



O USO DA IMUNOFENOTIPAGEM COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA NAS DIFERENTES LEUCEMIAS

THE USE OF IMMUNOPHENOTYPING AS A DIAGNOSTIC TOOL IN DIFFERENT LEUKEMIA

EL USO DE INMUNOFENOTIPAGE COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA EN DIFERENTES LEUQUEMAS

Monique Edwirges Simões Silva¹
Thaila Emilim Aparecida Silva Dias²
Eduarda Ferreira Marques da Costa³
Larissa Vani Marinho de Carvalho⁴
Mônica de Andrade⁵
Simone Bento da Rocha⁶
Renato Dias D'Andrea⁷
André Luis Braghini Sá⁸

DOI: 10.54751/revistafoco.v16n10-044

Recebido em: 01 de Setembro de 2023

Aceito em: 02 de Outubro de 2023



RESUMO

Introdução: A leucemia é definida como uma neoplasia maligna (câncer) que pode acometer todas as faixas etárias e sua origem muitas vezes é desconhecida. Essa doença é classificada de acordo com o grau de maturação celular e a linhagem afetada, podendo ser aguda ou crônica e mielocítica ou linfocítica. **O diagnóstico pode ser feito por vários métodos, contudo, a imunofenotipagem é considerada o padrão-ouro devido a sua alta especificidade e sensibilidade.** É definida pela identificação de subconjuntos de células imunológicas com base na expressão de antígenos em amostras biológicas. O objetivo deste trabalho é destacar a importância da expansão tecnológica das

¹ Graduanda em Biomedicina. Faculdade Una - Campus I. Rua João Basílio, 420, Centro, Pouso Alegre – MG, CEP: 37550-02. E-mail: moniquesimoessilva@gmail.com

² Graduanda em Biomedicina. Faculdade Una - Campus I. Rua João Basílio, 420, Centro, Pouso Alegre – MG, CEP: 37550-02. E-mail: emylym_outlook.com

³ Graduanda em Biomedicina. Faculdade Una - Campus I. Rua João Basílio, 420, Centro, Pouso Alegre – MG, CEP: 37550-02. E-mail: eduardaf8199@gmail.com

⁴ Graduanda em Biomedicina. Faculdade Una - Campus I. Rua João Basílio, 420, Centro, Pouso Alegre – MG, CEP: 37550-02. E-mail: laammarioh@gmail.com

⁵ Graduanda em Biomedicina. Faculdade Una - Campus I. Rua João Basílio, 420, Centro, Pouso Alegre – MG, CEP: 37550-02. E-mail: mkaandrade5@gmail.com

⁶ Graduanda em Biomedicina. Faculdade Una - Campus I. Rua João Basílio, 420, Centro, Pouso Alegre – MG, CEP: 37550-02. E-mail: simonyrocha04@gmail.com

⁷ Mestre em Biotecnologia pela Universidade de São Paulo (USP). Faculdade Una - Campus I. Rua João Basílio, 420, Centro, Pouso Alegre – MG, CEP: 37550-02. E-mail: reddpharma@yahoo.com.br

⁸ Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Faculdade Una - Campus I. Rua João Basílio, 420, Centro, Pouso Alegre – MG, CEP: 37550-02. E-mail: andre.braghini@animaeducacao.onmicrosoft.com

técnicas imuno-oncológicas para aplicações diagnósticas e prognósticas. Métodos: Este artigo foi estruturado a partir de uma **revisão bibliográfica de natureza explicativa**, na qual foi utilizada uma base de dados de artigos publicados em revistas científicas virtuais, como Scielo, Google Acadêmico, PubMed, Frontiers in Oncology e ScienceDirect. Discussão: **A imunoterapia contra o câncer busca entender os mecanismos que resultam na falha no bloqueio do checkpoint e identificar biomarcadores imunológicos preditivos.** Evidencia-se que tais abordagens podem ser aplicadas nas análises do perfil molecular das células, visto que a capacidade de estudar as respostas imunes cresceram, resultando em mais parâmetros celulares simultaneamente em células únicas com uma melhor resolução. **O objetivo maior é usar esses perfis imunológicos celulares para avaliar, caracterizar e definir o quadro clínico do paciente, visando delimitar o melhor tratamento disponível.** Resultados: Sejam as técnicas de imunofenotipagem quantitativas ou qualitativas, sua alta sensibilidade e especificidade para identificação da expressão antigênica desregulada de células revelaram novos insights sobre a biologia do câncer e permitiram que o diagnóstico de malignidades hematológicas, **o estudo de doença residual mínima, a quantificação de tumores circulantes células e a vigilância imune do câncer após o tratamento, tiveram um avanço consistente nos últimos anos.**

Palavras-chave: Imunofenotipagem; citometria de fluxo; leucemia e imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Introduction: Leukemia is defined as a malignant neoplasm (cancer) that can affect all age groups and its origin is often unknown. This disease is classified according to the degree of cell maturation and the lineage affected, and may be acute or chronic and myelocytic or lymphocytic. Diagnosis can be made by various methods, however, immunophenotyping is considered the gold standard due to its high specificity and sensitivity. It is defined by the identification of subsets of immune cells based on the expression of antigens in biological samples. The aim of this work is to highlight the importance of technological expansion of immunoncologic techniques for diagnostic and prognostic applications. Methods: This article was structured from a bibliographic review of explanatory nature, in which a database of articles published in virtual scientific journals such as Scielo, Google Academic, PubMed, Frontiers in Oncology and ScienceDirect was used. Discussion: Cancer immunotherapy seeks to understand the mechanisms that result in failure to block the checkpoint and identify predictive immunological biomarkers. It is evidenced that such approaches can be applied in the analysis of the molecular profile of cells, as the ability to study immune responses has grown, resulting in more cell parameters simultaneously in single cells with better resolution. The major objective is to use these cellular immunological profiles to evaluate, characterize and define the clinical picture of the patient, with a view to delimiting the best available treatment. Results: Whether quantitative or qualitative immunophenotyping techniques, their high sensitivity and specificity for identifying cell-deregulated antigenic expression revealed new insights into cancer biology and allowed the diagnosis of hematological malignancies, the study of minimal residual disease, the quantification of circulating tumors and cells and the immune surveillance of cancer after treatment, to have had a consistent advance in recent years.

Keywords: Immunophenotyping; flow cytometry; leukemia and immunohistochemistry.

RESUMEN

Introducción: la leucemia se define como un neoplasma maligno (cáncer) que puede afectar a todos los grupos de edad y su origen es a menudo desconocido. Esta

enfermedad se clasifica según el grado de maduración celular y la cepa afectada, y puede ser aguda o crónica y mielocítica o linfocita. El diagnóstico puede realizarse por diversos métodos, sin embargo, el inmunofenotipo se considera el patrón oro debido a su alta especificidad y sensibilidad. Se define mediante la identificación de subconjuntos de células inmunológicas basados en la expresión de antígenos en muestras biológicas. El objetivo de este trabajo es resaltar la importancia de la expansión tecnológica de las técnicas inmunoncológicas para aplicaciones diagnósticas y pronósticos. Métodos: Este artículo se estructuró a partir de una revisión de la literatura de naturaleza explicativa, en la que se utilizó una base de datos de artículos publicados en revistas científicas virtuales como Scielo, Google Academic, PubMed, Frontiers in Oncology y ScienceDirect. Discusión: La inmunoterapia contra el cáncer busca entender los mecanismos que resultan en el fracaso en bloquear el punto de control e identificar biomarcadores inmunológicos predictivos. Es evidente que estos enfoques pueden aplicarse en el análisis del perfil molecular de las células, ya que la capacidad de estudiar las respuestas inmunes ha aumentado, dando lugar a más parámetros celulares simultáneamente en células solteras con mejor resolución. El objetivo principal es utilizar estos perfiles inmunológicos celulares para evaluar, caracterizar y definir el cuadro clínico del paciente, con el fin de delimitar el mejor tratamiento disponible. Resultados: Si las técnicas cuantitativas o cualitativas de inmunofenotipificación, su alta sensibilidad y especificidad para la identificación de la expresión antigénica no regulada de las células revelaron nuevas percepciones sobre la biología del cáncer y permitieron el diagnóstico de neoplasias hematológicas, el estudio de la enfermedad mínima residual, la cuantificación de tumores circulantes en las células y la vigilancia inmune del cáncer después del tratamiento, que han tenido un avance constante en los últimos años.

Palabras clave: Inmunofenotipo; citometría de flujo; leucemia e inmunohistoquímica.

1. Introdução

Leucemias são neoplasias hematológicas que acometem os componentes da medula óssea, resultando na alteração dos elementos sanguíneos normocíticos por células leucocitárias neoplásicas. Essas células inibem o crescimento e maturação normal dos precursores linfocitários, eritróides, mieloides e megacariocíticos. À medida que se acumulam na medula óssea, as células leucêmicas suprimem a expansão das células progenitoras hematopoiéticas, levando ao quadro clínico da doença (SILVA, 2020).

As síndromes mielodisplásicas são um grupo heterogêneo de distúrbios clonais hematopoiéticos caracterizados por displasia, insuficiência progressiva da medula óssea e aumento do risco de evolução de leucemias. A abordagem inicial do diagnóstico consiste no exame citomorfológico do sangue periférico e da medula óssea, e embora os critérios de avaliações oncológicas estejam bem

estabelecidos, um pré diagnóstico baseado em achados morfológicos e citogenéticos costuma ter limitações devido a variação de casos clínicos (BONILLA, 2021).

O sistema imunológico conta com mecanismos de defesa contra células anormais, contando com a ação dos receptores de linfócitos, induzindo à destruição das células tumorais, mediado por células citotóxicas, como as células NK e os linfócitos T citotóxicos. Portanto, as células tumorais são capazes de expressar fenótipos que permitem o escape de tais mecanismos, comprometendo o tecido afetado e, conseqüentemente todo o organismo (SILVA J.I.A., 2021). Sendo assim, a imunofenotipagem é a identificação de subconjuntos de células imunológicas com base na expressão de antígenos em amostras biológicas. Ainda que sua finalidade superior seja para o diagnóstico e classificação de malignidades hematológicas, com o avanço tecnológico dos últimos anos, permitiu-se que as suas aplicações se expandissem. Logo, seja essa técnica realizada por citometria de fluxo ou imuno-citoquímica, seu mecanismo primário vem da “*proteômica in situ*” ou seja, estuda a distribuição, abundância, modificações, as interações e as funções de uma ou um grupo de proteínas em uma célula ou organismo.

São utilizados anticorpos monoclonais como reagentes para detecção de cada célula de interesse. A escolha de anticorpos monoclonais se deve a sua especificidade, reação cruzada e reprodutibilidade. O citômetro de fluxo mede as propriedades de dispersão de luz pelas células e a emissão de luz de anticorpos monoclonais associados a fluorocromos ou substância colorida ligados à superfície de uma célula (DIAS C.K., 2022).

Diante disso, esta revisão descreve os avanços recentes, tanto na tecnologia quanto nas aplicações para a análise de neoplasias hematológicas e quais os desafios da implementação e aprimoramento tecnológico das técnicas de imunofenotipagem no pré diagnóstico dos múltiplos casos de leucemias. O objetivo deste trabalho é destacar a importância da expansão do repertório de capacidade de teste para aplicações diagnósticas, prognósticas e terapêuticas.

2. Metodologia

O artigo foi estruturado a partir de uma revisão bibliográfica de natureza explicativa, onde foram utilizados como base de dados artigos nacionais e internacionais publicados em revistas científicas virtuais, como Scielo, Google Acadêmico, PubMed, *Frontiers in Oncology* e ScienceDirect. Foram selecionados artigos entre os anos 2019 e 2023, pesquisados por palavras-chaves como: Imunofenotipagem, leucemias, hematopoiese, leucemia mieloide e leucemia linfóide. Como critério de exclusão, publicações com data inferior a 2019 foram descartadas, em função da necessidade de atualização do tema.

3. Discussão

Atualmente, dois dos objetivos mais importantes na imunoterapia contra o câncer são entender os mecanismos que resultam na falha no bloqueio do checkpoint e identificar biomarcadores imunológicos preditivos que se correlacionam com a resposta ao tratamento, progressão da doença ou efeitos adversos (HARGADON, 2020). Os checkpoints imunológicos são responsáveis por regular a resposta imune, evitando a autoimunidade, por exemplo. O reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T é realizado principalmente pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), presente, por exemplo, em uma célula apresentadora de antígeno, ao Receptor de Célula T (TCR) (DIAS C.K., 2022). A identificação e validação de biomarcadores é realizada por meio das moléculas biológicas, as quais podem ser usadas como indicadores de uma condição biológica ou doença. Podem ser produzidos pelo próprio tecido cancerígeno ou por outras células do corpo em resposta ao câncer. Para uso clínico rotineiro não é apenas crítica para monitorar a doença ou a progressão do tratamento, mas também para personalizar e desenvolver novas terapias. Para atingir esses objetivos, ferramentas de pesquisa poderosas são necessárias. A citometria de fluxo se destaca como uma das ferramentas analíticas unicelulares mais bem-sucedidas que caracteriza fenótipos de células imunes para monitorar tumores sólidos, malignidades hematológicas, doença residual mínima ou progressão metastática (BONILLA, 2021).

Os métodos de citometria óptica fornecem quantificação automatizada em grande escala de células com base em seus parâmetros ópticos, célula por

célula, pela qual a luz do laser passa pelas partículas no fluxo de amostra, assim, ficando espalhadas e medidas por detectores ópticos. Cada evento ou célula no fluxo produz informações ou parâmetros característicos com base em sua dispersão de luz e/ou propriedades fluorescentes, portanto, os citômetros de fluxo óptico podem fornecer simultaneamente análises multiparamétricas com dados sobre morfologia celular e características químicas (VEMBADI, 2019).

Assim, evidencia-se que as técnicas de imunofenotipagem permitem aos profissionais da área da imuno-oncologia interpretar o perfil molecular das células, estabelecendo um fenótipo individual através da imunomarcagem de antígenos da superfície celular. Nesse contexto, se dá como exemplo que os pontos de bloqueio, denominados como proteínas de “checkpoint” como as moléculas CTLA-4 e PD-1, expressas nas células T ativadas se apresentam como importantes reguladores da ativação dos linfócitos. Ligantes para proteínas de checkpoint podem ser expressos em diferentes células, incluindo as células apresentadoras de antígenos e células tumorais (TEIXEIRA H.C., 2019). Logo, por meio da identificação desses anticorpos monoclonais é possível avaliar, caracterizar e definir o quadro clínico do paciente, visando delimitar o melhor tratamento disponível (BRITO *et. al.*, 2023; SILVA, 2020; BORGES, 2020).

No entanto, a imunoterapia oncológica não apresenta bons resultados em todos os pacientes com câncer, devido à complexidade da dinâmica do sistema imunológico em conjunto com a diversidade de populações celulares que abrange o microambiente tumoral. Portanto, se faz necessário uma melhor caracterização das respostas imunes em pacientes que recebem imunoterapia, para que seja possível trazer à luz das ciências biomédicas, os mecanismos de resistência aos medicamentos (VEMBADI, 2019).

4. Resultados

É posto em prova que, com o avanço tecnológico da esfera de pesquisa científica, a citometria de fluxo expandiu e aprimorou a essência de sua técnica. Atualmente são desenvolvidos estudos na citometria de massa, citometria de fluxo por imagem, citometria genômica e citometria espectral. Assim, a capacidade de estudar as respostas imunes cresceu, resultando em mais

parâmetros celulares simultaneamente em células únicas com uma melhor resolução (BONILLA, 2021).

Sejam as técnicas de imunofenotipagem quantitativas ou qualitativas, sua alta sensibilidade e especificidade para identificação da expressão antigênica desregulada de células revelaram novos insights sobre a biologia do câncer e permitiram que o diagnóstico de malignidades hematológicas, o estudo de doença residual mínima, a quantificação de tumores circulantes células e a vigilância imune do câncer após o tratamento, tivesse um avanço consistente nos últimos anos.

5. Conclusão

Perante a padronização metodológica da imunofenotipagem pelo uso de qualquer tipo de tecnologia de citometria óptica para estudos longitudinais de imunoterapia contra o câncer é necessário que seja desenvolvido protocolos reprodutíveis no espectro da imuno oncologia. Em relação à luz da reprodutibilidade destas técnicas, alguns objetivos devem ser alcançados como etapas claras do fluxo de trabalho do equipamento, desde o design experimental até a manipulação/aquisição de amostras e análise de dados para que se obtenha resultados confiáveis. Assim, múltiplos desafios podem ser enfrentados durante a implementação da citometria em estudos de monitoramento imunológico, seja pela subjetividade da análise ou pelo controle de qualidade, até a falta de consistência dos protocolos de uso, assim como na análise e interpretação de dados. O objetivo maior é expandir os dados sobre esses perfis imunológicos celulares como biomarcadores para que seja viável identificar tratamentos sucedidos e orientar as decisões terapêuticas para pacientes com câncer.

REFERÊNCIAS

BONILLA, D. L.; REININ, G.; CHUA, E. **Citometria de fluxo de espectro total como uma tecnologia poderosa para pesquisa de imunoterapia contra o câncer**. Frente. Mol. Boschi. 7:612801, volume 7; 2020. doi: 10.3389/fmolb.2020.61280.

BORGES, Rayssa. **A importância da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico e monitoramento das leucemias linfoides agudas.** 2020. Trabalho de conclusão de curso - Graduação em medicina, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, GO. 2020.

BRITO, J. L. C. *et al.* **Análise dos Critérios Imuno fenotípicos por Citometria de Fluxo para Definição das Doenças Linfoproliferativas Crônicas de Células B.** Revista Brasileira de Cancerologia, [S. l.], v. 69, n. 1, p. e-072734, 2023. DOI: 10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.2734.

DIAS, C. KEHL. **Avaliação imunobioquímica de células com diferentes perfis de ciclagem em leucemias agudas.** Lume Repositório Digital. www.lume.ufrgs.br, 2022.

HARGADON, Kristian M. **Tumor microenvironmental influences on dendritic cell and T cell function: A focus on clinically relevant immunologic and metabolic checkpoints.** Clinical and Translational Medicine, v. 10, n. 1, p. 374-411, 2020.

SILVA, Alessandra S. J. **Estudos do diagnóstico, classificação e avaliação prognóstica das Leucemias Linfóide Aguda no Rio Grande do Norte pela tecnologia de imunofenotipagem por citometria de fluxo.** 2020. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020.

SILVA, João Ivysson Assunção. **Análise Do Perfil Sociodemográfico E Clínico de Pacientes Submetidos a Imunoterapia Contra O Câncer Com Anticorpos Monoclonais Na Liga Mossoroense de Estudos E Combate Ao Câncer.** Repositorio.ufersa.edu.br, 19 Nov. 2021.

TEIXEIRA H.C.; DA SILVA Dias L.; MENÃO T.L.; ESTEVES de Oliveira E. **Proteínas de checkpoint imunológico como novo alvo da imunoterapia contra o câncer: revisão da literatura.** hu rev [Internet]. 28º de novembro de 2019.

SEMBADI, A.; MENACHERY, A.; QASAMEH, M. A. **Cell cytometry: Review and perspective on biotechnological advances.** Frontiers in bioengineering and biotechnology, v. 7, p. 147, 2019.