

Curso Pós-Graduado de Atualização em Neoplasias Linfóides

DECORREU NOS DIAS 16 E 17 DE FEVEREIRO NA FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA O XXV CURSO PÓS-GRADUADO DE ATUALIZAÇÃO EM NEOPLASIAS LINFÓIDES, SOB A COORDENAÇÃO DA **PROF.^a DOUTORA LEONOR CORREIA** E DA **DR.^a MARGARIDA SILVEIRA**. AMBAS DERAM AS BOAS-VINDAS AOS PARTICIPANTES, NUM EVENTO QUE VISOU A ATUALIZAÇÃO DA NOMENCLATURA DOS TUMORES DO TECIDO HEMATOPOIÉTICO E LINFÁTICO, BEM COMO ASPETOS RELACIONADOS COM O ESTADO ATUAL DO DIAGNÓSTICO E DA TERAPÊUTICA DAS NEOPLASIAS DO TECIDO LINFÓIDE. AS PALESTRAS DAS ORGANIZADORAS DERAM INÍCIO AO CURSO, CUJAS COMUNICAÇÕES PARTILHAMOS AQUI NA “HEMATOLOGIA E ONCOLOGIA”.



O alinhamento do primeiro dia compreendeu também uma dupla palestra do Dr. José Pedro Carda dedicada sobre à leucemia linfoblástica e à leucemia linfocítica crónica. Seguindo-se um “Laboratório de Hematologia”, versando sobre “Neoplasias das células linfóides: Interpretação e análise de citogramas e de histogramas obtidos em contadores hematológicos” e “Leucemias linfoblásticas.

Execução de fórmulas leucocitárias. Interpretação e discussão dos resultados obtidos para os casos clínicos em estudo”, contando com as intervenções do Dr. José Luis Gominho e das Dr.^{as} Felisbela Abreu, Rita Gonçalves e Vera Correia. Foram abordados os temas “Mieloma múltiplo: Estado da arte” e “Gamopatias monoclonais. Utilidade dos imunoensaios Freelite e Heavylite”, com comunicações

do Dr. Manuel Neves e Dr.^a Sónia Neto, respetivamente. O segundo dia do curso, dia 17, abriu com a intervenção da Dr.^a Daniela Alves sobre “Linfomas: Presente e futuro” e da Dr.^a Paula Gameiro, intitulada “Contributo da Biologia Molecular para o diagnóstico de neoplasias linfóides”. Seguindo-se novo “Laboratório de Hematologia”, com o painel formativo do primeiro laboratório, onde

se abordaram “Neoplasias linfóides de células maduras: Leucemias, linfomas e mielomas” e se realizou uma observação e análise de esfregaços de sangue periférico e de medula óssea.

CITOLOGIA DAS CÉLULAS LINFÓIDES

A linfocitopoiese é o processo de formação dos linfócitos e, nos adultos, em



PROF.ª DOUTORA LEONOR CORREIA

condições normais, decorre predominantemente na medula óssea, tal como a formação das outras células hematopoiéticas. A hematopoiese é o conjunto dos mecanismos responsáveis pela produção, substituição contínua altamente regulada e diferenciação dos diferentes tipos de células do sangue. As células progenitoras hematopoiéticas, multipotentes e imaturas, diferenciam-se progressivamente em progenitores específicos das diferentes linhagens sanguíneas, antes de originar as células maduras. O controlo da proliferação, diferenciação e maturação destas células é feito através de interações moleculares complexas com o microambiente medular, cuja composição é complexa e do qual fazem parte citocinas, que controlam a mitose e a diferenciação. Nos processos neoplásicos ocorrem alterações moleculares, capazes de induzir um novo comportamento biológico das células, bem como de alterar os seus mecanismos de adesão. *A interação das células leucémicas, com moléculas da matriz extracelular da medula*

óssea, pode ser um dos mecanismos utilizados por essas células para chegar ao sangue periférico. De salientar também o importante papel das células endoteliais e das moléculas de adesão em todo o processo. Os linfócitos têm origem nos seus precursores medulares e diferenciam-se nos órgãos linfoides. Os linfócitos da medula óssea e do timo migram por via sanguínea, através de vénulas pós-capilares, para os gânglios,

Nos processos neoplásicos ocorrem alterações moleculares, capazes de induzir um novo comportamento biológico das células, bem como de alterar os seus mecanismos de adesão

tecido não encapsulado e baço. Os linfócitos voltam ao sangue periférico pelo sistema linfático eferente e canal torácico. A duração de uma circulação completa é de cerca de 10 horas e a maioria (70–80%) dos linfócitos sanguíneos são T. Alguns linfócitos têm tempos de vida prolongados, podendo sobreviver como células de memória.

Consoante a sua fase de diferenciação, os linfócitos apresentam diferentes características morfológicas e imunofenotípicas e podem ser classificados em linfoblastos, prolinfócitos, e linfócitos.

Os linfoblastos são as células mais imaturas desta linhagem, têm 15–20 μ de diâmetro, núcleo redondo ou oval com cromatina fina, geralmente apresentam um ou dois nucléolos, citoplasma pouco abundante e bem delimitado, por vezes basófilo, e sem granulações.

Os prolinfócitos têm 9–15 μ de diâmetro, nucléolos menos pronunciados do que os linfoblastos e citoplasma ligeiramente basófilo. A existência de mais 55% de prolinfócitos em circulação é sugestiva de leucemia prolinfocítica.

Os pequenos linfócitos têm caracteristicamente 6–9 μ de diâmetro, núcleo redondo ou oval (por vezes reniforme), cromatina muito densa (por vezes em blocos), citoplasma fino e escasso e geralmente não têm granulações, mas quando as apresentam têm disposição assimétrica e são azurófilas. Os linfócitos pequenos são muito comuns nas leucemias linfocíticas crónicas (LLC), que afetam sobretudo homens adultos com idade avançada (>60 anos). Há uma heterogeneidade significativa, entre indivíduos, no número de glóbulos brancos observados nesta condição. Na LLC,

Medula óssea

- > Osso: osteoblastos, osteoclastos, osteóide;
- > Estroma: vasos, fibroblastos reticulina, gordura, ferro;
- > Tecido hematopoiético: séries granulocítica, eritrocitária, megacariocítica, monocítica e linfocítica;
- > Outras células: plasmócitos, macrófagos, mastócitos.

os linfócitos geralmente expressam CD5, CD19 e CD23. Na LLC observa-se uma leucocitose elevada à base de linfócitos maduros.

Os linfócitos estão envolvidos na resposta imunitária. As células B têm a capacidade de se transformar em plasmócitos e são responsáveis pela produção dos anticorpos. A imunidade humoral depende essencialmente das células B, já as células T estão fortemente implicadas na resposta celular. Os linfócitos T granulares possuem grânulos azurófilos que são tipicamente assimétricos e ricos em enzimas líticas. Do ponto de vista morfológico não é possível distinguir linfócitos T e B. Para essa distinção tem que se recorrer a imunofenotipagem.

Quando são ativados por estímulos antigénicos, os linfócitos podem aumentar de tamanho, apresentar nucléolos e basofilia no citoplasma, podendo ser designados de imunoblastos. Os linfócitos ativados são relativamente frequentes nas viroses, particularmente na mononucleose infecciosa. Segundo a Prof.ª Doutora Leonor Correia, “aproximadamente 10% dos linfócitos circulantes não apresentam os marcadores

clássicos de linfócitos T ou B. São os linfócitos *natural killer* (NK), que partilham funções com as células T citotóxicas e os macrófagos ativados, libertando substâncias capazes de induzir a apoptose de células neoplásicas ou infetadas por vírus”, explicou. Os plasmócitos são os elementos terminais da linhagem B e são células que já não apresentam imunoglobulinas de membrana, apenas intracelulares. Têm um citoplasma muito basófilo com uma zona perinuclear clara, um núcleo excêntrico e com cromatina condensada. No mieloma múltiplo, os plasmócitos não aparecem de forma significativa na circulação sanguínea. No entanto, podem ser encontrados no mielograma em valores superiores a 10%. Havendo mielomas em que a plasmocitose medular é superior a 90%. “Os plasmócitos podem ter formas de apresentação atípicas, como as ‘células de Mott’ ou em mórula (que apresentam vacúolos correspondentes a depósitos de imunoglobulina), os plasmócitos em chama (típicos dos mielomas a IgA) e os plasmócitos multinucleados (cuja presença confere mau prognóstico), explicou a Prof.^a Leonor Correia. Os linfoplasmócitos possuem algumas características do linfócito e do plasmócito e surgem em patologias, como a macroglobulinemia de Waldenstrom ou linfoma linfoplasmocítico. Os tricoleucócitos, ou ‘*hairy cells*’ são células que apresentam prolongamentos no citoplasma. “Podem ser visíveis nos esfregaços sanguíneos das leucemias a tricoleucócitos típicas (pancitopénicas) ou ou nas suas variantes hiperclulares,

nas quais se apresentam maiores e com mais citoplasma. Os linfócitos vilosos, característicos do linfoma esplénico, têm prolongamentos por vezes semelhantes aos dos tricoleucócitos, embora sejam imunologicamente diferentes. As células de Reed-Sternberg caracterizam o linfoma de Hodgkin. São células de grande dimensão, geralmente binucleadas e com núcleos simétricos, que não existem no sangue periférico pelo que, para se fazer o diagnóstico de linfoma de Hodgkin, é preciso recorrer a biópsia medular ou ganglionar. Encontram-se em ambientes heterogéneos e co-habitam com várias outras células, sendo a definição do subtipo de linfoma de Hodgkin feita com base nas características das outras células do microambiente”, concluiu.

No mieloma múltiplo, os plasmócitos não aparecem de forma significativa na circulação sanguínea. No entanto, podem ser encontrados no mielograma em valores superiores a 10%. Havendo mielomas em que a plasmocitose medular é superior a 90%

TUMORES DO TECIDO HEMATOPOIÉTICO E LINFOIDE (OMS 2016)

Segundo a Dr.^a Margarida Silveira, a classificação da OMS foi “fundamental”, porque “em ciência é necessário classificar. A classificação é a linguagem da Medicina”. Através da classificação, pretende-se a definição da doença reconhecida por médicos com o apoio da tecnologia disponível como uma entidade clínica distinta. “A classificação das neoplasias dos tecidos hematopoiéticos e linfoides da OMS foi atualizada em 2016”, afirmou. Para identificar neoplasias com causas distintas e variáveis, é necessária uma combinação de aspetos morfológicos, imunofenotípicos, genéticos, moleculares e clínicos. “Não há um ‘*gold standard*’ pelo qual todas as doenças são definidas.”

“A classificação das neoplasias dos tecidos hematopoiéticos e linfoides da OMS foi atualizada em 2016”

Exemplos de características distintivas em tumores hematopoiéticos

- > características morfológicas® e.g. bastonetes de Auer;
- > características imunofenotípicas® e.g. CD5+;
- > anomalias genéticas® e.g. gene de fusão BCR-ABL;
- > fatores genéticos de prognóstico® e.g. mutação FLT3-ITD;
- > alvos terapêuticos® e.g. anti-CD20;
- > características clínicas® e.g. idade.

Leucemia mielóide aguda (LMA) com anomalias genéticas recorrentes

- LMA com t(8;21): 5% ® prognóstico favorável
- Leucemia promielocítica aguda (LPA) com t(15;17): 5-8% ® prognóstico favorável
- LMA com inv(16) ou t(16;16): 5-8% ® prognóstico favorável
- 5-8% ® prognóstico favorável
- LMA com inv(3) ou t(3;3) ® prognóstico desfavorável
- LMA com t(9;11) ® prognóstico intermédio
- LMA com t(6;9) ® prognóstico desfavorável



DR.^a MARGARIDA SILVEIRA

“Existem decisões que são básicas: benigno vs maligno; crônico vs agudo; linfóide vs mielóide, esta última com impacto direto na terapêutica. Mas a maioria não o é”, salientou.

Pela citomorfologia é possível “fazer um diagnóstico apenas através da observação da lâmina e distinguir entre síndrome mielodisplásica (SMD), leucemia mielóide aguda (LMA), neoplasias mieloproliferativas (NMP),

leucemias agudas (LA), neoplasias linfóides (NLP), ou linfomas”. Depois deste diagnóstico inicial, é necessário confirmar se a patologia é maligna ou benigna, avaliar o prognóstico e monitorizar a doença. Os valores de referência de leucócitos são uma “informação valiosa na decisão terapêutica”. Com a atualização da classificação, foi definido que “apenas se tratam linfocitoses superiores a $5.0 \times 10^9/L$ ”.

Leucemia mielóide aguda (LMA) – LMA sem outra especificação

LMA com diferenciação mínima : <5%
LMA sem diferenciação: 5-10%
LMA com maturação: 10%
LMA mielomonocítica : 5-10%
LMA monoblástica/ monocítica: <10%
leucemia eritróide aguda: <5%
leucemia megacarioblástica: <5%

As LMA constituíram a “grande alteração da classificação da OMS, na medida em que passaram a incluir as leucemias com anomalias genéticas recorrentes”

As NMP têm “caracteristicamente uma grande quantidade de células na medula óssea, no sangue periférico e nos tecidos. Nas SMD observam-se medulas ricas com sangues periféricos pobres em células. Nas LLA verifica-se um aumento de proliferação sem maturação, tanto na medula como no sangue periférico. Nas NLP, muitas vezes não se observam células na medula, mas sim nos tecidos e, por vezes, no sangue periférico.”

As LMA constituíram a “grande alteração da classificação da OMS, na medida em que passaram a incluir as leucemias com anomalias genéticas recorrentes”.

Existem diferenças de sobrevivência significativas entre as entidades citogenéticas, nomeadamente na LPA, que tinha “muito mau prognóstico há alguns anos e é atualmente a que tem melhores taxas de sobrevivência a 10 anos”, explicou a especialista.

Segundo as recomendações da *European LeukemiaNet* (ELN), as avaliações para um doente com LMA incluem hemograma, mielograma, imunofenotipagem e citogenética, sendo a biópsia óssea e o *screening* dos genes RUNX1-RUNX1T1, CBF-MYH11, PML-RARA ou outros genes de fusão, opcionais. As neoplasias de células linfóides maduras (linfomas não-Hodgkin, LNH) “têm origem nos órgãos linfóides secundários. Resultam da proliferação de linfócitos maduros no sangue periférico, medula óssea, gânglios, baço, placas de Peyer, amígdalas, etc. A medula óssea pode estar ou não infiltrada, podendo também existir as alterações genéticas t(8;14), t(11;14), t(14;18) ou t(8;22). Estas neoplasias mimetizam os estádios de diferenciação e resposta imune normais.”

Estão definidos o linfoma folicular *in situ*, com baixo risco de progressão, e o linfoma folicular pediátrico, com proliferação clonal localizada e excelente prognóstico

Na LLC, a presença de citopenias ou sintomas sugestivos de doença são insuficientes para o diagnóstico perante uma contagem de linfócitos < $5 \times 10^9/L$. “Centros germinativos grandes, confluentes ou com uma fração proliferativa alta são um indicador independente de mau prognóstico, estando reconhecidas mutações com relevância clínica, como TP53, NOTCH1, SF381, ATM e BIRC3.” No linfoma folicular, o panorama mutacional é melhor compreendido “mas ainda não tem impacto clínico”. Estão definidos o linfoma folicular *in situ*, com baixo risco de progressão, e o linfoma folicular pediátrico, com proliferação clonal localizada e excelente prognóstico.

O linfoma de Burkitt é uma neoplasia agressiva com características distintas, a principal das quais é a translocação envolvendo os genes da Ig e c-MYC. Também incluído nas neoplasias de células maduras, o mieloma múltiplo caracteriza-se pela presença de proteína M no soro ou na urina, mais de 10% de plasmócitos monoclonais na



“É de salientar que a distinção entre leucemia e linfoma linfoblástico é arbitrária e baseia-se em critérios clínicos. Infiltração tímica, nodal ou extra-nodal, sem ou com escasso (<25%) envolvimento medular é classificada como linfoma linfoblástico”

medula óssea, hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas. As leucemias linfoblásticas agudas (LLA; neoplasias de células linfóides precursoras) têm origem na medula óssea (precursores linfóides), podem ter proliferação de linfoblastos no sangue periférico ou medula óssea e caracterizam-se por uma medula óssea hiperplásica e presença de alterações

genéticas. Os adultos constituem 20% dos casos e as crianças (<15 anos), 76%. “É de salientar que a distinção entre leucemia e linfoma linfoblástico é arbitrária e baseia-se em critérios clínicos. Infiltração tímica, nodal ou extra-nodal, sem ou com escasso (<25%) envolvimento medular é classificada como linfoma linfoblástico”, explicou a preletora.

São fatores de prognóstico favorável, LLA com hiperdiploidia (>50 cromossomas) e com t(12;21) ETV6-RUNX1 e de prognóstico desfavorável, LLA com t(9;22) BCR-ABL-1 (20-30% em adultos; 5% em crianças) e LLA com hipodiploidia (<44 cromossomas). “Os *outcomes* de doentes com diferentes anomalias cromossômicas também são

distintos, com ETV6-RUNX1 e elevada hiperdiploidia a associar-se a um melhor prognóstico e t(9;22), iAMP21, translocações MLL, 17p anormal e perda de 13q a associar-se a maior risco de recaída, morte ou ambos.”



10 anos de Formação em Hematologia

DESDE 2009 QUE A FACULDADE DE FARMÁCIA DE LISBOA TEM LEVADO A CABO A ORGANIZAÇÃO DE CURSOS DE ATUALIZAÇÃO EM HEMATOLOGIA. EM ENTREVISTA, A **PROF.ª DOUTORA LEONOR CORREIA** PARTILHA OS FUNDAMENTOS DESTAS AÇÕES DE FORMAÇÃO PÓS-GRADUADA.

Hematologia e Oncologia (HO) | Há uma década que a Faculdade de Farmácia continua a investir na organização de cursos de formação pós-graduada em Hematologia. Qual o retorno que têm obtido dos vossos formandos e que vos motiva a continuar?

Prof.ª Doutora Leonor Correia

(LC) | Para nós é sempre um grande prazer organizar estas formações porque temos sempre as inscrições esgotadas e os alunos muito motivados. No início tínhamos, quase exclusivamente, farmacêuticos e ao longo dos tempos estes cursos têm atraído vários alunos com outras formações, sobretudo médicos, mas também alguns técnicos de análises clínicas e de anatomia patológica, biólogos, veterinários e alguns investigadores. Têm também vindo a aumentar a participação de alunos de países lusófonos (Angola, Cabo Verde

e Guiné-Bissau) e também do Brasil, que consideram uma mais-valia os cursos serem apresentados em português. O entusiasmo com que estas formações são sempre acolhidas, o diálogo construtivo que se estabelece, o intercâmbio de conhecimentos, as sugestões e críticas que recebemos são, para nós, um enorme incentivo.

HO | Pensando no desenho programático dos primeiros cursos, qual a evolução mais evidente entre as primeiras edições e o programa destas últimas?

LC | Os programas dos cursos têm variado ao longo dos anos, tendo já sido abordados quase todos os temas mais relevantes da Hematologia e da Oncologia. Os programas são também adaptados às solicitações e às necessidades dos participantes. Assim sendo, temos cursos quase

exclusivamente laboratoriais, mais dirigidos a técnicos e a especialistas em análises clínicas, cursos com maior componente teórica, dirigidos a uma população mais global e heterogénea e cursos com maior componente terapêutica, cujo alvo são os farmacêuticos hospitalares e os médicos.

HO | Que diferenças encontra entre os profissionais que vos procuravam no início do lançamento do curso e o público a que se dirige nos dias de hoje?

LC | As solicitações do início e as atuais são idênticas, até porque os participantes também se renovam. A componente laboratorial continua a ser muito atrativa para a globalidade dos formandos, uma vez que não há muita oferta deste tipo de formação. Como os cursos ultimamente têm tido uma maior visibilidade e o número de frequentadores habituais e não habituais já é elevado (isto porque já fizemos cerca de 50 cursos, uma vez que muitos deles têm tido segundas e terceiras edições), o número de médicos que acorrem aos cursos é bastante elevado, constituindo nestes últimos cursos a população maioritária.

HO | A componente prática das vossas formações permite ajudar a colmatar lacunas de base. Perante a velocidade a que surgem novos conhecimentos e evidências, como têm conseguido acompanhar este ritmo de conhecimento?

LC | Para a conceção destes cursos procuro estar sempre atualizada. Participando regularmente em reuniões científicas nacionais e em congressos e tutoriais internacionais. Também dou apoio a trabalhos de investigação na área e oriento alguns trabalhos científicos. Habitualmente incluo, também, no programa destes cursos, oradores especialistas nas diferentes áreas do conhecimento abordadas.

HO | O que pode ser esperado nas próximas edições?

LC | Os próximos cursos incluirão, certamente, as neoplasias mieloides focando, também, as alterações introduzidas pela classificação da OMS de 2016, bem como a segunda edição deste curso de neoplasias linfóides, uma vez que muitos interessados fizeram pré-inscrição mas não o puderam frequentar por falta de vaga.