

# Diagnóstico de imunofenótipos de síndromes linfoproliferativas crônicas por citometria de fluxo na Fundação HEMOPA

Primeira submissão em 28/02/11  
Última submissão em 15/06/11  
Aceito para publicação em 16/06/11  
Publicado em 20/12/11

*Diagnosis of immunophenotyping of chronic lymphoproliferative syndromes by flow cytometry at HEMOPA blood center*

Lacy Cardoso de Brito Junior<sup>1</sup>; Danielle Cristinne Azevedo Feio<sup>2</sup>;  
Suane Reis Barbosa<sup>3</sup>; Alessandra Quinto Bentes<sup>4</sup>; Larissa Tatiane Martins Francês<sup>5</sup>

unitermos	resumo
Citometria de fluxo	<p><b>Introdução:</b> As síndromes linfoproliferativas formam um grupo heterogêneo de neoplasias malignas com diferentes comportamentos clínicos, fatores patológicos e características epidemiológicas e podem ter seu diagnóstico geral com base na morfologia das células linfóides observadas no sangue periférico. <b>Objetivo:</b> Testar a factibilidade diagnóstica do método de imunofenotipagem por citometria de fluxo para síndromes linfoproliferativas a partir da definição de um painel mínimo de anticorpos. <b>Material e métodos:</b> Participaram 47 pacientes para diagnóstico diferencial dos subtipos de síndromes linfoproliferativas por citometria de fluxo, no período de julho de 2008 a julho de 2010, atendidos na Fundação HEMOPA. <b>Resultados:</b> A mediana de idade dos pacientes foi de 68 anos, não houve diferença estatística entre os sexos e o subtipo de síndromes linfoproliferativas mais frequente foi a leucemia linfóide crônica/linfoma linfocítico de pequenas células B. <b>Conclusão:</b> O método de imunofenotipagem por citometria de fluxo, ao lado da morfologia, de amostras de sangue periférico mostrou-se uma metodologia auxiliar, segura, rápida, factível e não invasiva para o diagnóstico de síndromes linfoproliferativas crônicas a partir do painel de anticorpos sugerido.</p>
Imunofenotipagem	
Neoplasias hematológicas	
Diagnóstico	
Linfomas	

abstract	key words
<p><b>Introduction:</b> Lymphoproliferative syndromes comprise a heterogeneous group of malignant neoplasias with different clinical behaviors, pathological factors and epidemiological characteristics, whose diagnosis may be based on lymphoid cell morphology observed in peripheral blood. <b>Objective:</b> To test the diagnostic feasibility of immunophenotyping by flow cytometry for lymphoproliferative syndromes through the definition of minimal antibody panel. <b>Material and methods:</b> During the period of July 2008 to July 2010, 47 patients from HEMOPA blood center participated in this study for differential diagnosis of lymphoproliferative syndromes subtypes by flow cytometry. <b>Results:</b> The mean age was 68 years old. There was no statistical difference between genders, and the most frequent subtype of lymphoproliferative syndromes was chronic lymphoid leukemia/small B-cell lymphocytic lymphoma. <b>Conclusion:</b> Based on the antibody panel recommended in this investigation, the immunophenotyping method by flow cytometry associated with morphological characterization of peripheral blood samples is a reliable, rapid, feasible, and non-invasive procedure for the diagnosis of chronic lymphoproliferative syndromes.</p>	<p><i>Flow cytometry</i></p> <p><i>Immunophenotyping</i></p> <p><i>Hematological neoplasias</i></p> <p><i>Diagnosis</i></p> <p><i>Lymphomas</i></p>

1. Doutor em Ciências Médicas com ênfase em Patologia Experimental pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo (USP); professor adjunto IV da Universidade Federal do Pará (UFPA).

2. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA.

3. Biomédica.

4. Especialista em Hematologia; diretora de Ensino e Pesquisa da Fundação Hospital das Clínicas Gaspar Viana.

5. Especialista em Hematologia; gerente do Laboratório de Hematologia da Fundação HEMOPA.

Suporte financeiro: Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Governo do Estado do Pará, Secretaria de Estado de Desenvolvimento, Ciência e Tecnologia (SEDECT), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA).

## Introdução

As síndromes linfoproliferativas formam um grupo heterogêneo de neoplasias malignas com diferentes comportamentos clínicos, fatores patológicos e características epidemiológicas<sup>(8, 12, 15)</sup> e podem ter seu diagnóstico geral com base na morfologia das células linfoides, observadas no sangue periférico. No entanto, em função da similaridade da morfologia muitas vezes observada nesse material, sua classificação e, conseqüentemente, a escolha do tratamento são bastante dificultados, exigindo a confirmação diagnóstica por meio da biópsia de outros órgãos, como baço e linfonodos<sup>(1, 10, 14)</sup>.

A biópsia de medula óssea (MO) ou mesmo de outros órgãos linfoides para o diagnóstico de síndromes linfoproliferativas crônicas, todavia, além de demoradas, invasivas, que necessitam de técnicas complementares de diagnóstico, como a imuno-histoquímica, exigem a presença de profissionais treinados e altamente qualificados para a diferenciação dessas neoplasias<sup>(4, 14)</sup>. Diversos autores têm sugerido a utilização da imunofenotipagem por citometria de fluxo aliada à citologia convencional como método rápido e não invasivo de diagnóstico alternativo para síndromes linfoproliferativas<sup>(2-7, 9, 11, 14, 15)</sup>.

Assim, o objetivo deste estudo foi testar a factibilidade diagnóstica do método de imunofenotipagem por citometria de fluxo para síndromes linfoproliferativas, a partir da definição de um painel mínimo de anticorpos, por meio de material obtido de sangue periférico dos pacientes.

## Material e métodos

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 47 pacientes provenientes dos programas de diagnóstico e tratamento de leucemias e linfomas da Fundação HEMOPA, no período de junho de 2008 a julho de 2010.

Todos esses indivíduos foram informados de sua participação neste projeto de pesquisa mediante o termo de consentimento livre e esclarecido.

As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos de hemólise com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e encaminhadas, a temperatura ambiente, para o Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação HEMOPA, acompanhadas de história clínica, impressão diagnóstica e ficha com os dados clínicos.

### Diagnóstico por imunofenotipagem

Todas as amostras foram analisadas em até 24 horas após a coleta, minimizando, assim, as possibilidades de

perda de expressão de antígenos, com a utilização de alíquotas de 100 µl de sangue por tubo à lise das hemácias, sem lavagem das amostras para evitar a seleção ou a perda arbitrária de populações celulares específicas.

Foi adicionado 0,01 ml de diferentes anticorpos monoclonais específicos marcados com fluorocromos FITC, PE ou Percyp, em tríades de anticorpos por tubo, os quais, posteriormente, foram incubados no escuro, a temperatura ambiente, para posterior aquisição média de 10 mil eventos e análise em citômetro de fluxo FACSCalibur por meio do sistema Cell Quest Pro (Becton Dickinson, San Jose, CA) para três cores.

O painel mínimo de anticorpos utilizado para o diagnóstico dos tipos de síndromes linfoproliferativas crônicas compreendeu a combinação de tríades dos seguintes anticorpos comerciais: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD34, CD38, CD45, CD56, CD79b, CD103, CD117, HLA-DR, anti-Kappa, anti-Lambda, FMC7 e imunoglobulinas G e M (IgG e IgM).

## Resultados

Das 47 amostras analisadas, quatro foram diagnosticadas como inconclusivas para síndromes linfoproliferativas crônicas e duas foram diagnosticadas como mieloma múltiplo; 41 casos foram diagnosticados positivamente para algum dos subtipos de síndromes linfoproliferativas crônicas (**Tabela 1**). O subtipo leucemia linfóide crônica/linfoma linfocítico de pequenas células B foi a síndrome linfoproliferativa crônica de maior frequência (28/41; 68,29%). Esses dados foram confirmados após análise morfológica (dados não mostrados).

Quanto ao sexo, segundo a distribuição dos subtipos de síndromes linfoproliferativas crônicas, não houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

A análise de faixa etária (**Tabela 2**) mostrou que a média de idade dos pacientes diagnosticados com síndromes linfoproliferativas crônicas foi de 66,4 ± 11,51 anos (média ± desvio padrão), com mediana de 68 anos.

## Discussão

Neste estudo, o método de imunofenotipagem por citometria de fluxo, ao lado da morfologia, de amostras de sangue periférico mostrou-se uma metodologia auxiliar, segura, rápida, factível e não invasiva para o diagnóstico de síndromes linfoproliferativas crônicas, além de a escolha

**Tabela 1** Frequência dos subtipos de síndromes linfoproliferativas crônicas

	Frequência	
	Nº	%
Leucemia de células cabeludas	1	2,44
Leucemia de células cabeludas variante	1	2,44
Leucemia pró-linfocítica B	7	17,1
Linfoma de células do manto	1	2,44
Leucemia linfoide crônica/linfoma linfocítico de pequenas células B	28	68,29
Leucemia pró-linfocítica T	1	2,44
Síndrome linfoproliferativa crônica	2	4,88
Total	41	100

do painel de anticorpos sugerido ter sido suficiente para a diferenciação dos subtipos de síndromes linfoproliferativas.

Esses dados são corroborados por outros autores<sup>(2-7, 9, 11, 14, 15)</sup> que afirmam que a imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma metodologia rápida e precisa e uma ferramenta extremamente útil no diagnóstico, no prognóstico e no monitoramento da terapêutica e da epidemiologia das síndromes linfoproliferativas crônicas. Ressalte-se, entretanto, que em alguns casos o diagnóstico definitivo só é possível por meio de estudo histopatológico da peça anatômica (linfonodos, tecidos linfoides associados a mucosas ou glândulas, baço).

O painel estabelecido neste estudo permitiu, inicialmente, separar as síndromes linfoproliferativas de origem B das de origem T. Apesar de estas últimas não serem tão frequentes e

geralmente estarem associadas à infecção pelo vírus linfotrópico de células T (HTLV-1)<sup>(16, 17)</sup>, neste estudo, foi observado apenas um caso de leucemia pró-linfocítica T.

Quanto ao diagnóstico das síndromes linfoproliferativas de origem B, em especial a leucemia linfoide crônica/linfoma linfocítico de pequenas células B (LLC-B), a presença do fenótipo aberrante CD20/CD5, associada à positividade para CD23 e monoclonalidade de baixa expressão para IgM de superfície, facilitou sua identificação. Embora se discuta na literatura a existência de casos de LLC-B com CD5 negativo, segundo dados, estas ocorreriam em apenas 2% dos casos<sup>(9, 11, 14, 16)</sup>.

Outro achado importante, a partir do painel proposto neste estudo, foi a possibilidade de observação da expressão de CD38 (dados não mostrados), um marcador característico da linhagem plasmocítica que tem expressão já descrita em mais de 20% dos casos de LLC-B<sup>(11)</sup> associada à ausência de mutação somática da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina e a mau prognóstico nesses pacientes; embora, neste estudo, o prognóstico nesses indivíduos não tenha sido avaliado a partir desse achado.

A leucemia pró-linfocítica B foi outro achado importante neste estudo. Mesmo sendo pouco comum e cursando com grandes linfocitoses e esplenomegalia volumosa, foi caracterizada neste estudo pela expressão forte de imunoglobulinas de superfície (IgG e IgM), além de CD20, CD22, CD79b, FMC7 e CD38 positivos, com CD5 negativo, semelhante a outros estudos da literatura<sup>(11)</sup>.

O diagnóstico diferencial entre a LLC-B e o linfoma de células do manto, por sua vez, segue caracterização fenotípica já amplamente descrita na literatura com CD22 e CD20/CD5 positivos, CD23 negativo e expressão moderada de IgM<sup>(9, 16)</sup>.

**Tabela 2** Frequência dos subtipos de linfomas não Hodgkin segundo a faixa etária

	Faixa etária (anos)						
	21 a 30	31 a 40	41 a 50	51 a 60	61 a 70	71 a 80	81 a 90
Leucemia de células cabeludas	–	1	–	–	–	–	–
Leucemia de células cabeludas variante	–	–	–	–	–	1	–
Leucemia pró-linfocítica T	–	–	–	–	1	–	–
Leucemia pró-linfocítica B	1	–	2	–	–	2	1
Linfoma de células do manto	–	–	–	–	1	–	–
Leucemia linfoide crônica/linfoma linfocítico de pequenas células B	–	–	1	9	8	7	4
Síndrome linfoproliferativa crônica	–	1	–	–	1	–	–
Total	1	2	3	9	11	10	5

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>(13, 16, 17)</sup>, as neoplasias de células B maduras compreendem mais de 85% das síndromes linfoproliferativas crônicas no mundo, com a leucemia linfóide crônica/linfoma linfocítico de pequenas células B tendo maior ocorrência principalmente em países ocidentais, fato semelhante ao observado neste estudo, em que a leucemia linfóide crônica/linfoma linfocítico de pequenas células B apresentou maior frequência (68,29%) entre as síndromes linfoproliferativas crônicas.

Quanto ao sexo e à distribuição da frequência de síndromes linfoproliferativas crônicas diagnosticados, observou-se neste estudo não haver diferença estatística entre eles. Resultado discordante de outros estudos<sup>(16, 17)</sup>, que revelam uma relação (masculino/feminino) de 1,3/1. Entretanto, os dados deste estudo podem estar subestimados em função do tamanho da amostra analisada.

Quanto à maior frequência de síndromes linfoproliferativas crônicas em pessoas acima da quinta década de vida<sup>(12, 17)</sup>, esses dados estão de acordo com os encontrados neste estudo.

## Conclusão

Os resultados observados neste estudo confirmaram dados da literatura sobre a frequência dos subtipos de síndromes linfoproliferativas crônicas, bem como sua distribuição em relação à faixa etária.

A citometria de fluxo demonstrou ser uma importante ferramenta no diagnóstico, na classificação e na caracterização fenotípica dos subtipos de síndromes linfoproliferativas crônicas, de forma mais rápida e precisa, e o painel de anticorpos sugerido mostrou-se minimamente suficiente para esse diagnóstico.

## Referências

1. ABBOTT, B. L. Chronic lymphocytic leukemia: recent advances in diagnosis and treatment. *Oncologist*, v. 11, p. 21-30, 2006.
2. BACAL, N. S. et al. Citometria de fluxo: imunofenotipagem em 48 casos de leucemia de células cabeludas e a relevância das intensidades de fluorescências nas expressões dos anticorpos monoclonais para o diagnóstico. *Einstein*, v. 5, n. 2, p. 123-8, 2007.
3. CAVALCANTI JÚNIOR, G. B. et al. Detection of CD5 in B-cell chronic lymphoproliferative diseases by flow cytometry: a strong expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Acta Cir Bras*, v. 20, Supl. 1, 2005.
4. COSTA, F. P. S. et al. Diagnosis of non-Hodgkins lymphoma combining immunophenotyping and fine needle aspiration. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 27, n. 1, p. 16-20, 2005.
5. CRAIG, F. E.; FOON, K. A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms (review). *Blood*, v. 111, n. 8, p. 3941-66, 2008.
6. D'ARENA, G. et al. Quantitative flow cytometry for the differential diagnosis of leukemic b-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Am J Haematol*, v. 64, p. 275-81, 2000.
7. HERZENBERG, L. A. et al. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clinical Chemistry*, v. 48, n. 10, p. 1819-27, 2002.
8. HJALGRIM, H.; ENGELS, E. A. Infectious aetiology of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence. *J Intern Med*, v. 264, n. 6, p. 537-48, 2008.
9. JAIN, P. et al. Detection of cyclin D1 in B cell lymphoproliferative disorders by flow cytometry. *J Clin Pathol*, v. 55, p. 940-5, 2002.
10. LORAND-METZE, I.; CHIARI, A. C.; PEREIRA, F. G. O uso de um painel restrito de anticorpos monoclonais no diagnóstico diferencial das síndromes linfoproliferativas. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 22, n. 1, p. 41-5, 2000.
11. MATUTES, E. New additions to antibody panels in the characterization of chronic lymphoproliferative disorders. *J Clin Pathol*, v. 55, p. 180-3, 2002.
12. OSCIER, D. et al. Prognostic factors identified three risk groups in the LRF CLL4 trial, independent of treatment allocation. *Haematologica*, v. 95, n. 10, p. 1705-12, 2010.
13. PAES, R. A. et al. Classificação da Organização Mundial de Saúde para as neoplasias dos tecidos hematopoiético e linfóide: proposta de padronização terminológica em língua portuguesa do grupo de hematologia da Sociedade Brasileira de Patologia. *J Bras Patol Med Lab*, v. 38, p. 237-9, 2002.
14. SAH, S. P. et al. A comparison of flow cytometry, bone marrow biopsy, and bone marrow aspirates in the detection of lymphoid infiltration in B cell disorders. *J Clin Pathol*, v. 56, p. 129-32, 2003.
15. STETLER, M.; BRAYLAN, R. C. Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders. *Semin Haematol*, v. 38, n. 2, p. 111-23, 2001.
16. SWERDLOW, S. H. et al. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC: Lyon, 2008. p. 111-7.
17. TURNER, J. J. et al. Use of the WHO lymphoma classification in a population-based epidemiological study. *Annals of Oncology*, v. 15, p. 631-7, 2004.

### Endereço para correspondência

Lacy Cardoso de Brito Junior  
 Universidade Federal do Pará  
 Instituto de Ciências Biológicas  
 Laboratório de Patologia Geral  
 Imunopatologia e Citologia  
 Av. Augusto Corrêa, 1 – Guamá  
 CEP: 66075-900 – Belém-PA  
 Tel.: (91) 3201-7102  
 e-mails: lcdbrito@ufpa.br; lcdbrito@bol.com.br