

**FACULDADE DE ENFERMAGEM NOVA ESPERANÇA DE MOSSORÓ
CURSO DE BACHAREL EM BIOMEDICINA**

**ANA LÍVIA LOPES QUEIROZ
LENICE DE SOUSA SANTOS**

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS LEUCEMIAS: UMA REVISÃO
INTEGRATIVA**

**MOSSORÓ
2022**

**ANA LÍVIA LOPES QUEIROZ
LENICE DE SOUSA SANTOS**

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS LEUCEMIAS: UMA REVISÃO
INTEGRATIVA**

Artigo Científico apresentado a Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró (FACENE/RN), como requisito obrigatório, para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador (a): Prof. Me. Francisco Ernesto de Souza Neto

Faculdade Nova Esperança de Mossoró/RN – FACENE/RN.
Catalogação da Publicação na Fonte. FACENE/RN – Biblioteca Sant'Ana.

Q3d Queiroz, Ana Livia Lopes.

Diagnóstico laboratorial das leucemias: uma revisão integrativa / Ana Livia Lopes Queiroz; Lenice de Sousa Santos – Mossoró, 2022.

24 f. : il.

Orientador: Me. Francisco Ernesto de Souza Neto.
Monografia (Graduação em Biomedicina) – Faculdade Nova Esperança de Mossoró.

1. Leucemia linfóide. 2. Leucemia mieloide. 3. Diagnóstico laboratorial. 4. Diagnóstico molecular. 5. Prognóstico. I. Santos, Lenice de Sousa. II. Souza Neto, Francisco Ernesto. III. Título.

CDU 616.155.392

**ANA LÍVIA LOPES QUEIROZ
LENICE DE SOUSA SANTOS**

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS LEUCEMIAS: UMA REVISÃO
INTEGRATIVA**

Artigo Científico apresentado a Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró (FACENE/RN), como requisito obrigatório, para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Me. Francisco Ernesto de Souza Neto – Orientador
Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró

Prof. Dr. André Menezes do Vale – Avaliador
Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró

Prof. Dr. José Carlos da Silveira Pereira – Avaliador
Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS LEUCEMIAS: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

LABORATORY DIAGNOSIS OF LEUKEMIAS: AN INTEGRATIVE REVIEW

ANA LÍVIA LOPES QUEIROZ
LENICE DE SOUSA SANTOS

RESUMO

As leucemias compreendem um conjunto de doenças malignas e clonais em que ocorre o acúmulo de leucócitos na medula óssea e no sangue, geralmente de causa desconhecida. Por existirem vários leucócitos, há como consequência diferentes leucemias que acometem células específicas, de modo que a classificação destas foi sendo modificada a fim de contemplar a identificação e diferenciação de seus tipos e subtipos. O diagnóstico das leucemias é, muitas vezes, identificado ao acaso através de exames laboratoriais de rotina, como o hemograma, e confirmado por técnicas como mielograma, imunofenotipagem, FISH, RT-PCR, histoquímica e citogenética, que podem protagonizar no diagnóstico diferencial. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo evidenciar o fortalecimento das técnicas moleculares no diagnóstico e prognóstico das leucemias através de uma revisão de literatura integrativa, que se deu pela busca de artigos publicados nas plataformas eletrônicas Scielo, LILACS e PubMed, nos idiomas português e inglês, no período de 2012 a 2022. Embora a citogenética desempenhe um papel fundamental na determinação de valores diagnósticos e prognósticos associados a aberrações cromossômicas frequentes nas leucemias, técnicas como NGS e suas derivações, MLPA, índice de DNA, FISH, RT-PCR, SNP-array e CGAT se mostraram como potenciais substituidoras ou complementadoras da citogenética convencional, apresentando especificações e resultados mais robustos. Tais técnicas mostraram relevância importante na caracterização de interações complexas e aberrações isoladas ou críticas, visualização de evolução clonal e análise simultânea do genoma na atribuição de valor prognóstico. Devido a crescentes descobertas no âmbito das aberrações moleculares e sua influência no diagnóstico, prognóstico, curso clínico e tratamento das leucemias, pesquisas baseadas na padronização das diversas técnicas moleculares e seus achados contribuem para melhorar ainda mais o entendimento sobre as leucemias e o manejo dos pacientes com a doença.

PALAVRAS-CHAVE: leucemia linfóide; leucemia mieloide; diagnóstico laboratorial; diagnóstico molecular; prognóstico.

ABSTRACT

Leukemias comprise a set of malignant and clonal diseases in which there is an accumulation of leukocytes in the bone marrow and blood, usually of unknown cause. As there are several leukocytes, there are, consequently, different leukemias that affect specific cells, so that their classification was modified in order to contemplate the identification and differentiation of their types and subtypes. The diagnosis of leukemia is often identified at random through routine laboratory tests, such as blood count, and confirmed by techniques such as myelogram, immunophenotyping, FISH, RT-PCR, histochemistry and cytogenetics, which can play a role in the differential diagnosis. In this sense, the present study aimed to highlight the strengthening of molecular techniques in the diagnosis and prognosis of leukemias through an integrative literature review, which was carried out by searching for articles

published on the electronic platforms Scielo, LILACS and PubMed, in Portuguese and English, from 2012 to 2022. Although cytogenetics plays a key role in determining diagnostic and prognostic values associated with frequent chromosomal aberrations in leukemias, techniques such as NGS and its derivations, MLPA, DNA index, FISH, RT-PCR, SNP-array and CGAT proved to be potential substitutes or complements to conventional cytogenetics, presenting more robust specifications and results. Such techniques showed important relevance in the characterization of complex interactions and isolated or critical aberrations, visualization of clonal evolution and simultaneous analysis of the genome in assigning prognostic value. Due to increasing discoveries in the field of molecular aberrations and their influence on the diagnosis, prognosis, clinical course and treatment of leukemias, research based on the standardization of different molecular techniques and their findings contribute to further improve the understanding of leukemias and patient management with the disease.

KEYWORDS: lymphoid leukemia; myeloid leukemia; laboratory diagnosis; molecular diagnosis; prognosis.

1 INTRODUÇÃO

O sangue é um tecido conjuntivo fluido composto por elementos que circulam em uma parte líquida, o plasma. As principais células presentes no sangue são os eritrócitos (hemácias ou glóbulos vermelhos), os leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas, que são originadas e desenvolvidas nos órgãos hematopoiéticos por um processo chamado de hematopoese.¹ Da infância à vida adulta, a medula óssea constitui a única fonte de formação e renovação das células do sangue.²

O organismo humano possui um conjunto de mecanismos responsáveis por manter em níveis rigidamente regulados o volume do sangue, a quantidade de células e sua composição,³ cujas variações podem indicar alguma alteração fisiológica ou quadro patológico. No sangue de um indivíduo saudável, há, de forma proporcional, para cada 1 leucócito, 30 plaquetas e 500 eritrócitos, variando conforme gênero e idade do indivíduo.¹

Quando ocorre uma mutação nos genes que controlam o processo de proliferação e reparo das células, os chamados genes supressores de tumor e proto-oncogenes, a capacidade de reparação de danos no ciclo celular ou de indução da célula para apoptose é perdida, permitindo que células mutadas com capacidade de autorrenovação, sejam células-tronco ou progenitoras, se proliferem descontroladamente, levando à formação de tumores. A formação de clones originados de uma única célula mutada na medula óssea ou no tecido linfóide periférico caracteriza as neoplasias malignas hematológicas, sendo a leucemia um tipo dessas doenças.⁴

Do grego “*leukos*”, que significa branco, e “*haima*”, que significa sangue, as leucemias compreendem um conjunto de doenças malignas e clonais em que ocorre o

acúmulo de leucócitos na medula óssea e no sangue, geralmente de causa desconhecida.^{2,5,6} Classicamente, as leucemias são divididas quanto à velocidade de agravamento da doença, podendo ser agudas ou crônicas, e quanto à linhagem de células acometidas, se mieloide ou linfóide.^{6,7} Segundo o Instituto Nacional de Câncer⁷ (2022), há mais de 12 tipos de leucemias, cujas principais são: Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Leucemia Mieloide Crônica (LMC), Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) e Leucemia Linfocítica Crônica (LLC).

Por se tratarem de doenças pertencentes ao grupo das neoplasias hematológicas, as quais possuem ampla heterogeneidade de apresentações clínica e laboratorial, as leucemias foram classificadas a fim de contemplar a identificação e diferenciação de seus tipos e subtipos, sobretudo para facilitar o entendimento da origem, apresentação e comportamento dessas doenças.⁴ Por existirem vários leucócitos, há como consequência diferentes leucemias que acometem células específicas.¹ Em virtude dessa variedade celular, conhecer as variações morfológicas, imunológicas e moleculares dessas doenças configura ato fundamental para a conclusão do diagnóstico, avaliação do prognóstico, escolha do protocolo de tratamento adequado e detecção de doença residual mínima.²

Conforme dados recentes do INCA⁷ (2022), cerca de 62% dos casos de leucemia estimados para 2020 resultaram em óbito no Brasil. Frente a esse cenário, qual a importância da identificação e diferenciação das leucemias e como isso implica no diagnóstico precoce e prognóstico da doença? Ante o exposto, e frente ao papel que o profissional biomédico tem de informar a população sobre a importância dos exames diagnósticos para a saúde e qualidade de vida, o presente estudo identificou e descreveu os principais métodos utilizados no diagnóstico laboratorial das leucemias e teve como objetivo evidenciar o fortalecimento das técnicas moleculares no diagnóstico e prognóstico da doença através de uma revisão de literatura integrativa.

1.1 CLASSIFICAÇÃO DAS LEUCEMIAS

As leucemias são caracterizadas pelo acúmulo de leucócitos malignos na medula óssea e no sangue, podendo causar sintomas por insuficiência medular e infiltração de órgãos.² Elas são divididas em grupos de células sanguíneas mieloides e linfóides e conforme a evolução da doença. O prognóstico varia da morte até a lentidão da leucemia, respectivamente classificadas como agudas e crônicas.⁸ As leucemias agudas caracterizam-se pela rápida multiplicação de células imaturas malignas (blastos), causando uma enfermidade mais agressiva. Nesse tipo de leucemia, as células malignas transformadas apresentam

comprometimento da capacidade de maturação, de diferenciação e funcional. Já nas leucemias crônicas ocorre a proliferação lenta e gradativa de leucócitos neoplásicos relativamente bem diferenciados na medula óssea e sangue periférico, com preservação da capacidade de diferenciação, de maturação celular e parte das funções.^{2,6,7,9}

Antigamente, a classificação das leucemias agudas seguia critérios essencialmente morfológicos, propostos pela FAB (grupo corporativo franco-americano britânico). Dessa forma, e após atualizações baseadas em marcadores imunofenotípicos, as leucemias mieloides agudas foram divididas em M0 (mínima diferenciação), M1 (sem maturação), M2 (com maturação), M3 (promielocítica), M4 (mielomonocítica), M5 (monocítica), M6 (eritroleucemia) e M7 (megacarioblástica), e as linfoides agudas em L1, L2 e L3. Anos mais tarde, a OMS preservou os critérios morfológicos, citoquímicos, adicionou a porcentagem mínima de 20% de blastos na medula óssea e sangue periférico e valorizou mais os achados citogenéticos no diagnóstico, sobrevida e resposta ao tratamento.⁶

1.2 TIPOS DE LEUCEMIAS

1.2.1 Leucemia Mieloide Aguda

Conforme estudos, a Leucemia Mieloide Aguda se dá pelas várias mutações genéticas nas células-tronco mieloides, as quais influenciam a formação de blastos que não amadurecem como as demais células, se multiplicando desordenadamente. A LMA engloba uma série de doenças que são definidas por vários genes e cromossomos aberrantes. Com isso, os blastos propagam-se rapidamente na medula óssea e atrapalham o desenvolvimento das células saudáveis.⁷ A LMA pode estar relacionada a fatores genéticos, pois o indivíduo já nasce com o câncer ou pode desenvolvê-lo durante sua vida. Os fatores que podem contribuir para o desenvolvimento da doença são as alterações genéticas, exposição prolongada a produtos químicos e radiações, tabagismo, idade acima dos 60 anos, doenças de sangue, entre outros.¹⁰

Esse tipo de leucemia representa uma pequena fração das leucemias infantis (10-15%) e é a forma aguda mais comum em adultos, cuja incidência eleva-se com a idade, sendo os 65 anos uma média do começo da doença. Quanto ao acometimento por sexo e etnia, os homens se sobressaem ligeiramente às mulheres, com ascendência europeia um pouco mais prevalente do que a ascendência africana.^{2,11}

O diagnóstico da doença é realizado no laboratório através da coleta sanguínea (medular e periférica), da qual é feito o hemograma e esfregaço sanguíneo, exame da medula

óssea, além de exames de citogenética, imunofenotipagem, estudos da biologia molecular e histoquímicos. A leucemia é sinalizada quando os blastos são iguais ou maior a 20% das células nucleadas da medula óssea ou quando são iguais ou maior a 20% das células não-eritróides, e, quando o membro eritroide for maior a 50% ou em qualquer outra porcentagem de células blásticas anormais.^{12,13}

No entanto, as ciências de sequenciamento de nova geração (NGS) ajudaram na rapidez do descobrimento de inovações relacionadas as alterações moleculares. O NGS foi empregado com êxito em diversos estudos, promovendo um apanhado universal das alterações moleculares, bem como do desenvolvimento clonal da Leucemia Mieloide Aguda (LMA). O vasto conjunto de irregularidades encontrados por técnica de NGS está ultimamente sob larga validação de suas importâncias prognósticas e terapêuticas.¹⁴

1.2.2 Leucemia Mieloide Crônica

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é um câncer que acomete as células mieloides da medula óssea que se desenvolve lentamente, ou seja, de maneira crônica. As células se apresentam em uma proporção enorme de glóbulos brancos maduros (leucocitose) em comparação com as células blásticas imaturas. Relaciona-se com a mudança do DNA causando uma grande produção de granulócitos imaturos e maduros responsáveis pela defesa do organismo.¹⁰ A LMC tem como principal causa a translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, culminando na formação de um gene híbrido BCR-ABL com atividade tirosinoquinase e denominado de cromossomo Philadelphia (Ph1).⁶

A LMC acomete mais os homens e sua frequência aumenta com a idade, por volta dos 60 e 65 anos, sendo rara em crianças e jovens adultos. Pode ser ocasionada por exposição à radiação e radioterapia, mas a maioria dos casos não tem relação com esses agravos.¹²

Por se tratar de uma doença que se desenvolve ao longo do tempo, rara e por ser menos agressiva, as vezes os pacientes ficam sabendo do diagnóstico através de exames de rotina como a coleta de sangue e esfregaço sanguíneo. Com a suspeita do exame sanguíneo, também podem ser realizados os exames de biologia molecular e citogenética para identificar os genes que sofreram a mutação.¹⁰

As técnicas moleculares para detecção do gene BCR-ABL mais comumente empregadas são o FISH (hibridação *in situ* por fluorescência) e o PCR (reação em cadeia da polimerase) depois do convertimento do mRNA retirado das células leucêmicas em DNA integrante ou cDNA. Para esse primeiro passo, usa-se a enzima transcriptase reversa (RT), na

chamada prática RT-PCR, já que atualmente uma variante dessa metodologia tem como característica proporcionar efeitos quantificáveis para o transcrito BCR-ABL, o PCR em tempo real, permitindo que os pacientes com Leucemia Mieloide Crônica possam ser acompanhados ao longo de interferências promovendo a remissão demorada da doença.¹⁵

1.2.3 Leucemia Linfocítica Aguda

A Leucemia Linfocítica Aguda, também conhecida como leucemia linfoblástica aguda ou leucemia linfóide aguda, compreende um grupo de entidades onco-hematológicas de evolução rápida caracterizadas pela proliferação descontrolada de linfoblastos (um tipo de glóbulo branco imaturo) do tipo B ou T na medula óssea e sangue periférico.¹⁶ Como consequência, a insuficiência de medula óssea e a infiltração de órgãos podem ser observadas.² A etiologia aponta para uma aparente hereditariedade para a suscetibilidade à LLA de linhagem B e variações genéticas determinantes da resposta e da toxicidade a medicamentos. No entanto, com respeito aos mecanismos moleculares que desencadeiam os processos, ainda não há conhecimento.¹⁷

Acerca da epidemiologia, a LLA é predominante em crianças e incide ao máximo entre 3 e 7 anos de idade, ocorrendo uma elevação secundária de incidência após os 40 anos. A linhagem de células B é acometida com mais frequência (85% dos casos, em ambos os sexos) se comparada a de linhagem T (15% dos casos, com predomínio no sexo masculino).² Além da idade e linhagem celular, a incidência também varia conforme raça e etnia, ocorrendo mais em hispânicos e caucasianos e menos em afrodescendentes.¹¹

O diagnóstico é feito pelo médico através do exame de sangue e da medula óssea (mielograma). A coleta sanguínea é feita normalmente pelo braço do paciente. Outros exames que podem ser solicitados pelo médico são perfil químico sanguíneo, hemograma completo com diferencial, avaliação das células do sangue, exame de coagulação, testes genéticos, análise citogenética, citometria de fluxo, PCR, FISH, exame do líquido espinhal etc.¹²

Ao longo dos anos, foram se desenvolvendo técnicas mais eficazes para o uso da biologia molecular na detecção da LLA. O SNP (Single Nucleotide Polimorphism), por exemplo, é uma técnica de rastreamento que trouxe outro modo de localizar alterações genéticas, comportando um estudo de união e agregação entre doenças e o genótipo SNP, além da identificação de alterações do conteúdo de DNA no genoma pleno. Essas técnicas moleculares são mais sensíveis, mais particulares e mais velozes na detecção de anomalias dos genes, pois por meio do método de PCR em poucas horas é possível descobrir uma célula

leucêmica dentre várias células normais e com isso, aperfeiçoando o diagnóstico e entendimento da biologia molecular na LLA.¹⁸

1.2.4 Leucemia Linfocítica Crônica

A Leucemia Linfocítica Crônica, ou leucemia linfoide crônica, é um distúrbio linfoproliferativo caracterizado pela proliferação e acúmulo de células B neoplásicas de aparência madura com fraca expressão de imunoglobulina de superfície (IgM ou IgD).^{2,11} Essas células apresentam diminuição de apoptose e sobrevivida prolongada, se acumulando no sangue, medula óssea, fígado, baço e linfonodos. Exibe grande equivalência fenotípica e citogenética com o linfoma linfocítico de células pequenas, sendo este diferente da LLC por haver concentração de células majoritariamente nos linfonodos e células B monoclonais em número inferior a $5 \times 10^3/\text{mL}$ no sangue circulante.²

A LLC afeta mais os homens e compromete especificamente pessoas adultas, por volta da quinta ou sexta década de vida com elevação do pico após os 60 anos, com raros casos ocorrendo em idade inferior aos 50 anos. Manifesta prevalência maior no Ocidente e menor em países do extremo Oriente. Quanto a associação da doença com fatores ambientais, não foi observada relação, podendo a doença ser produto de mutações somáticas ou predisposição genética, embora os genes associados a esse risco sejam desconhecidos.^{2,4,19}

O diagnóstico é feito através de exames laboratoriais como hemograma, FISH, mielograma e biópsia de medula, imunofenotipagem, citogenética e biópsia de gânglio.¹²

A citogenética molecular abrange os procedimentos de cariotipagem espectral (SKY), hibridação genômica comparativa (CGH), hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), dentre outras. Mas, a técnica que melhor proporciona resultados é o método FISH, pois sua taxa de detecção de anomalias cromossômicas na LLC é bastante expressiva, em torno de 80% dos casos. Esse método é baseado na utilização de uma série de alicerces, que são as sondas, que completam o alvo que é o DNA se tornando um processo célere, sensível e específico, e com isso, identificando o locus gênico e ajudando no diagnóstico de microdeleção.²⁰

1.3 DIAGNÓSTICO POR HEMOGRAMA E MIELOGRAMA

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer⁷ (2022), o mielograma, exame da medula óssea, é um dos exames que dará a confirmação do diagnóstico da leucemia. A partir da parte interior do osso é retirado um pouco de sangue, oriundo do material esponjoso, do

qual serão realizadas as análises: citológica, na qual será observado o formato das células; molecular, momento em que serão verificadas as mutações genéticas; citogenética, onde serão analisados os cromossomos das células; e a imunofenotípica, que observará o fenótipo das células. Em algumas situações, é preciso fazer a biópsia da medula óssea, em que é retirado um pedaço bem pequeno do osso da bacia e levado ao médico patologista para analisá-lo.

A orientação adequada sobre composição, predomínio celular e relação quantitativa entre células sanguíneas na medula óssea é fundamental para o entendimento de alterações e sua conexão com neoplasias hematológicas, inclusive para o diagnóstico diferencial de situações benignas ou apenas reativas. Contudo, é importante salientar que, embora a medula óssea seja a base da implantação e do desenvolvimento das neoplasias hematológicas, os primeiros sinais e evidências desse grupo de enfermidades são observados no hemograma por meio da avaliação do sangue periférico, visto que esse tecido é um reflexo direto da condição em que se encontra a medula óssea.⁴

Em caso de suspeita de leucemia, é de suma importância realizar exame de sangue, mais especificamente o hemograma para a confirmação da doença. Quando o diagnóstico é confirmado, o hemograma aparecerá alterado revelando um maior número de leucócitos ligado ou não ao menor número de plaquetas e hemácias. Para complementar o diagnóstico, outras análises laboratoriais precisam ser feitas, como por exemplo, exames da coagulação sanguínea e de bioquímica que poderão apresentar-se, também, alterados.⁷

1.4 DIAGNÓSTICO POR IMUNOFENOTIPAGEM, CITOGENÉTICA E CITOQUÍMICA

Durante muitos anos, os exames realizados para descobrir se o indivíduo tinha leucemia foram o hemograma e mielograma, entretanto, a morfologia como único parâmetro não era suficiente para diagnosticar todos os tipos de leucemias existentes. Ainda assim, o hemograma continua sendo um exame importante na detecção dessas doenças em sua fase elementar, podendo identificá-las como crônicas ou agudas e precisar se são linfóides e mielóides. O mielograma também continua sendo um modo determinante, já que permite avaliação citogenética, imunofenotípica e citoquímica das células neoplásicas.⁴

1.4.1 Imunofenotipagem

É definida pela identificação de antígenos celulares particulares pertinentes à família e ao estado de maturação e distinção das células sanguíneas. Através dela são usados

anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos, agentes fluorescentes, em que a reação é avaliada em citometria de fluxo. A citometria de fluxo permite identificar individualmente as células presentes no sangue e vem sendo cada vez mais agregada nas práticas laboratoriais, como por exemplo no índice de plaquetas reticuladas, na concentração de hemoglobina nos reticulócitos, na contagem de reticulócitos, na contagem diferencial celular etc.⁴

A imunofenotipagem teve um avanço importante na época da epidemia do vírus HIV por causa da necessidade da identificação e quantificação dos linfócitos CD4+ e CD8+ presentes no sangue periférico, além desse tipo de diagnóstico ter permitido uma readequação da classificação FAB para as leucemias mieloides agudas e a partir disso, os tipos M0, leucemia mieloide aguda com pouca diferenciação, e M7, megacariocítica, e dos subtipos B e T nas neoplasias linfocíticas agudas e crônicas. Com a importância do diagnóstico através da imunofenotipagem, hoje, ela não fica reservada somente à caracterização da família e do estado de maturação das células tumorais, mas também, relacionando-se de maneira direta com as particularidades clínicas de cada tipo característico e detecção de doença residual mínima.⁴

Nos primeiros enfoques laboratoriais desse exame, são feitos alguns marcadores preliminares, como a diferenciação de mieloide/linfoide, linfócito T/linfócito B e depois justapostos de maneira integrante os marcadores mais peculiares.⁴ Os marcadores das principais leucemias são classificados da seguinte maneira: por imunofenotipagem (citometria de fluxo) mieloide: CD13, CD33, CD117, Glicoforina (CD235a) e antígenos plaquetários CD41, CD42 e CD61 e o marcador de células-tronco ou progenitoras CD34; linfoide B: CD10, CD19 e cCD22 e TdT; e linfoide T: CD2, cCD3, CD7 e TdT.²

1.4.2 Citogenética

O objetivo desse exame é o estudo das alterações cromossômicas nas células modificadas, colaborando com a classificação, o prognóstico, a observação da remissão parcial ou completa e de doença residual mínima nos pacientes que estão em tratamento. O aspirado de medula óssea é o mais adequado material biológico para esse fim, podendo também o sangue periférico ser usado desde que o número de blastos circulantes seja acima de 10% das células. Esse exame citogenético pode ser feito através da cultura celular ou pela análise direta das células.⁴ Chama-se citogenética clássica a visualização de cromossomos metafásicos, que conta com o uso de corantes, como Giemsa e nitrato de prata, formadores de

padrões de banda, cuja análise dá-se o nome de bandeamento. Por meio dessa técnica, é possível visualizar diferentes áreas do cromossomo e detectar alterações.¹⁸

A citogenética enveredou por novos rumos com a chegada da biologia molecular, dando origem à citogenética molecular e aprimorando de maneira irrefutável a detecção de anormalidades cromossômicas com embasamento no uso de instrumentos moleculares que são seguimentos conhecidos de ácidos nucléicos e que tem como finalidade identificar o seguimento integrante nos cromossomos estudados, tanto nos que estão em metáfase quanto na interfase. A reação é desvendada por meio de fluorocromos unidos a esse instrumento molecular e verificada através da microscopia de fluorescência.^{4, 18}

1.4.3 Citoquímica

Para a identificação de linhagem celular, a citoquímica nasceu como primeiro exame complementar na classificação das leucemias, especialmente as agudas. As provas mais usadas em virtude da padronização são a Mieloperoxidase (MPO), a Sudan Black (SB), o Ácido periódico de Schiff (PAS), esterases específicas e não-específicas.^{4, 18}

A Mieloperoxidase está nos grânulos azurófilos dos monócitos e nas granulações secundárias dos eosinófilos. A reação é positiva em blastos de procedência mieloide com um certo destaque de maturação, em pró-mielócitos e em mielócitos. Já nos metamielócitos e neutrófilos a reação positiva é fraca por causa do aumento dos grânulos secundários. Os monócitos e os monoblastos podem apresentar uma reação negativa ou positiva fraca. Uma prova positiva faz o diagnóstico de leucemia mieloide aguda, pois a MPO é importante para a caracterização do mieloblasto. A evidência da célula peroxidase positiva é vista pela coloração verde ou verde azulada.^{4, 18} Em relação a prova citoquímica do Sudan Black, interpreta-se da mesma maneira que a MPO, mas com a diferença de ser menos peculiar.⁴ A técnica se baseia na coloração de lipídeos, sobretudo os fosfolipídios intracelulares, e tem como vantagem o uso em esfregaços mais antigos.¹⁸

O PAS cora de vermelho o glicogênio intracelular, todavia, seu uso revela resultados inespecíficos e pouco influentes no diagnóstico das leucemias agudas, tendo em vista que as células hematopoiéticas são PAS positivas, em sua maioria. Apesar da limitação, essa prova citoquímica é utilizada para confirmar a eritroleucemia (LA-M6). As esterases específicas encontram-se nos granulócitos e são coradas pelo naftol AS-D cloroacetato esterase (CAE).⁴ A alfanaftil acetato (ANAE), uma esterase não específica, é uma enzima útil na diferenciação morfológica da LMA, pois mostra positividade alta em leucemias monocíticas,

megacariocíticas e eritroleucemia, indicando, também, o grau do componente monocítico na leucemia mielomonocítica aguda por meio da intensidade da coloração.¹⁸

1.5 ACHADOS LABORATORIAIS NAS LEUCEMIAS

Geralmente, a leucemia aguda é caracterizada pela presença de mais de 20% de blastos presentes na medula óssea, mas em alguns casos pode apresentar menos de 20% desses blastos caso haja alguma anomalia genético-molecular pertinente à leucemia. Através do exame morfológico pode-se definir a linhagem dos blastos, bem como através dos exames de análise molecular, análise citogenética e imunofenotipagem. Com isso, irá se determinar a genealogia dos blastos e em qual estágio se encontra a leucemia, além da sua diferenciação celular em linfoide ou mieloide. As análises moleculares e citogenéticas são fundamentais e são realizadas em células da medula óssea, mesmo que o sangue periférico seja usado quando houver uma grande quantidade de blastos na contagem. Já a citoquímica é pouco utilizada hoje em centros que possuem testes mais atuais e definitivos, apesar de ser útil na resolução da linhagem dos blastos.²

Na LMA, grande parte dos pacientes que fazem os exames hematológicos apresentam trombocitopenia, anemia normocítica e normocrômica. A medula óssea tem muitas células por penetração de blastos leucêmicos qualificados através da morfologia e das análises imunológica, citogenética e molecular, que são imprescindíveis para a confirmação do diagnóstico. Para a classificação de grande parte dos casos de leucemia mieloide aguda são usadas as anormalidades citogenéticas. De modo geral, a proteína PML forma homodímeros com ela mesma e a proteína RAR α forma heterodímeros com a proteína receptora do retinoide X, RXR. PML-RAR α como proteína de fusão se ligará a PML e RXR as impedindo de se ligarem com suas companheiras naturais resultando no fenótipo de término de diferenciação.²

Em relação ao diagnóstico da LMC, a leucocitose é considerada o principal aspecto, podendo atingir números acima de $200 \times 10^3/\mu\text{L}$. No sangue periférico pode ser vista uma ameaça de células mieloides e os níveis de mielócitos e neutrófilos extrapolam aos níveis de promielócitos e de blastos. É corriqueiro o paciente apresentar anemia normocítica e normocrômica, como também é comum o aumento de basófilos. O ácido úrico sérico normalmente apresenta-se aumentado, bem como a contagem de plaquetas (mais frequente), que também pode encontrar-se normal ou diminuída, dentre outras.²

Na maioria das vezes, o hemograma do paciente com LLA apresenta uma trombocitopenia e anemia normocítica e normocrômica. O número de blastos pode chegar a

200 x 10³/μL para mais, e com isso, a contagem de leucócitos poderá estar normal, diminuída ou aumentada. Em relação a medula óssea, ela é cheia de blastos leucêmicos, apresentando mais de 20%. O exame microscópico de distensão sanguínea costuma apresentar blastos em número mutável. Os blastos são identificados através da morfologia de análises citogenéticas e por exames imunológicos.²

A linfocitose na LLC mostra uma contagem de linfócitos clonais B por definição correspondente a 5 x 10³/μL podendo passar para mais de 300 x 10³/μL. Entre 70 e 99% dos leucócitos do sangue possuem aparência de pequenos linfócitos. Costumam estar presentes células achatadas na distensão. O paciente apresenta anemia normocítica e normocrômica nas fases demoradas como consequência de infiltração medular ou hiperesplenismo, podendo ser um fator complicador a hemólise autoimune. A trombocitopenia acomete vários pacientes, podendo ter, também, patogênese autoimune.²

As proteínas CD38 (marcador de diferenciação) e ZAP70 (proteína-quinase) são proteínas detectáveis através de citometria de fluxo com sentido prognóstico. A imunofenotipagem dos linfócitos exibe-se como células B, que são as CD19⁺ de superfície, apresentando baixos níveis de imunoglobulina de superfície e expressão de uma cadeia leve, de maneira característica também, células CD5⁺ e CD23⁺, mas que são CD79b⁻ e FMC7⁻. A biópsia da medula óssea apresenta infiltração linfocítica podendo apresentar-se como intersticial, nodular ou difusa.²

1.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS LEUCEMIAS

Com o passar do tempo, novas técnicas para diagnóstico das leucemias foram sendo utilizadas, como o sequenciamento de última geração (NGS), o sequenciamento de painel genético, transcriptoma, exoma e sequenciamento do genoma completo.²¹

Devido as novas mutações identificadas, o diagnóstico molecular tem sido cada vez mais usado como tática diagnóstica das leucemias para auxiliar nos tratamentos dos pacientes, levando-se a utilização de novas técnicas cada vez mais avançadas de diagnóstico, como por exemplo, a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), PCR digital, PCR convencional, qPCR (em tempo real) e o sequenciamento dos ácidos nucleicos.²²

Dentro da biologia molecular, PCR é um método muito utilizado, pois permite copiar uma molécula de DNA várias vezes. É uma técnica para acompanhamento do paciente em tratamento em tempo real, apresentando maior sensibilidade, mais simplicidade e maior

rapidez se for comparada ao método de citogenética, além de ser considerada uma técnica não agressiva, já que usa o sangue periférico do paciente.²³

O diagnóstico da leucemia por biologia molecular é medido diretamente através da presença dos transcritos, podendo se originar também o quanto destes transcritos podem estar no sangue ou presentes na medula óssea. Os transcritos observados na LMC são o b2a2 e o b3a2 que compilam a proteína p210, onde essas isoformas têm a mesma força clínica. A LLA é uma leucemia mais invasiva que a LMC, pois ela possui o transcrito ela2 compilando a proteína p190. É muito importante que os exames de biologia molecular sejam feitos mais frequentemente em pacientes que apresentam a leucemia mieloide crônica (LMC), já que seria possível acompanhar, monitorar o indivíduo e verificar a qualidade de vida dele através da utilização do inibidor de tirosina quinase.²³

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo constitui-se de revisão de literatura integrativa, a qual permite a busca, avaliação crítica e síntese das evidências disponíveis acerca de um determinado tema ou questão, com o propósito de obter entendimento sobre um dado fenômeno fundamentando-se em estudos progressos.²⁴

A construção da pesquisa se deu pela busca de artigos publicados nas plataformas eletrônicas Scielo, BVS e PubMed, nos idiomas português e inglês. A coleta dos dados da pesquisa foi norteadada pela busca combinada por operadores booleanos AND/OR dos seguintes descritores, em português e inglês: Leucemia Aguda, Leucemia Crônica, Diagnóstico Laboratorial, Diagnóstico Molecular, Prognóstico, Alterações Cromossômicas. Como critérios de inclusão, foram considerados apenas artigos científicos, publicados entre 2012 e 2022, nos idiomas português e/ou inglês, com texto completo e gratuito. Foram excluídos os artigos repetidos nas bases de dados, de acesso pago e que não contemplavam o objetivo proposto por esse estudo. Os recursos literários escolhidos abordaram diferentes métodos diagnósticos moleculares das leucemias independentemente do desenho de estudo adotado.

O levantamento dos estudos utilizados nessa pesquisa se deu pela aplicação dos seguintes cruzamentos: 1. “myeloid leukemia AND laboratory diagnosis OR molecular diagnosis AND prognosis AND chromosomal changes”; 2. “leucemia mieloide AND diagnóstico laboratorial OR diagnóstico molecular AND prognóstico AND alterações cromossômicas”; 3. “lymphoid leukemia AND laboratory diagnosis OR molecular diagnosis

AND prognosis AND chromosomal changes”; 4. “leucemia linfóide AND diagnóstico laboratorial OR diagnóstico molecular AND prognóstico AND alterações cromossômicas”.

Foram encontrados, ao todo, 1.335 artigos, dos quais 704 pertenciam aos cruzamentos 1 e 2 e 631, aos cruzamentos 3 e 4 (Tabela 1).

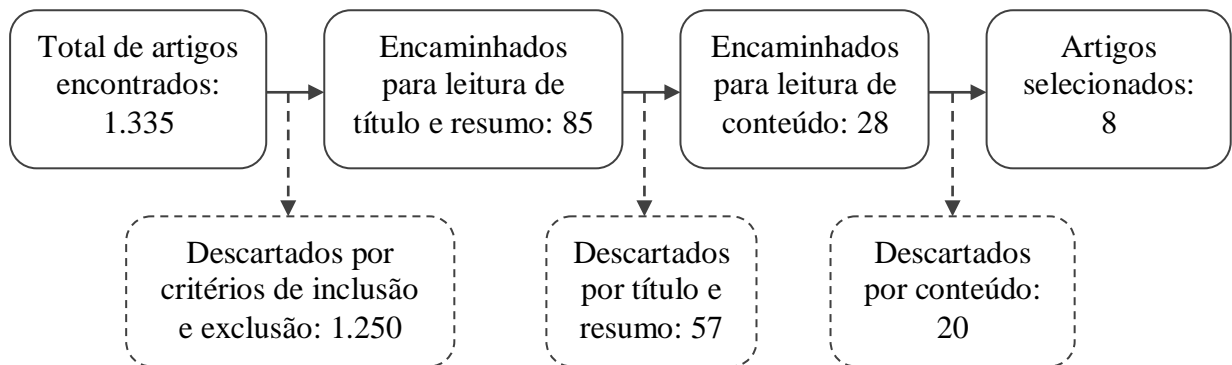
TABELA 1: Resultados das buscas por base de dados.

BASE DE DADOS	CRUZAMENTOS 1 E 2	CRUZAMENTOS 3 E 4
PUBMED	678	606
BVS	26	25
SCIELO	0	0
TOTAL	704	631

Fonte: elaboração própria (2022).

Após aplicados os critérios de inclusão e exclusão, 1.250 estudos foram descartados, restando 85 para análise de título e resumo. Dessa análise, 28 seguiram para análise de conteúdo, restando 8 estudos para o desenvolvimento da discussão.

GRÁFICO 1: Fluxograma das etapas de seleção dos artigos.



Fonte: elaboração própria (2022).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Mrózek²⁵, a investigação citogenética foi dada como preponderante na determinação de valores diagnósticos e prognósticos associados a aberrações cromossômicas frequentes. Sua importância também é verificada quando em conjunto com a análise mutacional de genes, colaborando na classificação de risco genético e orientando a escolha de tratamentos mais eficazes. Em virtude de algumas anormalidades cromossômicas menos comuns não estarem bem apuradas pela técnica, tornando o significado prognóstico

impreciso, estudos colaborativos e prospectivos contínuos mostram-se de grande valor, inclusive para correlacionar desfechos clínicos a alterações citogenéticas e genético-moleculares ou rearranjos genéticos específicos. Nesse sentido, as técnicas de sequenciamento de próxima geração (NGS), como WGS, ascenderam na análise genômica e caracterização de interações complexas em variações genéticas na leucemogênese, surgindo como alternativa à citogenética.

Em sua coorte, Mareschal et al.²⁶ apresentaram um comparativo dos resultados obtidos entre análise citogenética convencional (ACC), sequenciamento de genoma completo (WGS) de baixa cobertura e sequenciamento de transcriptoma completo (WTS). Embora a análise citogenética seja historicamente utilizada na caracterização genética da LMA, os autores apontaram o WGS e WTS como potenciais desafiadores da ACC no diagnóstico de rotina da LMA.

O WGS foi indicado como um método de maior resolução e sensibilidade, justificadas pela detecção de cromossomos complexamente rearranjados e de aberrações isoladas no número de cópias, respectivamente. O método WGS também apresentou associações mais significativas entre certas perdas genômicas e monossomias e seus prognósticos se comparado ao ACC, no entanto, apresentou limitada sensibilidade a aberrações subclonais ou altamente diluídas em células normais e mostrou-se pouco adequado para definição de cariótipos complexos por contagem de aberrações genômicas. Já o WTS se destacou pela cobertura mais ampla e consistente na detecção de fusões gênicas quando comparado à ACC, além de ser capaz de agregar valor prognóstico através de padrões de expressões gênicas.²⁶

Conforme Lejman et al.²⁷, a estimativa do risco de desenvolvimento ou recorrência de LLA podem ser orientadas pela identificação de anormalidades genéticas e novos marcadores da doença, permitindo personalização terapêutica e manejo melhorado da leucemia. Grupos genéticos e vias desorganizadas que não possuíam classificação em virtude da ausência de aneuploidia ou rearranjos cromossômicos únicos atualmente puderam ser desvendados devido ao avanço no sequenciamento de DNA e a análise integrada de dados biológicos em multiescala.

Vaska et al.²⁸ relatou falha na obtenção do cariótipo por bandeamento cromossômico em mais da metade dos casos de LLA-B infantil investigados, sob o argumento de não haver células suficientes em divisão ativa ou material pobre das células metafásicas. Ainda, usando FISH e RT-PCR como contraprova, foi apontada a baixa resolução da análise da metáfase para determinação de algumas anormalidades, consideradas possivelmente enigmáticas para a técnica ou por se tratar de variações submicroscópicas. A técnica de FISH foi, então,

sobressalente pela sua maior resolução e detecção de alterações críticas (como deleções, duplicações e translocações específicas) e, associada ao RT-PCR, elevou a detecção de anormalidades clinicamente relevantes. 9 genes deletados que participam do desenvolvimento de células B, controle do ciclo celular e hematopoiese foram detectados pela análise MLPA (amplificação multiplex de sondas dependente de ligação), mas a técnica foi apontada como não ideal na detecção de novos marcadores prognósticos e sua precisão depende de um máximo de 50% de blastos na amostra.

A SNP-array foi implementada pelos autores²⁸ como alternativa às limitações das demais técnicas e a fim de potencializar as estratégias de diagnóstico, prognóstico e tratamento, tendo suas vantagens evidenciadas pela exigência de pouco DNA, não dependência de células mitóticas, alta resolução, sensibilidade e precisão e capacidade de detecção simultânea de amplificações, deleções e perdas neurais de cópia de heterozigidade (CN-LOH) no genoma inteiro, sendo ideal na identificação de homozigose em regiões grandes. A técnica de SNP-array apresentou forte potencial de integração no diagnóstico de rotina pela sua heterogeneidade nos resultados dos pacientes.

Para Yu et al.²⁹, a associação entre MLPA e índice de DNA (DI) pode complementar a citogenética na detecção de alterações genéticas de LLA-B infantil. Enquanto o DI detecta alta hiperdiploidia, o MLPA atua identificando ganhos ou perdas específicas de cromossomos individuais (aneuploidia) e triando alterações numéricas de cromossomos inteiros (CNA). Além disso, a hipodiploidia mascarada, de diagnóstico difícil, pode ser detectada por DI e MLPA, comprovado por matrizes de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e repetições curtas em tandem (STR). A dupla também se mostrou superior à citogenética tradicional apresentando sensibilidade aprimorada, tempo de resposta mais curto e independência de índice mitótico, sendo bem-sucedida na detecção de alta hiperdiploidia em casos de ausência de metáfase ou cariótipo normal. Um novo subtipo de LLA-B proposto pela OMS, o iAMP21, pode ser identificado com êxito pelo MLPA graças à densidade de sondas ao longo do braço longo do cromossomo 21. Outras anormalidades de alto risco, como IKZF1, também são detectáveis pela técnica.

A matriz de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP-A) é apresentada por Park et al.³⁰ como um tipo de análise capaz de detectar e recuperar microdeleções intersticiais, indetectáveis por citogenética metafásica. Além disso, a identificação de evolução clonal microscópica foi apontada como mais vantajosa se feita por SNP-A quando comparada a outros métodos, que, quando relacionada a genótipo instável, pode sugerir mau prognóstico na LLA. Foi, então, concluído que o ensaio SNP-A permite a investigação de genes

importantes do ponto de vista clínico graças a sua sensibilidade na detecção de alterações críticas.

Gronseth et al.³¹ apontaram que a detecção de perda de heterozigosidade de cópia neutra (cnLOH) por teste de matriz genômica cromossômica (CGAT) apresenta utilidade prognóstica na LMA. Os autores demonstraram que resultados complexos de CGAT são semelhantes a cariótipos complexos em citogenética convencional quando utilizados na indicação de prognóstico ruim, apesar de transmitirem dados diferentes. A cnLOH ocorre com relativa frequência na LMA e pode sugerir mutações ou metilação anormal em constelação homozigótica, tendo efeito na recorrência da doença em pacientes com citogenética intermediária e desfavorável, em que o CGAT se encontra anormal. Ressalta-se no estudo que o CGAT detectou anormalidades que a citogenética, FISH e análise de mutação combinadas não foram capazes de achar, além da técnica ser apontada como substituta de menor custo do FISH para desequilíbrios genômicos, exceto em casos de translocações/rearranjos balanceados, em que FISH e citogenética de metáfase são exigidas. O CGAT apresentou como limitações, assim como FISH, a inaptidão para resolver muitos clones discretos tão eficazmente quanto a citogenética de metáfase.

Como forma de aliar as informações de vários biomarcadores genômicos novos e já documentados ao estabelecimento de diagnóstico, prognóstico e predições clínicas, Navrkalova et al.³² desenvolveram um painel baseado em sequenciamento de próxima geração para gerenciamento personalizado de doenças linfoproliferativas (LPDs), cujo desenho foi validado por procedimentos laboratoriais e bioinformáticos. O painel obteve êxito na investigação de diversos defeitos genéticos em neoplasias linfoides, se mostrando confiável analiticamente e na identificação imparcial de marcadores prognósticos e preditivos.

4 CONCLUSÃO

A detecção dos diversos tipos de leucemias conta com o uso de técnicas laboratoriais consagradas, tais como hemograma, mielograma, citogenética, imunofenotipagem e citoquímica, as quais permitem identificar desde alterações nas contagens de células nos tecidos sanguíneo e medular até alterações microscópicas, como linhagem celular acometida e variações cromossômicas envolvidas na patogênese da doença. Devido a crescentes descobertas no âmbito das aberrações moleculares e sua influência no diagnóstico, prognóstico, curso clínico e tratamento das leucemias, técnicas que otimizam o descobrimento

e rastreamento de diferentes alterações genéticas têm ganhado espaço nas pesquisas sobre a doença.

Dada a importância das técnicas diagnósticas convencionais e das inovações no campo da biologia molecular, os estudos nessa área vêm contribuindo para a identificação e catalogação das diversas alterações envolvidas na leucemogênese, bem como na padronização das diversas técnicas e seus achados, melhorando ainda mais o entendimento sobre as leucemias e o manejo dos pacientes com a doença.

REFERÊNCIAS

1. Rodrigues AD, Santos AV, Rotta LN, Amorim B, Silva EF, Stapenhorst A. Hematologia básica. 2. ed. Porto Alegre: SAGAH; 2019.
2. Hoffbrand AV, Moss PAH. Fundamentos em hematologia de Hoffbrand. 7. ed. Failace R, tradutor. Porto Alegre: Artmed; 2018.
3. Abrahamsohn P. Histologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2016.
4. Silva PH, Alves HB, Comar SR, Henneberg R, Merlin JC, Stingham ST. Hematologia laboratorial: teoria e procedimentos. Porto Alegre: Artmed; 2016.
5. Marty E, Marty RM. Hematologia laboratorial. São Paulo: Érica; 2015.
6. Tsujita M, Blatt SL, Schimieguel DM, Fock RA. Patologias dos Leucócitos: Neoplasias Hematológicas. In: Silva AM, Neto LMR, organizadores, Santos PCJL, coordenador. Hematologia: métodos e interpretação. São Paulo: Roca; 2017. p. 323-62.
7. Ministério da Saúde (BR), Instituto Nacional de Câncer. Leucemia [Internet]. [Brasília]: Ministério da Saúde (BR); 2022 [citado 7 mai 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/leucemia>.
8. Cimolin LC, Ronsoni NF, João PJM. Leucemias. In: Ricci VHP, Maman MJC, organizadores. Guia Prático de Hematologia: Liga Acadêmica de Hematologia da Região Carbonífera [Internet]. Criciúma: UNESC; 2019 [citado 7 mai 2022]. p. 66-85. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18616/hema>.
9. Leucemia Crônica [Internet]. Salvador: Rede D'or; 2022 [citado 24 mai 2022]. Disponível em: <https://www.rededorsaoluiz.com.br/clinica/cehon/sobre-o-cancer/neoplasias-hemat/leucemia-aguda>.
10. Ferri FF. Ferri oncologia e hematologia: recomendações atualizadas de diagnóstico e tratamento. Paris CAM, revisor científico, Robaina TF, tradutora. Rio de Janeiro: Elsevier; 2019.

11. Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia. Leucemias [Internet]. São Paulo: ABRALÉ; 2022 [citado 24 mai 2022]. Disponível em: <https://www.abrale.org.br/doencas/leucemia/>.
12. Emadi A, Law JY. Leucemia mieloide aguda (LMA) [Internet]. Rahway: MSD; 2020 [citado 24 mai 2022]. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/hematologia-e-oncologia/leucemia/síndrome-mielodisplásica-smd>
13. Silva FM, Conceição RR. Avanços e perspectivas no diagnóstico molecular da leucemia mieloide aguda: revisão sistemática. Rev. Bras. An. Clin. 2021 Jul;53(3):232-238.
14. Leucemia mieloide crônica (LMC) [Internet]. São Paulo: Fleury; 2022 [citado 13 nov 2022]. Disponível em: <https://www.fleury.com.br/medico/manuais-diagnosticos/hematologia-manual/leucemia-mieloide-cronica>.
15. Morales SJ, Miranda AH, Bello JR. Leucemia linfoblástica aguda infantil: una aproximación genômica. Bol Med Hosp Infant Mex. 2017 Jan-Feb;74(1):13-26.
16. Chauffaille ML, Zacchi FFS. Leucemia Linfoblástica Aguda. In: Chauffaille MLLF, organizadora. Diagnósticos em hematologia. 2ª ed. Barueri, SP: Manole; 2021. p. 428-41.
17. Bratz BSG, Gatzke M, Frizzo MN. Aspectos moleculares na leucemia linfoide aguda: uma revisão. Newslab. 2016;23(136):16-26.
18. Antunes SR, Ayres LS, Silva SS, Zanelatto C, Rahmeier FL. Hematologia clínica. Porto Alegre: SAGAH; 2019.
19. Manejo da LLC na era pós-molecular [Internet]. São Paulo: Fleury; 2016 [citado 13 nov 2022]. Disponível em: <https://www.fleury.com.br/medico/artigos-cientificos/manejo-da-llc-na-era-pos-molecular-revista-medica-ed-4-2016>.
20. Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. Nat Rev Clin Oncol. 2015 Jun;12(6):344-57.
21. Reis DMS, Visentainer JEL, Macedo LC. Aplicação das técnicas moleculares no diagnóstico das neoplasias mieloproliferativas. SaBios: Rev. Saúde e Biol. 2017 Jan-Apr;12(1):57-65.
22. Entrevista: Diagnóstico molecular auxilia tratamento de pacientes com leucemia [Internet]. Bio em Foco; 2019 [citado 12 nov 2022]. Disponível em: <https://bioemfoco.com.br/noticia/diagnostico-molecular-no-tratamento-de-leucemia/>.
23. Mendes KDS, Silveira RCCP, Galvão CM. Revisão integrativa: método de pesquisa para a incorporação de evidências na saúde e na enfermagem. Texto contexto - enferm. 2008 Dec;17(4):758-64.
24. Mrózek K. Molecular cytogenetics in acute myeloid leukemia in adult patients: practical implications. Pol Arch Intern Med. 2022 Aug;132(7-8):16300.

25. Mareschal S, Palau A, Lindberg J, Ruminy P, Nilsson C, Bengtzén S, et al. Challenging conventional karyotyping by next-generation karyotyping in 281 intensively treated patients with AML. *Blood Adv.* 2021 Feb;5(4):1003-16.
26. Lejman M, Chałupnik A, Chilimoniuk Z, Dobosz M. Genetic Biomarkers and Their Clinical Implications in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar;23(5):2755.
27. Vaska A, Makohusova M, Plevova K, Skalicka K, Cermak M, Chovanec F, et al. *Neoplasma.* 2019 Nov;66(6):1009-18.
28. Yu CH, Lin TK, Jou ST, Lin CY, Lin KH, Lu MY, et al. MLPA and DNA index improve the molecular diagnosis of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep.* 2020 Jul; 10(1):1-11.
29. Park SH, Lee SH, Kim SY, Lee SM, Yi J, Kim IS, et al. Clinical relevance of high-resolution single nucleotide polymorphism array in patients with relapsed acute lymphoblastic leukemia with normal karyotype: a report of three cases. *Ann Lab Med.* 2015 Jan;35(1):132-6.
30. Gronseth CM, McElhone SE, Storer BE, Kroeger KA, Sandhu V, Fero ML, et al. Prognostic significance of acquired copy-neutral loss of heterozygosity in acute myeloid leukemia. *Cancer.* 2015 Sep;121(17):2900-8.
31. Navrkalova V, Plevova K, Hynst J, Pal K, Mareckova A, Reigl T, et al. LYmphoid NeXt-Generation Sequencing (LYNX) Panel: A Comprehensive Capture-Based Sequencing Tool for the Analysis of Prognostic and Predictive Markers in Lymphoid Malignancies. *J Mol Diagn.* 2021 Aug;23(8):959-74.