

Leucemia promielocítica aguda: avaliação dos testes diagnósticos entre o período de 2000 e 2018 em um hospital público

Acute promyelocytic leukemia: evaluation of diagnostic tests from 2000 to 2018 in a public hospital

Aline C. Hey; Ana Paula Azambuja; Yara Carolina Schluga; Elenaide C. Nunes; Rodrigo Miguel Bendlin; Valderez R. Jamur

Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil.

RESUMO

Introdução: A leucemia promielocítica aguda (LPA) é causada pela translocação $t(15;17)(q24;q21)$, cujo produto é a oncoproteína de fusão PML-RAR α (leucemia promielocítica-receptor alfa do ácido retinoico). A morfologia dos promielócitos leucêmicos é habitualmente característica, com presença de faggot cells (células em maços ou feixes) e granulações citoplasmáticas grosseiras; o imunofenótipo é característico na maioria dos casos. Porém, o diagnóstico laboratorial definitivo deve ser feito pela detecção da $t(15;17)$ ou pela oncoproteína PML-RAR α . **Objetivos:** Comparar a citomorfologia, a citometria de fluxo e a citogenética clássica de amostras de medula óssea de pacientes com LPA atendidos no Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR), bem como descrever as possíveis discrepâncias entre as metodologias. **Método:** Análise retrospectiva dos casos de LPA atendidos no CHC-UFPR entre janeiro de 2000 e julho de 2018. **Resultados:** Dos 88 pacientes (42 homens e 46 mulheres; média de idade: 34 anos), 42,1% apresentaram prognóstico de alto risco. A citometria de fluxo foi realizada em 83 casos (94,3%); o cariótipo, em 79 casos (89,7%), mas a translocação foi confirmada em apenas 53 (60,2%) casos. Dos 28 pacientes com cariótipo não conclusivo, 14 (15,9%) tinham a presença do transcrito PML-RAR α . No total, 35 pacientes (39,8%) realizaram a pesquisa do gene PML-RAR α por biologia molecular. Quarenta e cinco pacientes (51,1%) obtiveram diagnóstico concordante entre as metodologias (morfologia, citometria de fluxo e citogenética). A sobrevivência global foi de 67% em 4,8 anos, com 29 óbitos. **Conclusão:** A confirmação genética foi realizada em 76,1% das amostras, sendo 60,2% por citogenética e 15,9% por biologia molecular. Houve discordância entre as metodologias e baixa sensibilidade da citogenética convencional, o que demonstra a importância da realização de técnicas moleculares para confirmação diagnóstica.

Unitermos: leucemia promielocítica aguda; citogenética; biologia molecular; citometria de fluxo/citologia.

ABSTRACT

Introduction: Acute promyelocytic leukemia (APL) is caused by $t(15;17)(q24;q21)$ translocation, which product is the fusion oncoprotein PML-RAR α (promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor alpha). The morphology of leukemic promyelocytes is usually characteristic, with the presence of faggot cells and coarse cytoplasmic granulations; immunophenotype is characteristic in most cases. However, definitive laboratory diagnosis should be performed by detecting $t(15;17)$ or by PML-RAR α fusion protein. **Objectives:** To compare cytomorphology, flow cytometry, and classical cytogenetic of bone marrow samples from patients with APL, treated at the Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR), as well as describe the possible discrepancies between the methodologies. **Method:** Retrospective analysis of APL cases treated at the CHC-UFPR from January 2000 to July 2018. **Results:** Eighty-eight patients (42 man/46 woman; mean age: 34 years), 42.1% of them presented a high-risk prognosis. Flow cytometry was performed in 83 cases (94.3%);

karyotype was performed in 79 cases (89.7%), but translocation t(15;17) was confirmed in only 53 cases (60.2%). From the 28 patients with a non-conclusive karyotype; fourteen (15.9%) of them presented the *PML-RAR α* transcript in the molecular analysis. In total, 35 patients (39.8%) performed research of the *PML-RAR α* gene by molecular biology. Only 45 patients (51.1%) presented concordant diagnosis among the three technical exams (morphology, flow cytometry and cytogenetics). Overall survival was 67% at 4.8 years, with 29 deaths. **Conclusion:** Genetic confirmation was observed in 76.1% of samples, 60.2% by conventional cytogenetics and 15.9% by molecular biology. There was a disagreement between the methodologies, and a low sensibility of the conventional cytogenetics, demonstrating the importance of performing molecular techniques for diagnostic confirmation.

Key words: acute promyelocytic leukemia; cytogenetics molecular biology; flow cytometry/cytology.

RESUMEN

Introducción: La leucemia promielocítica aguda (LPA) es causada por la translocación t(15;17)(q24;q21), cuyo producto es la oncoproteína de fusión PML-RAR α (proteína de la leucemia promielocítica-receptor alfa de ácido retinoico). La morfología de los promielocitos leucémicos suele ser típica, con presencia de células faggot (células en bacetas) y gruesas granulaciones citoplásmicas; el inmunofenotipo es característico en la mayor parte de los casos. No obstante, el diagnóstico final de laboratorio debe ser hecho por la detección de la t(15;17) o por la oncoproteína PML-RAR α . **Objetivos:** Comparar la citomorfología, la citometría de flujo y la citogenética clásica de muestras de médula ósea de pacientes con LPA asistidos en el Complejo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR), así como describir las posibles discrepancias entre los métodos. **Método:** Análisis retrospectivo de los casos de LPA asistidos en el CHC-UFPR entre enero de 2000 y julio de 2018. **Resultados:** De los 88 pacientes (42 hombres y 46 mujeres; edad promedio: 34 años), 42,1% presentaron pronóstico de alto riesgo. Citometría de flujo se realizó en 83 casos (94,3%); cariotipo en 79 casos (89,7%), pero la translocación se confirmó en sólo 53 (60,2%) casos. Entre los 28 pacientes con cariotipo no concluyente, 14 (15,9%) presentaron el transcripto PML-RAR α . En total, 35 pacientes (39,8%) realizaron la pesquisa del gen PML-RAR α por biología molecular. Cuarenta y cinco pacientes (51,1%) tuvieron diagnóstico acorde entre los métodos (morfología, citometría de flujo y citogenética). La supervivencia global fue de 67% en 4,8 años, con 29 muertes. **Conclusión:** Hubo confirmación genética en 76,1% de las muestras, siendo 60,2% por citogenética y 15,9% por biología celular. Hubo desacuerdo entre los métodos y baja sensibilidad de la citogenética convencional, lo que demuestra la importancia de la realización de técnicas moleculares para confirmación diagnóstica.

Palabras clave: leucemia promielocítica aguda; citogenética; biología molecular; citometría de flujo/citología.

INTRODUÇÃO

A leucemia promielocítica aguda (LPA) é um subtipo de leucemia mieloide aguda (LMA), com características clínicas, morfológicas e moleculares únicas, descrita pela primeira vez em 1957 por Hillestad⁽¹⁾. A LPA é caracterizada pela presença da translocação t(15;17)(q22;q21)⁽²⁾, que resulta na quebra e fusão do gene da leucemia promielocítica [*promyelocytic leukemia (PML)*], localizado no cromossomo 15, com receptor ácido retinoico alfa [*retinoic acid receptor alpha (RAR α)*], localizado no cromossomo 17. O produto final da translocação é a fusão dos genes que codificam as proteínas híbridas *PML-RAR α* e *RAR α -PML*⁽³⁾, oncoproteínas com sensibilidade à ação retinoide⁽⁴⁾. Essa oncoproteína provoca interrupção da maturação e do acúmulo de células no estágio de promielócitos anormais na medula óssea⁽⁵⁾.

A presença de promielócitos leucêmicos é, ocasionalmente, observada no sangue periférico; no entanto, a análise da medula óssea é essencial para o diagnóstico, principalmente nos casos de pancitopenia grave⁽⁶⁾. A LPA pode se apresentar como morfologia típica, com promielócitos hipergranulares ou na forma microgranular. Na forma hipergranular, o tamanho e a forma do núcleo são irregulares e o citoplasma é marcado por vários grânulos densos, agrupados na forma de bastões de Auer, que caracterizam as células *faggot* (em maço ou feixe). Na forma hipogranular, o núcleo é bilobado e o citoplasma possui pouco ou nenhum grânulo⁽⁷⁾.

Embora o diagnóstico morfológico seja altamente sugestivo de LPA, isso não é suficiente para caracterizá-lo; é necessário o uso de exames complementares como citoquímica, citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) e técnicas de citogenética convencional e molecular. Na análise citoquímica, os promielócitos neoplásicos

marcam fortemente com as reações de mieloperoxidase ou negro de Sudão⁽⁸⁾. O estudo do imunofenótipo pela CFM evidencia a presença de blastos com alta autofluorescência, que expressam marcadores mieloides, como CD117, CD13 e CD33; este último com padrão homogêneo de intensidade de fluorescência, no qual o marcador de células precursoras hematopoiéticas CD34 e o antígeno leucocitário humano (HLA)-DR são geralmente negativos. Diferentemente dos promielócitos normais, os marcadores indicativos de maturidade mieloide CD11b e CD15 são negativos ou de expressão muito baixa. Por ser um método rápido, a CFM reforça a suspeita diagnóstica de LPA e auxilia na indicação terapêutica precoce, mas não é um método adequado para o diagnóstico definitivo, que deve ser realizado por técnicas citogenéticas e moleculares⁽⁹⁾. É importante enfatizar que as três metodologias não são exclusivas, mas complementares para o diagnóstico preciso da LPA.

Embora todos os pacientes com LPA apresentem t(15;17) ou uma variante dessa translocação, com métodos citogenéticos convencionais, essas translocações são detectadas em apenas 70%-96% dos pacientes no diagnóstico. Casos raros de LPA sem a clássica t(15;17)(q21.1;q21.2) em estudos citogenéticos de rotina foram descritos com variantes complexas das translocações, cromossomo adicional ou com inserção submicroscópica de *RARα* na *PML*, levando à expressão de transcrição *PML-RARα*⁽¹⁰⁾.

OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo comparar os resultados obtidos na análise morfológica da medula óssea, no imunofenótipo por citometria de fluxo e na citogenética convencional de pacientes com LPA atendidos no Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR).

METODOLOGIA

Análise retrospectiva de pacientes com diagnóstico morfológico suspeito de LPA tratados no CHC-UFPR entre janeiro de 2000 e julho de 2018.

Os resultados da morfologia da medula óssea, dos citogenéticos clássicos e da CFM foram consultados nos prontuários e os dados comparados, buscando analisar a concordância entre as três metodologias.

A CFM foi realizada no BD FACS Calibur™ utilizando painéis de quatro cores, marcando com as seguintes combinações

de anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e peridina-clorofila-proteína (PerCP) ou ficoeritrina-cianina 5 (PE-Cy5), fluorocromo e alofocianina tandem (APC), direcionados contra antígenos de superfície: CD11b, CD13, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD36, CD38, CD45, CD56, CD64, CD117, CD123, HLA-DR. Além disso, a expressão de MPO, CD79a e CD3 também foi explorada no nível citoplasmático. Após o ano de 2017, FACS Canto II™ foi introduzido e foi realizado o painel Euroflow de oito cores em todos os casos de leucemia.

A citogenética convencional foi realizada conforme descrição de Gus (2011)⁽¹¹⁾. A análise molecular do transcrito *PML-RARα* começou a ser sistematicamente realizada após o ano de 2006, quando o CHC-UFPR entrou no estudo corporativo brasileiro denominado Consórcio Internacional sobre Leucemia Promielocítica Aguda [International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia (IC-APL)]⁽¹²⁾. Após esse ano, todos os pacientes que realizaram análise molecular foram considerados para confirmação da doença.

Seleção de pacientes

Inicialmente, 95 pacientes com diagnóstico citomorfológico suspeito para LPA foram selecionados entre janeiro de 2000 e julho de 2018.

Foram excluídos quatro pacientes que não foram submetidos a citogenética e citometria de fluxo para comparação. Após a revisão morfológica e da citometria de fluxo, outros dois pacientes diagnosticados com LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia e um confirmado como leucemia monoblástica aguda sem outras especificações (SOE) também foram excluídos. Os perfis citogenéticos desses pacientes estão descritos na **Tabela 1**.

Para calcular a sensibilidade e a especificidade da análise citogenética clássica, excluímos os nove casos em que o exame não foi realizado e consideramos os 82 casos restantes (53 casos positivo-verdadeiros, 26 casos falso-negativos e três casos negativo-verdadeiros). Não houve casos falso-positivos nesta coorte.

TABELA 1 – Cariótipo e diagnóstico dos três pacientes excluídos do estudo

| Paciente | Cariótipo | Diagnóstico final |
|----------|---|--|
| 1 | (39~46,XY,del(7)(q22),del(9)(q21),add(19)(p13)[cp16]/idem,Y,-22 [03]) | LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia |
| 2 | 46,XY,de(11)(q23)[2]/46,XY[6] | LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia |
| 3 | 46,XY,del(7)(q32)[3]/47,XY,sl,+8[31] | Leucemia monoblástica aguda SOE |

LMA: leucemia mieloide aguda; SOE: sem outras especificações.

RESULTADOS

Foram avaliados 88 pacientes – 42 homens e 46 mulheres –, com idade mediana de 34 anos (variando de 12 a 78 anos).

Apenas 66% dos casos puderam ser classificados de acordo com o risco prognóstico devido à disponibilidade dos dados. A mediana das plaquetas nesse período foi de $31 \times 10^9/l$ (intervalo de $7 \times 10^9/l$ a $528 \times 10^9/l$), e a dos leucócitos, de $5,48 \times 10^9/l$ (intervalo de $63 \times 10^9/l$ a $122,92 \times 10^9/l$). Como resultado, 11 pacientes (19,3%) foram classificados como de baixo risco; 22 (38,6%), como risco intermediário; e 24 (42,1%), como alto risco.

A análise morfológica da medula óssea ou do sangue periférico foi considerada o padrão-ouro do estudo. Apenas dois casos sem análise da medula óssea foram incluídos, os quais exibiram morfologia sanguínea periférica altamente sugestiva de LPA. Dez casos de morfologia microgranular ou morfologia variante (núcleos em forma de halteres e poucos grânulos citoplasmáticos) foram observados. A análise citoquímica da mieloperoxidase (MPO) foi positiva em todas elas.

Dos 88 pacientes com análise morfológica sugestiva de LPA, 83 realizaram exames de CFM (94,3%) (**Figura 1**).

A análise citogenética convencional foi realizada em 79 casos (89% da amostra), mas a translocação (15; 17) foi confirmada em 53 casos (60,2%). Treze pacientes tinham cariótipo normal e cinco não tinham metáfase para avaliação. Nove pacientes não realizaram o cariótipo, sete deles antes da entrada no estudo do Consórcio Internacional (IC-APL). Esses dados são apresentados na **Figura 2**.

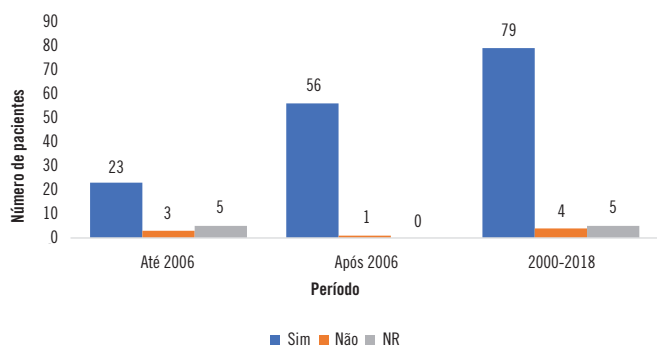


FIGURA 1 – Testes CFM sugestivos de LPA (sim, não ou não realizado), antes e depois de 2006, e no período total do estudo

CFM: citometria de fluxo multiparamétrica; LPA: leucemia promielocítica aguda; NR: não realizado.

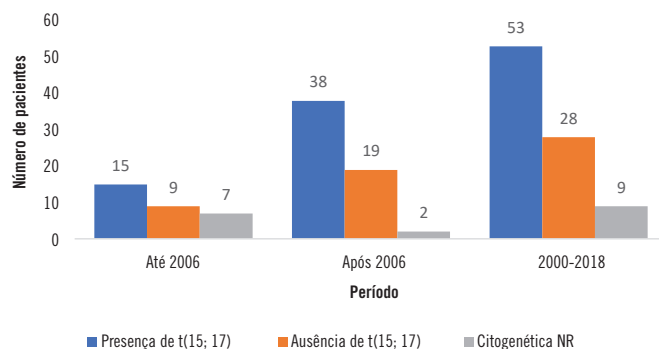


FIGURA 2 – Citogenética convencional de pacientes com translocação t(15;17) presente, ausente ou não realizada antes de 2006, depois de 2006 e no período total do estudo
NR: não realizado.

Como esperado, a especificidade da citogenética clássica foi de 100% nos casos com suspeita morfológica, mas a sensibilidade foi de 67% (53 casos positivo-verdadeiros e 26 casos falso-negativos), quando os casos não realizados foram considerados.

A busca pelo transcrito *PML-RAR α* por biologia molecular foi realizada pelo estudo IC-APL desde dezembro de 2005 em 35 pacientes (39,8%), todos positivos. Em relação aos 26 pacientes com cariótipo não conclusivo, 14 (53,8% dos testados, 15,9% do total de casos) confirmaram a presença do transcrito *PML-RAR α* por análise molecular.

No total, 35 pacientes (39,8%) realizaram pesquisa do gene *PML-RAR α* por biologia molecular, e as amostras foram enviadas para Ribeirão Preto, no estudo IC-APL.

Antes de 2006, foram encontrados sete casos sem análise citogenética, quatro sem metáfase e cinco com cariótipo normal. Após esse período, apenas dois pacientes não realizaram o cariótipo e um caso não apresentou crescimento de metáfases na cultura celular.

Dos pacientes com translocação t(15;17) confirmada, houve alterações citogenéticas adicionais em seis pacientes; destes, dois foram considerados cariótipos complexos. Oito pacientes apresentaram alterações citogenéticas: +8 ($n = 2$), del11q ($n = 1$), del17p ($n = 2$) e cromossomos marcadores ($n = 1$), mas sem translocação t(15;17).

Um caso nesta amostra apresentou a translocação variante t(11;17)(q13;q21), e um caso, translocação tripla t(5;15;17)(q13;q24;q21).

Normalmente, a translocação que envolve os cromossomos 15 e 17 ou suas variantes foi detectada por citogenética convencional em 60,2% dos casos e confirmada por análise molecular em 15,9%, totalizando 76,1% das amostras confirmadas por métodos genéticos nesta coorte. Esses resultados são mostrados na **Tabela 2**.

TABELA 2 – Resultados do cariótipo e da fusão *PML-RAR α*

| Paciente | Cariótipo | Fusão <i>PML-RARα</i> |
|-----------------------------------|--|---|
| 1, 5, 7, 12, 13, 14, 17, 34, e 86 | Não realizado | NR |
| 9, 15, 19, e 29 | Sem metáfase | NR |
| 47 | Sem metáfase | Sim |
| 25 | Cariótipo normal 46,XY[20] | NR |
| 26 | Cariótipo normal 46,XX[15] | NR |
| 31 | Cariótipo normal 46,XX[9] | Sim |
| 33 | Cariótipo normal 46,XX[20] | NR |
| 36 | Cariótipo normal 46,XY[5] | Sim |
| 40 | Cariótipo normal 46,XY[20] | NR |
| 41 | Cariótipo normal 46,XX[21] | NR |
| 60 | Cariótipo normal 46,XX[20] | Sim |
| 63 | Cariótipo normal 46,XY[20] | NR |
| 68 | Cariótipo normal 46,XX[11] | Sim |
| 75 | Cariótipo normal 46,XX[3] | Sim |
| 78 | Cariótipo normal 46,XX[13] | Sim |
| 84 | Cariótipo normal 46,XY[20] | Sim |
| 2 | 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[02] | NR |
| 3 | 46,XY,t(15;17)(q24;q11)[19]/46,XY[1] | NR |
| 4 | 46,XX,t(15;17)(q24;q11)[10] | NR |
| 6 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[13] | NR |
| 8 | 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[19]/46,XY[01] | NR |
| 10 | 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[11]/46,XY[5] | NR |
| 11 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[11] | NR |
| 16 | 46,XY,t(15;17)(q24;q11)[6] / 46,XY[14] | NR |
| 18 | 46,XY,t(15;17)(q24;q11)[4]/46,XY [08] | NR |
| 20 | 46,XY,t(15;17)(q24;q11) [12] / 46,XY [5] | NR |
| 21 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[1]/46,XX[1] | NR |
| 22 | 46,XX,t(15;17)(q24;q11)[3] / 46,XX[20] | NR |
| 23 | 46,XX,t(15;17)(q24;q11)[15]/46,XX[5] | NR |
| 24 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[2]/46, idem, del(1)(p22)[6]/46,XX[2] | NR |
| 27 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[14]/46,XX[6] | NR |
| 32 | 46,XY,t(15;17)(q24;q11)[11]/46,XY[9] | NR |
| 35 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[7]/46,XX[13] | NR |
| 37 | 46,XX,t(15;17)(q24;q11-21)[5]/ 46,XX[11] | Sim |
| 39 | 46,XX, t(15;17)(q24;q21) [18] / 46,XX [2] | NR |
| 42 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[11]/ 46,XX[10] | NR |
| 43 | 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[5]/ 46,XY[9] | Sim |
| 44 | 46,XX,t(15;17)(q24;q11)[14] / 46,XX[6] | Sim |
| 45 | 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[15]/46,XY[5] | Sim |
| 50 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[7]/46,XX[13] | Sim |
| 51 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[20] | Sim |
| 52 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[5]/46,XX[21] | NR |
| 55 | 46,XY[11]/?46,XY,t(15;17)[2] | NR |
| 56 | 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[4]/46,XY[16] | NR |
| 57 | 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[12]/46,XY[8] | NR |
| 62 | 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[13]/46,XY[2] | Sim |
| 64 | 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[15]/46,XY[5] | Sim |
| 65 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[13]/46,XX[4] | NR |
| 66 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[13]/46,XX[1] | Sim |
| 70 | 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[15] | Sim |
| 72 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[5]/46,XX[23] | NR |
| 74 | 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[18]/46,XY[6] | NR |
| 76 | 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[04]/46,XY[03] | |
| 79 | 46,XY,t(15;17)(q24)(q21)[5] | NR |
| 80 | 46,XY,t(15;17)(q24)(q21)[8]/46,XY[11] | Sim |
| 81 | 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[11]/46,XY[4] | Sim |

| | | |
|----|--|-----|
| 82 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[17] | Sim |
| 83 | 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[4]/46,XY[9] | Sim |
| 85 | 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[9]/46,XY[20] | NR |
| 87 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[13]/46,XX[2] | Sim |
| 88 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[19]/46,XY[1] | NR |
| 48 | 46,XX,t(5;11)(q31;q23);t(15;17)(q24;q21)[8]/46,XX[7] | Sim |
| 49 | 46,XY,inv(9)(p12q13),t(15;17)(q24;q21)[20] | Sim |
| 54 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21), add(16)(p?) [20] | NR |
| 67 | 46,XX,t(15;17)(q24;q21)[9]/46,sl,del(11)(q23)[2]/46,XX[9] | Sim |
| 46 | 46,XY,t(15;17)(q24;q21)[6]/47,sl,+8[4]/47,sdl,inv(9)(p11q13)[7]/46,XY[6] | Sim |
| 77 | 46-47,X,-X[11],?t(15;17)(q24;q21)[4],+mar[18],+marX2[3][cp26]/46,XX[2] | Sim |
| 71 | 46,X,?del(X)(q21),?t(5;15;17)(q13;q24;q21),?del(18)(p10)[14] | NR |
| 58 | 44~46,XX,+8,t(11;17)(q13;q21),-14,del(22)(q11)[9]/46,XX[12] | NR |
| 28 | 47,XX,-6,+mar,+21[03]/46,XX,-6,+mar[14] | NR |
| 30 | 46,XX, del(17)(p11) [11] / 46,XX [16] | NR |
| 38 | 46,XX,-E,+mar [7] / 46,XX [14] | NR |
| 53 | 47,XY,+8[9]/46,XY[21] | NR |
| 59 | 46,XY,del(11)(q23)[2]/46,XY[18] | Sim |
| 61 | Complex karyotype 7 and 11 [22]/46,XX[2] | Sim |
| 69 | 47,XY,+8[6]/46,XY[16] | Sim |
| 73 | 46,XY,?del(17)(q24)[5]/46,XY[13] | Sim |

PML-RAR α : gene da leucemia promielocítica-receptor alfa do ácido retinoico; NR: não realizado; sim: positivo.

Houve cinco casos de discordância entre morfologia, citometria de fluxo e citogenética convencional e 32 casos de concordância apenas entre imunofenótipo e morfologia, com cariótipo normal em 13 e ausência de metáfases em cinco. Nove não realizaram cultura e seis realizaram outro cariótipo.

Apenas 45 pacientes (51,1%) apresentaram diagnóstico concordante entre os três exames (morfologia, citometria de fluxo e citogenética convencional) (Figura 3).

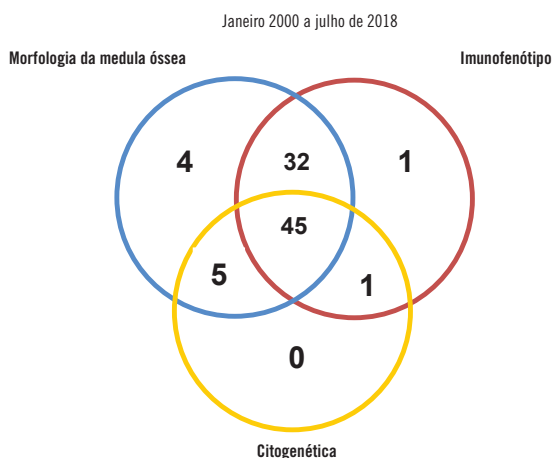


FIGURA 3 – Diagramas relacionados com morfologia da medula óssea, imunofenótipo e citogenética para pacientes diagnosticados de janeiro de 2000 a julho de 2018

Tratamento e acompanhamento

A maioria dos pacientes recebeu terapia com ácido all-trans-retinoico (ATRA) (45 mg/m² por via oral até a remissão completa), iniciada o mais rápido possível após o diagnóstico presuntivo de LPA, com base nas características morfológicas, no imunofenótipo e no julgamento clínico. Entre 2001 e 2006, o protocolo de tratamento baseou-se na combinação de ATRA com quimioterapia (daunorrubicina 60 mg/m² e mitoxantrona 10 mg/m²), seguida de consolidação com transplante autólogo de medula óssea. Após 2006, o protocolo de indução foi substituído pela antraciclina nos dias 2, 4, 6 e 8, associado ao ATRA, de acordo com o algoritmo de tratamento proposto pelo IC-APL, em 2006⁽¹²⁾.

Em um segmento médio de 4,83 anos, 59 pacientes estão vivos com resposta completa (sobrevida global de 67%). Houve 18 mortes precoces (até três meses de terapia) e 11 mortes tardias, sendo seis mortes por recaída confirmada. Quatorze das 29 mortes relatadas ocorreram em pacientes de alto risco (48,3%).

DISCUSSÃO

ALPA é um tipo de leucemia causada pela translocação t(15;17)(q24;q21), cujo produto é a oncoproteína *PML-RAR α* . A avaliação clinicomorfológica inicial do LPA é essencial para o início precoce da terapia; no entanto, sabe-se que nem sempre é conclusiva⁽¹³⁾.

A LPA requer atenção especial entre os subtipos de LMA para suas implicações prognósticas e terapêuticas. Com a terapia atual, 70%-80% dos pacientes permanecem livres de doença por pelo menos cinco anos⁽¹⁴⁾. Pacientes com proteína de fusão *PML-RARα* apresentam coagulopatia; 40% deles desenvolvem sangramento grave, como pulmonar e cerebral, que pode ser letal⁽¹⁵⁾. Devido a essa complicação, a LPA foi, por muitos anos, considerada um dos subtipos mais fatais da LMA. Contudo, com a introdução do ATRA como tratamento, tornou-se a forma mais curável de LMA⁽¹⁶⁾.

O diagnóstico definitivo de LPA deve ser confirmado por técnicas capazes de detectar a translocação t(15;17)(q24;q21) ou o rearranjo *PML-RARα*, ou alterações que envolvem o gene *RARα*. Citogenética convencional, hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) são as opções disponíveis. A técnica FISH tem sensibilidade mais baixa que a RT-PCR, mas é mais específica.

O cariótipo convencional tem a vantagem de permitir o diagnóstico de alterações citogenéticas adicionais, no entanto, o tempo de execução é maior e o número e a qualidade das metáfases podem variar⁽⁹⁾. Casos raros de LPA sem a t(15;17)(q24;q21) clássica em estudos citogenéticos de rotina foram descritos com translocações variantes complexas, cromossomos adicionais ou com inserção submicroscópica do *RARα* na *PML*, levando à expressão do transcrito *PML-RARα*⁽¹⁰⁾. Apesar das limitações da técnica, a citogenética parece ter boa especificidade e valor preditivo positivo nessa patologia.

No presente estudo, a translocação t(15;17) ou suas variantes foram confirmadas pela análise citogenética convencional em apenas 60,2% da amostra (53 casos), e 14 (15,9%) pacientes adicionais com cariótipo inconclusivo puderam ser confirmados pela presença do transcrito *PML-RARα* por análise molecular. No total, 76,2% das amostras dessa coorte foram confirmadas por métodos genéticos. Esse resultado é semelhante ao obtido por Berger e Coniat (2000)⁽¹⁰⁾, em que 62,8% dos 121 pacientes estudados apresentaram essa alteração citogenética. Como esperado, a especificidade da citogenética clássica foi de 100% neste estudo, mas a sensibilidade foi bastante baixa (67%). Segundo a literatura, a translocação t(15;17) está presente em até 90% dos casos em alguns estudos⁽¹⁷⁾. O baixo percentual de detecção de translocação na citogenética convencional pode ocorrer devido à limitação da técnica, uma vez que a análise pode ser realizada em células que não pertencem ao clone neoplásico (clone normal), podendo haver dificuldades em identificar a translocação, ou

mesmo em razão da presença de rearranjos enigmáticos que mascaram a translocação^(14,17).

Neste estudo, em cinco casos, não houve sucesso na obtenção da metáfase; quatro deles ocorreram antes de 2006. Além disso, o grande número de testes não realizados (sete casos antes de 2006 e dois casos após essa data) pode ser explicado pela ausência de um protocolo rígido para avaliação e acompanhamento dos pacientes até esse período. A associação com o IC-APL⁽¹²⁾, estabelecida no final de 2005, poderia contribuir para o aprimoramento das ferramentas de diagnóstico e para o melhor prognóstico em nossa instituição, uma vez que foi implementada uma abordagem padronizada para um diagnóstico específico e imediato, além de mudanças no tratamento, medidas de apoio e acompanhamento dos casos. Foi possível observar um aumento no diagnóstico conclusivo a partir do ano de 2006, quando o protocolo IC-APL foi introduzido no nosso hospital. Houve uma melhora significativa de diagnóstico correto para a doença devido ao estabelecimento do fluxo correto dos testes diagnósticos a serem realizados, resultando em diminuição no número de exames que não foram processados e em um aumento no diagnóstico conclusivo, principalmente por conta da implantação do transcrito *PML-RARα* por biologia molecular.

Aproximadamente 30% a 40% dos pacientes com LPA podem ter alterações citogenéticas adicionais além da t(15;17). Os mais frequentes são trissomias dos cromossomos 8 e 21, anormalidades estruturais no cromossomo 9 e isocromossomo 17q⁽⁸⁾. Neste estudo, foram encontrados dois casos com trissomia do cromossomo 8 e um caso com deleção no braço longo do cromossomo 17.

Ademais, em cerca de 2% dos casos, o gene *RARα* pode ser fundido com outro gene que não o *PML*, sendo a proteína com dedos de zinco da leucemia promielocítica (PLZF) resultante da t(11;17)(q23;q21), nucleofosmina (NPM) resultante da t(5;17)(q35;q21) e aparelho mitótico nuclear (NuMA) resultante da t(11;17)(q13;q21)⁽¹⁸⁾. Translocações complexas com mais de dois cromossomos também podem ser encontradas, com 33 casos comprovados relatados na literatura desde o ano de 2009⁽¹⁹⁾. Neste estudo, foram encontradas duas translocações variantes: a translocação t(11;17)(q13;q21) em um caso e a t(5;15;17)(q13;q24;q21) em outro.

A imunofenotipagem por citometria de fluxo tem sido útil para distinguir a LPA de outros tipos de LMA, uma vez que a ausência de expressão dos marcadores HLA-DR e CD34 é característica, mas não específica da LPA⁽²⁰⁾. A LMA com mutações *FLT3* e *NPM*

são exemplos de outras doenças que também podem apresentar negatividade para esses marcadores⁽²¹⁾. Essa diferenciação é bastante importante porque essa técnica pode ajudar a orientar a terapia específica para a doença, aumentando a taxa de sobrevida do paciente com LPA. Em nosso estudo, houve três pacientes cujo diagnóstico integrado entre morfologia, CFM e citogenética foi essencial para a exclusão de LPA.

A análise da classificação de risco baseou-se na classificação realizada por Cingam e Koshy (2017)⁽²²⁾. A maioria dos pacientes deste estudo foi classificada como de alto risco (41,1%), risco intermediário (39,3%) ou baixo risco (19,3%). Esse resultado foi diferente do encontrado em centros europeus, que apresentam maior prevalência de pacientes de risco intermediário (55,5%), seguidos por pacientes de baixo risco (37,8%) e, por último, pacientes de alto risco (16,7%)⁽²³⁾. A sobrevida global foi de 67%

em cinco anos, mas quase metade das 29 mortes relatadas ocorreu em pacientes de alto risco, o que indica a importância dessa classificação na avaliação prognóstica da doença.

CONCLUSÃO

A translocação envolvendo os cromossomos (15;17)(q24;q21) ou suas variantes, foi detectada em 60,2% dos pacientes com suspeita de LPA, através da citogenética convencional, e em 15,9% dos casos pela análise molecular.

Houve discordância entre morfologia, citometria de fluxo e citogenética, e uma baixa sensibilidade do cariótipo convencional, demonstrando a importância da realização de técnicas moleculares para confirmação diagnóstica.

REFERÊNCIAS

- Roldan CJ, Haq SM, Miller AH. Acute promyelocytic leukemia; early diagnosis is the key to survival. *Am J Emerg Med.* 2013; 31(8): 1290-1. PubMed PMID: 23702072.
- Rowley J, Golomb H, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet.* 1977; 1(8010): 549-50. PubMed PMID: 65649.
- Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus. *Nature.* 1990; 347(6293): 558-61. PubMed PMID: 2170850.
- Grignani F, Ferrucci PF, Testa U, et al. The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR α fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cells.* 1993; 74(3): 423-31. PubMed PMID: 8394219.
- Muindi J, Frankel SR, Miller Jr WH, et al. Continuous treatment with all-trans retinoic acid causes a progressive reduction in plasma drug concentrations: implications for relapse and retinoid "resistance" in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 1992; 79(2): 299-303. PubMed PMID: 1309668.
- Jácomo RH, Figueiredo-Pontes LL, Rego E. Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. *Rev Assoc Med Bras.* 2008; 54(1): 82-9. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ramb/v54n1/26.pdf>.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. World Health Organization classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2016.
- Leal AM, Kumeda CA, Velloso, EDRP. Características genéticas da leucemia promielocítica aguda de novo. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009; 31(6): 454-62. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v31n6/aop9009.pdf>.
- Orfao A, Chillon MC, Bortoluci AM, et al. The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-RAR α gene rearrangements. *Haematologica.* 1999; 84(5): 405-12. PubMed PMID: 10329918.
- Berger R, Coniat MB. Uneven frequencies of secondary chromosomal abnormalities in acute myeloid leukemias with t(8;21), t(15;17), and inv(16). *Cancer Genet Cytogenet.* 2000; 117(2): 159-62. PubMed PMID: 10704690.
- Gus R. Técnicas de cultura de tecidos para análise citogenética. In: Maluf SW, Riegel M, Schinzel A, et al., editors. *Citogenética humana.* Porto Alegre: Artmed; 2011. p. 54-62.
- Rego EM, Kim HT, Ruiz-Argüelles GJ, et al. Improving acute promyelocytic leukemia (APL) outcome in developing countries through networking, results of the International Consortium on APL. *Blood.* 2013; 121(11): 1935-43. PubMed PMID: 23319575.
- Lock RJ, Virgo PF, Kitchen C, Evely RS. Rapid diagnosis and characterization of acute promyelocytic leukaemia in routine laboratory practice. *Clin Lab Haematol.* 2004; 26(2): 101-6. PubMed PMID: 15053803.
- Sagrillo MR, Cardoso SH, Silva LRJ, et al. Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). *Rev Bras Hematol Hemoter [Internet].* 2005; 27(2): 94-101. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v27n2/v27n2a08.pdf>
- Dekking EH, van der Velden VH, Varro R, et al. Flow cytometric immunobead assay for fast and easy detection of PML-RARA fusion proteins for the diagnosis of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia.* 2012; 26(9): 1976-85. PubMed PMID: 22948489.
- Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood.* 2008; 111(5): 2505-15. PubMed PMID: 18299451.
- Ramchandren R, Jazaerly T, Bluth MH, Gabali AM. Molecular diagnosis of hematopoietic neoplasms: 2018 update. *Clin Lab Med.* 2018; 38(2): 293-310. PubMed PMID: 29776632.

18. Sainy D, Liso V, Cantù-Rajnoldi A, et al. A new morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLZF/RARA gene rearrangements. *Blood*. 2000; 96(4): 1287-96. PubMed PMID: 10942370.
19. Abe S, Ishikawa I, Harigae H, Sugawara T. A new complex translocation t(5;17;15)(q11;q21;q22) in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008; 184(1): 44-7. PubMed PMID: 18558288.
20. Oelschlaegel U, Mohr B, Schaich M, et al. HLA-DRneg patients without acute promyelocytic leukemia show distinct immunophenotypic, genetic, molecular, and cytomorphic characteristics compared to acute promyelocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2009; 76(5): 321-7. PubMed PMID: 19291801.
21. Kussick SJ, Stirewalt DL, Yi HS, et al. A distinctive nuclear morphology in acute myeloid leukemia is strongly associated with loss of HLA-DR expression and FLT3 internal tandem duplication. *Leukemia*. 2004; 18(10): 1591-8. PubMed PMID: 15343344.
22. Cingam SR, Koshy NV. Cancer, acute promyelocytic leukemia (APL, APLM). PubMed PMID: 2908325. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2908325>. [Acesso em: 2 dez 2018].
23. Crespo-Solis E, Contreras-Cisneros J, Demichelis-Gómez R, et al. Survival and treatment response in adults with acute promyelocytic leukemia treated with a modified International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia protocol. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2016; 38(4): 285-90. PubMed PMID: 27863754.

AUTOR CORRESPONDENTE

Aline Carvalho Hey  0000-0002-5575-7807
e-mail: linechey@gmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.