

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA

EDUARDO STTOCCO DA SILVA; ELINE ELIEN MAGNO MOREIRA DORST;
VINÍCIUS SANTOS TULIO; JULIANA SPEZIA; CLAUDRIANA LOCATELLI

RESUMO

A leucemia promielocítica (LPA) é uma condição caracterizada pela proliferação neoplásica na medula óssea de células com fenótipo promielocítico com translocação t (15;17) (q24.1; q21.2), que resulta na expressão da proteína de fusão promielocítica (PML)-receptor ácido retinóico-a (RARA). Essa translocação afeta a maturação normal das células promielocíticas, resultando no acúmulo dessas células anormais na medula óssea e sangue periférico. A presença dessas células anômalas ativa o sistema de coagulação, aumentando o risco de sangramentos internos e mucocutâneo e eventos tromboembólicos. Desta forma, este estudo destaca a importância do diagnóstico laboratorial precoce da LPA, cujo objetivo é o prognóstico e tratamento ideal para o paciente. O hemograma e avaliações citogenética, imunofenotípica e molecular do sangue periférico ou medula óssea são fundamentais para o diagnóstico e prognóstico, cujos resultados guiam estratégias terapêuticas personalizadas. A capacidade de identificar as células anormais promielocíticas é uma habilidade fundamental para os analistas clínicos, pois desempenha um papel crucial em diagnóstico médico, e na detecção rápida das características da LPA. Isso permite avanços na compreensão da doença e na melhoria da saúde do paciente, visto ao bom prognóstico, quando tratada.

Palavras-chave: Promielócito. Sangramento. Diagnóstico. Laboratório. Neoplasia.

1 INTRODUÇÃO

A leucemia é uma condição caracterizada pela produção descontrolada de células hematopoiéticas. Essa proliferação desordenada de células na medula óssea interfere na produção normal de todas as linhagens celulares, incluindo glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas. Como resultado, surgem sintomas característicos da anemia, de infecções e de hemorragias devido a essa disfunção na produção das células sanguíneas. A base de classificação das leucemias é determinada pela linhagem celular afetada e pelo grau de maturação das células. De uma maneira geral, as leucemias podem ser categorizadas em agudas e crônicas, e em mieloides e linfoides (Delfino, 2022).

As leucemias agudas, recebem esse nome devido à presença de células imaturas (blastos) e à rápida evolução da doença em pacientes não tratados. Quando a linhagem mielóide é afetada, esta classificação a define como Leucemia Mieloide Aguda (LMA). Dentre as LMAs, existem inúmeras variantes sendo a Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) um subtipo (Delfino, 2022).

O diagnóstico e classificação precisa das malignidades mieloides de acordo com o sistema de classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Classificação de Consenso Internacional de Neoplasias Mieloides e Leucemias Agudas (ICC) requer uma investigação integrativa da história clínica, da morfologia das células hematopoiéticas na circulação e na medula óssea, da imunofenotipagem (por citometria de fluxo e/ou imunohistoquímica) e da presença de alterações genéticas e/ou moleculares (Bain e Béné, 2019; Khoury *et al*, 2022).

Desta forma, embora exames complementares ainda sejam necessários para confirmar o diagnóstico final, uma cuidadosa avaliação citomorfológica de características únicas apresentadas pelas células precursoras hematopoiéticas podem prever alterações genéticas em muitos casos de neoplasias mieloides com um grande grau de confiança, além de ser útil na triagem e na avaliação da gravidade da doença. Esse aspecto é particularmente evidente em emergências hematológicas, como a LPA, onde a administração imediata de terapia específica pode ter impactos significativos na trajetória da doença (Bain and Béné, 2019; Hwang, 2020). Nesta revisão iremos apresentar a importância da avaliação criteriosa da lâmina de extensão sanguínea como ferramenta diagnóstica importante de LPA, além de apresentarmos uma revisão geral dos principais aspectos laboratoriais da LPA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão integrativa da literatura, onde a estratégia de busca foi de artigos científicos publicados entre 2014 a 2023, utilizando as seguintes palavras chaves: leukemia AND acute AND promyelocytic. As bases de dados utilizados foram: *Pubmed*, *Scielo* e *Google Scholar*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

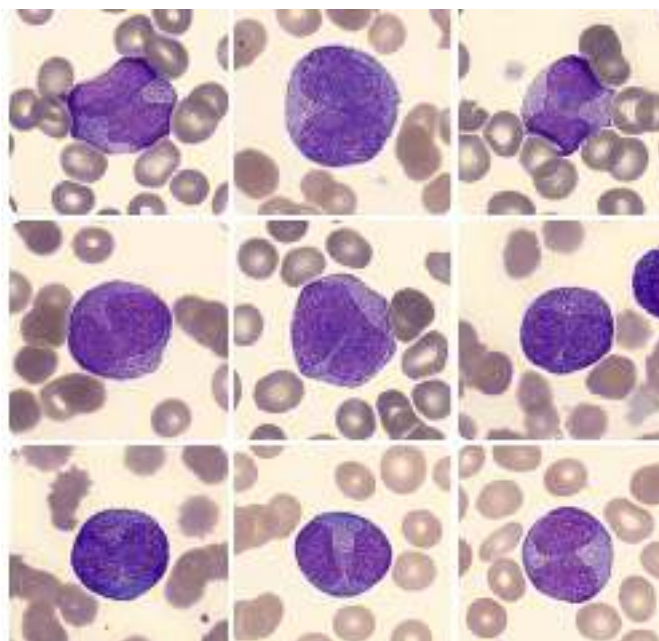
O diagnóstico das Leucemias Mieloides Agudas (LMAs) envolve uma análise abrangente que inclui hemograma, mielograma, avaliação citogenética, imunofenotípica e biologia molecular. Essas avaliações são de grande importância para identificar mutações específicas, o que, por sua vez, desempenha um papel crucial na determinação do prognóstico do paciente (Bain e Béné, 2019).

Anteriormente a 2022, exceto nos casos de translocações específicas (8;21), (15;17) ou (16;16), ou ainda a inversão (16) (p13.1q22), o diagnóstico de LMAs só poderia ser confirmado se a contagem de mieloblastos, monoblastos ou megacarioblastos na medula óssea ou sangue periférico fosse superior a 20% (Brasil, 2014). No entanto, com as atualizações nas diretrizes da OMS referentes às LMAs, a partir de 2022, todos os casos que se enquadram na categoria "LMA com alterações genéticas recorrentes", com exceção daqueles que apresentam a fusão BCR-ABL1 ou a mutação CEPBA, podem ter o diagnóstico confirmado mesmo com uma contagem de blastos inferior a 20%, desde que haja uma correlação observada entre os aspectos clínicos, morfológicos e genéticos. Essa atualização reflete uma abordagem mais abrangente e precisa no diagnóstico das LMAs, integrando informações clínicas e moleculares de forma mais holística (Khoury *et al*, 2022).

Hemograma

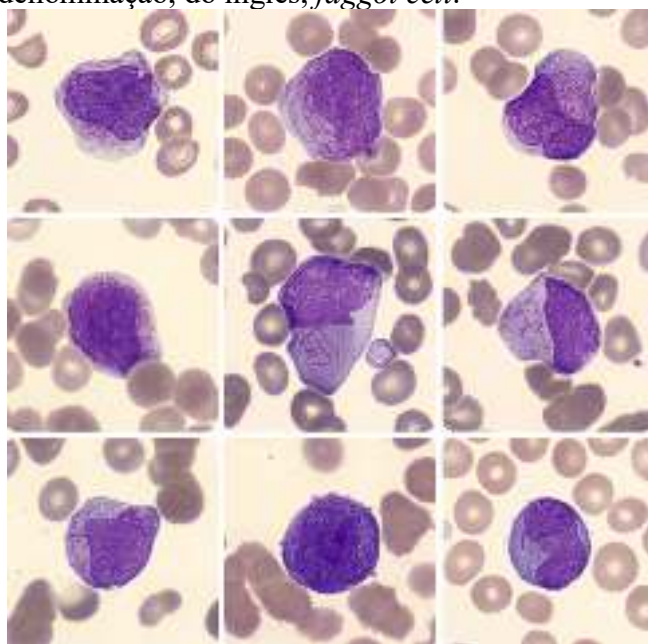
Os promielócitos são as células encontradas com frequência na LPA. Normalmente eles são definidos como uma célula de tamanho relativamente grande, com núcleo redondo ou oval localizado excêntricamente, podendo apresentar um ou mais nucléolos, tem média relação núcleo/citoplasma, o citoplasma apresenta certa basofilia, com área mais clara perinuclear (zona de Golgi) e presença de grânulos azul escuro que se encontram no citoplasma e sobre o núcleo. Segundo a classificação FAB, na LPA há a presença de promielócitos anômalos em sangue periférico ou aspirado medular, podendo apresentar características peculiares como núcleo bilobular, chamados de “asas de anjo” ou “asas de borboleta”, como apresentado na Figura 1 (Bain e Béné, 2019; Smit, 2023).

Figura 1 – Promielócito anômalo. Fonte: CellWiki (2023)



É muito frequente encontrar a presença de bastonete de Auer nos promielócitos de LPA, mas uma característica marcante de anormalidade nestas células promielocíticas é a presença dessas estruturas citoplasmáticas agrupadas, sendo então, denominadas *Faggot Cell*, do inglês, células em “feixe”, como mostrado na Figura 2. Estas características de promielócitos anormais com múltiplos bastonetes de Auer são patognomônicas em casos de LPA (Bain e Béné, 2019; Stone *et al*, 2023).

Figura 2 – Promielócito anômalo com inúmeros bastonetes de Auer agrupados e dispostos como feixes, daí sua denominação, do inglês, *faggot cell*.

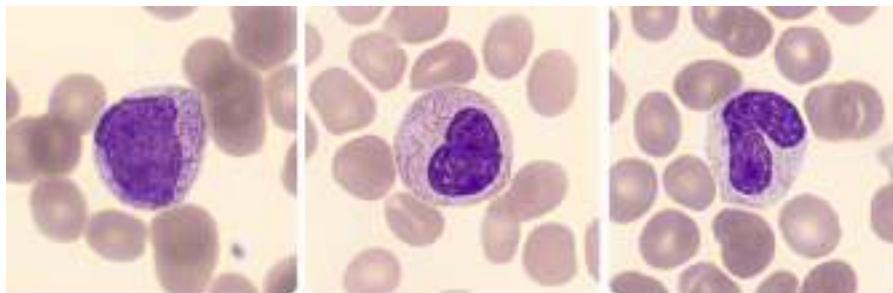


Fonte: CellWiki (2023)

Após o tratamento, com a maturação forçada desses promielócitos, é possível ver a presença desses bastonetes de Auer nas formas mais maduras dos granulócitos neutrofilicos,

disposto na Figura 3 (Smit, 2023).

Figura 3 – Granulócito neutrofilico com bastonete de Auer.



Fonte: CellWiki (2023)

Os indicadores morfológicos fornecem uma riqueza de informações para o clínico, direcionando a pesquisa de outros exames para um diagnóstico definitivo. Além disso, podem auxiliar na detecção de muitas LMA, antes mesmo de atingir o ponto de corte de 20% de células blásticas, o que pode resultar em implicações imediatas nas decisões terapêuticas. Vale destacar que o hemograma é um exame simples, de baixo custo e solicitado como exame de rotina para muitas consultas médicas, porém, não apresenta especificidade para um diagnóstico definitivo de inúmeras patologias (Bain e Bené, 2019; Khoury *et al*, 2022).

Para isto, exames complementares como citoquímicos, citogenéticos, imunofenotípicos e genéticos, são necessários não apenas para alcançar um diagnóstico preciso, mas também desempenham um papel crucial na determinação do prognóstico da doença, que visa uma escolha terapêutica adequada (Bain e Bené, 2019; Khoury *et al*, 2022).

Citoquímica

As colorações citoquímicas, embora não muito utilizadas nesta condição, desempenham um papel essencial como parte integrante dos procedimentos complementares de diagnóstico. Seu propósito reside em fornecer suporte nos exames hematológicos, facilitando a classificação da origem mieloide e/ou linfóide das células em análise. A coleta e análise de amostras são realizadas tanto na medula óssea quanto no sangue periférico (Resende *et al*, 2017; Pagnano *et al* 2014; Bain e Béné, 2019).

No contexto do diagnóstico da LPA, destaca-se a relevância da coloração mieloperoxidase (MPO) e Sudan Black B (SBB). A MPO, especificamente, é empregada pela sua especificidade na diferenciação mieloide, apresentando positividade em grânulos de mieloblastos, enquanto os monócitos podem exibir negatividade ou positividade em partículas finas. Por outro lado, a coloração SBB permite distinguir mieloblastos positivos, contrastando com linfoblastos que apresentam negatividade. A confirmação da natureza mieloide dos blastos e a identificação dos bastonetes de Auer ocorrem em cerca de 65% dos casos quando a MPO ou o Sudan Black B são positivos. Este método é específico para as linhagens de granulócitos, eosinófilos e monócitos. Por ser uma célula da linhagem mieloide apresenta positividade para reação citoquímica de mieloperoxidase (Resende *et al*, 2017; Pagnano *et al* 2014; Bain e Béné, 2019).

Citogenética

A citogenética é um dos exames mais importantes para o diagnóstico diferencial das neoplasias hematológicas pelo estudo das alterações cromossômicas nas células transformadas.

O principal achado citogenético através da análise do cariótipo e da técnica molecular de FISH (hibridização fluorescente *in situ*) é a translocação cromossômica t (15; 17) (Q24; q21). Esta translocação resulta na fusão dos genes PML e RARA. A análise citogenética

permite detectar essa translocação, que é essencial para confirmar o diagnóstico de LPA e diferenciá-la de outras formas de leucemia. Através do estudo do cariótipo é possível a demonstração da presença da t (15; 17) (Q24; q21) em 91% dos pacientes. (Pagnano *et al*, 2014; Adams e Nassiri, 2015; Stone *et al*, 2023).

É importante ressaltar que a presença da anormalidade citogenética em uma neoplasia mielóide com aumento de blastos ou promielócitos anormais na medula óssea ou no sangue periférico qualifica isso como uma LMA, independentemente da porcentagem específica de blastos, conforme classificação da OMS. Além da translocação t(15;17), outras alterações cromossômicas podem estar presentes e têm implicações prognósticas. A citogenética também é utilizada para monitoramento da doença, análise da remissão da alteração e reaparecimento do clone com novas alterações, influenciando as decisões terapêuticas (Ferreira *et al*, 2022; Khoury *et al*, 2022; Stone *et al*, 2023).

Mas apesar de apresentar alta especificidade, a cariotipagem pode ser considerada uma técnica demorada (necessita de experiência profissional na análise), requer alto custo e metáfases de alta qualidade para visualizar as translocações. Ademais, por definição, a técnica falha na detecção de casos em que as fusões PML-RARA resultam de rearranjos crípticos (falsos negativos). A tecnologia de FISH tem apresentado benefícios sobre a citogenética clássica devido a sua maior sensibilidade, especificidade e rapidez no diagnóstico (Delfino, 2022).

É uma tecnologia que pode identificar especificamente a região de translocação que envolve o uso de fitas (únicas ou duplas) do DNA, na qual detecta a fusão dos dois genes que produzem fluorescência na qual é analisada em microscópio com filtros específicos, permitindo a visualização de sequências específicas de ácidos nucleicos em cromossomos metafásicos ou no núcleo de células interfásicas no contexto de PML e RARA. Esse estudo pode ser utilizado para determinar a origem clonal da leucemia, monitorar os efeitos do tratamento, detectar a presença de doença residual mínima após o tratamento, identificar a recorrência da doença e detectar anormalidades numéricas cromossômicas, como amplificações ou deleções de genes (Delfino, 2022).

Imunofenotipagem

A imunofenotipagem desempenha um papel crucial no diagnóstico da LPA. Este método utiliza anticorpos monoclonais específicos para identificar e caracterizar as células leucêmicas com base nas proteínas de superfície celular e antígenos presentes. Desta forma, nas leucemias agudas, é possível determinar, através da citometria de fluxo, a linhagem celular, análise de clonalidade e o estado de maturação das células leucêmicas, expressão de padrões de antígenos aberrantes típicos de determinados grupos de leucemias e acompanhamento do tratamento e detecção de doença residual mínima (DRM) (Adams e Nassiri, 2015; Santos e Cordeiro, 2021; Oliveira *et al*, 2023).

Os marcadores imunofenotípicos comumente avaliados na LPA incluem a expressão de antígenos mielóides, como CD13, CD33, CD117, e a ausência ou redução da expressão de HLA-DR (antígeno de diferenciação de células T e células B). Além disso, a análise do antígeno CD34, geralmente negativo ou pouco expresso na LPA, é outro aspecto relevante na imunofenotipagem. Essa abordagem imunofenotípica auxilia os hematologistas a confirmar o diagnóstico da LPA e a distingui-la de LMA e leucemias linfóides. O uso da imunofenotipagem contribui significativamente para uma caracterização mais precisa da leucemia, orientando estratégias terapêuticas e prognósticos mais precisos (Adams e Nassiri, 2015; Santos e Cordeiro, 2021; Oliveira *et al*, 2023).

Biologia molecular – estudos genéticos

A Biologia Molecular desempenha um papel crucial no diagnóstico da LPA. Aqui estão

algumas das principais contribuições da biologia molecular nesse contexto:

- a) **Confirmação da Translocação PML-RAR α :** A característica distintiva da LPA é a translocação cromossômica t(15;17), que resulta na fusão dos genes PML e RAR α . Técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), são frequentemente utilizadas para confirmar a presença desta translocação específica (Khoury *et al*, 2022; Stone *et al*, 2023).
- b) **Quantificação da Carga Leucêmica:** A biologia molecular permite a quantificação precisa da carga leucêmica, ou seja, a quantidade de células leucêmicas no sangue ou na medula óssea. Isso é crucial para avaliar a resposta ao tratamento e monitorar a progressão ou remissão da doença ao longo do tempo (Khoury *et al*, 2022; Stone *et al*, 2023).
- c) **Identificação de Variantes Moleculares:** Além da translocação t(15;17), a biologia molecular pode ajudar a identificar variantes moleculares específicas associadas à LPA. Isso é relevante para uma caracterização mais detalhada da doença e pode ter implicações prognósticas e terapêuticas (Khoury *et al*, 2022; Stone *et al*, 2023).
- d) **Monitoramento de Doença Residual Mínima (DRM):** A detecção de DRM é crítica para avaliar a eficácia do tratamento. Técnicas moleculares sensíveis, como a PCR em tempo real, são empregadas para identificar traços mínimos de células leucêmicas após a conclusão da terapia (Khoury *et al*, 2022; Stone *et al*, 2023).
- e) **Determinação de Mutações Adicionais:** A análise molecular pode ajudar a identificar mutações adicionais em genes específicos associados à LPA. Essas mutações podem influenciar o prognóstico e, em alguns casos, orientar a escolha de terapias específicas direcionadas (Khoury *et al*, 2022; Stone *et al*, 2023).

Com base nas informações fornecidas pela biologia molecular, é possível aplicar estratégias terapêuticas personalizadas, com a escolha de tratamentos específicos e a adaptação do plano terapêutico conforme necessário (Khoury *et al*, 2022; Stone *et al*, 2023).

4 CONCLUSÃO

A LPA é uma doença de rápida progressão, mas com ótimo prognóstico quando identificada e tratada precocemente. A partir desse estudo, pôde-se realizar uma revisão geral e importante das principais características da LPA e do curso da doença, desde sua epidemiologia ao seu tratamento, caracterizando uma fonte para consulta para estudantes, profissionais da saúde e a quem mais desejar, servindo ainda, de base para trabalhos futuros nessa linha.

A capacidade de identificar as células anormais promielocíticas é uma habilidade fundamental para os analistas clínicos, pois desempenha um papel crucial em diagnóstico médico, e na detecção rápida das características da LPA. Isso permite avanços na compreensão da doença e na melhoria da saúde do paciente, visto ao bom prognóstico, quando tratada.

Vale ressaltar que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

ADAMS; NASSIRI. Acute Promyelocytic Leukemia: A Review and Discussion of Variant Translocations. **Arch Pathol Lab Med**, Indianapolis, v. 139, Número, p. 1308-1313, dez. /2015.

BAIN; BÉNE. Morphological and immunophenotypic clues to the WHO categories of acute myeloid leukaemia. **Acta haematologica**, v. 141, n. 4, p. 232-244, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 834, de 05 de setembro de 2014. Diretrizes**

Diagnósticas e Terapêuticas da Leucemia Mieloide Aguda do Adulto. Brasília, 2014.

CELLWIKI. Angel Wings. **CellWiki**. Ano não disponível. Formato: Imagem. Disponível em: <https://www.cellwiki.net/en/aberrations/promyelocytes-angel-wings/>. Acesso em: 07 de novembro de 2023.

CELLWIKI. Faggot Cell. **CellWiki**. Ano não disponível. Formato: Imagem. Disponível em: <https://www.cellwiki.net/en/aberrations/promyelocytes-faggot-cells/>. Acesso em: 07 de novembro de 2023.

DELFINO. Diagnóstico laboratorial da Leucemia Promielocítica Aguda. **Repositório Universitário da Ânima (RUNA)**. 2022.

FERREIRA; FONSECA; RESENDE; SEIWALD; ZOGBI. Leucemia Mieloide Aguda (LMA) em paciente com Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) não tratada previamente: relato de caso. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 44, p. S194, 2022.

HWANG. Classification of acute myeloid leukemia. **Blood research**, v. 55, n. S1, p. S1-S4, 2020. KHOURY; SOLARY; ABLA; AKKARI; ALAGGIO; APPERLEY; HOCHHAUS. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. **Leukemia**, v. 36, n. 7, p. 1703-1719, 2022.

OLIVEIRA; SALES; MEDEIROS; RAMOS; GUIMARAES; SOARES; BARROSO. Comparação do painel Euroflow AML/MDS e Clearlab M1/M2 na citometria de fluxo hematológica para diagnóstico de LMA e SMD: vantagens e desafios. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 45, p. S137, 2023.

PAGNANO; REGO; ROHR; CHAUFFAILLE; JACOMO; BITTENCOURT; BERNARDO. Guidelines on the diagnosis and treatment for acute promyelocytic leukemia. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 36, p. 71-92, 2014.

RESENDE; DA COSTA GILENO; MORAES-SOUZA; CARLOS; LEAL; MARTINS. The Role of Cytochemistry in the Diagnosis of Acute Leukemias. **Int J Med Health Sci Res**, v. 7, p. 290-5, 2017.

SANTOS; CORDEIRO. A imunofenotipagem no diagnóstico da leucemia mieloide aguda. **Revista Brasileira de Biomedicina**, v. 1, n. 1, 2021.

SMIT. Angel Wings. **CellWiki**. Disponível em: <https://www.cellwiki.net/en/aberrations/promyelocytes-angel-wings/>. Acesso em: 07 de novembro de 2023.

SMIT. Faggot Cell. **CellWiki**. Disponível em: <https://www.cellwiki.net/en/aberrations/promyelocytes-faggot-cells/>. Acesso em: 07 de novembro de 2023.

STONE; LILLEY; TANG; LOGHAVI; MIRZA. Phenotypic clues that predict underlying cytogenetic/genetic abnormalities in myeloid malignancies: A contemporary review. **Cytopathology**, 2023.