

PADRONIZAÇÃO DE CRITÉRIOS HEMATOLÓGICOS PARA O AUXÍLIO NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE LEUCEMIAS MIELÓIDES

Miriane da Costa Gileno*
Débora Helena Pereira**
Mariana H.D.Ruggeri**
Marta M.F. Vasques**
Pâmela Alegranci**
Lígia Terezani***
Mariana M. de Castro***

Introdução

As leucemias são um grupo de doenças cuja manifestação em comum é a proliferação maligna intrínseca da medula óssea, podendo envolver qualquer uma das células progenitoras hematopoiéticas. Embora cada tipo de leucemia tenha uma progressão diferente, o clone leucêmico usualmente substitui a população celular normal da medula óssea. Em 1900, as leucemias foram classificadas em crônicas e agudas e envolviam diferentes tipos de glóbulos brancos. Nas leucemias crônicas ocorria um aumento incontrolável na medula óssea e circulação de leucócitos maduros e nas agudas estava envolvida a proliferação de células imaturas, ou blastos (Gunz, 1980).

As leucemias agudas afetam crianças e adultos indistintamente; são caracterizadas por um surto abrupto de sintomas (febre, hemorragia e fraqueza) e a morte pode ocorrer em semanas, ou meses, se o tratamento adequado não for instituído. Os blastos proliferam desordenadamente na medula óssea e constituem pelo menos 30 % das células nucleadas medulares (Bennett et al., 1976). A patogenia mais importante das leucemias agudas é a insuficiência da

*Professora Doutora em Análises Clínicas pela FCF UNESP/Araraquara, responsável pela disciplina Hematologia Clínica do Centro Universitário de Araraquara – UNIARA.

** Alunas do Curso de Biomedicina. Departamento de Ciências Exatas e Naturais. Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara-SP.

***Biomédicas do setor de Hematologia do Laboratório de Análises Clínicas Santa Casa – UNIARA.

medula óssea que ocasiona principalmente: anemia, trombocitopenia (hemorragias) e neutropenia (Kouvides; Bennett, 1992).

As leucemias agudas foram divididas citomorfologicamente, em leucemias mielóides agudas (LMA) e leucemias linfóides agudas (LLA) de acordo com a semelhança morfológica dos mieloblastos e linfócitos imaturos.

As leucemias agudas foram classificadas pelo grupo FAB (Bennett et al., 1985) obedecendo principalmente a critérios morfológicos e citoquímicos da seguinte forma: a) leucemias mielóides agudas (LMA): M0, M1, M2, M3, M4, M5a, M5b, M6 e M7; b) Leucemias Linfóides Agudas (LLA): L1, L2 e L3.

A leucemia mielóide aguda (LMA) é uma doença caracterizada pela proliferação clonal e maturação aberrante de um dos precursores hematopoéticos da linhagem mielóide. Representa cerca de 15-20% das leucemias agudas da infância e 80% das leucemias agudas que ocorrem entre adultos. Na maioria dos casos, não há evidência da influência dos fatores genéticos e raciais, ao contrário da leucemia linfóide aguda.

O diagnóstico morfológico da LMA tem base nas características nucleares e citoplasmáticas e no grau de maturação das células blásticas. Apenas a análise do esfregaço do sangue periférico não é considerada suficiente para o diagnóstico (Martins; Rego; Falcão, 2000).

As reações citoquímicas têm uma grande importância na classificação das leucemias; estas reações revelam uma determinada substância marcadora da série mielóide, linfóide ou monocítica. O exame morfológico e citoquímico dos esfregaços da medula óssea e do sangue periférico permitem o diagnóstico e classificação na maioria dos casos de leucemia (Martins; Rego; Falcão, 2000).

A Mieloperoxidase (E.C. 1.11.1.7, MPO) é uma enzima que contém heme e na presença de peróxido de hidrogênio é efetiva na morte de vários microrganismos, além de exercer uma grande variedade de funções extracelulares (Tobler; Koefler, 1991). A principal fonte dessa enzima são leucócitos polimorfonucleares (PMN), sendo uma enzima específica da série mielóide. Estudos de várias linhagens de células de leucemia mielóide em diferentes estágios de diferenciação confirmaram que a expressão gênica está confinada a linhagem mielóide (Tobler et al., 1988). Portanto, a mieloperoxidase é um marcador específico das células hematopoiéticas mielóides e, sua demonstração em blastos leucêmicos é fator de diagnóstico definitivo para as leucemias mielóides agudas, diferenciando-as das leucemias agudas linfóides (Buccheri et al., 1992). Esse diagnóstico diferencial é essencial para o tratamento adequado do paciente (Buccheri et al., 1992).

As leucemias crônicas são divididas em mielóides e linfóides. Caracterizam-se de uma maneira geral por um grande número de células na corrente circulatória pela evolução rápida da doença, pela presença de toda a linhagem de célula no esfregaço sanguíneo. Sendo que as leucemias linfóides

crônicas são de fácil diagnóstico devido à presença de um grande número de glóbulos brancos no esfregaço especialmente linfócitos complementando a sintomatologia clínica (Pasquini, 2000).

A leucemia mielóide crônica (LMC), laboratorialmente se assemelha bastante com um estado infeccioso grave, sendo assim mais difícil seu diagnóstico. Trata-se de uma expansão clonal da célula progenitora hematopoética, traduzindo-se por hiperplasia mielóide, leucocitose, basofilia e esplenomegalia. A história natural constitui-se inicialmente de uma fase crônica mais prolongada seguida de uma fase acelerada e finalmente, advém a crise blástica habitualmente fatal (Pasquini, 2000).

Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos: 1) padronizar a reação citoquímica da mieloperoxidase, auxiliando no diagnóstico exato das leucemias agudas, acelerando assim o tratamento e encaminhamento médico; 2) padronizar a leitura dos esfregaços com leucocitose e desvio à esquerda, com relação à observação de eosinófilos, basófilos, eritroblastos, promielócitos e mielócitos, para o diagnóstico diferencial de LMC; 3) análise da incidência de Leucemia Mielóide Aguda e Crônica nos pacientes do Laboratório da Santa Casa de Misericórdia de Araraquara – SP.

Materiais e métodos

Amostras: Foram analisadas amostras de sangue colhidas por punção venosa, em tubo contendo K₂EDTA, de 54 pacientes da Santa Casa de Misericórdia de Araraquara - SP de ambos os sexos e sem limite de idade, cujo hemograma se apresentou alterado (presença de blastos ou número elevado de leucócitos com células imaturas), durante o período de Setembro de 2003 à Março de 2005.

Metodologia: Nos casos de leucocitose com células imaturas foram realizados hemogramas completos, com principal atenção para os casos onde se observou a presença de blastos. Além do hemograma completo, foi realizado esfregaço com sangue recém colhido para a realização da reação citoquímica da mieloperoxidase. Nos casos duvidosos para LMC ou Desvio a esquerda, foi realizada a leitura minuciosa dos esfregaços analisando a presença de basófilos, eosinófilos, eritroblastos, promielócitos/ mielócitos e trombocitose.

A mieloperoxidase é uma enzima encontrada nos grânulos das células mielóides; a benzidina ou derivados benzidínicos são usados como indicadores de atividades dessa enzima leucocitária. A peroxidase age sobre o peróxido de hidrogênio, liberando o oxigênio; o oxigênio liberado, oxida a benzidina que precipita na forma de grânulo amarelo- pardo. O procedimento é detalhado a seguir:

- A coloração deve ser feita no prazo máximo de 48 horas, após a confecção da lâmina.
- Colocar 1,0 ml de álcool/benzidina sobre a lâmina e esperar 30 segundos.
- Colocar sobre esta, 2,0 ml de água destilada, tomando cuidado para não derramar o outro reagente.
- Assoprar durante 3 minutos.
- Observar a formação de cristais brancos.
- Lavar em água corrente e secar bem.
- Contracorar com Leishman diluído por 10 minutos na proporção de 1:2 em água.

Resultados

Foram avaliados 46 casos de leucocitose. considerou-se LMC os casos que apresentaram positividade para mais de três critérios avaliados (eosinófilo, basófilo, eritroblasto, mielócito e trombocitose), sendo assim, o estudo revelou que 58% dos casos tratava-se de desvio a esquerda e 42% eram Leucemia Mielóide Crônica (Figura 1).

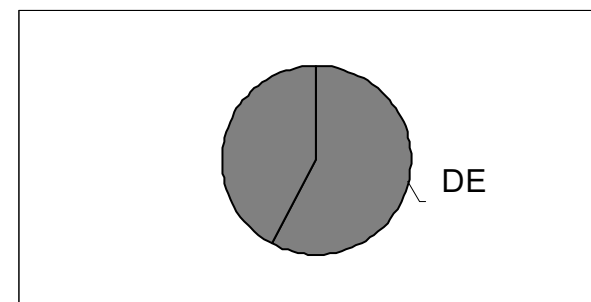


Figura 1. Distribuição dos casos de leucocitose analisados com desvio à esquerda (DE) e Leucemia Mielóide Crônica (LMC).

A padronização da reação da mieloperoxidase foi possível, mediante a análise de 8 casos com suspeita de Leucemia Aguda, dentre os quais 6 apresentaram positividade para a reação citoquímica da mieloperoxidase (evidenciando coloração amarelo-pardo no citoplasma dos blastos – (Tabela 1).

Tabela 1. Estudo de 8 casos de leucemia aguda. Todos os pacientes apresentavam quadro de anemia e plaquetopenia na época do estudo.

| Pacientes | Leucócitos/mm ³ | Blastos (%) | Reação MPO |
|-----------|----------------------------|-------------|------------|
| AF | 5000 | 30 | Negativa |
| JMS | 600 | 5 | Negativa |
| FAZ | 60.900 | 64 | Positiva |
| BPT | 3.000 | 14 | Positiva |
| MJE | 53.400 | 20 | Positiva |
| ATC | 126.000 | 79 | Positiva |
| BCM | 35.100 | 9 | Positiva |
| MM | 10.600 | 57 | Positiva |

Após a análise dos 54 casos estudados no total, observamos a incidência de 4% de Leucemias Agudas não Mielóides, 11% de Leucemias Mielóides Agudas, 19% de Leucemias Mielóides Crônicas e 50% de Desvio à Esquerda relatados no período de Setembro de 2003 à Março de 2005 (Figura 2).

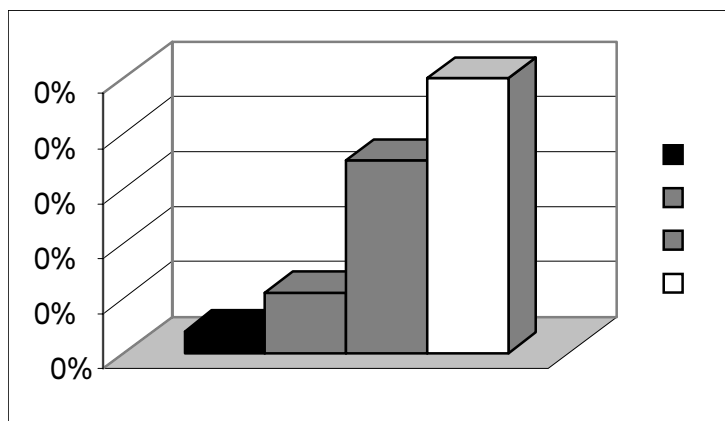


Figura 2. Análise da Incidência de Leucemias Agudas não Mielóides (LA), de Leucemias Mielóides Agudas (LMA), de Leucemias Mielóides Crônicas (LMC) e de Desvio à Esquerda (DE) nos pacientes do Laboratório da Santa Casa de Misericórdia de Araraquara - SP.

Discussão

Após a realização do trabalho chegou-se a conclusão de que é importante realizar um hemograma mais consciencioso no caso de leucocitose, principalmente quando esta se apresentar acima de 20.000 leucócitos/mm³, avaliando sempre os critérios discutidos no trabalho. Observamos que muitas das amostras de leucocitose por nós estudadas apresentou uma contagem diferencial diferente dos profissionais que realizam o hemograma no laboratório, principalmente no que diz respeito a presença de eosinófilos, basófilos e seus precursores e eritroblastos. Observamos também que justamente nestes casos as lâminas estavam mal coradas, onde o certo seria ter confeccionado novo esfregaço e coloração realizando a contagem diferencial novamente.

Analisando nossos resultados podemos concluir que realmente a maioria dos casos de leucocitose que entraram no laboratório tratava-se de desvio a esquerda (59 %), no entanto o número de casos de leucemia mielóide crônica se apresentou bastante alto (41 %), fortalecendo nossa observação de uma análise bastante criteriosa de hemogramas onde se observa leucocitose, principalmente em amostras de sangue de internos.

Observamos que do total de pacientes com alterações hematológicas desde a presença de leucocitose à blastos, que deram entrada no período em que realizamos nosso estudo, (setembro de 2003 à março de 2005) 50%, tratam-se de Leucemias. A utilização da reação citoquímica da mieloperoxidase nos casos suspeitos de leucemia aguda mostrou-se uma importante ferramenta para diferenciar blastos de linhagem mielóide, podendo ser padronizada facilmente em laboratórios de rotina, auxiliando assim no diagnóstico da patologia numa primeira instância. A utilização da reação fica prejudicada somente em casos onde o número de leucócitos e blastos é muito baixo, onde seria interessante incorporar a etapa de separação de células antes da realização da reação. Ressaltamos que a utilização da benzidina como reagente da reação da mieloperoxidase, requer cuidados na manipulação com treinamento do pessoal responsável pela realização do exame, por se tratar de uma substância carcinogênica. Já foi iniciado o processo de treinamento dos profissionais responsáveis pelo setor de Hematologia do Laboratório de Análises Clínicas Santa Casa – UNIARA, introduzindo assim uma nova ferramenta no diagnóstico diferencial de leucemias agudas.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Análises Clínicas Santa Casa – UNIARA e a FUNADESP.

Referências bibliográficas:

- BENNETT, J.M. et al. Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br. J. Haematol.**, v.33, n.4, p. 451-8, 1976.
- BENNETT, J.M. et al. (FAB Cooperative Group). The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia: concordance among observers and clinical correlations. **Br. J. Haematol.**, v.47, n.4, p. 553-61, 1981.
- BENNETT, J.M. et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: a report of the French-American-British cooperative group. **Ann. Intern Med.**, v. 103, n.4, p.620-5, 1985.
- BENNETT, J.M et al. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megacaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British cooperative group. **Ann. Intern. Med.**, v.103, n.3, p.460-2, 1985.
- BUCCHERI V. et al. The role of an anti-myeloperoxidase antibody in the diagnosis and classification of acute leukaemia: A comparison with light and electron microscopy cytochemistry. **Br. J. Hematol.**, v.80, n.1, p.62-8, 1992.
- GUNZ, F.W. The dread leukemias and their prospects. In: WINTROBE, M.M. **Blood Pure and Eloquent: A story of discovery, of people, and ideas.** New York: McBraw-Hill, p.511-16, 1980.
- KOUVIDES, P.A.; BENNETT, J.M. Morphology and classification of mielodisplastic syndrome. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, v.6, p.485, 1992.
- MARTINS S.L.R.; REGO E.M.; FALCÃO R.P. Classificação das leucemias agudas: citologia, citotóxica e imunofenotipagem. In: ZAGO M.A. **Hematologia fundamentos e prática.** São Paulo: Atheneu, 2000.
- PASQUINI R. Mielofibrose Primária (Metaplasia Mielóide Agnogênica). In: ZAGO M.A. **Hematologia fundamentos e prática.** São Paulo: Atheneu, 2000.
- TOBLER, A.; KOEFFLER, P. Myeloperoxidase: localization, structure, and function. In: HARRIS, J.R. **Blood Cell Biochemistry.** New York and London: Plenum Press, v.3, ch.10, p.255-87, 1991.

TOBLER, A. et al. Regulation of gene expression of myeloperoxidase during myeloid differentiation. **J. Cell. Physiol.**, v.136, p.215-225, 1988.

Resumo:

As leucemias são um grupo de doenças cuja manifestação em comum é a proliferação maligna de células hematopoiéticas na medula óssea; o clone leucêmico usualmente substitui a população celular normal da medula óssea. O presente trabalho teve como objetivos: 1) padronizar a reação citotóxica da mieloperoxidase, auxiliando no diagnóstico exato das leucemias agudas, acelerando assim o tratamento e encaminhamento médico; 2) padronizar a leitura dos esfregaços com leucocitose e desvio à esquerda, com relação à observação de eosinófilos, basófilos, eritroblastos, promielócitos e mielócitos, para o diagnóstico diferencial de LMC; 3) análise da incidência de Leucemia Mielóide Aguda e Crônica nos pacientes do Laboratório da Santa Casa de Misericórdia de Araraquara – SP.

Foram analisadas amostras de sangue de 54 pacientes da Santa Casa de Misericórdia de Araraquara-SP, cujo hemograma se apresentou alterado (presença de blastos ou número elevado de leucócitos com células imaturas). Para as amostras que apresentaram blastos em número aumentado, realizou-se a reação citotóxica da mieloperoxidase. Para as amostras com leucocitose os critérios hematológicos avaliados foram: presença de eosinófilos, basófilos, mielócitos, eritroblastos, e trombocitose.

Dos 46 casos de leucocitose avaliados, identificamos que 59 % das amostras tratavam-se de reação leucemóide e 41 % de LMC. A padronização da reação da mieloperoxidase foi possível, mediante a análise de 8 casos com suspeita de Leucemia Aguda, dentre os quais 6 apresentaram positividade para a reação. Após a realização do trabalho chegamos a conclusão de que é importante realizar um hemograma mais consciencioso no caso de leucocitose, avaliando sempre os critérios discutidos no trabalho. A padronização da reação citotóxica da mieloperoxidase nos casos suspeitos de leucemia aguda mostrou-se muito fácil podendo ser utilizada em qualquer laboratório de rotina, o que auxiliaria no diagnóstico diferencial de leucemias agudas mielóides e linfóides, aumentando assim a chance de sobrevivência do paciente.

Palavras-chave:

Mieloperoxidase; Leucemias; Hemograma.