 1992.
29. STEINHERZ, P.G. Acute Lymphoblastic leukemia of childhood. Hematol/Oncol. Clin. of N. Amer., v. 1, n. 4, p. 549-566, dez., 1987.
30. STROSS, W.P., JONES, M., MASON, D.Y. Automation of APAAP immunocytochemical technique. J. Clin Pathol., v. 42, n. 1, p. 106-112, jan., 1989.
31. THOMAS, J.O. et al. Immunohistological diagnosis of "plasmacytoid T cell lymphoma" in paraffin wax sections. J. Clin. Pathol., v. 44, n. 8, p. 632-635, aug., 1991.