

Diagnóstico molecular das leucemias

Molecular diagnosis of leukemias

Jamille Maria Mendes Bezerra¹, Amanda de Oliveira Gomes¹, Rayssa da Silva Fonseca¹, Gabriele Teixeira Marques¹, Edmilson Matias Ferreira de Oliveira¹, Samuel de Souza Frota¹, Pedro Everson Alexandre de Aquino¹.

¹ Universidade de Fortaleza: Fortaleza, Ce, BR.

Palavras-chave

Leucemia
Diagnóstico Molecular
Biologia Molecular
Leucemia Mielóide
Leucemia Linfóide

A leucemia é uma neoplasia hematológica de origem clonal, tendo sua classificação estabelecida entre leucemia linfocítica e leucemia mielóide, podendo se manifestar de forma aguda ou crônica. Os fatores de risco para surgimento de leucemias são as exposições constantes a radiação, terapêutica ou de maneira ocupacional, quimioterapias, associados a um constante tempo de exposição, histórico familiar e anormalidades genéticas. A utilização do diagnóstico molecular para identificação de novas mutações e rearranjos gênicos resultou em estratégias de diagnósticos. Este trabalho apresenta como objetivo realizar uma revisão de literatura baseada na aplicação de diagnóstico molecular para a detecção precoce de leucemias, consequentemente, tratamentos cada vez mais específicos, além de um melhor prognóstico para o paciente. Este é um estudo de revisão bibliográfica, onde foram utilizados sites de busca, como PUBMED, SCIELO e NBCI, através das palavras-chave: Leucemia, Diagnóstico Molecular, Biologia Molecular, Leucemia Mielóide, Leucemia Linfóide. Pesquisados artigos publicados em português, inglês e espanhol; no período entre 2015 e 2020. Foram encontrados 37 artigos em diferentes revistas e plataformas, referentes a diagnósticos de leucemias com os mais diversos métodos, cada um sendo mais específico a um tipo de classe de leucemia. Conclui-se então que o diagnóstico molecular da linhagem linfocítica, é descrito sendo a citometria de fluxo, citogenética e imunofenotipagem como técnicas de custos acessíveis, importantes para confirmação de linhagem e estágio de maturação, com 50% da identificação das aberrações relevantes, e a análise de FISH com 80% de identificação de anormalidades genéticas; a Imunofenotipagem tem grande papel na classificação dos subtipos da LLA; o RT-qPCR é um método de grande sensibilidade e rapidez; as técnicas de sequenciamento NGS são técnicas de alto padrão, custos elevados, porém tendo a melhor abordagem e grande potencial para prever o diagnóstico das leucemias linfocíticas. No que se refere a as leucemias mielóides, as técnicas de WES e WGS continuam sendo a abordagem preferida para analisar as mutações. As técnicas como FISH, imunofenotipagem, citogenética, RT-qPCR, NSG e citometria de fluxo são citadas. Já sobre a LMC foi observado que é usada a técnica FISH.

Keywords

Leukemia
Molecular Diagnosis
Molecular Biology
Myeloid Leukemia
Lymphoid Leukemia

Leukemia is a hematological neoplasm of clonal origin, with its classification established between lymphocytic leukemia and myeloid leukemia, which can manifest itself in an acute or chronic form. Risk factors for the onset of leukemia are constant exposure to radiation, therapeutic or occupationally, chemotherapy, associated with a constant exposure time, family history and genetic abnormalities. The use of molecular diagnosis to identify new mutations and gene rearrangements resulted in diagnostic strategies. This work aims to carry out a literature review based on the application of molecular diagnosis for the early detection of leukemias, consequently, increasingly specific treatments, in addition to a better prognosis for the patient. Search sites such as PUBMED, SCIELO and NBCI were used, using the keywords: Leukemia, Molecular Diagnosis, Molecular Biology, Myeloid Leukemia, Lymphoid Leukemia. Researched articles published in Portuguese, English and Spanish; in the period between 2015 and 2020. 37 articles were found in different magazines and platforms, referring to the diagnosis of leukemia with the most diverse methods, each one being more specific to a type of leukemia class. It is concluded that the molecular diagnosis of the lymphocytic lineage is described as flow cytometry, cytogenetics and immunophenotyping as affordable techniques, important for confirming the lineage and maturation stage, with 50% of the identification of the relevant aberrations, and the analysis FISH with 80% identification of genetic abnormalities; Immunophenotyping plays a big role in the classification of ALL subtypes; RT-qPCR is a method of great sensitivity and speed; NGS sequencing techniques are high-standard, high-cost techniques, but with the best approach and great potential to predict the diagnosis of lymphocytic leukemias. With regard to myeloid leukemias, WES and WGS techniques remain the preferred approach for analyzing mutations. Techniques such as FISH, immunophenotyping, cytogenetics, RT-qPCR, NSG and flow cytometry are cited. Regarding CML, it was observed that the FISH technique is used.

INTRODUÇÃO

A leucemia é uma neoplasia hematológica de origem clonal, tendo seus tipos definidos conforme a citologia celular envolvida e o nível de maturação das células (BRUTUS; CARMO; SOARES, 2019); em consonância, a classificação das leucemias ocorre nas linhagens linfóide e mieloide, podendo se manifestar de forma aguda ou crônica (MORAIS et al., 2017). A diferença entre a forma aguda e a forma crônica ocorre através da perda da capacidade de diferenciação celular devido à rápida progressão na leucemia aguda, enquanto na leucemia crônica há um acúmulo de células diferenciadas funcionais no organismo progredindo de forma lenta (GUIMARÃES, 2015).

Segundo Kantarjian (2018), a pesquisa da leucemia seguia um progresso historicamente lento, porém, recentemente os resultados estão acelerando devido à melhor compreensão da fisiopatologia das diferentes leucemias. Dentre os diversos tipos de leucemias, os quatro tipos mais comuns são: leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crônica (LLC), leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia mieloide crônica (LMC) (SALAH et al., 2019).

Os principais fatores de risco para surgimento de leucemias são as exposições constantes a radiação, seja de origem terapêutica ou de maneira ocupacional, como também quimioterapias, ambos associados a um constante tempo de exposição, histórico familiar, o surgimento de síndromes e anormalidades genéticas (BISPO; PINHEIRO; KOBERTZ, 2020); O contato com produtos químicos sendo benzenos, hidrocarbonetos, pesticidas, formalídeos; e fatores associados ao estilo de vida prejudicial como uso de tabaco e álcool (AWELINO; AGUERA; FERREIRA-ROMANICHEN, 2019). Em concordância com Bernbeck (2009), existe uma apresentação clássica de sintomas ligados à leucemia, sendo eles o cansaço, febre alta, palidez, sinais de sangramento da pele ou mucosas, dor óssea e artralgia.

O diagnóstico parte de uma análise do hemograma do paciente, com associações morfológicas celulares presentes no sangue periférico e no mielograma, podendo tornar-se evidente pelos aspectos clínicos (INCA, 2016). No entanto, somente esta visualização superficial não é suficiente para um diagnóstico seguro; sendo assim, se faz necessário a aplicação de biologia molecular a partir de marcadores celulares presentes na membrana e no citoplasma de cada célula leucêmica.

A utilização do diagnóstico molecular para identificação de novas mutações e rearranjos gênicos resultou em estratégias de diagnósticos e tratamentos terapêuticos superiores. O que levou à utilização de técnicas avançadas de diagnóstico, tais como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional, em tempo real (qPCR), PCR digital e sequenciamento de ácidos nucleicos (4-6) (REIS; VISENTAINER; MACEDO, 2017). Nos últimos anos, foi inserido nos estudos o uso de técnicas de sequenciamento de última geração (NSG) para identificar todas as alterações genéticas hereditárias e somáticas, incluindo sequenciamento de painel genético, exoma, transcriptoma e sequenciamento de genoma completo (ROBERTS; MULLIGHAN, 2015) Todas essas

técnicas são achados de grande importância clínica, a implementação do sequenciamento clínico no manejo da leucemia melhoram o diagnóstico, o monitoramento e a detecção precoce para a administração de terapias precisas (IACOBUCCI; MULLIGHAN, 2017).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o número de novos casos esperados para o ano de 2018 e 2019 no Brasil foi de 5.940 casos em homens e 4.860 em mulheres (INCA, 2018). A leucemia é o câncer infantil mais comum, representando 28% dos casos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020), dessa forma, faz-se importante a identificação dos fatores de risco para a leucemia infantil (ambiental, genética e infecciosa) para haver a redução da carga total da doença (BELSON; KINGSLEY; HOLMES, 2007). A contagem de novos casos esperados para o Brasil em 2020-2022 será de 5.920 em homens e 4.890 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,67 novos casos a cada 100 mil homens e 4,56 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2020).

As técnicas no diagnóstico das leucemias vêm sendo introduzida gradualmente, como na utilização dos exames histológicos descrito na década de 70 e no início da utilização das técnicas fenotípicas nos anos 90, tais avanços significaram na atualização das recomendações da OMS em 2016 para a classificação das neoplasias hematológicas e nelas estão inclusos novos marcadores moleculares e citogenéticos (VIGIL et al., 2018). Sob a perspectiva atual, com o aumento dos determinantes de risco e casos de leucemia, torna-se indispensável o uso de equipamentos e técnicas que tenham uma sensibilidade e precisão para possibilitar um diagnóstico e tratamento eficientes atenuando os danos ao paciente (AZEVEDO, 2013). Diante disso, o objetivo deste trabalho é construir uma revisão de literatura baseada na aplicação de diagnóstico molecular para a detecção precoce de leucemias e, conseqüentemente, tratamentos cada vez mais específicos, além de um melhor prognóstico para o paciente.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente artigo trata-se de uma revisão de literatura integrativa que visa sintetizar uma unificação dos dados de estudos científicos, assim elucidando os diagnósticos das leucemias disponíveis no meio científico. Para a seleção de artigos, foram utilizadas 4 bases de dados: US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed), Scientific Electronic Library Online (SciELO), National Center for Biotechnology Information (NCBI) e livros acadêmicos. Após pesquisas nas bases de dados citadas, foram utilizados 36 trabalhos científicos para compor esta revisão de literatura. As palavras-chave utilizadas foram: Leucemia, Diagnóstico Molecular, Biologia Molecular, Leucemia Mieloide, Leucemia Linfóide.

Os critérios de inclusão para a presente revisão foram: artigos publicados em português, inglês e espanhol; no período entre 2015 e 2020; artigos de revisão de literatura, estudos observacionais e comparativos, estudos clínicos; artigos com resumos disponíveis nas bases de dados descritas acima. Foram utilizados como critérios de exclusão: artigos

duplicados nas bases de dados; artigos que não englobassem LLA, LLC, LMA e LMC. Foram coletadas publicações científicas cujo embasamento seria a importância dos diagnósticos moleculares, imunofenotípicos e citoquímicos, associados ao

perfil genético de pacientes leucêmicos e quais seus tratamentos mais específicos.

RESULTADOS

Autor e Ano de Publicação	Base de Dados	Tipo de Publicação	Objetivo	Tipo de Leucemia	Técnica Molecular	Direcionamento
Dantas, G. K. S. et al (2015)	ResearchGate	Revisão de literatura	Apontar os avanços e perspectivas no diagnóstico diferencial da LLA em pacientes infanto-juvenis.	LLA	Citogenética; Imunofenotipagem.	Utilizando a imunofenotipagem, a classificação das LLAs é caracterizada por alterações imunofenotípicas dos linfoblastos e é a melhor alternativa para classificar o grau de diferenciação das células leucêmicas.
Roberts, K. G., Mullighan, C. G. (2015)	NCBI	Revisão de literatura	Revisar a atual classificação citogenética e molecular de LLA, com ênfase nos mais recentes insights sobre as novas entidades de LLA.	LLA	Sequenciamento de nova geração (NGS);	Novas abordagens diagnósticas devem implementar direcionamentos por estudos de sequenciamento ou utilizar NGS no diagnóstico para classificar com precisão, estratificar o risco e direcionar os pacientes para terapia direcionada ao gene ou à via.
Vizcaíno, M. et al (2016)	Scielo	Revisão de literatura	Revisar as diferentes etapas tanto na prevenção, diagnóstico, tratamento de adolescentes com LLA.	LLA	Citometria de fluxo; PCR.	Ao analisar a citometria de fluxo e o PCR para detectar LLA em crianças, conclui-se que ambos os métodos são eficazes. No entanto, a PCR teve uma sensibilidade mais consistente (0,001%) na detecção de rearranjos genéticos de células leucêmicas.
Bratz, B. S. G.; Gatzke, M.; Frizzo, M. N. (2016)	NewsLab	Revisão de literatura	Avaliar os novos recursos moleculares utilizados no diagnóstico, prognóstico e tratamento da LLA.	LLA	Citometria de fluxo; RT-PCR; FISH; PCR; Citogenética;	Translocações que resultam na fusão de genes são adequados, principalmente, para análise com RT-PCR. A citometria deve ser complementada obrigatoriamente com ensaios moleculares, uma vez que na análise das células malignas devem ser usando RT-PCR e FISH para evidência do gene de fusão BCR-ABL.
Iacobucci, I., Mullighan, C. G. (2017)	NCBI	Revisão de literatura	Revisar estudos genômicos em LLA e discutir o papel dos testes genômicos no manejo clínico.	LLA	Transcriptoma, WGS e exoma; Sequenciamento do genoma; Citometria de fluxo; PCR.	Ensaios que se baseiam em sequenciamento de DNA e RNA não detectam todas as deleções focais características de LLA. Abordagens baseadas em sequenciamento são usadas para analisar rearranjos de receptores de antígeno e quantificar DRM de forma mais sensível que a citometria de
Lang, C. A (2019)	SAH	Revisão de literatura	Revisar os tipos de detecção utilizando biologia molecular para diagnosticar LLA com perfil ph like.	LLA(ph like)	Citometria de fluxo; FISH; MLPA; RT-PCR.	As técnicas mais acessíveis atualmente são: superexpressão de proteína CRLF2 por citometria de fluxo; CRLF2, detecção de rearranjo ABL1, ABL2 e PDGFRB por FISH; detecção de alteração número de IKZF1 e outros genes para MLPA; e detecção de rearranjo P2RY 8 CRLF2 por RT-PCR.

Quadro 1 – Resultados

Roosbroeck, K. V., Calin, G. A. (2016)	NCBI	Revisão de literatura	Descrever as associações entre miRNAs e as aberrações citogenéticas comumente encontradas na LLC.	LLC	miRNA; FISH; IGHV status; Citometria de fluxo (ZAP70, B2M, CD38).	Anormalidades genéticas, IGHV e citometria de fluxo nem sempre são tão bem definidos. A citogenética é a técnica de maior ajuda para o manejo clínico dos pacientes. Microarray e sequenciamento são consideradas as técnicas para melhor identificação de miRNA.
Rodrigues, C. A. et al (2016)	SciELO	Revisão de literatura	Revisar as recomendações do Grupo Brasileiro de Leucemia Linfocítica Crônica para o tratamento e diagnóstico da LLC.	LLC	Citometria de fluxo (ZAP-40); IGHV status; FISH (TP53, del 17p13).	FISH é a técnica mais eficiente em encontrar anormalidades genéticas em LLC. A detecção da proteína ZAP-40 não é mais sensível do que o estadiamento clínico.
Martín, P. G.; Puerta, J. M. P.; Chacón, M. J. (2017)	ResearchGate	Revisão de literatura	Revisar diagnóstico, prognóstico e tratamento de LLC.	LLC	Imunofenotipagem; FISH.	O desenvolvimento da técnica FISH apresenta alterações como del17p/TP53, del13q, del11q ou trissomia 12, importantes por seu valor prognóstico e que podem auxiliar na decisão terapêutica.
Mirzaei, H. et al (2018)	PubMed	Revisão de literatura	Revisar a importância da LLC com base nas descobertas de biomarcadores.	LLC	Biomarcadores (CD 38, anormalidades, ZAP-70, cromossômicas, TP53 e miRNA).	Entre todos os biomarcadores, os miRNAs regulam mais de 100 genes alvo. Por outro lado, um gene pode ser regulado por vários miRNAs. Essas moléculas podem servir como biomarcadores para o diagnóstico de LLC.
Strati, P.; Jain, N.; O'Brien, S. (2018)	PubMed	Revisão de literatura	Revisar sobre o diagnóstico, prognóstico e tratamento de pacientes com LLC.	LLC	Citometria de fluxo (CD38, ZAP 70, CD49d); FISH; PCR (TP53); NGS (NOTCH1, SF3B1, MYD88 e BIRC).	É recomendável que as análises de FISH e IGHV sejam realizadas como padrão para LLC. Na NGS foi identificado mutações com importância prognóstica, mas a validação ainda está em andamento e a aplicação na prática é prejudicada devido a limitação da técnica.
Marrero, Y. T. et al (2019)	SciELO	Revisão de literatura	Revisar os aspectos etiopatogênicos, moleculares e prognósticos da LLC.	LLC	Citometria de Fluxo (CD19+ CD5+, CD23+, CD200+/-++, CD20, kappa o lambda).	A citometria de fluxo em conjunto com mAbs é muito valiosa para classificar neoplasias. A CMF é o método de escolha para a identificação e caracterização imunofenotípica de células leucêmicas para LLC.

Lira, A. O.; Pereira, A. (2019)	ResearchGate	Revisão de literatura	Descrever os métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico da LLC.	LLC	Citometria de fluxo; Citogenética convencional; FISH; PCR.	A confirmação da linhagem e do estágio de maturação é feita por meio da imunofenotipagem por citometria de fluxo. A citogenética convencional é útil para detecção de mutações genéticas, já que essas alterações ocorrem em cerca de 80% dos casos. Técnicas moleculares como o FISH e PCR são complementares
Farzadfard, E.; Kalantari, T.; Tamaddon, G. (2020)	NCBI	Estudo comparativo	O estudo separou 30 pacientes com LLC confirmados através de citometria de fluxo e compararam o nível de expressão com RQ-PCR.	LLC	RT-PCR e RQ-PCR – miRNAs (miR30d miR25-3p, miR1 9a-3p, miR133b, miR4 51a, miR145 e miR1 44 a); Imunofenotipagem; Citogenética; FISH.	Utilizando o RT-PCR foi observado superexpressão em miRNA 25-3p, 19a-3p em pacientes com LLC que pode desempenhar um papel importante na patogenicidade da LLC.
Metzeler, K. H. et al (2016)	PubMed	Estudo clínico	Visão geral do espectro, associações clínicas e relevância prognóstica de mutações de 664 pacientes com idade entre 18 e 86 anos.	LMA	Sequenciamento de nova geração (NGS).	O NGS é classificado como alto rendimento que levou ao aprimoramento do diagnóstico de LMA. Mutações no NPM1, FLT3, CEBPA, TP53 e, em pacientes de 60 anos, DNMT3A e RUNX1 são fatores de risco molecular mais importantes na LMA.
Papaemmanuil, E. et al (2016)	PubMed	Estudo clínico	Entender como a diversidade genética define a fisiopatologia da LMA. Estudo de 111 genes cancerígenos.	LMA	Sequenciamento completo do genoma (WGS); Citogenética.	As características genômicas foram os preditores mais poderosos entre os fatores genômicos, genes de fusão, alterações de número e mutações pontuais. A combinação genotípica de NPM1, DNMT3A e FLT3ITD ocorreu com maior frequência, encontrada em 93 dos 1540 pacientes.
Pereira, A. (2016)		Revisão de literatura	Indicar a epidemiologia da A LMA juntamente com descrições e especificações de seus diagnósticos	LMA	Citometria de fluxo; Citogenética; FISH; RT-PCR	Apresentou os métodos de diagnóstico e diferenciação dentre as leucêmicas, desde citogenéticos a imunohistoquímico e biomoleculares, apresentando suas diferenças entre métodos e especificidades.
Döhner, H. et al (2017)	PubMed	Revisão de literatura	Revisar amplas recomendações para o diagnóstico e tratamento da LMA em adultos.	LMA	Citogenética; RT-qPCR; Screening.	Citogenética (NPM1, FLT3) e screening da mutação CEBPA estão sendo as técnicas mais utilizadas na rotina laboratorial. Testes moleculares como RT-PCR podem ser úteis para a recorrência de rearranjos.
Bullinger, L.; Döhner, K.; Döhner, H. (2017)	PubMed	Revisão de literatura	Revisar a paisagem genômica da LMA, incluindo avanços na classificação baseado no genoma.	LMA	NGS; RQ-PCR; Citometria de fluxo.	A técnica de NSG abrange melhor a caracterização do tumor, permitindo uma melhor abordagem e abrangência do monitoramento individual.

Bhatnagar, B. et al (2019)	NCBI	Estudo clínico	Análise de 138 pacientes com LMA, comparando pacientes com trissomia nos cromossomos 4, 8, 11, 13, 21 e pacientes com outras anormalidades cromossômicas.	LMA	Citogenética (STAG2, TET2, NP M1, IDH2, TYK2, U2AF1, Mutações ETV6, SRSF2, DNMT3A, RUNX1 e BCOR).	A análise citogenética é utilizada como melhor técnica para diagnosticar as seguintes trissomias e as anormalidades cromossômicas em LMA. Os resultados foram confirmados por revisão central citotípica.
Hey, A. C. et al (2019)	Scielo	Artigo original	Avaliação de diagnósticos para leucemia promielocítica aguda.	LMA-M3	RT-PCR; FISH; Citogenética convencional; Citometria de fluxo.	A especificidade da citogenética clássica foi de 100% neste estudo, mas a sensibilidade foi bastante baixa (67%). A imunofenotipagem por citometria de fluxo é útil para distinguir a LPA de outros tipos de LMA. A técnica FISH tem sensibilidade mais baixa que a RT-PCR, mas é mais específica.
Vinhas, R. et al (2016)	PubMed	Revisão de literatura	Revisar as estratégias atuais para o diagnóstico de LMC comparando-as com a futura tendência em nanotecnológicos.	LMC	AnchoredChromPET, RT-PCR, Digital PCR, Carbonnanotube-HRP, Molecular Beacon, PNA-FISH, TMA-HPA, AuNPs-LDI-TOF, Immuno-beads, nanotecnológicos.	A nanotecnologia é considerada como a futura tendência para diagnóstico, permitindo o monitoramento em tempo real da progressão/remissão da doença.
Sossela, F; Zoppas, B; Webber L. (2017)	RBAC	Revisão de Literatura	Revisar o curso clínico e sintomatologia da LMC, método de diagnóstico e seu tratamento	LMC	FISH (t9-22) / gene BCR-ABL; RQ-PCR (rearranjo BCR-ABL) / miRNA p210.	A técnica de FISH utilizada no monitoramento da resposta citogenética. Já o RT-qPCR capaz de correlacionar análise citogenética e identificar o rearranjo BCR-ABL determinando o número de cópia de mRNA.
Löf, L. et al (2017)	PubMed	Estudo clínico.	Análise de amostras de medula óssea obtidas de 36 pacientes no momento do diagnóstico e um no acompanhamento durante o tratamento.	LMC	FISH; RQ-PCR; Citometria de fluxo.	Embora RQ-PCR seja um método poderoso para diagnósticos, a leitura com citometria de fluxo é um método rápido, sensível e específico com resultados que se correlacionam bem com os do RQ-PCR para o transcrito de fusão.
Luatti, S. et al (2017)	NCBI	Estudo clínico	Relato de uma análise das características clínicas, citogenéticas e moleculares de 6 pacientes com LMC Ph-neg, tratados com inibidores da tirosina quinase.	LMC Ph-neg.	Citogenética; FISH; RT-PCR e RQ-PCR.	A análise de FISH é a ferramenta mais eficiente para caracterizar rearranjos Ph-neg, pois permite detectar a ocorrência de rearranjos BCR / ABL e monitorar a resposta à terapia.
Prone, L. F. (2018)	RepHipUNR	Estudo clínico	Desenvolver um método para a detecção e quantificação de transcritos do gene de fusão BCR-ABL1.	LMC/LLA	RT-PCR e RQ-PCR.	A RT-PCR é a técnica mais sensível para detectar células que transportam a referida translocação. Sua quantificação por qPCR tem valor prognóstico na evolução de ambos os tipos de leucemia.

Dorfman, L. E. et al (2018)	Scielo	Revisão de Literatura	Revisar sobre a LMC, destacando a importância da análise citogenética para o monitoramento da evolução e manejo terapêutico desta doença.	LMC	Citogenética; FISH; RQ-PCR e RT-PCR.	FISH é recomendado quando Ph-neg é detectado pela citogenética clássica. Técnicas RQ-PCR ou RT-PCR têm maior sensibilidade para detecção de doença residual mínima após transplante, permitindo o diagnóstico precoce.
Bonavigo, A. G. et al (2018)	RBAC	Revisão de Literatura	Revisar sobre o diagnóstico laboratorial, comparando os métodos de citogenética e biologia molecular na detecção da translocação t(9;22).	LMC	Citogenética; FISH; RT-PCR e RQ-PCR.	A maior parte dos estudos recomenda que a citogenética convencional seja realizada para o estudo de outras alterações citogenéticas, mas não para detecção da t(9;22). A RQ-PCR garante informações muito mais precisas, oferecendo a vantagem de ser facilmente padronizada.
Raspadori, D. et al (2019)	PubMed	Estudo clínico	Avaliar como CD26 pode ser uma ferramenta útil para melhorar a identificação de células LMC utilizando ensaio de citometria de fluxo.	LMC	Citogenética (cromossomo Ph); FISH; Citometria de fluxo.	A ferramenta mais rápida no desenvolvimento do diagnóstico seria representada pela avaliação direta de citometria de fluxo, de modo a superar também a variabilidade entre pacientes com LMC no nível de transcrição BCR-ABL.
Hochhaus, A. et al (2020)	PubMed	Revisão de Literatura	Revisar as respostas hematológicas, citogenéticas e moleculares.	LMC	Análise de banda cromossômica (CBA); FISH; RQ-PCR; NGS.	Um PCR quantitativo não é obrigatório no momento do diagnóstico. Se um ensaio molecular demonstrar BCR-ABL1, mas o cromossomo Ph não puder ser identificado por citogenética, um teste FISH é necessário. A CBA sozinha não é suficiente para detectar sensibilidade no monitoramento.
Jabbour, E.; Kantarjian, H. (2020)	Filey Online Libra	Revisão de Literatura	Revisar referências citogenéticas e moleculares para pacientes em terapia.	LMC	FISH; RT-PCR e RQ-PCR.	A comparação de amostras simultâneas de medula e sangue por análise FISH mostra alta concordância (1% a 5% de falsos positivos). O RT-PCR é altamente sensível na detecção de doença residual mínima. O RQ-PCR é a técnica mais útil para o diagnóstico de LMC.

Fonte: Autores

DISCUSSÃO

No estudo de Dantas e colaboradores (2015) foi afirmado que a citogenética é um método molecular de extrema importância, no qual é feito uma análise cromossômica (cariótipo) das doenças hematológicas e assim, elaborado um diagnóstico mais refinado da malignidade das LLAs em crianças. A imunofenotipagem tem função de possibilitar a classificação das LLAs fazendo a análise das características imunofenotípicas dos linfoblastos. Além da detecção da leucemia através deste método, é possível classificar o grau de diferenciação das células leucêmicas possibilitando um diagnóstico com maior especificidade. Observaram em seguida que avanços técnicos no diagnóstico como ambos os métodos contribuem para uma intervenção precoce, um melhor prognóstico e tratamento.

Já no estudo de Roberts e Mullighan (2015), se apresentou uso de NGS para identificar todas as alterações

genéticas somáticas e hereditárias, abrangendo uma gama de técnicas como: o sequenciamento de exoma (WES), sequenciamento de transcriptoma e sequenciamento completo do genoma (WGS). A investigação do transcriptoma é importante para identificar RNAs não codificantes e alterações em regiões potenciadoras. Quando compararam o WGS com o sequenciamento de exoma, perceberam que o sequenciamento é uma abordagem mais barata, porém não detectam todas as alterações genéticas da LLA, e por fim, é necessário o uso de WGS para análise conclusiva.

Após o estudo feito por Vizcaíno e colaboradores (2016), todos os pacientes com leucemia linfocítica aguda devem realizar estudo morfológico, imunológico, genético e molecular. Foi observado que através da citometria de fluxo é possível determinar o envolvimento do sistema nervoso central apenas em pacientes com estadiamento e que a realização do PCR em medula óssea apresenta alta sensibilidade e especificidade na detecção de rearranjos,

concluindo que, para detectar doença residual mínima, ambos os métodos são efetivos. Em concordância com Dantas e Vizcaíno, Bratz e colaboradores (2016) afirmam que o PCR é um ensaio molecular com maior sensibilidade e rapidez, na análise com RT-PCR e FISH é possível visualizar translocações, como BCR-ABL e, por sua vez, a citometria de fluxo tem menor sensibilidade, porém tem custo mais acessível e deve ser utilizada para caracterizar a expressão antigênica e identificação dos subtipos da LLA. Vale ressaltar que os autores concluíram que o PCR não pode substituir análises citogenéticas, pois existem ainda um grande número de aberrações numéricas, translocações e hiperploídia que não podem ser apresentadas através do PCR, frisando a importância conjunta da análise citogenética.

Iacobucci e Mullighan (2017), sugerem que a escolha do melhor método molecular vai depender da sensibilidade, do número de genes a serem rastreados e a detecção dos rearranjos genômicos. Os ensaios baseados em sequenciamento de DNA ou RNA são capazes de detectar com precisão as mutações e os rearranjos, mas não conseguem detectar todas as exclusões focais. A utilização de transcriptoma, exoma e WGS são métodos imparciais que estão sendo cada vez mais utilizados no diagnóstico de LLA, valendo ressaltar que a análise de rearranjos de receptor antigênico e quantificação de doença residual mínima (DRM) é mais sensível por meio de sequenciamento do que por citometria de fluxo ou PCR.

Segundo Amaral e Juvenal (2020) através da citometria de fluxo é determinado o grau de diferenciação celular, a presença ou não de clonalidade e expressões antigênicas aberrantes nas populações celulares malignas. Lang (2019) já reconhecia a importância e eficiência dessa técnica e afirmava que ela deveria ser incluída nos painéis de diagnósticos de LLA. Sobre a análise por FISH os primeiros autores citados concluem que é utilizado para diagnóstico de LLA devido sua alta sensibilidade em comparação a outros estudos. E o segundo autor diz que essa mesma técnica é ótima para detecção de rearranjo de expressões gênicas CRLF2, ABL1, por exemplo. Estes pesquisadores concordam que a utilização do PCR é essencial para casos de anormalidades genéticas.

No que se refere a imunofenotipagem por citometria de fluxo para Souza e Pedrazzani (2019) é uma técnica fundamental, pois de forma rápida e inequívoca confirma se a população de células predominante na amostra é normal ou anômala e se for anômala qual a linhagem pertencente, além de mostrar se são imaturas ou maduras. Em contrapartida, Araújo e Staggemeier (2019) que utilizaram outras formas de diagnósticos falaram pontos sobre cada uma. A de Citogenética Convencional foi limitante, pois através dela não foi possível a identificação das deleções, amplificações e a fusão dos genes ETV6/RUNX1. Já a de FISH foi eficiente na detecção de anormalidades envolvendo os mesmos genes, assim como alterações adicionais.

Strati e Shanafelt (2015) iniciam uma análise em pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) que é considerado o tipo de leucemia mais comum em adultos, caracterizada pelo acúmulo clonal de células neoplásicas maduras resistentes à

apoptose; os autores descrevem que a abordagem em citometria de fluxo é necessária quando há clonagem de origem neoplásica, no entanto a identificação de anormalidades genéticas feita por FISH é em alta contagem para LMB (linfocitose monoclonal de células B). No estudo de Shahjahani et al (2015), Rodrigues et al (2016) e Strati e colaboradores (2018), afirmaram que a análise citogenética permite a identificação de menos de 50% das aberrações genéticas relevantes e que a análise por FISH tem identificação em 80%, concordando com os autores acima.

Roosbroeck e Calin (2016) e Mirzaei et al (2018) conduzem uma nova abordagem esclarecendo os miRNAs como pequenos RNAs não codificantes que modulam vias oncogênicas e são consideradas como uma nova promessa para identificação de marcadores de presença de metástase, ligando-se e degradando a RNAs mensageiros (mRNA), com grande potencial para prever o diagnóstico precoce (FURTADO, 2015). Eles afirmam que prognósticos são feitos por técnicas de citogenética, FISH, status IGHV e expressões de ZAP70, B2M e CD38, porém são mecanismos que nem sempre são tão bem definidos. Técnicas de alto padrão, como sequenciamento de RNA e microarray, que permitem a avaliação simultânea da expressão de milhares de genes, são consideradas como a melhor abordagem de dados e identificação de um grande número de miRNAs expressos diferencialmente.

Lira e Pereira (2019), constataram que através da citometria de fluxo é possível a confirmação da linhagem e do estágio de maturação em que estão. E sobre essa mesma técnica Mareiro e colaboradores (2019) já haviam descoberto que ela permite classificar neoplasias derivadas das células de acordo com a ontogenia das células hematopoiéticas. O primeiro autor também cita outro método laboratorial, o FISH, o qual melhorou a detecção de anormalidades cromossômicas específicas da LLC. Martins e colaboradores (2017) já mostravam em seus estudos que essa técnica realmente continha alterações específicas como del17p/TP53, del13q.

Nos estudos de Farzadfard e colaboradores (2020), a imunofenotipagem é apresentada como um método para pacientes com diagnóstico precoce de LLC, quando houver necessidade de um diagnóstico mais aprofundado, citogenética e FISH são úteis para performar os subtipos. O PCR em tempo real (RT-PCR), que é uma técnica que permite a replicação *in vitro* do DNA de forma mais rápida, detecta a expressão de miRNAs em soro de pacientes com LLC. Com isso, os autores puderam encontrar os miRNAs 30d, 25-3p, 19a-3p, 133b, 451a, 145 e 144 circulando no soro dos pacientes. Os miRNAs 25-3p e 19a-3p são oncomiRs potencialmente ligados a patogenicidade de LLC; a superexpressão do miR19a-3p está também diretamente ligada à pacientes com LMA.

Segundo Metzeler et al (2016), ainda existem muitas mutações no gene drive que foram recentemente identificadas na leucemia mieloide aguda (LMA), porém ainda não são bem definidas. O sequenciamento de próxima geração (NGS) permite porcionar células que carregam uma mutação somática com base na sua frequência de alelos,

levando à descoberta de inúmeras mutações de genes presentes na LMA. Os autores afirmam que as técnicas WES ou WGS continuam sendo a abordagem preferida para análise de mutações. No estudo de Papaemmanuil et al (2016) foi analisado 111 genes com a técnica WGS e citogenética, concluindo que as características genômicas são os maiores preditores, respondendo por cerca de dois terços da variação explanada e com um outro terço contribuído por variáveis demográficas, clínicas e do tratamento.

Döhner et al (2017) por sua vez, fala que a imunofenotipagem detecta marcadores de linhagem específicas, úteis para definição de leucemias agudas de fenótipo misto, a análise citogenética convencional permanece obrigatória, caso falhe, é necessária a execução de FISH para detectar rearranjos de genes. Técnicas moleculares como, RT-qPCR e NSG são padronizados para detectar lesões genéticas associadas à LMA. Bullinger e colaboradores (2017) seguem na mesma linhagem, afirmando que as técnicas moleculares citadas acima são 90% informativas para pacientes com LMA e que a avaliação por citometria de fluxo é mais precisa do que a avaliação convencional de CR baseada na morfologia. O estudo de Bhatnagaret al (2019) possui uma abordagem diferente, concluindo que a análise citogenética sendo a mais indicada para diagnosticarem trissomia no +4, +8, +11, +13 ou +21 em 138 pacientes.

Na visão de Vinhas et al (2016), quando falamos sobre leucemia mieloide crônica (LMC) que é uma desordem mieloproliferativa, o diagnóstico citogenético ajuda a sondar a presença de cromossomo Ph ou executando FISH ou Screening em busca da anormalidade molecular BCR- ABL1; o RT-qPCR é capaz de detectar uma célula de LMC fornece a porcentagem de BCR-ABL1 transcrito em um background de 100.000 células saudáveis. Afirma também, que as nanopartículas estão ganhando o seu espaço na precisão da detecção de BCR-ABL1 em nível de proteína. Löf et al (2017) segue o mesmo princípio que o autor anterior, explicando que a translocação t (9,22) é detectado por citogenética ou FISH e o BCR-ABL1 pode ser demonstrado por RT-qPCR, porém ele acrescenta que mesmo o RT-qPCR seja um método poderoso e mundialmente utilizado, a aplicação da citometria de fluxo é bastante sensível para BCR-ABL1 e pela acessibilidade do diagnóstico.

Sossela e colaboradores (2017) e Bonavigo (2018) concordam que a técnica de RT-PCR é muito útil na detecção de doença residual após quimioterapia ou transplante de medula óssea. Bem como Prone (2018) falando sobre a mesma técnica citou que ela detecta na presença de BCR-ABL de forma muito eficiente células que transportam essa translocação. Os dois primeiros autores também falaram que a técnica FISH é bem avançada na análise citogenética da medula óssea. Luatti et al (2017) e Raspadori et al (2019) demonstraram que em casos de rearranjos Ph-neg, a análise de FISH é considerada como a mais eficiente para tal caracterização, pois permite detectar a ocorrência de BCR-ABL1 e monitoramento da terapia.

Dorfman et al (2018) e Jabbour e Kantarjian (2020), descrevem que o desenvolvimento na pesquisa citogenética

de cromossomo Ph e t (9;22)(q34;q11) possibilitou a melhoria no manejo terapêutico da LMC, o FISH é recomendado para casos que foi impossível a detecção do cromossomo Ph e quando há grandes sondas genômicas específicas para BCR-ABL1, já a RT-qPCR é definida como método de escolha para detecção quantitativa de doença residual mínima após transplante de medula devido a sua maior sensibilidade, permitindo um diagnóstico precoce. O segundo autor ressalta que utilizando FISH pode conter uma faixa de 1% a 5% de falsos-positivos, dependendo da sonda utilizada; resultados falso-positivo e falso- negativo podem acontecer com PCR; resultados falso-negativos podem ser fruto de um RNA de baixa qualidade ou falha na reação e resultados falso-positivos podem ser devido à contaminação. Por outro lado, Hochhaus et al (2020) concluiu que citogenética não é suficiente sensível para monitoramento de respostas terapêuticas, tal técnica dele ser feita em pacientes com translocações atípicas, transcritos raros de BCR-ABL1 ou atípicos que não podem ser medidos por qPCR, já em casos de transcrições atípicas, se faz necessário o uso de FISH para monitoramento.

CONCLUSÃO

De acordo com o exposto sobre o diagnóstico molecular das leucemias de linhagem linfocítica, a literatura científica descreve que a citometria de fluxo, citogenética e imunofenotipagem são técnicas de custos acessíveis, muito importantes para confirmação de linhagem e estágio de maturação, porém apenas permitem cerca de 50% da identificação das aberrações relevantes, enquanto a análise por FISH tem identificação de anormalidades genéticas de 80%, como um complemento para as técnicas anteriores; todos os autores concordaram que a Imunofenotipagem tem grande papel na classificação dos subtipos da LLA; o RT-qPCR é um método de replicação in vitro de grande sensibilidade e rapidez, detectando a expressão de miRNAs em soro de pacientes com LLC; as técnicas de sequenciamento NGS são técnicas de alto padrão, custos elevados, porém consideradas como a melhor abordagem com grande potencial para prever o diagnóstico precoce das leucemias linfocíticas.

No que se refere a as leucemias mielóides, iniciando pela LMA, os autores afirmam que as técnicas de WES e WGS continuam sendo a abordagem preferida para analisar as mutações. Outras técnicas como FISH, imunofenotipagem, citogenética, RT-qPCR, NSG e citometria de fluxo são alternativas citadas por vários autores como abordagens para que o diagnóstico seja feito de diversas formas. Já sobre a LMC foi observado que a técnica FISH é usada em muitas situações como: quando não se detecta ph, em busca da anormalidade molecular BCR- ABL e em casos de transcrições atípicas. Confirma-se assim o quanto essa técnica é importante para o diagnóstico, mas como visto nos estudos muitas vezes é necessário completar a RT-qPCR ou Screening.

REFERÊNCIAS

- AKAHOSHI, Y. *et al.* Additional Cytogenetic Abnormalities with Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia on Allogeneic Stem Cell Transplantation in the Tyrosine Kinase Inhibitor Era. **Biology Blood Marrow Transplant**. Japão, v. 24, n. 10, p. 2009-2016, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29908230/>. Acesso em: 28 out. 2020.
- AMARAL, C. M.; JUVENALE, M. Leucemia linfóide aguda em pacientes infante-juvenis. **Brazilian Journal of Health Review**. Curitiba, v. 3, n. 3, p. 4770-478, 2020. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/10295>. Acesso em: 22 out. 2020.
- AMOR VIGIL, A. M. *et al.* La biología molecular em La precisión diagnóstica de las leucemias. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, Cuba, v. 34, n. 3, 2018. Disponível em: <http://revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/882/801>. Acesso em: 10 ago. 2020.
- ARAÚJO, L. B. L. Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) em crianças e adolescentes: diagnóstico citogenético e molecular. Tese (Especialista em Biologia Molecular Aplicada à Saúde) – Universidade Feevale, Novo Hamburgo, 2019. Disponível em: <https://biblioteca.feevale.br/Vinculo2/000025/000025d8.pdf>. Acesso em: 22 out. 2020.
- AWELINO, J. F.; AGUERA, R. G.; FERREIRA-ROMANICHEN, F. M. D. F. Epidemiológicos das leucemias mieloide e linfóide. **Revista Uningá**, v. 56, n. 3, p. 9-19, set. 2019. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uninga/article/view/2810>. Acesso em: 20 jul. 2020.
- AZEVEDO, M. R. A. **Hematologia básica e diagnóstico laboratorial**. 5ed. Rio de Janeiro, Revinter, 2013, p. 430.
- BARBOSA, S. F. C. *et al.* Aspectos Epidemiológicos dos Casos de Leucemia e Linfomas em Jovens e Adultos Atendidos em Hospital de Referência para Câncer em Belém, Estado do Pará, Amazônia, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, local, v. 6, n. 1, p. 43-50, 2015. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232015000300006&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 13 ago. 2020.
- BELSON, M; KINGSLEY, B; HOLMES, A. Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. **Environmental Health Perspectives**, Georgia, v. 115, n. 1, p. 138-145, 2007. Disponível em: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/pdf/10.1289/ehp.9023>. Acesso em: 13 ago. 2020.
- BHATNAGAR, B. *et al.* Clinical and molecular characterization of patients with acute myeloid leukemia and sole trisomies of chromosomes 4, 8, 11, 13 or 21. **Leukemia**, Columbus, v. 34, n. 2, p. 358-368, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6995758/>. Acesso em: 15 out. 2020.
- BISPO, J. A. B; PINHEIRO, P. S; KOBERTZ, E. K. Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Florida, v. 10, n. 8, p. 1-23, 2020. Disponível em: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/10/6/a034819.full.pdf+html>. Acesso em: 16 jul. 2020.
- BONAVIGO, A. G. *et al.* Comparação entre o diagnóstico citogenético e por biologia molecular das leucemias mieloide crônicas (LMC): uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. Cascavel, v. 50, n. 2, p. 47-50, 2018. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2018/10/RBAC-2018502-Supl-2-revista-completa.pdf#page=48>. Acesso em: 21 out. 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **A implantação da unidade de saúde da família**. Secretaria de Políticas de Saúde. Brasília, DF, 2000.
- BRATZ, B. S. G.; GATZKE, M.; FRIZZO, M. N. Aspectos Moleculares da Leucemia Linfóide Aguda: uma revisão. **Revista Newslab**, Santo Ângelo, v. 23, n. 136, p. 16-26, 2016. Disponível em: <https://newslab.com.br/aspectos-moleculares-na-leucemia-linfóide-aguda-uma-revisao/>. Acesso em: 23 out. 2020.
- BRUTUS, J. N; CARMO, E. J; SOARES, G. M. Diagnósticos da Leucemia Linfóide Aguda: Uma Revisão de Literatura. **Boletim Informativo Unimotrisaúde em Sociogerontologia BIUS**, Manaus, v. 14, n. 8, p. 1-19, 2019. Disponível em: <https://periodicos.ufam.edu.br/index.php/BIUS/article/view/6876>. Acesso em: 20 jul. 2020.
- BUGA C. V.; GLÚCK, A.; ARION, C. Actual biological diagnosis of acute myeloblastic leukemia in children. **Journal of Medicine and Life**, Bucareste, v. 7, n.2, p. 291-295, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4197485/pdf/JMedLife-07-291.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2020.
- BULLINGER, L.; DÖHNER, K.; DÖHNER, H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. **Journal of Clinical Oncology**. Ulm, v. 35, n. 9, p. 934-946, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28297624/>. Acesso em: 23 set. 2020.
- CAVALCANTE, M. S; ROSA, I. S.; TORRES, F. Leucemia Linfóide Aguda e seus principais conceitos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 8, n. 2, p. 151-164, 2017. Disponível em: <http://www.faema.edu.br/revistas/index.php/Revista-FAEMA/article/view/578/464>. Acesso em: 13 ago. 2020.
- CECÍLIO, S. C. C. **Caracterização físico-química e Biologia de Nanopartículas para Tratamento de Leucemias**. Tese (Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica) – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014. Disponível em: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/28983>. Acesso em: 24 ago. 2020.
- CHEN, X. *et al.* The Epidemiological Trend of Acute Myeloid Leukemia in Childhood: a Population-Based Analysis. **Journal**

- of **Cancer**, Guangdong, v. 10, n. 20, p. 4824-4835, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6775523/>. Acesso em: 13 ago. 2020.
- COSTA, R. S. et al. A influência da citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das leucemias linfoides. **Textura**, Bahia, v. 11, n. 20, p. 21-31, 2018. Disponível em: <https://textura.famam.com.br/textura/article/view/17>. Acesso em: 21 ago. 2020.
- CRAMER, P.; HALLEK, M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia- what do we need to know? **Nature Reviews Clinical Oncology**, Cologne, v. 8, n. 1, p. 38-47, 2011. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2010.167>. Acesso em: 16 ago. 2020.
- DANTAS, G. K. S. et al. Diagnóstico Diferencial da Leucemia Linfóide Aguda em pacientes infanto-juvenis. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Aparecida de Goiânia, v. 13, n. 2, p. 3-18, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/283188932_DIA_GNOSTICO_DIFERENCIAL_DA_LEUCEMIA_LINFOIDE_AGUDA_EM_PACIENTES_INFANTO-JUVENIS. Acesso em: 21 out. 2020.
- DOBRE, J. A.; ADI, S. S. Um sistema para auxiliar na seleção das regiões específicas de sequências biológicas. **Revista Brasileira de Sistemas de Informação**, Mato Grosso do Sul, v. 11, n. 3, p. 127-151, 2019. Disponível em: <http://www.seer.unirio.br/index.php/isys/article/view/6589/7349>. Acesso em: 24 ago. 2020.
- DÖHNER, H. et al. Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from International Expert Panel. **Blood**, Ulm, v. 129, n. 4, p. 424-447, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27895058/>. Acesso em: 15 out. 2020.
- DORFMAN, L. E. et al. The role of cytogenetics and molecular biology in the diagnosis, treatment and monitoring of patients with chronic myeloid leukemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio Grande do Sul, v. 54, n. 2, p. 83-91, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jbpm/v54n2/1676-2444-jbpm-54-02-0083.pdf>. Acesso em: 21 out. 2020.
- DUTRA, R. A. et al. Importância do hemograma no diagnóstico precoce da leucemia. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, Franca, v. 12, n. 7, p. 3528-3529, 18 jun. 2020. Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/3529>. Acesso em 13 ago. 2020.
- FARIAS, M. G.; BIERMANN, M. B. Análise morfológica, imunofenotípica e molecular na identificação da leucemia megacariocítica aguda (LMA-M7). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. Porto Alegre, v. 29, n. 4, p. 387-393, 2007. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-84842007000400013&script=sci_arttext&lng=pt. Acesso em: 29 out. 2020.
- FARZADFARD, E.; KALANTARI, T.; TAMADDON, G. Serum Expression of Seven MicroRNAs in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. **Journal of Blood Medicine**. Iran, v. 11, p. 97-102, 2020. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7075349/#__ffn__sectitle. Acesso em: 23 set. 2020.
- FRANÇA, M. E. et al. Testes Citogenéticos no Diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 3, n. 2, p. 2278-2286, 2020. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/8025/0>. Acesso em: 20 jul. 2020.
- FURTADO, F. M. **Avaliação da expressão de miRNAs e comprimento telomérico em linfocitose B monoclonal e leucemia linfocítica crônica**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17138/tde-06012016-153157/publico/FelipeMagalhaesFurtado.pdf>. Acesso em: 1 nov. 2020.
- GUIMARÃES, L. O. **Caracterização de subpopulações de Leucemia Mieloide Aguda portadora do rearranjo MLL quanto à resposta diferencial ao tratamento em longo prazo com Citarabina**. 2015. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17135/tde-07012016-115206/pt-br.php>. Acesso em 14 ago. 2020.
- HALLEK, M. Chronic Lymphocytic Leukemia: 2020 Update on Diagnosis, Risk Stratification and Treatment. **Am. J. Hematol**, Alemanha, v. 94, p. 1266-1287, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31364186/>. Acesso em: 5 ago. 2020.
- HEY, A. C et al. Leucemia promielocítica aguda: avaliação dos testes diagnósticos entre o período de 2000 e 2018 em um hospital público. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 6, p. 580-597, 2019. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442019000600580&lng=en&nrm=iso. Acesso em 23 out. 2020.
- HOCHHAUS, A. et al. European Leukemia Net 2020 recommendations for treating chronic myeloid leucemia. **Leukemia**, Jena, v. 34, n. 4, p. 966-984, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32127639/#affiliation-1>. Acesso em: 17 out. 2020.
- IACOBUCCI, I; MULLIGHAN, C. G. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**. Memphis, v. 35, n. 9, p. 975-983, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5455679/>. Acesso em: 18 set. 2020.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Ministério da Saúde. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, 2018.

- JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. **American Journal of Hematology**, Houston, v. 95, n. 6, p. 691-709, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ajh.25792>. Acesso em: 17 out. 2020.
- JEMAL, A. *et al.* Global Cancer Statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. Atlanta, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.3322/caac.20107>. Acesso em: 11 ago. 2020.
- KATARJIAN, H. M.; KEATING, M. J.; FREIREICH, E. J. Toward the Potential Cure of Leukemia in the Next Decade. **Cancer**, Texas, v. 124, p. 4301-4313, 2018. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cncr.31669>. Acesso em: 13 ago. 2020.
- LAGO, C.; PETRONI, T. F. Fisiopatologia e Diagnóstico da Leucemia Mieloide Crônica. **Revista Saúde UniToledo**, v. 1, n. 1, p. 121-133, 2017. Disponível em: <http://www.ojs.toledo.br/index.php/saude/article/view/2442>. Acesso em: 20 jul. 2020.
- LANG, C. A. Métodos diagnósticos para leucemias linfoblásticas B con perfil Ph-like (LLA Ph-like). **Hematología Actualización en LLA**, v. 23, p. 93-99, 2019. Disponível em: https://books.google./books?hl=en&lr=&id=Gy0DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA93&dq=related:qcdHR4TYwO2rtM:scholar.google.com/&ots=rMbLqZT07p&sig=YI73c_a1qu1tnxySSZyIFWU21RM&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false. Acesso em: 22 out. 2020.
- LAVAUT SANCHEZ, K.; HERNANDEZ AGUILAR, N.; RUIZ MOLEON, V. Hibridación in situ fluorescente: herramienta en el diagnóstico de las hemopatías malignas. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, Habana, v. 32, n. 1, p. 99-109, 2016. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892016000100009&lng=es&nrm=iso. Acesso em: 10 agosto 2020.
- LIRA, A. O.; PEREIRA, A. Métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico da leucemia linfóide crônica: uma revisão. **Brazilian Journal of Health Review**. Curitiba, v. 2, n. p. 2847-2917, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/333851040_Metodos_utilizados_para_o_diagnostico_da_leucemia_linfóide_cronica_uma_revisao. Acesso em: 22 out. 2020.
- LÖT, L. *et al.* Flow Cytometric Measurement of Blood Cells with BCR-ABL1 Fusion Protein in Chronic Myeloid Leukemia. **Scientific Reports**. Uppsala, v. 7, n. 1, p. 623, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28377570/>. Acesso em: 21 out. 2020.
- LUATTI, S. *et al.* Cryptic BCR-ABL fusion gene as variant arrangement in chronic myeloid leukemia: molecular cytogenetic characterization and influence on TKIs therapy. **Oncotarget**, Bologna, v. 8, n. 18, p. 29906-29913, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5444712/>. Acesso em: 21 out. 2020.
- MACHADO, M.F.A.S. **Compreensão das Mudanças Comportamentais do Usuário No PSF por meio da participação habilitadora**. 2007. Tese (Doutorado em enfermagem) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Fortaleza, 2007. Disponível em: http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/2130/1/2007_tese_mfasmachado.pdf. Acesso em 14 ago. 2020.
- MANCERO RODRÍGUEZ, M. J. *et al.* Leucemia Linfoblástica Aguda Diagnóstico. **Recimundo**, Equador, v. 4, n. 2, p. 53-63, 2020. Disponível em: <https://recimundo.com/index.php/es/article/view/822>. Acesso em: 25 jul. 2020.
- MARRERO, Y. T. *et al.* Leucemia linfóide crônica de células B: revisión de sus aspectos etiopatogénicos, moleculares y pronósticos. **Revista Cubana de Hematología**. La Habana, v. 35, n. 1, p. 927, 2019. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892019000100002. Acesso em: 22 out. 2020.
- MARTÍN, P. G.; PUERTA, J. M. P.; CHACÓN, M. J. Leucemia linfática crônica B. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento. **Actualidad Médica**. Granada, v. 100, n. 800, p. 52-53, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/318398890_B_cronicgate_leukemia_Diagnosis_prognosis_and_treatment. Acesso em: 22 out. 2020.
- MAURICIO, B. Q.; FARFÁN, J. Biología Molecular Aplicada al Diagnóstico Clínico. **Revista Médica Clínica Las Condes**. Chile, v. 26, n. 6, p. 788-793, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864015001546>. Acesso em: 28 out. 2020.
- MELO, Marcio; SILVEIRA, Cristina. **Laboratório de hematologia: teorias, técnicas e atlas**. 1. ed. Rio de Janeiro, Rubio, p. 258, 2015.
- METZELER, K. H. *et al.* Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. **Blood**, San Francisco, v. 128, n. 5, p. 686-698, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27288520/>. Acesso em: 16 out. 2020.
- MIRZAEI, H. *et al.* State of the art in MicroRNA as diagnostic and therapeutic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. **Journal of Cellular Physiology**, Iran, v. 233, n. 2, p. 888-900, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28084621/>. Acesso em: 19 set. 2020.
- MORAES, Elisane Silveira. *et al.* Análise de indivíduos com leucemia: limitações do sistema de vigilância de câncer. **Ciênc. Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 3321-3332, 2017. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S14

- 13-81232017021003321&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 10 ago. 2020.
- NASCIMENTO, C. A. D. *et al.* Leucemia Mieloide Aguda (LMA): As Condições Psicológicas do Paciente Adulto. **Psicologia em Revista**, Pernambuco, v. 22, n. 2, p. 336-355, 2016. Disponível em: <http://periodicos.pucminas.br/index.php/psicologiaemrevista/article/view/P.16789523.2016V22N2P336>. Acesso em: 25 jul. 2020.
- OLIVEIRA, A. M. *et al.* Mapeamento de competências em Bibliotecas Universitárias. **Perspectiva em Ciências da Informação**, Belo Horizonte, v. 11, n. 3, p. 360-382, set/dez. 2006. Disponível em: <http://www.eci.ufmg.br/pcionline/>. Acesso em: 11 abr. 2007.
- OLIVEIRA, R. A. G. **Hemograma como fazer e interpretar**. 2ed. São Paulo, Red Publicações, p. 643, 2015.
- PAPAEMMANUIL, E. *et al.* Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. **The New England Journal of Medicine**, London, v. 374, n. 23, p. 2209-2221, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27276561/>. Acesso em: 16 out. 2020.
- PEREIRA, A. T. C. R. **Leucemia Mieloide Aguda na Criança: do Diagnóstico ao Prognóstico**. Tese (Mestre em Análises Clínicas) – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, 2016. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/86284/2/162685.pdf>. Acesso em: 23 out. 2020.
- PODOLTSEV, N. A. *et al.* Selecting Initial Treatment of Acute Myeloid Leukemia in Older Adults. **Blood Reviews**, v. 31, p. 43-62, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268960X16300819>. Acesso em: 12 ago. 2020.
- PRONE, L. F. **Desarrollo de Técnicas de Diagnóstico Molecular de Enfermedades Oncohematológicas**. Tese (Graduação em Biotecnologia) – Universidad Nacional de Rosario, Rosario, 2018. Disponível em: https://repositoriosdigitales.mincyt.gob.ar/vufind/Record/RepUNR_d18419809a009e8a8bd71bdee3fe4760. Acesso em: 21 out. 2020.
- RASPADORI, D. *et al.* Flow Cytometry Assessment of CD26+ leukemic stem cells in peripheral blood: a simple and rapid new diagnostic tool for chronic myeloid leukemia. **Cytometry B Clin Cytom**, Siena, v. 96, n. 4, p. 294-299, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30714299/>. Acesso em: 19 out. 2020.
- REINATO, M. H; MARTINI, T. G. Diagnóstico Diferencial e Atualização em Relação ao Tratamento da Leucemia Mieloide Crônica: Revisão da Literatura Especializada. **International Journal of Health Management**, São Paulo, v. 5, n. 3, 2019. Disponível em: <https://ijhmreview.org/ijhmreview/article/view/179>. Acesso em: 10 ago. 2020.
- REIS, D. M. S.; VISENTAINER, J. E. L.; MACEDO, L. C. Aplicações das técnicas moleculares no diagnóstico das neoplasias mieloproliferativas. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**. Maringá, v. 12, n. 1, p. 57-65, 2017. Disponível em: <http://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/2224>. Acesso em: 19 set. 2020.
- ROBERTS, K. G.; MULLIGHAN, C. G. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. **Nature Review Clinical Oncology**. Memphis, v. 12, p. 344-357, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25781572/>. Acesso em: 19 set. 2020.
- ROCHA, J. M. C. **Estudo comparativo da detecção de Doença Residual Mínima pelas técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e reação em cadeia da polimerase, em crianças e adolescentes com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda**. Trabalho de Conclusão de Curso (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUBD-AY4F7V>. Acesso em: 24 ago. 2020.
- RODRIGUES, C. A. *et al.* Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: recommendations from the Brazilian Group of Chronic Lymphocytic Leukemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São Paulo, v. 38, n. 4, p. 346-357, 2016. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842016000400346. Acesso em: 21 set. 2020.
- ROOSBROECK, K. V.; CALIN, G. A. MicroRNAs in CLL: miRNAs for prognosis and target therapies? **Seminars in Oncology**. Houston, v. 43, n. 2, p. 209-214, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5533104/>. Acesso em: 23 set. 2020.
- SALAH, H. T. *et al.* Machine Learning Applications in the Diagnosis of Leukemia: Current Trends and Future Directions. **International Journal of Laboratory Hematology**, Minnesota, v. 41, p. 717-725, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31498973/>. Acesso em: 9 jul. 2020.
- SANTANA, A. M. O. **Leucemia Promielocítica Aguda: do Diagnóstico precoce ao tratamento**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Faculdade de Ciências de Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2019. Disponível em: <https://repositorio.uniceub.br/jspui/bitstream/prefix/13663/1/21605843.pdf>. Acesso em: 07 ago. 2020.
- SHAHJAHANI, M. *et al.* Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis. **Cellular Oncology (Dordr)**, Iran, v. 38, n. 2, p. 93-109, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25563586/>. Acesso em: 18 set. 2020.

SIEGEL, R. L; MILLER, K. D; JEMA, A. CancerStatistics, 2020. **CA: A Cancer Journal of Clinicians**, Georgia, v. 70, n. 1, p. 7-30, 2020. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21590>. Acesso em: 13 ago. 2020.

SOSSELA, Fernanda Roberta; ZOPPAS, Barbara Catarina de Antoni; WEBER, Liliana Portal.Leucemia Mieloide Crônica: aspectos clínicos, diagnóstico e principais alterações observadas no hemograma. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [S.l.], v. 49, n. 2, p. 127-130, 2 de jun/jul 2017. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/artigos/leucemia-mieloide-cronica-aspectos-clinicos-diagnostico-e-principais-alteracoes-observadas-no-hemograma/>. Acesso em: 25 set. 2020.

SOUZA, Antonielle Arruda de; PEDRAZZANI, Fabiane Spagnol. Importância do painel de Screening de Imunofenotipagem por citometria de fluxo para diagnóstico de leucemias agudas. **Inova Saúde**, Criciúma, v. 9, n. 1, p. 155-175, 3 jul. 2019. Disponível em: <http://periodicos.unesc.net/Inovasaude/article/view/3041>. Acesso em: 25 set. 2020.

STRATI, P.; JAIN, N.; O'BRIEN, S. Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, Texas, v. 93, n. 5, p. 651-664, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29728204/>. Acesso em: 21 set. 2020.

STRATI, P.; SHANAFELT, T. D. Monoclonal B-cell lymphocytosis and early – stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risks stratification. **Blood**, Rochester, v. 126, n. 4, p. 454-62, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4624440/>. Acesso em: 22 set. 2020.

VINHAS, R. *et al.* Current trends in molecular diagnostics of chronic myeloid leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, Caparica, v. 58, n. 8, p. 1791-1804, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27919203/>. Acesso em: 21 set. 2020.

VIZCAÍNO, M. *et al.* Guía de atención integral para çadetección oportuna, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de leucemia linfoide aguda em niños, niñas y adolescentes. **Revista Colombiana de Cancerología**. Colombia, v. 20, n. 1, p. 17-27, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcc/v20n1/v20n1a04.pdf>. Acesso em: 22 out. 2020.

Submissão: 16/06/2021

Aprovado para publicação: 20/06/2022