



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRANSLACIONAL

FLÁVIA MELO CUNHA DE PINHO PESSOA

**VALIDAÇÃO DE UM PAINEL MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE
ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIAS
AGUDAS NO ESTADO DO CEARÁ.**

FORTALEZA-CE

2023

FLÁVIA MELO CUNHA DE PINHO PESSOA

**VALIDAÇÃO DE UM PAINEL MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE
ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIAS
AGUDAS NO ESTADO DO CEARÁ.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Medicina Translacional.

Orientador: Prof.^a Dra. Caroline de Fátima Aquino Moreira Nunes
Coorientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

FORTALEZA-CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P567v Pessoa, Flávia.
Validação de um Painel Molecular para detecção de alterações genéticas em pacientes portadores de leucemias agudas no estado do Ceará / Flávia Pessoa. – 2023.
115 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Caroline Aquino Moreira Nunes.
Coorientação: Profa. Dra. Manoel Odorico de Moraes Filho.
1. Diagnóstico Molecular. 2. Leucemias. 3. Biomarcadores. 4. Prognóstico. 5. Reação em Cadeia da Polimerase. I. Título.

CDD 610

FLÁVIA MELO CUNHA DE PINHO PESSOA

**VALIDAÇÃO DE UM PAINEL MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE
ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIAS
AGUDAS NO ESTADO DO CEARÁ.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Medicina Translacional.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Caroline de Fátima Aquino Moreira Nunes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. André Salim Khayat
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Prof. Dr. Fernando Augusto Rodrigues Mello Júnior
Universidade da Amazônia (UNAMA)

Prof.^a Dra. Ana Virginia Van Den Berg
Universidade Federal do Pará (UFPA)

DEDICATÓRIA

Dedico minha maior conquista à Deus, à minha família e à minha orientadora, pelo incentivo, força e amparo. Obrigada, do fundo do meu coração.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família, principalmente aos meus pais por nunca deixarem faltar nada na minha vida, sempre me dando tudo de melhor e apoiando meus estudos. Obrigada por todo o amor e carinho sempre. Gostaria também de agradecer à minha irmã Sofia, que sempre se faz presente para me escutar e aconselhar da melhor forma.

Aos membros do Laboratório de Farmacogenética -NPDM/UFC. Gostaria de agradecer especialmente aos meus colegas do grupo de pesquisa em oncohematologia: Igor, Caio, Renan, Karol, Bia e Lívia. E não poderia deixar de agradecer ao Jean e ao Emerson que se colocaram à disposição para realizar o meu treinamento assim que entrei para o laboratório. Obrigada por todos os ensinamentos.

Às agências de fomento Cnqp, Funcap e Capes que permitiram a realização desse projeto que é tão grande e possui tanta importância não só para mim, mas para todos os pacientes e familiares que foram tocados de alguma forma.

Ao Dr. Rodrigo, chefe do ambulatório da hematologia do HGF que abriu as portas para mim e para o nosso grupo de pesquisa, ao Dr. Deivide, Dra. Kaira e Dra. Ana Paula que realizaram todas as coletas de medula óssea dos pacientes participantes e me ensinaram tanto. Sou grata também à Jaira e à Aurélia por me acolherem tão bem desde o início das coletas e que tanto me ajudaram e me ajudam em tudo que preciso.

Ao Professor André Khayat e seu grupo de pesquisa de Belém do Pará que me ajudaram tanto na condução do projeto e no processo de padronização da *Nested-PCR*. Obrigada por me acolherem tão bem nas duas semanas que passei na cidade e por se fazerem presentes mesmo com a distância.

À Caroline Aquino, minha orientadora que é um grande exemplo de pessoa e de profissional para mim. Obrigada, professora, por me incentivar e por me ensinar tanto desde a graduação. Sou muito grata por todas as oportunidades que me proporcionou, por sua confiança em mim e por me incentivar a buscar ser sempre mais. Gostaria que soubesse que sempre me inspirei em você e que, para mim, você é o maior exemplo de mulher na ciência.

À minha amiga Carol que desde a graduação se fez tão presente na minha vida e que me compreende como ninguém. Obrigada por escutar meus desabafos, por me incentivar sempre e por cada conselho. Obrigada por comemorar cada passo comigo. Estaremos sempre juntas.

Às minhas amigas de longa data, Isabella, Gabriela e Maria Fernanda. Obrigada por me acompanharem em cada fase da minha vida e por comemorarem cada conquista. O papel de vocês em cada passo que dou é fundamental. Obrigada por todos os conselhos, por todas as saídas, cafés e noites de jogos que me ajudaram e me ajudam a colocar os pés no chão e esquecer a loucura.

À minha amiga que está distante e, ao mesmo tempo, se faz tão presente em todos os momentos importantes, Marcela. Obrigada por ser minha melhor amiga e minha confidente por todos esses anos. A distância faz o coração apertar, mas a certeza de que posso contar com você a qualquer momento me enche de amor. Obrigada por tudo.

Eu agradeço a todos vocês, por tudo e mais um pouco.

EPÍGRAFE

“Os sonhos são como uma bússola, indicando os caminhos que seguiremos e as metas que queremos alcançar. São eles que nos impulsionam, nos fortalecem e nos permitem crescer.”

Augusto Cury

RESUMO

A leucemia é um dos tipos mais comuns de câncer envolvendo pacientes adultos e pediátricos em todo o mundo, e sua distribuição pode estar associada a uma ampla gama de fatores como nível socioeconômico, fatores ocupacionais e etnia. No Estado do Ceará, não há diagnóstico molecular para detecção dos diversos subtipos genéticos que determinam o diagnóstico, prognóstico e terapia alvo-dirigida em indivíduos atendidos nos serviços de saúde. Isso aumenta os custos com internamento, e/ou tratamento clínico/cirúrgico, e resulta em um pior prognóstico para estes pacientes. Ademais, o Estado do Ceará é um dos Estados do Brasil com maior índice de casos de leucemias segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (2023). Esses dados podem estar relacionados com a exposição a fatores ocupacionais ou ainda com fatores genéticos intrínsecos dessa população. Nesse contexto, o trabalho tem como objetivo caracterizar a população cearense acometida por leucemias agudas através de uma avaliação de dados clínicos-epidemiológicos e de expressão dos principais biomarcadores genéticos relacionados à doença descritos na literatura: *BCR::ABL1* (p190+), *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1*, *SIL::TAL1*, *KMT2A::AFF1*, *CBFB::MYH11*, *PML::RARA*, *RUNX1::RUNX1T1* e *FLT3-ITD*. A pesquisa por esses marcadores foi realizada através das técnicas de *Nested-PCR* e de RT-qPCR, visando comparar a sensibilidade de detecção dos dois métodos. Além disso, tendo em vista a ausência de estudos sobre o melhor gene de referência para a análise de pacientes com leucemia aguda, foi selecionado da literatura um painel de genes comumente utilizados como endógenos para análise da estabilidade: *GAPDH*, *ABL*, *HPRT1*, *RPLPO*, *ACTB* e *TBP*. Ao todo, contou-se com uma amostragem de 117 pacientes que foram estratificados de acordo com as diretrizes do *European LeukemiaNet* e da Organização Mundial da Saúde. Os pacientes foram classificados com base no tipo de leucemia, idade, gênero, procedência, parâmetros laboratoriais, risco, ocupação e desfecho. Para a análise estatística baseada nos dados clínico-epidemiológicos dos pacientes, foi aplicado o teste de Chi-quadrado, assumindo um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$). Após todas as análises, foi possível identificar que os participantes do estudo eram predominantemente do sexo masculino e possuíam uma média de idade de 47,3 anos. O estudo também foi capaz de estabelecer o melhor conjunto de endógenos a ser utilizado nos ensaios de expressão com amostras de pacientes com leucemias agudas: *ACTB*, *ABL*, *TBP* e *RPLPO*. Ademais, foram detectadas as alterações genéticas *BCR::ABL1*, *TCF3::PBX1*, *CBFB::MYH11*, *PML::RARA*, *RUNX1::RUNX1T1* e *FLT3-ITD* através das duas técnicas de diagnóstico utilizadas, porém observou-se que a sensibilidade da RT-qPCR foi consideravelmente maior quando comparada à *Nested-PCR*.

Palavras-chave: Diagnóstico Molecular; Leucemias; Biomarcadores; Prognóstico; Reação em Cadeia da Polimerase; Sistema Único de Saúde.

ABSTRACT

Leukemia is one of the most common types of cancer involving adult and pediatric patients worldwide, and its distribution may be associated with a wide range of factors such as socioeconomic status, occupational factors, and ethnicity. In the State of Ceará, there is no molecular diagnosis to detect the various genetic subtypes that determine the diagnosis, prognosis and target-directed therapy in individuals treated in health services. This increases the costs of hospitalization and/or clinical/surgical treatment, and results in a worse prognosis for these patients. In addition, the State of Ceará is one of the states in Brazil with the highest rate of leukemia cases according to data from the National Cancer Institute (2023). This data may be related to exposure to occupational factors or even to intrinsic genetic factors of this population. In this context, the study aims to characterize the Ceará population affected by acute leukemias through an evaluation of clinical-epidemiological data and expression of the main genetic biomarkers related to the disease described in the literature: *BCR::ABL1 (p190+)*, *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1*, *SIL::TAL1*, *KMT2A::AFF1*, *CBFB::MYH11*, *PML::RARA*, *RUNX1::RUNX1T1* and *FLT3-ITD*. The search for these markers was performed using *Nested-PCR* and RT-qPCR techniques, in order to compare both tests sensitivity. In addition, in view of the absence of studies on the best reference gene for the analysis of patients with acute leukemia, a panel of genes commonly used as endogenous for stability analysis was selected from the literature: *GAPDH*, *ABL*, *HPRT1*, *RPLPO*, *ACTB* and *TBP*. Overall, there was a sample of 117 patients who were stratified according to the guidelines of the European Leukemia Net and the World Health Organization. Patients were classified based on type of leukemia, age, gender, origin, laboratory parameters, risk, occupation, and outcome. For the statistical analysis based on patients clinical and epidemiological data, the Chi-square test was applied, assuming a significance level of 95% ($p \leq 0.05$). After all the analyses, it was possible to identify that the study participants were predominantly male and had a mean age of 47.3 years. The study was also able to establish the best set of endogenous genes to be used in expression assays with samples from patients with acute leukemias: *ACTB*, *ABL*, *TBP* and *RPLPO*. In addition, the genetic alterations *BCR::ABL1*, *TCF3::PBX1*, *CBFB::MYH11*, *PML::RARA*, *RUNX1::RUNX1T1* and *FLT3-ITD* were detected through the two diagnostic techniques used, but it was observed that the sensitivity of RT-qPCR was considerably higher when compared to *Nested-PCR*.

Keywords: Molecular Diagnosis; Leukemias; Biomarkers; Prognosis; Polymerase Chain Reaction; Unified Health System.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do processo de Hematopoiese.....	16
Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.....	17
Figura 3. Transformação de células-tronco hematopoiética em células-tronco leucêmicas. ...	19
Figura 4. Anormalidades citogenéticas e cromossômicas associadas a grupos de risco prognóstico na leucemia mieloide aguda.	21
Figura 5. Fluxograma das etapas utilizadas para selecionar o melhor conjunto gênico endógeno.	49
Figura 6. Características clínico-epidemiológicas dos pacientes portadores de leucemias agudas.....	50
Figura 7. Distribuição dos pacientes entre a capital e os outros municípios.....	51
Figura 8. Distribuição dos pacientes pelas macrorregiões do Ceará.	53
Figura 9. Alterações observadas no exame de cariótipo.	56
Figura 10. Média de expressão dos diferentes candidatos a endógenos para leucemia aguda.	64
Figura 11. Frequência de alterações citogenéticas nos pacientes da pesquisa.	70
Figura 12. Curva de amplificação de amostras de LMA com detecção de PML::RARA.	70
Figura 13. Curva de amplificação de amostras de LMA com detecção de RUNX1::RUNX1T1.	71
Figura 14. Curva de amplificação de amostras de LMA com detecção de FLT3-ITD.	72
Figura 15. <i>Nested</i> -PCR e curvas de amplificação de amostras de pacientes portadores de LLA com BCR::ABL1.	73
Figura 16. <i>Nested</i> -PCR e curvas de amplificação de amostras de pacientes portadores de LLA com TCF3::PBX1.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estratificação de risco da LMA segundo ELN 2022.....	22
Tabela 2. Classificação das Leucemias Linfoblásticas segundo a OMS.....	24
Tabela 3. Estratificação de risco de pacientes com LLA.....	25
Tabela 4. Classificação das leucemias agudas de linhagem mieloide segundo a FAB.	30
Tabela 5. Marcadores imunofenotípicos expressos nos subtipos de LMA.	31
Tabela 6. Marcadores imunofenotípicos expressos nos subgrupos de LLA.....	32
Tabela 7. Painel de Biomarcadores Genéticos em Leucemias Agudas.	41
Tabela 8. Sequência de primers da <i>Nested-PCR</i>	42
Tabela 9. Reagentes utilizados na <i>Nested-PCR</i>	43
Tabela 10. Sondas utilizadas na RT-qPCR para detecção de alterações genéticas.	44
Tabela 11. Reagentes utilizados na RT-qPCR.....	44
Tabela 12. Sondas utilizadas na RT-qPCR para validação dos endógenos.....	46
Tabela 13. Distribuição de pacientes por municípios e regiões.....	51
Tabela 14. Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes portadores de LMA e de LLA. .	54
Tabela 15. Alterações observadas no exame de cariótipo.	55
Tabela 16. Classificação dos cariótipos de acordo com ISCN 2016.....	57
Tabela 17. Ocupação laboral de pacientes com LLA e LMA.....	57
Tabela 18. Análise de Chi-Quadrado dos dados Clínico-Epidemiológicos dos pacientes portadores de leucemias agudas participantes do estudo.	59
Tabela 19. Ranking de valores de estabilidade dos endógenos.	62
Tabela 20. Blast de primers e sondas	65
Tabela 21. Análise in silico do anelamento de primers e sondas.....	66
Tabela 22. Características clínico-epidemiológicas dos pacientes com alterações citogenéticas identificadas.....	75
Tabela 23. Características clínico-epidemiológicas dos pacientes sem alterações citogenéticas identificadas.....	77
Tabela 24. Comparação entre a sensibilidade das técnicas de citogenética clássica, <i>Nested-PCR</i> e RT-qPCR.....	78
Tabela 25. Panorama clínico para detecção de alterações genéticas.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL	<i>Abelson Leukemia Gene</i>
ACTB	Beta Actina
AML1	<i>AML1 mei2-like protein</i>
BCR-ABL	<i>Breakpoint Cluster Region–Abelson Murine Leukemia</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CBF	<i>Core Binding Factor</i>
CBFB	Subunidade beta do fator de ligação ao núcleo
CD	<i>Clusters of differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
CEBPA	Proteína alfa de ligação do potenciador CCAAT
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CMF	Citometria de fluxo
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CTHs	Células-tronco hematopoiéticas
CTL	Células-tronco leucêmicas
DEK	<i>DEK proto-oncogene</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRM	Doença Residual Mínima
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELN	<i>European Leukemia Net</i>
ETV6	ETS fator de transcrição variante 6
FAB	<i>French-American-British</i>
FISH	Hibridização in situ por fluorescência
FLT3	Receptor tirosina quinase 3 relacionado à fms
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
Hb	Hemoglobina
HGF	Hospital Geral de Fortaleza
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano DR
HPRT	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
iAMP21	Amplificação intra-cromossomal do cromossomo 21
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISCN	<i>International System for Human Cytogenomic Nomenclature</i>
ITD	<i>Intern Taden Duplication</i>
KMT2A	Lisina metiltransferase 2A
LDH	Lactato Desidrogenase
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LLC	Leucemia Linfoide Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
MAPK/ERK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno/Quinase Regulada por Sinal Extracelular

miRNA	MicroRNA
MM	Mieloma Múltiplo
MO	Medula Óssea
MPO	Mieloperoxidase
mRNA-seq	<i>Transcriptoma Sequencing</i>
MYH11	Cadeia pesada da miosina 11
NCCN	<i>Clinical Practice Guidelines in Oncology Guidelines</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NK	<i>Natural Killers</i>
NOS	Casos que não podem ser classificados mesmo após testes abrangentes
NPM1	Nucleofosmina 1
NUP214	Nucleoporina 214
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBX1	PBX homeobox 1
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Ph	<i>Philadelphia</i>
PI3K/AKT	Fosfatidilinositol 3-Quinase
PML	<i>PML nuclear body scaffold</i>
pré-CTL	Células-tronco pré-leucêmicas
RARA	Receptor de ácido retinóico alfa
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RPLPO	<i>Large Ribosomal Protein</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real
RUNX1	Fator de Transcrição 1 da Família RUNX
RUNX1T1	Co-repressor transcricional do parceiro RUNX1
SIL	<i>SCL interrupting locus</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Sangue Periférico
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
STAT5	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 5
SUS	Sistema Único de Saúde
TAL1	<i>TAL BHLH Transcription Factor 1</i>
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Tdt	<i>Terminal Deoxynuceotidyl Transferase</i>
TKD	<i>Tyrosine Kinase Domain</i>
TEL	<i>Telomere elongation</i>
TP53	Proteína Tumoral p53
WBC	<i>White blood cell</i>
WES	<i>Whole exom sequencing</i>
WGS	<i>Whole genom sequencing</i>
WT	<i>Wild Type</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Problema a ser pesquisado	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1	Leucemias Agudas	15
<i>3.1.1</i>	<i>Epidemiologia</i>	16
<i>3.1.2</i>	<i>Etiopatogenia</i>	18
3.2	Leucemia Mieloide Aguda	20
<i>3.2.1</i>	<i>Estratificação de Risco</i>	20
3.3	Leucemia Linfoblástica Aguda	22
<i>3.3.1</i>	<i>Estratificação de Risco</i>	24
3.4	Alterações Genéticas	25
<i>3.4.1</i>	<i>Alterações Genéticas em Leucemia Mieloide Aguda</i>	25
<i>3.4.2</i>	<i>Alterações Genéticas em Leucemia Linfoblástica Aguda</i>	27
3.5	Diagnóstico	29
<i>3.5.1</i>	<i>Citomorfolgia</i>	29
<i>3.5.2</i>	<i>Imunofenotipagem</i>	30
<i>3.5.3</i>	<i>Citogenética</i>	32
<i>3.5.4</i>	<i>Biologia Molecular</i>	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Pacientes	38
<i>4.1.1</i>	<i>Aspectos Éticos</i>	38
4.2	Etapas do Estudo	38
<i>4.2.1</i>	<i>Amostra para Estudo Molecular</i>	39
<i>4.2.1.1</i>	<i>Sangue</i>	39
<i>4.2.1.2</i>	<i>Medula óssea</i>	39
<i>4.2.2</i>	<i>Crterios de Inclusão, Exclusão e de Retirada do Estudo</i>	39
<i>4.2.3</i>	<i>Estratificação Clínica de Pacientes do Estudo</i>	40

4.3	Métodos de Diagnóstico Molecular.....	40
4.3.1	<i>Extração de RNA.....</i>	40
4.3.2	<i>Quantificação de RNAs e Análise de Integridade dos RNAs.....</i>	40
4.3.3	<i>Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa (RT-PCR).....</i>	40
4.3.4	<i>Identificação de Biomarcadores Genéticos.....</i>	41
4.3.5	<i>Reação em Cadeia da Polimerase Convencional do Tipo NESTED (Nested-PCR).....</i>	41
4.3.6	<i>Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR).....</i>	44
4.3.6.1	<i>Validação da Expressão Gênica por Real Time PCR Quantitativo (RT-qPCR)..</i>	45
4.3.6.2	<i>Avaliação dos melhores genes de referência por RT-qPCR.....</i>	46
4.4	Análise de Dados.....	47
4.4.1	<i>Análise dos Dados Clínico-Epidemiológicos.....</i>	47
4.4.2	<i>Análise do Dados da Normalização dos Endógenos.....</i>	47
5	RESULTADOS	50
5.1	Dados Clínico-Epidemiológicos dos Pacientes.....	50
5.2	Investigação do Painel de Endógenos.....	61
5.3	Validação de <i>Primers</i> e Sondas.....	65
5.4	Comparação de Sensibilidade das técnicas de <i>Nested-PCR</i> e <i>RT-qPCR</i>	69
6	DISCUSSÃO.....	81
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
8	CONCLUSÃO	88
9	REFERÊNCIAS.....	89
	ANEXO 1 – COMPROVANTE DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	107
	ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	108
	ANEXO 3 – QUESTIONÁRIO CLÍNICO PARA PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIAS.....	112

1 INTRODUÇÃO

O estudo das bases moleculares no desenvolvimento de neoplasias forneceu suporte para o conceito de que o câncer é uma doença genética causada pelo acúmulo progressivo de alterações moleculares. Este acúmulo de alterações genéticas confere à célula a propriedade de evasão dos mecanismos de controle homeostático, garantindo a sua própria sobrevivência e proliferação clonal (HANAHAN;WEINBERG, 2000; HANAHAN, 2022; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Dentre os tipos de câncer que afetam o homem, as neoplasias hematológicas apresentam considerável incidência no Brasil. Estimam-se 6.250 novos casos de leucemia em homens e 5.290 em mulheres para cada ano do triênio 2023/2025, além de ser uma das 10 principais causas de morte entre homens e mulheres com câncer, levando mais de 6.738 pessoas a óbito em 2020, reforçando a magnitude deste problema de saúde pública no país (INCA, 2023).

As leucemias agudas representam um conjunto de neoplasias malignas que resultam de falhas na hematopoiese, em que se observa um comprometimento no desenvolvimento e funcionamento normal das células sanguíneas. Devido à proliferação e acúmulo excessivo dessas células, em adultos essa doença se apresenta com um pior prognóstico, com uma estimativa média de vida de 5 anos em torno 23%, quando comparados a crianças e adolescentes, cujas taxas chegam a 90% de cura (ALEXANDER *et al.*, 2018; WEINBERG, 2013).

Mesmo que nos últimos anos os tratamentos de diferentes subtipos de leucemia tenham avançado constantemente, ainda existem muitos obstáculos a serem superados. Por exemplo, a ocorrência de neoplasias relacionadas à terapia está altamente associada à exposição à quimioterapia convencional para leucemia primária. Além disso, o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas no câncer nas células pode ocorrer mesmo após alguns ciclos de quimioterapia e é considerado um dos principais desafios dos tratamentos das leucemias (DU; CHEN, 2017; KANTARJIAN, H. M.; KEATING; FREIREICH, 2018; MCNERNEY; GODLEY; LE BEAU, 2017).

Diante deste cenário, nos últimos anos, esforços intensivos vêm sendo dedicados ao uso de técnicas moleculares de baixo custo e maior rapidez a fim de identificar alterações genéticas que contribuam para a leucemogênese, que influenciem a resposta ao tratamento e que possam ser aplicadas na clínica como novas ferramentas de prognóstico e alvos

terapêuticos. E neste contexto, o desenvolvimento de terapias moleculares direcionadas tem mudado completamente a dinâmica no tratamento da maioria das neoplasias, sendo alternativas menos tóxicas e mais eficazes do que a quimioterapia convencional (KANSAGRA; DAHIYA; LITZOW, 2018; LEE; TAN; OON, 2018; TAYLOR, K. N.; ESKANDER, 2017).

1.1 Problema a ser pesquisado

Atualmente, a terapêutica oncológica tradicional, com a utilização de agentes citotóxicos, vem se mostrando pouco eficiente para o tratamento das mais diversas malignidades, uma vez que muitas delas não são específicas para as alterações moleculares e particularidades genéticas que levam ao desenvolvimento maligno. Assim sendo, o surgimento de novas moléculas baseadas em biomarcadores moleculares para o diagnóstico, manejo e tratamento de pacientes oncológicos se torna imprescindível no sentido de que melhores prognósticos possam ser alcançados (TAYLOR, K. N.; ESKANDER, 2017).

Nesse contexto, implementar um painel de biomarcadores genéticos para o diagnóstico molecular através de técnicas moleculares sensíveis como a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), em pacientes portadores de leucemias no Estado do Ceará pode proporcionar tratamentos direcionados e melhores prognósticos, diminuindo assim os gastos em saúde e melhorando a qualidade de vida e chance de cura dos pacientes atendidos nas redes de atendimento especializado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Validar um painel molecular para detecção de alterações genéticas, através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), em pacientes adultos portadores de leucemias agudas no estado do Ceará.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil epidemiológico e clínico-laboratorial de pacientes portadores de leucemias agudas atendidos em centros de referência no Estado do Ceará;
- Correlacionar a frequência de casos de leucemias, nas regiões estudadas, com a exposição ocupacional ou fatores genéticos de predisposição à doença;
- Identificar o gene de referência (controle endógeno) mais adequado para o estudo de expressão gênica e utilização no diagnóstico e acompanhamento de doença residual mínima, através da técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR);
- Comparar a sensibilidade das técnicas de *Nested* PCR e RT-qPCR na detecção de alterações genéticas prognósticas e diagnósticas comuns nas leucemias agudas em estudo, em amostras de sangue periférico e medula óssea;
- Validar o painel de marcadores genéticos, através da técnica de RT-qPCR, para aplicação diagnóstica e de acompanhamento dos pacientes com leucemias agudas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

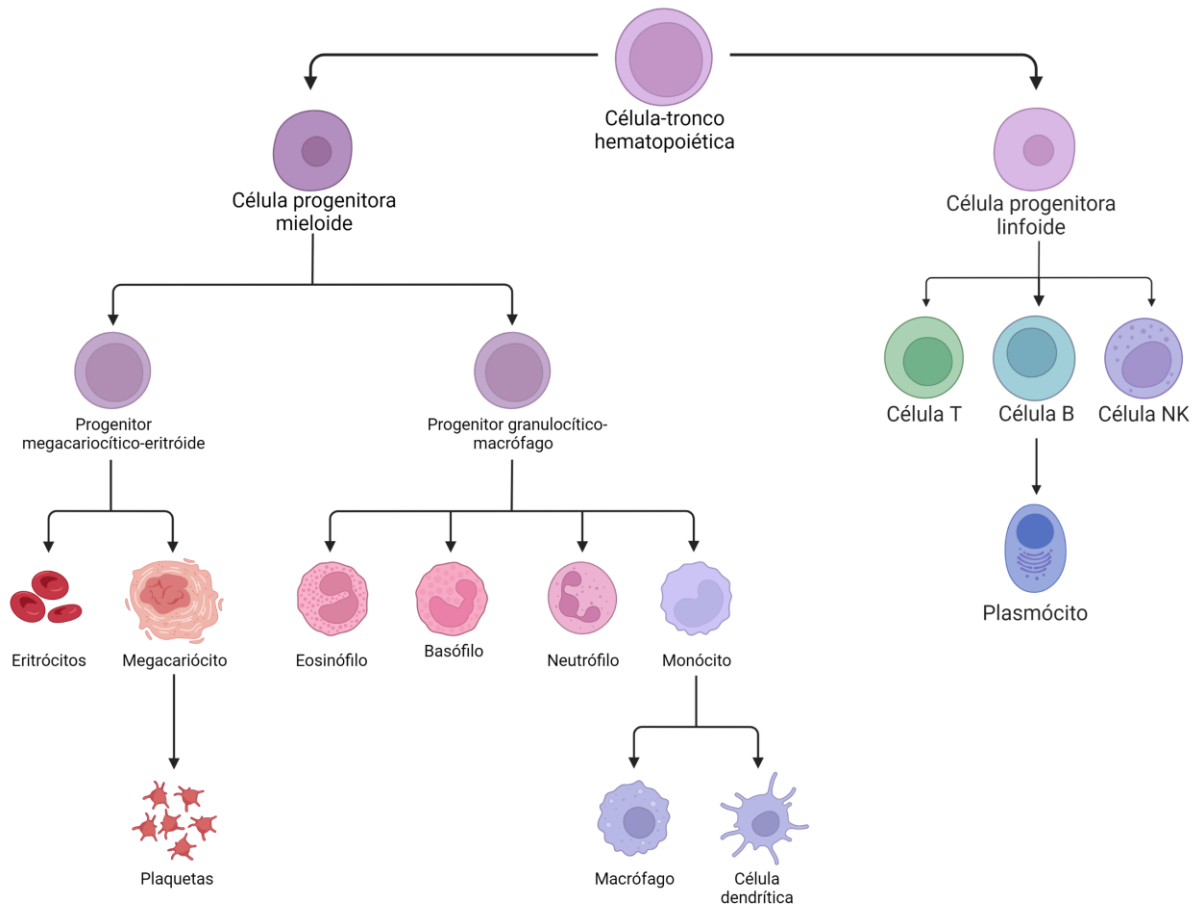
3.1 Leucemias Agudas

As leucemias agudas representam um conjunto de neoplasias malignas que resultam de falhas na hematopoiese, em que se observa um comprometimento no desenvolvimento e funcionamento normal das células sanguíneas. Sua principal característica é o acúmulo de células neoplásicas na medula óssea (MO) que ocorre devido à proliferação excessiva e descontrolada (MWIRIGI; DILLON; RAJ, 2017; PEJOVIC; SCHWARTZ, 2002)

Essa neoplasia ocorre a partir de mutações nas células-tronco hematopoiéticas (CTHs) estão localizadas na MO e são responsáveis por sustentar e regenerar o sistema hematológico, através da produção constante de células progenitoras que se multiplicam e se diferenciam em células hematopoiéticas funcionais. Ao decorrer do tempo, o acúmulo constante de mutações que ocorrem nas CTHs devido ao envelhecimento celular ou à exposição a alguns fatores pode estimular a transformação da CTH em uma célula-tronco pré-leucêmica (Pré-CTL). Quando uma pré-CTL adquire características malignas ela se torna uma célula-tronco leucêmica (CTL) (BARRETO *et al.*, 2022; CHOPRA; BOHLANDER, 2019; PEJOVIC; SCHWARTZ, 2002).

No geral, as leucemias podem ser classificadas de acordo com os precursores afetados: mielóides ou linfóides. O precursor mielóide é responsável pela formação de eritrócitos, granulócitos (eosinófilos, basófilos e neutrófilos), monócitos e plaquetas. O precursor linfóide, por sua vez, forma os linfócitos B/T e células natural killers (NK) (**Figura 1**). Além disso, as leucemias também podem ser categorizadas em agudas e crônicas, a depender da velocidade da evolução e da agressividade da doença. Portanto existem quatro principais tipos de leucemias: Leucemia Mielóide Aguda (LMA), Leucemia Mielóide Crônica (LMC), Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) e Leucemia Linfóide Crônica (LLC) (BURKE; STARTZELL, 2008; DONG *et al.*, 2020; PEJOVIC; SCHWARTZ, 2002).

Figura 1. Esquema do processo de Hematopoiese.



Legenda: As células-tronco hematopoiéticas da medula óssea se diferenciam em qualquer célula no sangue periférico. Várias citocinas ajudam a orientar a diferenciação na direção que o corpo exigir naquele momento. Algumas dessas citocinas, como, por exemplo, a EPO, a TPO e o GM-CSF, são usados clinicamente para manipular a saída da medula óssea. **Fonte:** Adaptado de Seldin; Sloan (2015).

O acúmulo de células neoplásicas na MO leva a uma insuficiência medular, comprometendo todas as três linhagens celulares e, conseqüentemente, causando anemias, hemorragias e infecções. Além disso, os pacientes portadores de leucemias ainda podem apresentar fadiga, palidez, perda de peso e dispnéia, bem como infiltrações leucêmicas em órgãos no baço, fígado e/ou sistema nervoso central (SNC) em alguns casos (PAUL; KANTARJIAN; JABBOUR, 2016; POTENZA *et al.*, 2022; TOMASZEWSKI *et al.*, 2016; USTWANI *et al.*, 2016).

3.1.1 Epidemiologia

Essa neoplasia é um dos tipos mais comuns de câncer envolvendo pacientes adultos e pediátricos em todo o mundo, e sua distribuição pode estar associada a uma ampla gama de fatores como nível socioeconômico, fatores ocupacionais e etnia. Dentre os tipos de câncer que afetam o homem, as neoplasias hematológicas apresentam considerável incidência


no Brasil (INCA, 2023; JULIUSSON; HOUGH, 2016; REIS, SR *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2016).

Mundialmente, em 2020, foram estimados 475 mil casos de leucemia, o que equivale a 2,5% de todos os tipos de câncer. Em relação à mortalidade, em 2020, ocorreram 311.594 e 6.738 óbitos por leucemia no mundo e no Brasil, respectivamente (FERLAY *et al.*, 2021; INCA, 2020; SUNG *et al.*, 2021).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são estimados 11.540 novos casos de leucemia para o Brasil, para cada ano do triênio de 2023 a 2025, o que corresponde a um risco estimado de 5,33 por 100 mil habitantes. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,90 casos novos a cada 100 mil homens e 4,78 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2023).

Considerando o Brasil como um todo, as leucemias não estão entre os dez tipos de câncer mais incidentes no país. Porém, na região Nordeste, as leucemias são listadas como o sexto e o nono tipo de câncer mais incidentes em homens e mulheres, respectivamente. Apenas para o ano de 2023 foram previstos 3.300 novos casos de leucemia nessa região, dos quais 850 são correspondentes ao Estado do Ceará. A capital Fortaleza apresenta as leucemias como o oitavo tipo de câncer mais incidentes (**Figura 2**) (INCA, 2023).

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			Homens	Mulheres			
Próstata	20.650	38,1%			Mama feminina	15.690	28,1%
Traqueia, brônquios e pulmões	3.450	6,4%			Colo do útero	5.280	9,5%
Estômago	3.450	6,4%			Glândula tireoide	4.060	7,3%
Cólon e reto	3.100	5,7%			Cólon e reto	3.930	7,0%
Cavidade oral	2.350	4,3%			Traqueia, brônquio e pulmão	3.120	5,6%
Leucemias	1.770	3,3%			Estômago	2.230	4,0%
Esôfago	1.630	3,0%			Ovário	1.960	3,5%
Fígado	1.600	2,9%			Corpo do útero	1.550	2,8%
Laringe	1.450	2,7%			Leucemias	1.530	2,7%
Sistema nervoso central	1.410	2,6%			Sistema nervoso central	1.360	2,4%

Legenda: As leucemias estão entre os 10 tipos de câncer mais incidentes na população da região nordeste. **Fonte:** Adaptado de INCA (2023).

O estado do Ceará é o terceiro estado com o maior número de casos de leucemias do país, sendo superado apenas por São Paulo e Minas Gerais que preveem 2.600 e 990 novos casos de leucemias para o ano de 2023, respectivamente. Além disso, a capital Fortaleza também se enquadra como a terceira capital do país com o maior número de casos de

leucemias, contabilizando 250 casos. São Paulo e Rio de Janeiro são as duas capitais com a maior quantidade de casos, contabilizando 590 e 380, respectivamente (INCA, 2023).

3.1.2 Etiopatogênese

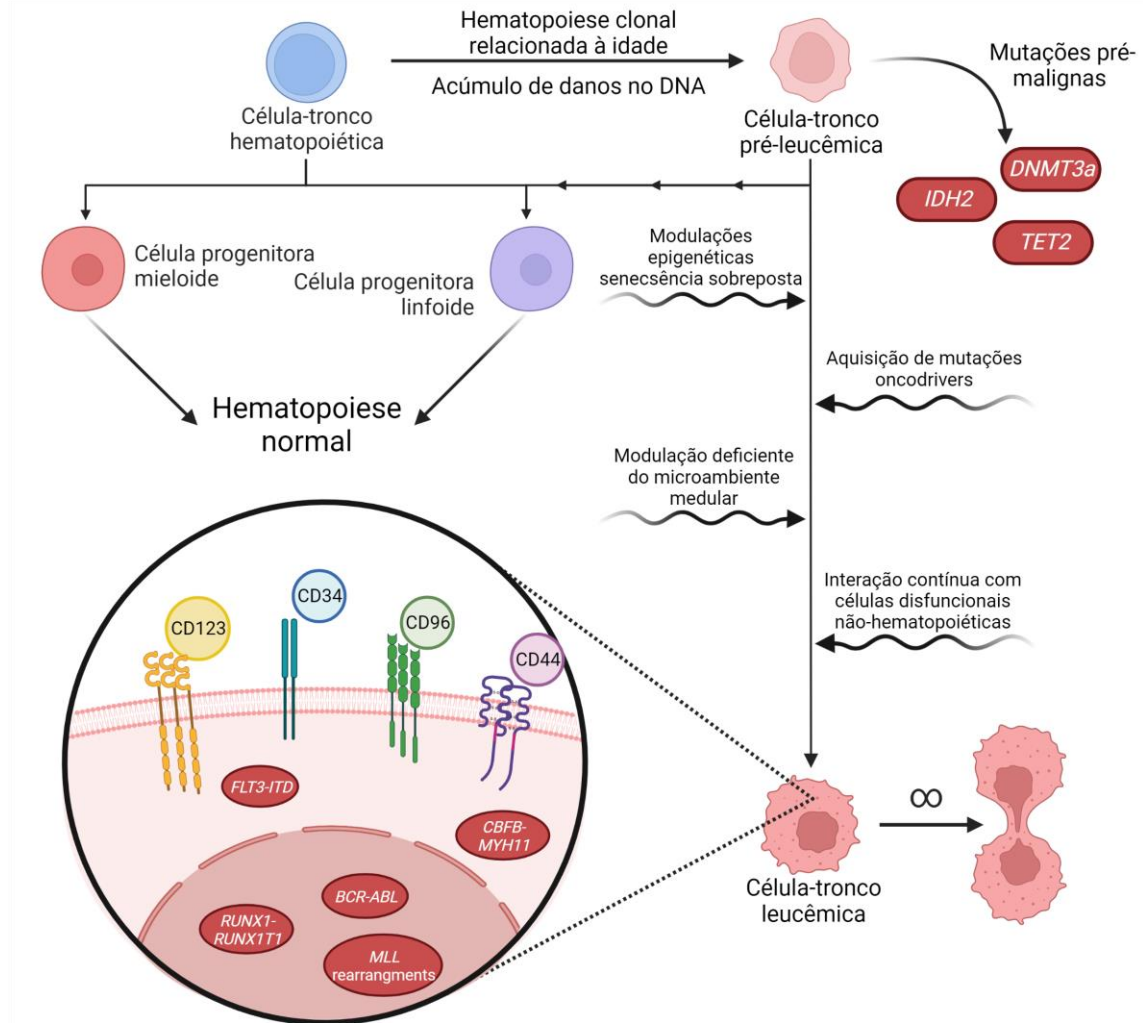
Embora a etiologia da maioria dos casos dessa doença seja desconhecida, sabe-se que ela pode estar associada a uma grande gama de fatores de risco, como: fatores relacionados à idade, ao sexo, ao tabagismo, à genética, a outras neoplasias, a infecções e exposição a fatores ambientais e a agentes químicos (NARAYANAN; WEINBERG, 2020; O'DONNELL *et al.*, 2012; SHALLIS *et al.*, 2019; TEBBI, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019)

Algumas síndromes genéticas aumentam a predisposição dos pacientes portadores a desenvolverem leucemias. Dentre elas, pode-se citar: síndrome de Down, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi, síndrome de Klinefelter, ataxia-telangiectasia e síndrome de degradação de Nijmegen (ALTER, 1996; HASLE, 2001; KJELDSEN, 2022; PAUL; KANTARJIAN; JABBOUR, 2016; TAYLOR, A. M. R. *et al.*, 1996; WHITLOCK, 2006).

Estudos mostram que fatores de exposição ambiental e ocupacional, como a exposição a agrotóxicos e a outros agentes químicos (benzenos, formaldeídos), pode ser considerada como uma das principais condições potencialmente associadas ao desenvolvimento do câncer seja como agente iniciador, podendo originar o tumor a partir de alterações no DNA de uma célula; ou como agente promotor, estimulando a célula alterada a se dividir de forma desorganizada (INCA, 2019; MORAES *et al.*, 2017).

No caso das leucemias, as alterações genéticas em CTHs podem ser potencializadas pelo uso ocupacional de agrotóxicos, o que confere aos usuários destes produtos químicos uma chance aumentada em até 58% no desenvolvimento destes tipos de neoplasias, mesmo em baixas doses de exposição (**Figura 3**) (BARRETO *et al.*, 2022; HOCHANE *et al.*, 2017).

Figura 3. Transformação de células-tronco hematopoiética em células-tronco leucêmicas.



Legenda: Vias de malignidade na hematopoiese e suas características. O envelhecimento e a exposição a agentes ambientais perigosos levam ao acúmulo de danos ao DNA e mutações em células precursoras hematológicas, induzindo um fenótipo de células-tronco pré-leucêmicas (pré-CTL). Os pré-CTLs adquirem vantagens de proliferação sobre as células-tronco hematopoiéticas normais (CTHs) devido a mutações em genes como a DNA metiltransferase 3 alfa (*DNMT3a*), mas ainda mantêm sua capacidade de promover hematopoiese normal. No entanto, outras características malignas adquiridas ao longo dos anos podem levar essas células a um estágio leucêmico adequado. A transformação de pré-CTLs pode acontecer através de processos específicos da célula, como modulação epigenética ou novas mutações adquiridas, ou através de interações entre essas células e seu microambiente, através de mudanças nas vias normais de sinalização de crescimento e sobrevivência ou devido a interações com células estromais ou mesenquimais disfuncionais que também estão presentes na medula óssea. Após o início da malignidade, as células-tronco leucêmicas (CTL) podem apresentar uma variedade de rearranjos cariótipos, como *BCR::ABL* ou *FLT3-ITD*, que determinam suas características malignas e tendem a apresentar perfis de imunofenotipagem que ainda se assemelham a CTHs normais, como $CD34^+ 38^-$, além de super-expressar uma coorte de antígenos de superfície celular que são altamente variáveis entre pacientes e mesmo entre diferentes populações celulares no mesmo paciente. **Fonte:** Adaptado de Barreto et al., (2022).

Em um estudo publicado por Moraes e colaboradores (2017), sobre a correlação de casos de leucemias e fatores ocupacionais no Brasil, o Estado do Ceará aparece como um dos estados com maior frequência de casos de leucemia associados a tais fatores ocupacionais,

dentre eles o uso de agrotóxicos, somando 48% do total de todos os casos, devido ao fato de que a produção agrícola é base econômica fundamental de muitas famílias da região.

3.2 Leucemia Mieloide Aguda

A leucemia mieloide aguda (LMA) é um distúrbio das células-tronco hematopoiéticas causado por alterações genéticas em precursores de células sanguíneas. Nela ocorre uma expansão clonal de blastos mieloides (mieloblastos) no sangue periférico, medula óssea e/ou outros tecidos (LÖWENBERG; BURNETT, 1999; NEWELL; COOK, 2021; PELCOVITS; NIROULA, 2020; STONE; DONNELL; SEKERES, 2004).

A LMA é a segunda leucemia mais frequente em adultos e é o tipo de leucemia aguda mais comum. Trata-se de uma doença cuja idade média ao diagnóstico é em torno de 68 anos e em que se observa um aumento de incidência proporcional à idade. A LMA costuma apresentar um curso bastante agressivo e taxas de sobrevida baixas (ALIBHAI *et al.*, 2015; CELLA *et al.*, 2012; DÖHNER *et al.*, 2017; O'DONNELL *et al.*, 2012; ORAN; WEISDORF, 2012).

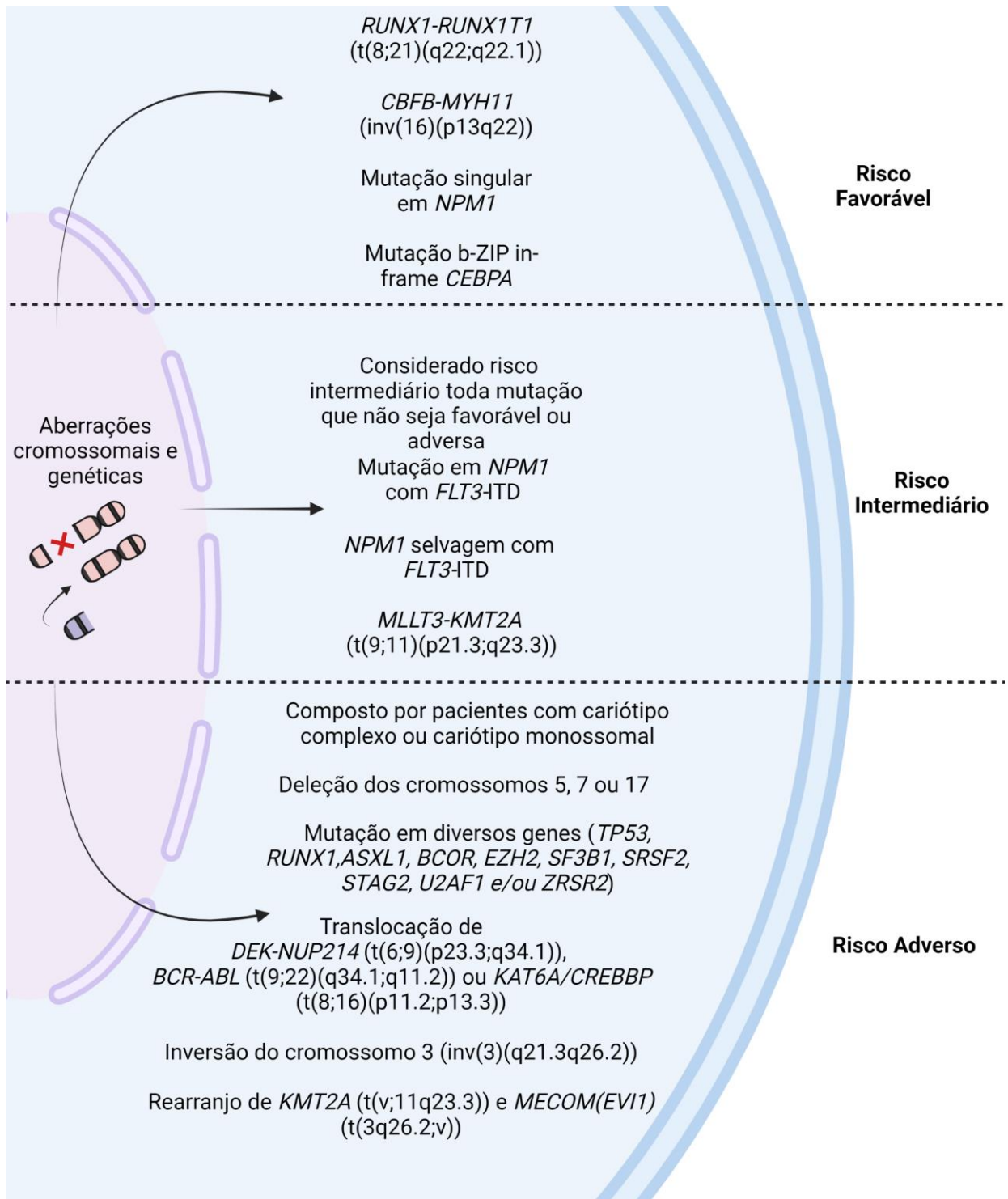
A sobrevida geral estimada na LMA em 5 anos é de 30% e difere bastante entre as várias faixas etárias de pacientes, podendo chegar a 50% em pacientes mais jovens e a valores menores de 10% em pacientes com mais de 60 anos (O'DONNELL *et al.*, 2012; SHIMONY; STONE; STAHL, 2022).

3.2.1 Estratificação de risco

Uma nova diretriz do grupo *European Leukemia Net* (ELN) para 2022, que inclui uma atualização da classificação de risco de 2017, estabeleceu os novos critérios para a estratificação de risco de pacientes portadores de LMA. Essa nova classificação integra o conhecimento de novos achados moleculares e resultados de ensaios recentes, além de enfatizar o risco com base na avaliação da resposta e na negatividade de DRM (DÖHNER *et al.*, 2017, 2022; SHIMONY; STONE; STAHL, 2022).

O ELN, assim como a OMS, realiza a estratificação de risco dos pacientes com LMA de acordo com as aberrações citogenéticas apresentadas. As alterações são divididas em favoráveis, intermediárias e adversas, de acordo com sua influência no prognóstico dos pacientes (**Figura 4**) (ALAGGIO *et al.*, 2022; DÖHNER *et al.*, 2022).

Figura 4. Anormalidades citogenéticas e cromossômicas associadas a grupos de risco prognóstico na leucemia mieloide aguda.



Legenda: *RUNX1*: Fator de transcrição da família *RUNX* 1; *RUNX1T1*: Co-repressor transcricional do parceiro *RUNX1*; *CBFB*: subunidade beta do fator de ligação ao núcleo; *MYH11*: cadeia pesada da miosina 11; *CEBPA*: Proteína alfa de ligação do potenciador CCAAT; *NPM1*: Nucleofosmina 1; bZIP: domínio básico do zíper de leucina; *FLT3-ITD*: receptor tirosina quinase 3 relacionado à *fms* - duplicação interna em tandem; WT: Tipo selvagem; *KMT2A*: lisina metiltransferase 2A; *MLLT3*: Subunidade do complexo de super alongamento *MLLT3*; *TP53*: proteína tumoral p53; *ASXL1*: Regulador transcricional *ASXL* 1; *BCOR*: *BCL6* corepressor; *EZH2*: potenciador da subunidade 2 do complexo repressivo policomb zeste 2; *SF3B1*: fator de splicing 3b subunidade 1; *SRSF2*: fator de splicing rico em serina e arginina 2; *STAG2*: antígeno estromal 2; *U2AF1*: U2 fator auxiliar de RNA nuclear pequeno 1; *ZRSR2*: dedo de zinco tipo CCCH, motivo de ligação de RNA e rico

em serina/arginina 2; DEK: DEK proto-oncogene; NUP214: nucleoporina 214; BCR: ativador de BCR de RhoGEF e GTPase; ABL: ABL proto-oncogene 1; KAT6A: lisina acetiltransferase 6A; CREBBP: proteína de ligação CREB; KMT2A: Histona-lisina N-metiltransferase 2A; MECOM (EVII): sítio de integração de vírus ecotrópicos 1 proteína homóloga. **Fonte:** Adaptado de Pessoa et al., (2023).

As alterações genéticas presentes na LMA, assim como em outras leucemias, são caracterizadas por fusões gênicas e mutações singulares em genes que alteram o processo hematológico normal, o que piora o prognóstico e manejo clínico dos pacientes (TALLMAN *et al.*, 2019).

As alterações citogenéticas mais frequentes nesta doença são *PML::RARA* [t(15;17)(q24.1; q21.2)], *RUNX1::RUNX1T1* [t(8;22)(q22;q22.1)], *CBFB::MYH11* [t(16;16)(p13.1;q22)], cariótipo complexo e mutações em *FLT3*, *NPM1*, *TP53*, *ASXL1*, entre vários outros genes (**Tabela 1**) (DÖHNER *et al.*, 2022; KANTARJIAN, H. *et al.*, 2021).

Tabela 1. Estratificação de risco da LMA segundo ELN 2022.

Risco	Alteração genética
Favorável	t(8;21)(q22;q22.1)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i> inv (16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFB::MYH11</i> Mutação em <i>NPM1</i> sem <i>FLT3-ITD</i> Mutação em bZIP <i>CEBPA</i>
Intermediário	Mutação em <i>NPM1</i> com <i>FLT3-ITD</i> <i>NPM1</i> selvagem com <i>FLT3-ITD</i> t(9;11)(p21.3;q23.3)/ <i>MLLT3::KMT2A</i> Anormalidades citogenéticas não classificadas como favoráveis ou adversas
Adverso	t(6;9)(p23.3;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i> t(v;11q23.3)/ rearranjo de <i>KMT2A</i> t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i> t(8;16)(p11.2;p13.3)/ <i>KAT6A::CREBBP</i> inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2</i> , <i>MECOM(EVII)</i> t(3q26.2;v)/ rearranjo de <i>MECOM(EVII)</i> del(5q); del(7), del(17p) Cariótipo complexo; Cariótipo monossomal Mutação em <i>TP53</i> , <i>ASXL1</i> , <i>BCOR</i> , <i>EZH2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>STAG2</i> , <i>U2AF1</i> e/ou <i>ZRSR2</i>

Fonte: Adaptado de DOHNER et al., (2022).

3.3 Leucemia Linfoblástica Aguda

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma malignidade hematológica impulsionada pela proliferação descontrolada e acúmulo de células progenitoras linfoides

(linfócitos B e/ou T) na medula óssea e/ou sítios extramedulares. Os subtipos LLA-B e LLA-T apresentam incidência e padrões distintos (JABBOUR, E. *et al.*, 2015; JABBOUR, E. J.; FADERL; KANTARJIAN, 2005; PIZZO *et al.*, 2014; USTWANI *et al.*, 2016). A LLA de células B é responsável por aproximadamente 75% dos casos de LLA em adultos, enquanto a LLA de células T ocorre nos 25% de casos restantes (BARDELLI *et al.*, 2021; COCCARO *et al.*, 2019; SAMRA *et al.*, 2020).

A LLA ocorre em uma distribuição etária bimodal, cujo primeiro pico ocorre em crianças entre 0-5 anos de idade e o segundo em adultos acima de 50 anos de idade. A incidência dessa malignidade na população pediátrica é alta, tendo em vista que a LLA representa 80% dos casos de leucemia infantil, enquanto na população adulta ela corresponde a cerca de 15-25% dos casos de leucemias agudas (FADERL *et al.*, 2010; GÖKBUGET; HOELZER, 2009; JABBOUR, E. *et al.*, 2015; JASO *et al.*, 2014; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

Ao contrário da LLA pediátrica, que é curável em > 90% dos casos, a LLA em adultos é caracterizada por um prognóstico desfavorável, com opções limitadas de tratamento e taxas de cura inferiores a 40% devido, em parte, às características de doença de maior risco nessa população e toxicidade significativa associada à quimioterapia (COCCARO *et al.*, 2019; MALARD; MOHTY, 2020; SALEH; FERNANDEZ; PASQUIER., 2022; SAMRA *et al.*, 2020).

Quanto à análise citogenética, a LLA também pode ser categorizada em diferentes subtipos, de modo que a OMS classifica a Leucemia Linfoblástica B/linfoma de acordo com as anormalidades genéticas recorrentes e específicas, sendo elas: LLA-B/linfoma NOS (casos que não podem ser classificados mesmo após testes abrangentes), LLA-B/linfoma com alta hiperdiploidia, LLA-B/linfoma com hipodiploidia, LLA-B/linfoma com amplificação intracromossomal do cromossomo 21 (iAMP21), LLA-B/linfoma com fusão *BCR::ABL1* [t(9;22)(q34;q11.2)], LLA-B/linfoma com características *BCR::ABL1*-like, LLA-B/linfoma com rearranjos de *KMT2A* (*MLL*), LLA-B/linfoma com fusão *ETV6::RUNX1* [t(12;21)(p13.2;q22.1)], LLA-B/linfoma com características *ETV6-RUNX1*-like, LLA-B/linfoma com fusão *TCF3::PBX1* [t(1;19)(q23;p13.3)], LLA-B/linfoma com fusão *IGH::IL3* [t(5;14)(q31.1;q32.1)], LLA-B/linfoma com fusão *TCF3::HLF* [t(17;19)(q22;p13)], LLA-B/linfoma com outras anormalidades genéticas (**Tabela 2**) (ALAGGIO *et al.*, 2022; ALEXANDER *et al.*, 2018; BARDELLI *et al.*, 2021; MAN; MORRIS; KENG, 2017; MANSUR *et al.*, 2009; MULLIGHAN, 2012; PUI; EVANS, 2006).

Por sua vez, a leucemia linfoblástica T/linfoma pode ser classificada em basicamente dois tipos: LLA-T/linfoma de precursores T e LLA-T/linfoma NOS. As anormalidades mais frequentes na LLA-T são a fusão *SIL::TALI* e a expressão ectópica de *HOX11L2* (**Tabela 2**) (ALAGGIO *et al.*, 2022; ALEXANDER *et al.*, 2018; BARDELLI *et al.*, 2021; MAN; MORRIS; KENG, 2017; MANSUR *et al.*, 2009; MULLIGHAN, 2012; PUI; EVANS, 2006).

Tabela 2. Classificação das Leucemias Linfoblásticas segundo a OMS.

Leucemia Linfoblástica B/ Linfoma	
LLA-B/linfoma NOS	LLA-B/linfoma com fusão <i>ETV6::RUNX1</i>
LLA-B/linfoma com alta hiperdiploidia	LLA-B/linfoma com características <i>ETV6::RUNX1</i> -like
LLA-B/linfoma com hipodiploidia	LLA-B/linfoma com fusão <i>TCF3::PBX1</i>
LLA-B/linfoma com <i>iAMP21</i>	LLA-B/linfoma com fusão <i>IGH::IL3</i>
LLA-B/linfoma com fusão <i>BCR::ABL1</i>	LLA-B/linfoma com fusão <i>TCF3::HLF</i>
LLA-B/linfoma com características <i>BCR::ABL1</i> -like	LLA-B/linfoma com outras anormalidades genéticas
LLA-B/linfoma com rearranjos de <i>KMT2A</i>	
Leucemia Linfoblástica T/ Linfoma	
LLA-T/linfoma de precursores T	LLA-T/linfoma NOS

Fonte: Adaptado de OMS (2022).

3.3.1 Estratificação de risco

A estratificação de risco da LLA em adultos é realizada em dois grupos: risco padrão e alto risco. Atualmente, as classificações de risco são baseadas em características clínicas (idade, contagem de leucócitos, envolvimento de órgãos extramedulares), imunofenótipo, citogenética, genética molecular e monitoramento de DRM (DEANGELO; JABBOUR; ADVANI, 2023; FOÀ; CHIARETTI; GUARINI; VITALE, 2009).

O risco padrão foi definido por uma contagem de leucócitos $< 30 (x10^9 /L)$, um fenótipo não-pró-B e pela ausência do rearranjo *BCR-ABL1* em LLA-B. O grupo de alto risco é caracterizado por uma contagem leucocitária $>100 (x10^9/L)$, citogenética/genética adversa e LLA T-precoce / madura, independentemente dos resultados da DRM (**Tabela 3**) (BASSAN *et al.*, 2018; FOÀ; CHIARETTI; GUARINI; VITALE, 2009).

A citogenética/genética adversa é definida pela presença de *BCR::ABL1*, do rearranjo de *KTM2A/t(4;11)*, 11q23 anormal, adição do cromossomo 8, deleção do cromossomo 7, deleção do braço longo do cromossomo 6 (6q), presença da translocação

t(8;14) (*IGH::MYC*), hipodiploidia, alta hiperdiploidia ou cariótipo complexo com cinco ou mais anomalias não relacionadas (BASSAN *et al.*, 2018). Além disso, a presença do gene de fusão *CDX2::UBTF* e/ou de rearranjos de genes como *MYC*, *MEF2D* e *HLF* confere um prognóstico ruim aos pacientes com LLA (ARBER *et al.*, 2022).

Tabela 3. Estratificação de risco de pacientes com LLA.

Risco Padrão	<ul style="list-style-type: none"> • Leucócitos < 30 (x10⁹ /L) • Fenótipo não-pró-B • Ausência do rearranjo <i>BCR::ABL1</i>
Alto Risco	<ul style="list-style-type: none"> • Leucócitos >100 (x10⁹/L) • LLA T-precoce / madura • Presença de <i>BCR::ABL1</i> • Rearranjo de <i>KTM2A/t(4;11)</i> • Presença 11q23 anormal • Adição do cromossomo 8 • Deleção do cromossomo 7 • Deleção do braço longo do cromossomo 6 • Presença da translocação t(8;14) (<i>IGH::MYC</i>) • Hipodiploidia • Alta hiperdiploidia • Presença de <i>CDX2::UBTF</i> • Rearranjos de <i>MYC</i>, <i>MEF2D</i> e <i>HLF</i>

Fonte: Adaptado de Bassan et al., (2020), Arber et al., (2022).

3.4 Alterações Genéticas

3.4.1 Alterações genéticas em Leucemia Mieloide Aguda

Na LMA, anormalidades citogenéticas recorrentes são marcadores diagnósticos e prognósticos estabelecidos; podem ser alvo terapêutico, uma vez que a maioria dessas mutações confere resistência às opções terapêuticas tradicionalmente utilizadas (KANTARJIAN, H. *et al.*, 2021; PESSOA *et al.*, 2023). As alterações genéticas na LMA são recorrentes e incluem ampliações, translocações, deleções, rearranjos e mutações pontuais (DAVER *et al.*, 2019; DÖHNER *et al.*, 2017; WALTER, M. J. *et al.*, 2009).

A translocação t(8;21)(q22;q22.1) resulta em uma fusão gênica entre os genes *RUNX1* e *RUNX1T1*, derivando o gene híbrido *RUNX1::RUNX1T1*. Essa aberração citogenética é especialmente identificada em pacientes com LMA M2 de acordo com a

classificação franco-americana-britânica (FAB) (BENNETT *et al.*, 1976). O oncogene de fusão *RUNX1::RUNX1T1* codifica um fator de transcrição aberrante, que desempenha um papel fundamental na iniciação e manutenção da LMA. Além disso, esse oncogene também atua na regulação do splicing alternativo de RNA em células leucêmicas e está presente em cerca de 15% dos casos de LMA (GRINEV *et al.*, 2021; PESSOA *et al.*, 2023; SWART; HEIDENREICH, 2021).

A inversão *inv(16)(p13q22)* e a translocação *t(16;16)(p13q22)* resultam na formação do gene quimérico *CBFB::MYH11*, que codifica a proteína de fusão CBFb-SMMHC. A mutação *inv(16)* é relatada em quase todos os pacientes com o subtipo M4Eo (M4 com eosinofilia) de LMA de acordo com a FAB, que constitui cerca de 5–7% de todos os pacientes com LMA. É tipicamente associada a achados morfológicos distintos, incluindo um componente monocítico proeminente, eosinofilia e anormalidades envolvendo grânulos eosinofílicos imaturos nos estágios promielocíticos e mielocíticos tardios da maturação dos eosinófilos. Devido à variabilidade dos pontos de quebra genômicos dentro de *CBFB* e *MYH11*, mais de 10 variantes de transcritos de fusão *CBFB::MYH11* de tamanhos diferentes foram relatadas. Mais de 85% das fusões são do tipo A (PESSOA *et al.*, 2023; QUESADA *et al.*, 2021; SCHWIND *et al.*, 2013).

De acordo com as diretrizes do ELN, pacientes que apresentam mutações no FSC, como translocação 8;21 (*t(8;21)(q22;q22.1)*) e inversão 16 (*inv(16)(p13q22)*) ou *t(16;16)(p13;q22)*, são classificados como de risco favorável, juntamente com pacientes com uma única mutação em *NPM1* ou *CEBPA* mutado in-frame bZIP (AGUILERA *et al.*, 2015; ALIBHAI *et al.*, 2015; ARBER *et al.*, 2022; BENNETT *et al.*, 1976; FALZONE *et al.*, 2021; PESSOA *et al.*, 2023).

Mutações no gene da tirosina quinase 3 (*FLT3*) representam uma das alterações genéticas mais frequentemente identificadas na LMA. Duas classes principais de mutações ativadoras de *FLT3* foram identificadas em pacientes com LMA: duplicações internas em tandem (ITD) e mutações pontuais no domínio tirosina quinase (TKD). As mutações do tipo ITD são detectadas em 20%-25% dos pacientes com LMA, enquanto as mutações do tipo TKD são identificadas em 5%-10% dos casos dessa doença. Em ambos os casos, essas mutações são responsáveis por causar ativação constitutiva do gene *FLT3*, levando à ativação aberrante de múltiplas vias, como fosfatidilinositol 3-quinase PI3K/AKT, proteína quinase ativada por mitógeno/quinase regulada por sinal extracelular (MAPK/ERK) e transdutor de sinal e ativador de transcrição 5 (STAT5) (DAVER *et al.*, 2019; KINDLER; LIPKA; FISCHER, 2010; MESHINCHI *et al.*, 2006; TSE *et al.*, 2001).

A presença de mutações no gene *FLT3-ITD* está altamente associada ao aumento da contagem de leucócitos, altas porcentagens de sangue periférico (SP) e blastos de medula óssea (MO) e LMA aparentemente com citogenética normal (65%-70%). A presença de *FLT3-ITD* está associada com riscos aumentados de recidiva e diminuição de taxas de sobrevida geral, podendo atuar como um fator prognóstico em pacientes portadores de LMA. Atualmente, a presença dessa anormalidade citogenética confere risco intermediário aos pacientes portadores (DÖHNER *et al.*, 2022; FRÖHLING *et al.*, 2002; KINDLER; LIPKA; FISCHER, 2010; KOTTARIDIS *et al.*, 2001; PESSOA *et al.*, 2023; SCHNITTGER *et al.*, 2002).

A leucemia promielocítica aguda (LPA) é um subtipo biológico e clinicamente distinto de leucemia mieloide aguda (LMA) com patogênese molecular, manifestações clínicas e tratamento únicos. Esse subtipo é caracterizado citogeneticamente por uma translocação balanceada entre os genes *PML* e *RARA* (t(15;17)(q24;q21)), que resulta no gene de fusão *PML::RARA* (taxas de cura de aproximadamente 90%) (BENNETT *et al.*, 1976; BURNETT *et al.*, 2015; CASTOLDI *et al.*, 1994; CONNEELY; STEVENS, 2020; GOLOMB *et al.*, 1980; ILAND *et al.*, 2012; LIQUORI *et al.*, 2020; LO-COCO *et al.*, 2013).

O gene de fusão *PML::RARA* produz um bloqueio da diferenciação mieloide na fase promielocítica. Neste caso, o *PML::RARA* reprime a transcrição de vários genes implicados na diferenciação mieloide, como aqueles envolvidos na diferenciação para a linhagem de granulócitos. Além disso, essa alteração confere sobrevida e vantagem proliferativa às células leucêmicas, resultando no acúmulo progressivo de promielócitos na medula óssea de pacientes com LPA (GRISOLANO *et al.*, 1997; HE *et al.*, 1998; KAMASHEV; VITOUX; THÉ, 2004; PANDOLFI *et al.*, 1992).

3.4.2 Alterações genéticas em Leucemia Linfoblástica Aguda

As alterações citogenéticas observadas nos casos de leucemia linfoblástica aguda são caracterizadas majoritariamente por translocações cromossômicas que são responsáveis por gerar genes de fusão que também são capazes de influenciar no prognóstico dos pacientes (ALAGGIO *et al.*, 2022).

A translocação entre os cromossomos 9 e 22 (t(9;22)(q34;q11)) é caracterizada pela formação do gene de fusão *BCR::ABL1*, que também comumente chamado de cromossomo Philadelphia (Ph). Essa alteração é normalmente encontrada em pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC), mas também pode ocorrer em alguns casos de leucemia linfoblástica aguda (LLA). A depender da localização do ponto de quebra no gene BCR, a

transcrição resulta em mRNAs de vários comprimentos que são traduzidos em proteínas de fusão com um peso molecular de 230kDa (p230), 210 kDa (p210), que é normalmente encontrada nos pacientes com LMC, ou 190 kDa (p190), forma comumente identificada nos casos de LLA. A presença da translocação *BCR::ABL1* gera ativação constitutiva da atividade de tirosina quinase (CLARK *et al.*, 1988; ERIKSON *et al.*, 1986; FADERL *et al.*, 2000; GÖTZ *et al.*, 1992; MAINO *et al.*, 2014; MAURER *et al.*, 1991; PRETI *et al.*, 1994; RECKEL *et al.*, 2017)

A LLA Ph-positiva está associada a mau prognóstico tanto em crianças como em adultos. Esses pacientes respondem mal à terapia e possuem taxas de curta remissão e sobrevida. A incidência de leucemia Ph-positiva aumenta com a idade e explica, em parte, os piores resultados terapêuticos na LLA adulta (FADERL *et al.*, 2000; RECKEL *et al.*, 2017; WESTBROOK *et al.*, 1992)

O gene de fusão *TCF3::PBX1* (t(1;19)(q23;p13)) é expresso como resultado da translocação cromossômica t(1;19)(q23;p13) em quase 5% dos casos de leucemia linfoblástica aguda. Evidências atuais suportam a ideia de que a atividade oncogênica do *TCF3::PBX1* é propagada pela ativação aberrante de genes normalmente controlados pelos complexos *PBX* e *HOX*. Normalmente, a presença dessa translocação confere aos pacientes prognósticos melhores, com maiores taxas de sobrevida geral e duração de (DIAKOS *et al.*, 2014; FELICE *et al.*, 2011; KAGER *et al.*, 2007).

Na LLA, a presença do gene de fusão *KMT2A::AFF1*, derivado da translocação t(4;11)(q21;q23), é o rearranjo mais recorrente do gene *KMT2A*, e funciona como ativador transcricional. Essa alteração na leucemia costuma ser associada a um imunofenótipo pró-B e é reconhecida pelos principais grupos cooperativos como um subgrupo com um desfecho particularmente ruim e com baixas taxas de sobrevida (ESTEVE *et al.*, 2021; MEYER *et al.*, 2018; PICIOCCHI *et al.*, 2021; RICHARD-CARPENTIER *et al.*, 2021; TAMAI *et al.*, 2017; THOMAS, M. *et al.*, 2005; VORUZ *et al.*, 2021).

A translocação t(12;21)(p13;q22) que gera o gene de fusão *ETV6::RUNX1* é uma anormalidade genética presente em cerca de 25% dos casos de LLA de células B na infância. O gene *RUNX1* pertence à família de fatores de transcrição *core binding factor* (CBF), enquanto o gene *ETV6* está envolvido em translocações cromossômicas em uma ampla variedade de neoplasias hematológicas. Estudos sugerem que a presença de *ETV6::RUNX1* pode estar associada a um desfecho favorável dos pacientes, com baixas taxas de recidivas (BHOJWANI *et al.*, 2012; BURMEISTER *et al.*, 2010; ROMANA *et al.*, 1995; RUBNITZ *et al.*, 1997; VAN DELFT *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2012; ZUNA *et al.*, 1999).

A alteração cromossômica resultante da fusão dos genes *SIL::TAL1* ocorre em 16%–26% dos casos de LLA de precursores do tipo T, e é frequentemente detectada em crianças e adolescentes. A fusão de *SIL::TAL1* resulta de uma deleção no gene *TAL1* que se funde com a porção 5' não-codificante do gene *SIL*, levando a uma hiper expressão aberrante da proteína TAL1. A relevância clínica e o valor prognóstico dessa alteração na LLA-T ainda não foram completamente estabelecidos (CAVÉ *et al.*, 2004; D'ANGIÒ *et al.*, 2015; DELABESSE *et al.*, 1997; MANSUR *et al.*, 2009).

3.5 Diagnóstico

O diagnóstico das leucemias é feito através de uma série de ferramentas diagnósticas incluem técnicas de citomorfologia, citoquímica, imunofenotipagem, citogenética e técnicas de genética molecular, onde todas se complementam para classificar a doença. Ao diagnóstico, os pacientes são estratificados por uma série de fatores que ajudam a determinar o prognóstico e a abordagem terapêutica ideal (JABBOUR, E. *et al.*, 2015).

3.5.1 Citomorfologia

Inicialmente, a classificação das leucemias agudas era feita de acordo com as características citomorfológicas das células neoplásicas, seguindo o padrão estabelecido pelo grupo Francês-Americano-Britânico (FAB). Essa classificação levava em consideração o tipo de célula em que a leucemia se desenvolve, o grau de maturidade das células, bem como critérios morfológicos e citoquímicos (BORNE, 1982; HASSAN *et al.*, 1993; LOPES E SOUZA, 2007).

A FAB estratificou a LMA em 8 subtipos (M0-M7), levando em consideração o tipo de célula em que a leucemia se desenvolve, o grau de maturidade das células, bem como critérios morfológicos e citoquímicos (**Tabela 4**) (BORNE, 1982; HASSAN *et al.*, 1993; LOPES E SOUZA, 2007). Já a LLA foi subdividida em três subtipos diferentes: L1, L2 e L3. Os subtipos eram determinados através de critérios morfológicos como tamanho celular, citoplasma, presença ou ausência de nucléolos, basofilia e vacuolização (CHIARETTI; ZINI; BASSAN, 2014; FADERL; JEHA; KANTARJIAN, 2003; JABBOUR, E. J.; FADERL; KANTARJIAN, 2005; RAWAT *et al.*, 2017).

Tabela 4. Classificação das leucemias agudas de linhagem mieloide segundo a FAB.

Classificação	Nome
M0	Leucemia mieloblástica aguda indiferenciada
M1	Leucemia mieloblástica aguda com maturação mínima
M2	Leucemia mieloblástica aguda com maturação
M3	Leucemia promielocítica aguda
M4	Leucemia mielomonocítica aguda
M5	Leucemia monocítica aguda
M6	Leucemia eritroide aguda
M7	Leucemia megacarioblástica aguda

Fonte: Adaptado de Sanz et al., (2019).

Atualmente, a classificação estabelecida pela FAB entrou em desuso, porém ela foi utilizada durante muitos anos como ferramenta para o estadiamento das leucemias agudas, mesmo que ela não levasse em consideração fatores que afetam o prognóstico (INFANTE; PIRIS; HERNÁNDEZ-RIVAS, 2018; MROŹEK *et al.*, 2012; WALTER, R. B. *et al.*, 2013).

3.5.2 Imunofenotipagem

As células do tecido hematopoiético expressam antígenos de superfície, intracitoplasmáticos e intranucleares que podem estar associados a uma linhagem celular ou ao estágio de maturação das células (CAVALCANTI JÚNIOR *et al.*, 2004). A imunofenotipagem é uma técnica que permite o reconhecimento específico desses marcadores através de citometria de fluxo (CMF) ou imuno-citoquímica (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

A CMF é uma técnica multiparamétrica que é realizada por meio de anticorpos monoclonais específicos que reconhecem epítomos específicos de antígenos celulares (clusters of differentiation - CD). Esses anticorpos são marcados com fluorescência diferentes que são capazes de reconhecer padrões de intensidade de expressão de diversos antígenos celulares (DA SILVA *et al.*, 2006; HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008; QUIXABEIRA; SADDI, 2008; REGO; SANTOS, 2009).

A imunofenotipagem por meio de CMF passou a ser utilizada como procedimento padrão para o diagnóstico e classificação das leucemias bem como para a detecção e monitoramento de doença residual mínima (DRM). Além de avaliar a presença de marcadores associados ao prognóstico, essa técnica é capaz de detectar marcadores que são possíveis alvos terapêuticos (BARDELLI *et al.*, 2021; CHIARETTI; ZINI; BASSAN, 2014; HAFERLACH, 2019; JABBOUR, E.; PUI; KANTARJIAN, 2018; TISO *et al.*, 2022; ZEISIG *et al.*, 2021).

Essa técnica é de grande importância, sendo crucial para a detecção, caracterização e quantificação das células. Ademais, através dela é possível traçar o perfil de expressão de cada subpopulação presente em uma amostra, tendo em vista que é possível medir a intensidade de fluorescência que é proporcional à intensidade de expressão de cada marcador (CAVALCANTI JÚNIOR *et al.*, 2004; HAFERLACH; SCHMIDTS, 2020; LORAND-METZE, 2006; TISO *et al.*, 2022; ZEISIG *et al.*, 2021).

Em relação à identificação de antígenos para o diagnóstico de LMA, eles são classificados como precursores (CD34, CD117, HLA-DR), marcadores mieloides (MPO, CD33, CD13), marcadores de maturação mielóide (CD11b, CD15, CD64, CD4, CD38, CD11c), marcadores monocíticos (CD14, CD36, CD64), marcadores megacariocíticos (CD41, CD36, CD61) e marcadores eritrocitários (CD235, CD71, CD36), como é observado na **Tabela 5** (BASHARAT *et al.*, 2019; HAFERLACH; SCHMIDTS, 2020; KHALIDI; MEDEIROS; CHANG; BRYNES; SLOVACK; ARBER., 1997; THOMAS, D.; MAJETI, 2017).

Tabela 5. Marcadores imunofenotípicos expressos nos subtipos de LMA.

Tipo de LMA	Marcadores imunofenotípicos
M0	CD33, CD13, CD11b, MPO, CD34, CD45, CD11c,
M1	CD11c, CD13, CD45, CD33, CD2, CD19, CD20
M2	CD13, CD33, CD65, MPO, CD19, CD56, CD34, CD45, CD11c
M3	MPO, CD45, CD13, CD33, CD56, CD36, CD34-, HLA-DR
M4	MPO, CD45, CD11c, CD13, CD33, HLA-DR, CD64, CD4, CD14, CD36
M5	CD11c, CD14, CD33, CD36, HLA-DR, CD45, CD13, CD56

M6 CD235, CD71, CD36, CD15, CD33, CD11c, CD117, CD13

M7 CD41, CD36, CD61, CD13, CD33, CD11c, CD56, CD4

Fonte: Adaptado de KHALIDI et al., (1997); Basharat et al., (2019).

As leucemias de linhagem B foram divididas de acordo com os estágios de diferenciação dos progenitores B na medula óssea, sendo classificadas em pró-B, comum, pré-B e B maduro. Já as leucemias de linhagem T também são subdivididas em grupos de acordo com os marcadores de diferenciação expressados: LLA pré-T, T-intermediária e T madura. Os marcadores imunofenotípicos característicos de cada tipo estão descritos na **Tabela 6** (CHIARETTI; ZINI; BASSAN, 2014; FARIAS, MARIELA GRANERO; DE CASTRO, 2004; JABBOUR, E. J.; FADERL; KANTARJIAN, 2005; JABBOUR, E.; PUI; KANTARJIAN, 2018; PAUL; KANTARJIAN; JABBOUR, 2016).

Tabela 6. Marcadores imunofenotípicos expressos nos subgrupos de LLA.

Linhagem B	
Classificação	Marcadores imunofenotípicos
LLA Pró-B	TdT, HLA-DR, CD34, CD19, CD22 e/ou CD79a
LLA comum	CD10, CD22, CD19 e/ou CD20
LLA pré-B	Cadeias citoplasmáticas μ , CD19, CD20 e/ou CD10
LLA-B madura	Cadeias de imunoglobulinas
Linhagem T	
Classificação	Marcadores imunofenotípicos
LLA pré-T	CD7, CD2, CD5 e/ou TdT
LLA T-intermediária	CD3c, CD2 e/ou CD1a
LLA-T madura	CD2, CD5, CD7, CD4 e/ou CD8

Fonte: Adaptado de Chiaretti et al., (2014).

3.5.3 Citogenética clássica

Citogenética é a área da ciência responsável pelo estudo da estrutura e propriedades cromossômicas, incluindo o comportamento cromossômico durante a divisão celular e fatores que causam alterações cromossômicas. A análise cromossômica fornece informações essenciais sobre a constituição genética do genoma de uma pessoa, tendo em vista que os cromossomos normais possuem morfologia e tamanho constantes. Além disso,

anomalias cromossômicas resultam em inúmeras doenças genéticas, especialmente neoplasias hematológicas (CAMPOS-GALINDO, 2020; SCHOCH; HAFERLACH, 2002).

A citogenética clássica é baseada na técnica de cariótipo que é um dos ensaios mais comuns e de fácil acesso. O cariótipo permite a identificação precisa dos cromossomos e, conseqüentemente, a determinação de anormalidades cromossômicas, como: presença de inversões, deleções, translocações, adições cromossomais, altas hiperdiploidias e/ou hipodiploidias (KEARNEY, 2001; MROZEK; HEEREMA; BLOOMFIELD, 2004).

Esta técnica revela todas as aberrações cromossômicas microscopicamente detectáveis que ocorrem simultaneamente em células leucêmicas, independentemente de essas aberrações serem numéricas ou estruturais, equilibradas ou desequilibradas. A detecção e caracterização das anormalidades cromossômicas é feita através da análise de bandas (MRÓZEK; HARPER; APLAN, 2009).

O método consiste, basicamente, em realizar uma cultura das células que serão analisadas para estimular sua proliferação. O ciclo celular é interrompido na fase de metáfase para realizar a colheita dos cromossomos através de um tratamento hipotônico das células. Os cromossomos são fixados em lâminas e, em seguida, passam pelo processo de coloração ou bandagem, que permitirá sua visualização no microscópio (BICKMORE, 2001; CAMPOS-GALINDO, 2020).

A técnica de bandas G com tratamento com tripsina seguido de coloração de Giemsa é o método mais comumente utilizado para visualizar o padrão de bandas dos cromossomos. Cada banda recebe uma designação única capaz de indicar sua localização em cada cromossomo humano. A nomenclatura de atribuição de bandas e aberrações cromossômicas é resumida pelo Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (BATES, 2011; CAMPOS-GALINDO, 2020).

Com o passar dos anos, a importância da citogenética se tornou cada vez mais evidente, fazendo com que fosse adotado um outro tipo de classificação das leucemias agudas, dessa vez, baseado na Organização Mundial de Saúde (OMS). A partir disso, novas diretrizes foram estabelecidas para o diagnóstico de neoplasias hematológicas que levam em consideração análises citomorfológicas, imunofenotípicas e, principalmente, citogenéticas (ALAGGIO *et al.*, 2022).

A presença de algumas alterações citogenéticas é capaz de determinar valores prognósticos e escolhas de condutas terapêuticas para os pacientes portadores de leucemias,

tendo em vista que existem alterações que conferem resistência ao tratamento utilizado convencionalmente. A estratificação de risco de pacientes com LMA, por exemplo, é estabelecida de acordo com as aberrações genéticas apresentadas pelos pacientes (DÖHNER *et al.*, 2022; DUFFIELD; MULLIGHAN; BOROWITZ, 2023).

3.5.4 Biologia Molecular

O diagnóstico dos cânceres hematológicos representa ainda um grande desafio. Os diversos estágios da diferenciação hematopoiética normal dão origem a uma série de cânceres biologicamente e clinicamente distintos (STAUDT, 2003). O diagnóstico das leucemias, nos Estados do Nordeste, e no Ceará em particular, ainda é baseado em testes morfológicos e de imunofenotipagem, que levam apenas em consideração a identificação das células blásticas e de seus marcadores de membrana, podendo induzir a erros de estratificação dos diversos subtipos das leucemias. Isso acarreta prejuízo no prognóstico, bem como na escolha da terapêutica molecular mais indicada, que aumenta as chances de sobrevida e qualidade de vida dos pacientes durante o tratamento (MULLIGHAN, 2012).

Apesar da eficácia da citogenética clássica em determinar prognósticos e direcionar tratamentos, sua sensibilidade ainda é insuficiente (CAMPOS-GALINDO, 2020; KORF; REHM, 2013). Além disso, as análises de bandas cromossômicas, através do exame de cariótipo, fornecem a base para a caracterização genética de leucemias agudas e podem ser combinadas com técnicas moleculares baseadas em reação em cadeia da polimerase (PCR) ou hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), quando necessário. Entretanto, a análise do cariótipo é muito demorada e, por vezes, inconclusiva, tendo em vista que o cultivo celular das amostras nem sempre é bem-sucedido. Ademais, a pesquisa desses marcadores moleculares determinantes de prognóstico e de tomada de decisão terapêutica não é feita em todos os casos (BACHER *et al.*, 2009; STAUDT, 2003).

Diante disso, o avanço das técnicas de biologia molecular como a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e reação em cadeia da polimerase (PCR) são cada vez mais empregados para ajudar a refinar diagnósticos, estabelecer os prognósticos e determinar o tratamento mais adequado para cada paciente (BEZERRA *et al.*, 2021; CROTTY *et al.*, 1994; FARIAS, MARIELA GRANERO; DE CASTRO, 2004; HUGHES; BRANFORD, 2003; MASON; GRIFFITHS, 2012).

A citogenética molecular, como a técnica FISH, pode ser amplamente utilizada para identificar cromossomos, detectar e caracterizar anormalidades cromossômicas específicas e para o mapeamento de genes para locais específicos nos diferentes cromossomos. Essa metodologia tornou-se muito útil devido à sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez (AVET-LOISEAU, 1999; PHILLIPS; REED, 1996; VOLPI; BRIDGER, 2008).

Vários estudos clínicos foram capazes de determinar que aberrações cromossômicas nas leucemias agudas podem ser utilizadas para classificação de grupos de risco. A detecção dessas alterações pode ser realizada através de diferentes técnicas de PCR. O trabalho de van Dongen et al., (1999) estabeleceu a *Nested-PCR* como metodologia padrão ouro na detecção de fusões gênicas nas leucemias agudas ao diagnóstico e na pesquisa de doença residual mínima (DRM) (BIONDI; RAMBALDI, 1996; DONGEN *et al.*, 2015; MARTINEZ-CLIMENT, 1997).

A *Nested-PCR* é uma técnica que consiste em uma dupla amplificação de um molde de DNA ou cDNA que utiliza o produto obtido na primeira amplificação como modelo para a segunda. Dessa forma, a sensibilidade e a especificidade da análise são melhoradas. A detecção das alterações é confirmada através da realização de uma eletroforese em gel de agarose (DONGEN *et al.*, 2015; GONZÁLEZ *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, o painel de marcadores moleculares em neoplasias hematológicas recorrentes mostrou rápida expansão ao passo que novas técnicas moleculares para diagnóstico avançaram. A PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), em especial, revolucionou o diagnóstico e o acompanhamento de doença residual mínima (DRM), já que permite uma detecção altamente sensível de células leucêmicas residuais (BACHER *et al.*, 2009; MASON; GRIFFITHS, 2012).

Essa técnica consiste, basicamente, na amplificação exponencial de uma região específica de ácidos nucleicos. Na RT-qPCR a amplificação e a detecção dos fragmentos de ácidos nucleicos ocorrem simultaneamente, conferindo maior rapidez e sensibilidade para o método. Através dessa técnica é possível analisar o perfil de expressão gênica de diversos genes e/ou fusões cromossômicas, por isso, ela pode ser utilizada tanto para o diagnóstico como para o monitoramento da doença e detecção de DRM (BACHER *et al.*, 2009; BEZERRA *et al.*, 2021; STAUDT, 2003; WATT; BAGG, 2010).

Além disso, a estratificação de risco de pacientes com leucemia deixou de levar em consideração aspectos citomorfológicos e de imunofenotipagem e passou a se basear

quase exclusivamente nas alterações citogenéticas presentes nas células do indivíduo doente. Diante disso, as técnicas moleculares alcançaram uma posição muito importante no processo de diagnóstico das leucemias, não apenas pela sensibilidade garantida nas detecções, mas também pelo fato de que a escolha terapêutica passou a ser baseada na estratificação de risco (DONGEN *et al.*, 2015; GIUDICE *et al.*, 2022; TRAN *et al.*, 2020).

Apesar do fato de que a *Nested*-PCR ainda é considerada como o método padrão ouro de detecção de alterações citogenéticas em pacientes com leucemias, trata-se de uma técnica muito demorada e cuja última padronização foi realizada em 1999. Hoje em dia, com a tecnologia da RT-qPCR disponível e amplamente difundida no mundo todo, essa metodologia demonstra maior sensibilidade, rapidez e eficácia na detecção dessas mesmas alterações (DONGEN *et al.*, 2015; BACHER *et al.*, 2009).

Ademais, o advento das tecnologias de sequenciamento de próxima geração (NGS) acelerou a descoberta de novas lesões genéticas nas leucemias agudas. Essa tecnologia aplica diferentes estratégias de enriquecimento de alvos e amplificação clonal de ácidos nucleicos, resultando na possibilidade de sequenciar milhões de cadeias de DNA em paralelo (COCCARO *et al.*, 2019; ILYAS *et al.*, 2015).

O conceito de NGS envolve sequenciamento de DNA, RNA ou miRNA através de várias abordagens, como sequenciamento direcionado, sequenciamento de exoma inteiro (WES), sequenciamento de transcriptoma (mRNA-seq), sequenciamento de genoma completo (WGS) e epigenômica (MONTAÑO *et al.*, 2018; SALA TORRA *et al.*, 2017).

Ao contrário do sequenciamento de Sanger, o NGS é capaz de detectar simultaneamente sinais de milhares de canais, aumentando a eficiência. O NGS permitiu a caracterização de novas alterações genéticas nas leucemias agudas aumentando as perspectivas para diagnósticos individualizados e terapias alvo-dirigidas (COCCARO *et al.*, 2019; YU, J. *et al.*, 2020).

Entretanto, apesar de ser uma ferramenta importante na detecção das alterações genéticas que condicionam a patogênese, o prognóstico e a evolução dos pacientes de leucemias agudas, a aplicação clínica da técnica do NGS apresenta grandes limitações. Isso ocorre porque o NGS requer sistemas sofisticados de bioinformática, processamento rápido de dados e grandes recursos de armazenamento de dados, o que aumenta o custo da técnica (MONTAÑO *et al.*, 2018).

Atualmente, a terapêutica oncológica tradicional, com a utilização de agentes citotóxicos, vem se mostrando pouco eficiente para o tratamento das mais diversas malignidades, uma vez que muitas delas não são específicas para as alterações moleculares e

particularidades genéticas que levam ao desenvolvimento maligno. Assim sendo, o surgimento de novas moléculas baseada em biomarcadores moleculares para o diagnóstico, manejo e tratamento de pacientes oncológicos se torna imprescindível no sentido de que melhores prognósticos possam ser alcançados (TAYLOR, K. N.; ESKANDER, 2017).

Ademais, a resistência e a ausência de resposta à quimioterapia têm sido o maior obstáculo no tratamento de pacientes com câncer sendo este um fator que contribui para um prognóstico ruim (AGUILERA *et al.*, 2015; YAMASAKI *et al.*, 2011). Diversos mecanismos já foram identificados como contribuintes, dentre eles destacam-se: mudanças genéticas e epigenéticas nas vias de sinalização de sobrevivência, nas enzimas de metabolização do fármaco e nos transportadores de membrana. Portanto, é de grande importância identificar alvos que possam ser aplicados como biomarcadores para que novos medicamentos possam ser desenvolvidos ou administrados com uma maior taxa de resposta e eficácia, reduzindo as taxas de toxicidade e mortalidade observada para esses pacientes (DEBATIN; KRAMMER, 2004; DU; CHEN, 2017; KANTARJIAN, H. M.; KEATING; FREIREICH, 2018; LOWE, 2004; MCNERNEY; GODLEY; LE BEAU, 2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Pacientes

4.1.1 Aspectos Éticos

O Projeto foi submetido à Plataforma Brasil e obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Ceará, sob número de registro 4.339.719 (ANEXO 1). Os participantes desse estudo foram pacientes com suspeita/diagnóstico de leucemias agudas do tipo mieloide ou linfoide atendidos nos serviços de saúde participantes, Hospital Geral de Fortaleza, Hospital Geral Cesar Cals e Hospital Maternidade São Vicente de Paulo. Os pacientes ou seus responsáveis foram submetidos a leituras e análise de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 2), e só participaram da pesquisa depois de aceite do exposto e assinatura dele.

4.2 Etapas do Estudo

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2), a equipe de saúde treinada e/ou a equipe de pesquisadores aplicou um questionário (ANEXO 3), onde constam informações relacionadas à identificação (nome, data de nascimento, filiação, naturalidade, procedência, ocupação). Em seguida, o questionário segue com perguntas voltadas à presença ou ausência dos principais sinais e/ou sintomas relacionados à doença. Após a aplicação do questionário, os pacientes passaram por uma avaliação clínica realizada pela equipe médica do hospital, para posterior coleta de material biológico: sangue e medula óssea (quando aplicável).

As coletas de informações de prontuário e de amostras de sangue e medula óssea de pacientes com suspeita ou diagnóstico de leucemias agudas, do tipo mieloide ou linfoide, foram realizadas no período de julho de 2021 até fevereiro de 2023 no Hospital Geral de Fortaleza (HGF), totalizando 175 pacientes. Após a aplicação dos critérios de exclusão, o estudo contou com a participação de 117 pacientes, devido ao fato de que os 58 pacientes restantes que buscaram atendimento médico por suspeita de leucemias agudas, foram diagnosticados com outras doenças hematológicas, como: leucemia linfoide crônica (LLC), mieloma múltiplo (MM), síndrome mielodisplásica (SMD) e síndrome mieloproliferativa (SMP).

4.2.1 Amostras para Estudo Molecular

4.2.1.1 Sangue

Todos os 117 participantes da pesquisa foram dirigidos para coleta de sangue periférico para realização de avaliação genética, independentemente da porcentagem de blastos circulantes. Este material foi coletado no serviço de saúde em que paciente estava realizando atendimento, por meio de punção venosa periférica, por pessoal capacitado. Foram coletados 5 mL de sangue periférico para extração de RNA em tubo com EDTA. Todas as amostras seguiram o mesmo padrão de coleta e acondicionamento.

4.2.1.2 Medula Óssea

As 84 amostras de medula óssea foram obtidas de pacientes que se encaixavam nos critérios de inclusão, atendidos em hospitais de referência participantes deste estudo, submetidos a procedimentos terapêuticos e/ou diagnósticos que geravam a coleta do material, sem ocasionar quaisquer transtornos adicionais ao paciente.

4.2.2 Critérios de inclusão, exclusão e de retirada do estudo

Atendiam aos critérios de inclusão do estudo os pacientes que possuíam: suspeita ou diagnóstico clínico-laboratorial de Leucemias Linfoblástica Aguda ou Leucemia Mieloide Aguda atendidos nos serviços de saúde participantes, anteriormente ao início do tratamento. Além disso, os pacientes deveriam ser capazes de compreender a natureza e objetivo do estudo, e com intenção de cooperar com o pesquisador e agir de acordo com os requerimentos de todo o ensaio, o que vem a ser confirmado mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Por sua vez, pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial excludente dos dois tipos de leucemias abordadas no estudo, pacientes com doenças oncohematológicas que não preencham os critérios clínicos e/ou genéticos para diagnóstico de leucemias agudas e pacientes que não concordaram em assinar o TCLE foram retirados do estudo pelos critérios de exclusão.

Como critérios para retirada do sujeito da pesquisa do estudo foram considerados a retirada de consentimento pelo paciente ou familiar por qualquer motivo e a presença de qualquer condição que impeça o paciente de participar do estudo pelo julgamento do investigador.

4.2.3 Estratificação clínica de pacientes do estudo

A estratificação de risco dos pacientes portadores de LMA foi realizada com base nas diretrizes do *European Leukemia Net* (ELN) publicadas em 2022. Essa estratificação leva em consideração apenas alterações citogenéticas e moleculares, classificando os pacientes em três subgrupos: risco favorável, risco intermediário e risco adverso (DÖHNER *et al.*, 2022).

Os pacientes com LLA, por sua vez, foram estratificados de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e com o guideline *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN). Nessa estratificação são levados em consideração aspectos citogenéticos, imunofenotípicos, moleculares e clínicos (como o número de leucócitos ao diagnóstico), classificando os pacientes em apenas dois subgrupos: risco padrão e risco adverso (ALAGGIO *et al.*, 2022; NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2021).

4.3 Métodos de diagnóstico molecular

4.3.1 Extração de RNA

O RNA das amostras de sangue periférico e medula óssea dos pacientes foi extraído da camada de leucócitos com kit comercial *TRIzol Reagent*® (Applied Biosystems) de acordo com instruções do fabricante.

4.3.2 Quantificação de RNAs e Análise da Integridade dos RNAs

A quantificação foi realizada utilizando o espectrofotômetro *NanoDrop2000* (*Thermo Scientific*) seguindo o protocolo designado pela empresa. A avaliação da qualidade do RNA total foi medida pela qualidade da amplificação do gene endógeno β -actin (*ACTB*). A qualidade do RNA foi determinada pelo Número de Integridade do RNA (RIN), utilizando a plataforma *BioAnalyzer 2100* (*Agilent Technologies*). O RIN é uma estimativa da integridade do RNA total das amostras.

4.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa (RT-PCR)

A partir de 20 μ L de RNA, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) para síntese de cDNA. A conversão foi realizada com o auxílio do *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystem, EUA*), segundo o protocolo do fabricante. Essa etapa foi realizada em um *Veriti*® *Thermal Cycler* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*). Após essa etapa, as amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C até o uso para análise.

4.3.4 Identificação de Biomarcadores Genéticos

Inicialmente, um painel de 9 biomarcadores genéticos, descritos na literatura como os mais frequentes em leucemias agudas, foram utilizados para a triagem de pacientes atendidos nos serviços de saúde, através de técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) (**Tabela 7**).

As amostras de sangue periférico e medula óssea dos pacientes foram submetidas ao teste pareado para a validação de ambas as amostras biológicas para identificação dos biomarcadores genéticos deste estudo através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). Além disso, foram analisadas as expressões dos genes endógenos *ACTB*, *ABL* e *TBP* em todas as amostras.

Tabela 7. Painel de Biomarcadores Genéticos em Leucemias Agudas.

Gene	Tipo de Leucemia
<i>BCR::ABL (p190+)</i>	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>ETV6::RUNX1</i>	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>TCF3::PBX1</i>	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>SIL::TAL1</i>	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>KMT2A::AFF1</i>	Leucemia Linfoblástica Aguda
<i>CBFB::MYH11</i>	Leucemia Mieloide Aguda
<i>PML::RARA</i>	Leucemia Mieloide Aguda
<i>RUNX1::RUNX1T1</i>	Leucemia Mieloide Aguda
<i>FLT3-ITD</i>	Leucemia Mieloide Aguda

4.3.5 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional do Tipo NESTED (Nested-PCR)

A detecção dos genes por *Nested-PCR* foi realizada utilizando o aparelho *Veriti® Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o kit comercial *Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ II PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific®).

Os primers utilizados nessa técnica foram baseados no consenso estabelecido para diagnóstico de leucemias agudas no artigo de padronização da técnica publicado por van Dongen e colaboradores (1999). Além disso, foram utilizados os genes *GAPDH* e *HPRT* como genes de referência/controle. As informações sobre os *primers* escolhidos para o estudo estão resumidas na **Tabela 8**.

Tabela 8. Sequência de primers da *Nested-PCR*.

Primers LLA	Sequência 5'-3'	Primers LMA	Sequência 5'-3'	Primers Endógenos	Sequência 5'-3'
<i>BCR::ABL (p190)</i>		<i>RUNX1::RUNX1I</i>		<i>GAPDH</i>	
BCR-A (F)	GACTGCAGCTCCAAT GAGAAC	AML1-A (F)	CTACCGCAGCCATGA AGAACC	GAPDH (F)	ACAGTTGCCAT GTAGACC
ABL-B (R)	GTTTGGGCTTCACAC CATTCC	ETO-B (R)	AGAGGAAGGCCATT GCTGAA	GAPDH (R)	TTGAGCACAGG GTACTTTA
BCR-C (F)	CAGAACTCGCAACA GTCCTTC	AML1-C (F)	ATGACCTCAGGTTTGT CGGTCCG		
ABL-D (R)	TTCCCCATTGTGATTA TAGCCTA	ETO-D (R)	TGAACTGGTTCTTGG AGCTCCT		
<i>TCF3::PBX1</i>		<i>CBFB::MYH11</i>			
E2A-A (F)	CACCAGCCTCATGCA CAAC	CBFB-A (F)	GTTATCTGGAAAGGCT GGATTG		
PBX1-B (R)	TCGCAGGAGATTCAT CACG	MYH11-B (R)	TACGAGGAGTGAGGA TGGATCT		
E2A-C (F)	CACCCTCCCTGACCT GTCT	CBFB-C (F)	TATGGGCTGTCTGGAG TTTGAT		
PBX1-D (R)	GGCCTGCTCGTATTT CTCC	MYH11-D (R)	ATGTGGAATGTCCTCT CGTCTC		
<i>KMT2A::AFF1</i>		<i>PML::RARA</i>			
MLL-A (F)	CCGCCTCAGCCACCT AC	PML-A (F)	CCGTCATAGGAAGTG AGGTCTT		
AF4-D (R)	TGTCACTGAGCTGAA GGTCG	RARA-B (R)	CCTTGTTGATGATGCA GTTCTT		
MLL-C (F)	TGTCACTGAGCTGAA GGTCG	PML-C (F)	GACCCTATTGACGTTG ACCTG		
AF4-D (R)	CGTTCCTTGCTGAGA ATTTG	<i>FLT3-IDT</i>			
<i>ETV6::RUNX1</i>		FLT3-IDT (F)	GCAATTTAGGTATGAA AGCCAGC		
TEL-A (F)	TGCACCCTCTGATCC	FLT3-IDT	CTTTCAGCATTTTGAC		

	TGAAC	(R)	GGCAACC		
AML1-B (R)	AACGCCTCGCTCATC TTGC				
TEL-C (F)	AAGCCCATCAACCTC TCTCATC				
AML1-D (R)	TGGAAGGCGGCGTG AAGC				
SIL::TAL1					
SIL-A (F)	TCCCGCTCCTACCCT GCAA				
TAL1-B (R)	CGCGCCAGTTCGAT GAC				
TAL-D (R)	CCGCGTCCCGTCCCT CTA				

Fonte: Adaptado de van Dongen et al., (1999).

O protocolo das reações utilizou as quantidades de reagentes descritas na **Tabela 9**, totalizando uma reação de 12,5µL. O protocolo de amplificação das reações constituiu-se de 35 ciclos da seguinte forma: 95°C/3 min, 94°C/2 min, 65°C/1 min, 70°C/2 min e 70°C/30min.

Tabela 9. Reagentes utilizados na *Nested*-PCR.

Reagentes	µL
Água deionizada	4,25
2X Platinum™ SuperFi™ II PCR Master Mix	6,25
Foward Primer	0,5
Reverse Primer	0,5
cDNA	1
	12,5

Após a última reação de *Nested*-PCR, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose para revelar se houve ou não amplificação da região alvo. Utilizou-se a *UltraPure™ Agarose (Invitrogen)* para confeccionar um gel de 100mL com uma concentração de 1,5. O *kit 1KB Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific®)* foi adicionado juntamente com os produtos de *Nested*-PCR em cada poço. A eletroforese foi realizada com 100V, 400mA e por

60 min. Em seguida, foi realizada a visualização do gel através do aparelho *IBright 1500* (Thermo Fisher Scientific®).

4.3.6 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo real (RT-qPCR)

A detecção da expressão das alterações genéticas por PCR em tempo real quantitativa (RT-qPCR) foi realizada utilizando o aparelho *QuantStudio 5* (Applied Biosystems®) e kit comercial *TaqMan® Expression Master Mix* (Thermo Fisher Scientific®). As informações sobre os genes e as sondas escolhidas para o estudo estão resumidas na **Tabela 10**.

Tabela 10. Sondas utilizadas na RT-qPCR para detecção de alterações genéticas.

Alvo	Identificação da sonda
<i>BCR::ABL</i> (p190)	Hs03024435_ft
<i>TCF3::PBX1</i>	Hs03024664_ft
<i>KMT2A::AFF1</i>	Hs03043614_ft
<i>ETV6::RUNX1</i>	Hs03043640_ft
<i>SIL::TALI</i>	Hs03296414_ft
<i>FLT3-ITD</i>	Hs00174690_m1
<i>PML::RARA</i>	Hs03024794_ft
<i>CBFB::MYH11</i>	Hs03460064_ft
<i>RUNX1::RUNX1T1</i>	Hs03024752_ft
<i>ACTB</i>	Hs01060665_g1
<i>ABL</i>	Hs01104728_m1
<i>TBP</i>	Hs00427620_m1

Fonte: Adaptado de Thermo Fisher.

O protocolo das reações utiliza as quantidades de reagentes descritas na **Tabela 11**, totalizando uma reação de 25µL. O protocolo de amplificação das reações constituiu-se da seguinte ciclagem: 50°C/2 min, 95°C/10 min e 50 ciclos de 95°C/15 segundos e 60°C/ 1 min.

Tabela 11. Reagentes utilizados na RT-qPCR.

Reagentes	µL
Água deionizada	3,5
Tampão (TaqMan® gene expression master Mix)	5
TaqMan® Gene expression assay	0,5
cDNA	1

4.3.6.1 Validação da Expressão Gênica por Real-Time PCR Quantitativo (RT-qPCR)

Após a amplificação, os fragmentos foram quantificados pela análise dos dados fluorescentes através do software versão 1.1 no equipamento *QuantStudio 5 (Applied Biosystems®)*.

Para estabelecer o grau de expressão de cada um dos genes escolhidos para a etapa de validação utilizou-se como referência o nível de expressão da β -actina, gene de expressão constitutiva e que se presta como referência de expressão entre as diferentes amostras.

Na análise de RT-qPCR, a quantificação é baseada no *Cycle Threshold (CT)*, que é inversamente proporcional ao logaritmo do número de cópias iniciais (TYAGI; BRATU; KRAMER, 1998). O CT é definido como o primeiro ciclo de amplificação no qual a fluorescência indica que os produtos de PCR se tornaram detectáveis. Para determinar a linha de corte para a expressão gênica alterada em tecidos tumorais, o 16 valor CT será determinado também em tecido normal.

Estabelecidos os CT de cada amostra, o cálculo do nível de expressão foi realizado através do Método CT comparativo ou Método 2 - $\Delta\Delta CT$, dessa forma, o nível de expressão do gene de interesse foi relatado em relação ao do gene de referência para cada amostra (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008):

$$\text{Expressão do Gene de Interesse} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Onde $\Delta CT = (CT \text{ gene interesse}) - (CT \beta\text{-actina})$ para cada amostra em triplicata

$$\Delta\Delta CT = (\Delta CT_{LMC}) - (\Delta CT_{controle})$$

Para que o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ seja validado, deve-se assumir que a eficiência de amplificação do gene alvo e a eficiência de amplificação do controle interno devem ser aproximadamente iguais (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Cada amostra em análise foi realizada em duplicata para a validação da técnica e dos valores de CT.

Todos os experimentos de RT-qPCR seguiram as exigências feitas por *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments MIQE Guidelines* (BUSTIN, STEPHEN A. *et al.*, 2009).

4.3.6.2 Avaliação dos melhores genes de referência por RT-qPCR

A tecnologia de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) revolucionou o cenário de detecção em todas as áreas da biologia molecular. Esta técnica é considerada o método de diagnóstico mais confiável e preciso (DEINDL *et al.*, 2002; HUGGETT *et al.*, 2005; LE *et al.*, 1998; VILÀ *et al.*, 2000). No entanto, inúmeras falhas podem ocorrer durante o processo de RT-qPCR, o que pode levar a interpretações errôneas dos resultados e conclusões incorretas. Por isso, a aplicação de um método de normalização adequado é uma necessidade absoluta para a obtenção de resultados confiáveis (FRAGA; MEULIA; FENSTER, 2014; JIA, 2012; VALASEK; REPA, 2005).

O uso de genes de referência é considerado o método mais eficaz para a etapa de normalização da técnica de RT-qPCR (WILHELM; PINGOUD, 2003). Genes de referência podem ser usados como controle interno de reação para análise da expressão gênica e para isso são considerados confiáveis e devem atender a vários critérios importantes. Um bom gene de referência não é afetado por fatores experimentais e apresenta mínima variabilidade entre tecidos e estados fisiológicos do organismo. Portanto, é benéfico escolher um gene de referência que apresente um ciclo de limiar semelhante em estudos dentro de diferentes genes de interesse (BUSTIN, S. A., 2002; BUSTIN, S. A. *et al.*, 2005; GALIVETI *et al.*, 2010; JACOB *et al.*, 2013; KOZERA; RAPACZ, 2013).

A RT-qPCR foi utilizada para identificar diferentes expressões dos principais genes de referência que são comumente utilizados como endógenos em estudos de expressão gênica geral. Foram selecionados 50 pacientes já participantes da pesquisa, dos quais 25 eram portadores de LMA e 25 de LLA. Todas as amostras selecionadas para a realização da validação dos endógenos passaram por análises de expressão dos seguintes genes: *ACTB*, *ABL*, *GAPDH*, *HPRT*, *TBP* e *RPLPO*. As informações sobre os genes e sondas escolhidos para o estudo são apresentadas na **Tabela 12**. A análise dos endógenos seguiu o mesmo protocolo descrito anteriormente.

Tabela 12. Sondas utilizadas na RT-qPCR para validação dos endógenos.

Endógeno	Identificação da sonda
<i>ACTB</i>	Hs01060665_g1
<i>ABL</i>	Hs01104728_m1
<i>GAPDH</i>	Hs02786624_g1
<i>HPRT</i>	Hs2800695_m1
<i>TBP</i>	Hs00427620_m1

RPLPO	Hs00420895_gH
-------	---------------

Fonte: Adaptado de Thermo Fisher.

4.4 Análise dos Dados

4.4.1 Análise dos Dados Clínico-Epidemiológicos

Os dados dos prontuários foram analisados estatisticamente tomando por base as variáveis de interesse para o estudo, e organizados em tabelas, quadros e gráficos. Foi realizada uma análise estatística descritiva, quando foram calculados as médias e os desvios padrão para distribuição normal dos dados, ou mediana. Os dados categóricos foram analisados através de teste Exato de Fisher. Para a realização de todos os procedimentos estatísticos foi utilizado o programa GraphPad Prism 8.0 e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4.4.2 Análise dos Dados da Normalização dos endógenos

Em estudos de normalização e validação de modelos endógenos para doença, o teste estatístico deve ser feito entre Ct-caso endógeno e Ct-controle endógeno. Se houver diferença, o uso da droga endógena é inviável, pois está sendo influenciado pela condição. Além disso, é necessário remover ensaios quem é endógeno apresenta um comportamento outlier (Ct endógeno $> 2 \times DP$ da média de Cts endógenos). É de grande importância verificar se há correlação entre Ct endógeno e Ct alvo, considerando que isso pode caracterizar viés experimental.

A estabilidade dos genes de referência candidatos foi analisada de acordo com os seguintes métodos estatísticos de avaliação: o método Delta Ct, a estimativa da variação intra e intergrupos (NormFinder) (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTTOFT, 2004) e a comparação pareada (GeNorm) (VANDESOMPELE et al., 2002). Além disso, uma análise mais profunda e individual foi realizada usando o software R (“The R Project for Statistical Computing”, [S.d.]) e ordens de classificação abrangentes desses genes candidatos foram disponibilizadas a partir dos quatro métodos.

GeNorm usa um modelo baseado em comparação par a par para selecionar de um painel de genes de referência candidatos, o par de genes mostrando a menor variação na razão de expressão entre amostras. Ele calcula uma medida de estabilidade gênica (M) de cada gene com base na variação média par a par entre todos os genes testados. Os genes com os menores valores de M são os que demonstram a expressão mais estável (VANDESOMPELE et al.,

2002). Este cálculo baseia-se no princípio de que exclui gradualmente o gene com o valor M mais elevado. Além disso, GeNorm envolve um valor de corte de 0,15, abaixo do qual a inclusão de um gene de referência adicional não é necessária.

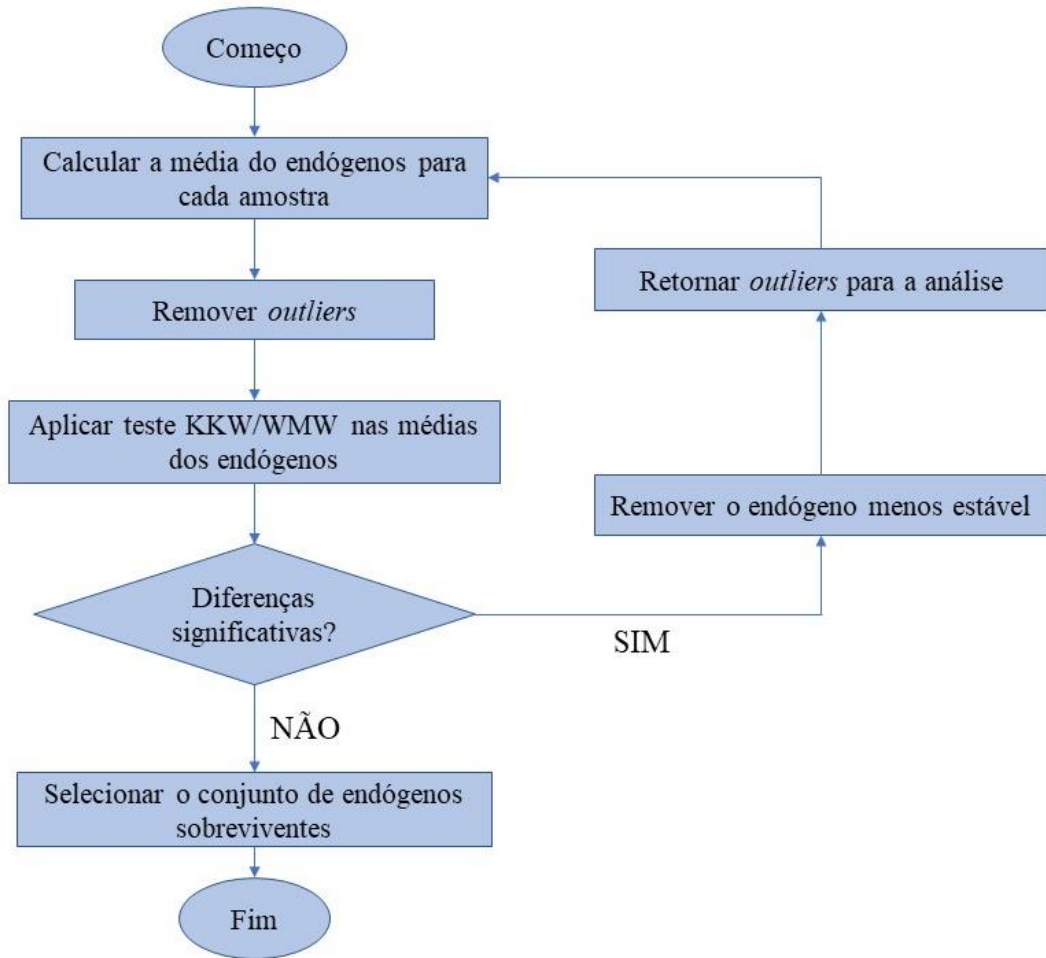
O NormFinder usa uma abordagem baseada em modelo para estimar não apenas a variação geral da expressão dos genes de normalização candidatos, mas também a variação entre os subgrupos de amostra do conjunto de amostras. Os candidatos com as menores variações intergrupos e intragrupos fornecem o menor valor de estabilidade S e, portanto, são classificados como mais estáveis (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004). NormFinder envolve um valor de corte de 0,15.

Para avaliar os potenciais genes endógenos, três análises foram realizadas: i) utilizando todas as amostras, ii) utilizando apenas amostras de sangue periférico (SP) e iii) utilizando apenas amostras de medula óssea (MO).

O teste de Kruskal-Wallis (KKW) foi realizado para cada gene para identificar diferenças significativas entre os grupos (controle, LMA e LLA). Adicionalmente, foi calculada a soma das diferenças quadradas entre a média (Ct) e o desvio padrão de cada condição e a média do gene (Ct) e o desvio padrão. Esses valores indicam a variação da média e do desvio padrão entre os diferentes grupos. Valores maiores indicam maior variância entre os grupos.

Para selecionar o melhor conjunto gênico endógeno, um método iterativo foi aplicado: i) a média endógena foi calculada para cada amostra; ii) amostras médias de outliers foram removidas; iii) o teste de Kruskal-Wallis/Wilcoxon-Mann-Whitney foi aplicado à média endógena entre as condições/grupos; iv) se houver diferenças significativas entre as condições/grupos, o gene endógeno menos estável foi retirado da análise, as amostras removidas foram devolvidas à análise e o processo é reiniciado na etapa i); v) se não houver diferenças significativas entre os grupos, o conjunto de genes endógenos de sobrevivência é selecionado (**Figura 5**).

Figura 5. Fluxograma das etapas utilizadas para selecionar o melhor conjunto gênico endógeno.



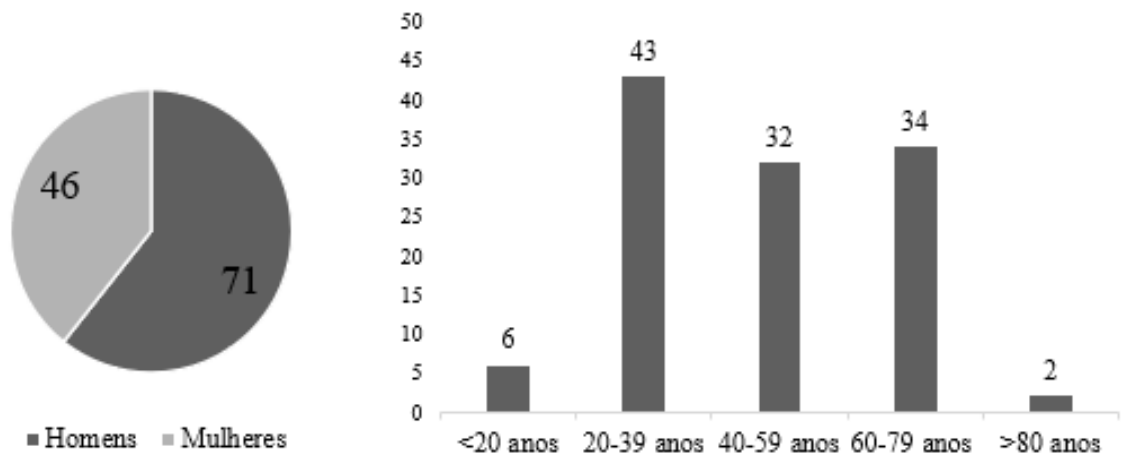
Fonte: Adaptado de Pessoa et al., 2023.

5 RESULTADOS

5.1 Dados clínico-epidemiológicos dos pacientes

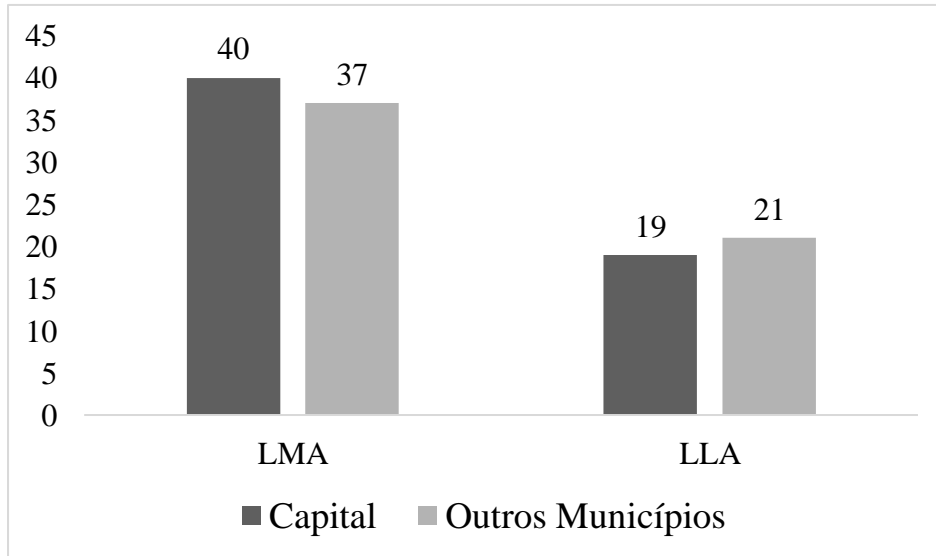
Ao todo, foram coletadas amostras de 117 pacientes, dos quais 71 (60,7%) são homens e 46 (39,3%) são mulheres (**Figura 6**). A média de idade observada foi de 47,3 anos. Entre os pacientes atendidos, 6 possuíam menos de 20 anos, 43 possuíam entre 20-39 anos, 32 possuíam entre 40-59 anos, 34 possuíam entre 60-79 anos e apenas 2 possuíam idades acima de 80 anos.

Figura 6. Características clínico-epidemiológicas dos pacientes portadores de leucemias agudas.



Fonte: Dados da pesquisa.

Ao todo, 58 pacientes (49,6%) eram residentes da capital (Fortaleza), enquanto os outros 59 pacientes (50,4%) que buscaram atendimento no HGF eram provenientes de outros municípios cearenses (**Figura 7**).

Figura 7. Distribuição dos pacientes entre a capital e os outros municípios.

Legenda: LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda; LMA: Leucemia Mieloide Aguda. **Fonte:** Dados da pesquisa.

O Estado do Ceará é dividido em sete macrorregiões: Noroeste, Norte, Região Metropolitana de Fortaleza, Sertões, Jaguaribe, Centro-Sul e Sul. Esse estudo contou com a participação de pacientes provenientes de todas as macrorregiões exceto o Sul cearense. A **Tabela 13** demonstra a distribuição dos pacientes por municípios e macrorregiões.

Tabela 13. Distribuição de pacientes por municípios e regiões.

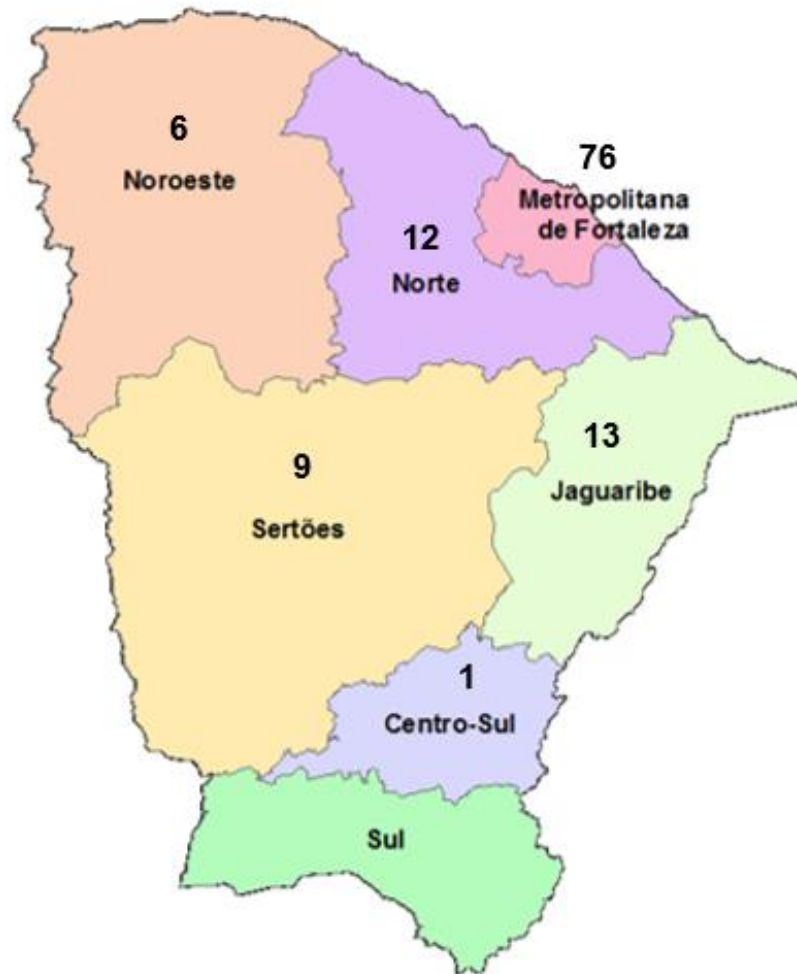
Macrorregião	Municípios	Número de Pacientes
Noroeste	Acaraú	1
	Guaraciaba do Norte	1
	Moraújo	1
	São Benedito	1
	Sobral	1
	Tianguá	1
Norte	Amontada	1
	Canidé	2
	Cascavel	3
	Chorozinho	1
	Guaramiranga	1
	Itapipoca	2
	Paraipaba	1
	Pentecostes	1
Metropolitana de Fortaleza	Caucaia	6
	Eusébio	1
	Fortaleza	58
	Horizonte	1

	Itaitinga	3
	Maracanaú	5
	Maranguape	1
	Pacatuba	1
Sertões	Boa Viagem	2
	Crateús	2
	Nova Russas	1
	Pedra Branca	2
	Solonopole	1
	Tauá	1
Jaguaribe	Aracati	1
	Fortim	2
	Limoeiro do Norte	2
	Morada Nova	2
	Pereiro	2
	Quixeré	1
	Russas	2
	Tabuleiro do Norte	1
Centro-Sul	Iguatu	1

Fonte: Dados da pesquisa.

A **Figura 8** permite a visualização da distribuição dos pacientes portadores de leucemias agudas participantes do estudo pelas diferentes macrorregiões do estado.

Figura 8. Distribuição dos pacientes pelas macrorregiões do Ceará.



Fonte: Dados da pesquisa.

Ao longo do estudo, foram diagnosticados 77 (65,8%) pacientes com Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e 40 (34,2%) com Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), dos quais 35 (87,5%) correspondiam ao tipo B e 5 (12,5%) ao tipo T. As características clínicas e epidemiológicas dos pacientes portadores de leucemias agudas são descritas na **Tabela 14**. A incidência ambas as leucemias predominou em pacientes do sexo masculino. A frequência de casos de LMA foi maior em pacientes entre 60-79 anos, enquanto a maior quantidade de casos de LLA ocorreu em pacientes entre 20-39 anos. Ainda não foi possível observar relação entre a procedência e o número de casos das doenças.

Ao diagnóstico dos pacientes portadores de LMA, observou-se que 94,8% apresentavam hemoglobina (Hb) abaixo de 10g/dL, que 59,7% apresentavam blastos circulantes em sangue periférico e que 83,1% demonstravam um quadro de plaquetopenia. Em relação aos pacientes portadores de LLA, foi possível detectar que 85% possuíam Hb

abaixo de 10g/dL, que 52,5% apresentavam blastos circulantes em sangue periférico e que 85% tinham plaquetopenia.

Tabela 14. Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes portadores de LMA e de LLA.

	LMA	LLA
Nº de pacientes	Total: 77 Masculino: 45 (58,4%) Feminino: 32 (41,6%)	Total: 40 Masculino: 26 (65%) Feminino: 14 (35%)
Idade	18-96 anos Média: 50,7 anos	18-90 anos Média: 42 anos
Procedência	Fortaleza: 40 (57,1%) Outros municípios: 30 (42,9%)	Fortaleza: 19 (47,5%) Outros municípios: 21 (52,5%)
Hemoglobina (Hb)	Hb <10g/dL: 73 (94,8%) Hb >10 g/dL: 4 (5,2%)	Hb <10g/dL: 34 (85%) Hb >10 g/dL: 6 (15%)
Leucócitos (WBC)	WBC ≤ 10.000/mm ³ : 40 (52%) WBC > 10.000/mm ³ : 25 (32,4%) WBC > 100.000/mm ³ : 12 (15,6%)	WBC ≤ 10.000/mm ³ : 19 (47,5%) WBC > 10.000/mm ³ : 17 (42,5%) WBC > 100.000/mm ³ : 4 (10%)
Blastos em sangue periférico	Sim: 46 (59,7%) Não: 31 (40,3%)	Sim: 21 (52,5%) Não: 19 (47,5%)
Plaquetas (Plq)	Plq < 150.000/mm ³ : 60 (85,7%) Plq > 150.000/mm ³ : 10 (14,3%)	Plq < 100.000/mm ³ : 34 (85%) Plq > 100.000/mm ³ : 6 (15%)
Blastos em medula óssea	Média: 62,7% Blastos ≤ 10%: 5 Blastos ≤ 70%: 10 Blastos > 70%: 25	Média: 51,4% Blastos ≤ 10%: 17 Blastos ≤ 70%: 28 Blastos > 70%: 32
LDH em SP	LDH ≤ 400 U/L: 29 LDH > 400 U/L: 23 LDH > 1.000 U/L: 9 Sem resultado: 16	LDH ≤ 400 U/L: 8 LDH > 400 U/L: 15 LDH > 1.000 U/L: 13 Sem resultado: 4
Imunofenotipagem	CD33, CD117, CD45, CD34, CD13, HLA-DR, MPO e CD64	LLA-B: CD19, CD10, CD38, CD45, CD22, CD34, CD20, CD81, CD58 e cyCD79a LLA-T: CD1a, CD2, CD3, CD5, CD7,

		CD8 e CD45.
Cariótipo	Alterado: 32 Normal: 23 Sem resultado: 22	Alterado: 15 Normal: 10 Sem resultado: 15
Estratificação de Risco	Favorável: 8 Intermediário: 36 Adverso: 15 Sem resultado: 18	Padrão: 17 Adverso: 23

Legenda: LMA: Leucemia Mieloide Aguda; LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda; Hb: Hemoglobina; Wbc: Contagem de Células Brancas; Plq: Plaquetas; LDH: Lactato Desidrogenase; CD: Cluster of Differentiation; HLA-DR: Antígeno Leucocitário Humano DR; MPO: Mieloperoxidase; SP: Sangue Periférico; U/L: Unidade por Litro; mm³: Milímetro Cúbico; N°: Número. **Fonte:** Dados da pesquisa.

O procedimento operacional padrão no diagnóstico de leucemias em geral consiste na coleta de amostras de medula óssea que são destinadas a exames de mielograma, imunofenotipagem e cariótipo. No exame de mielograma foi observado que os pacientes portadores de LMA e LLA apresentavam em média 62,7% e 51,4% de blastos na medula óssea, respectivamente. Nas análises de imunofenotipagem inferiu-se que os fenótipos mais incidentes na LMA eram CD33, CD117, CD45, CD34, CD13, HLA-DR, MPO e CD64, enquanto na LLA observou-se a predominância de CD19, CD10, CD38, CD45, CD22, CD34, CD20, CD81, CD58 e cyCD79a no tipo B e CD1a, CD2, CD3, CD5, CD7, CD8 e CD45 no tipo T.

Foram obtidos resultados de cariótipo de apenas 55 pacientes com LMA (71,4%) e de 25 pacientes com LLA (62,5%). Pacientes apresentaram cariótipos sem alterações em 29,8% e 25 % dos casos de LMA e LLA, respectivamente. Cerca de 41,5% e 37,5% dos resultados correspondiam a cariótipos alterados nos grupos de LMA e LLA, respectivamente. Essas alterações observadas eram caracterizadas, principalmente, pela presença de cariótipos complexos, translocações, inversões, trissomias e monossomias (**Tabela 15**) (**Figura 9**).

Tabela 15. Alterações observadas no exame de cariótipo.

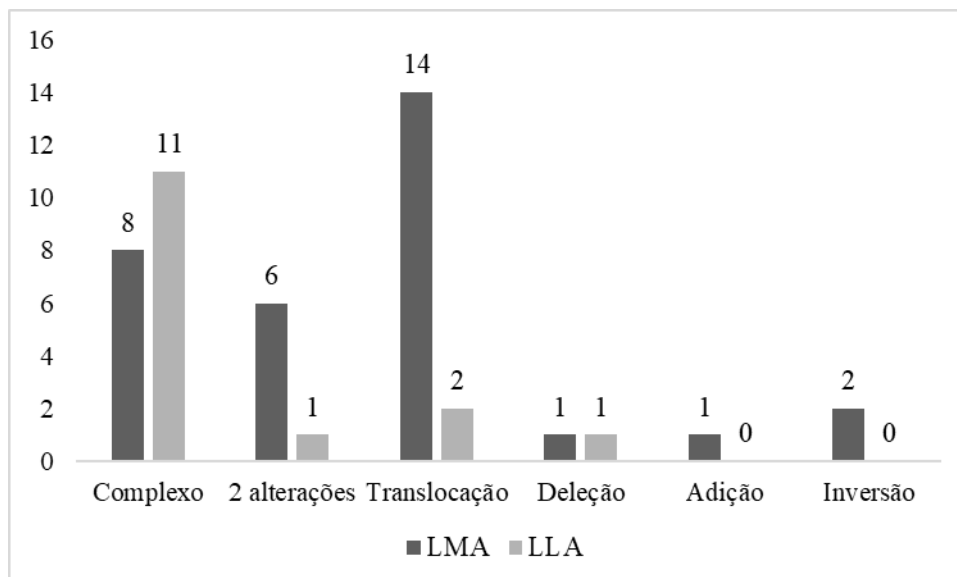
Tipo de alteração	LLA	LMA
Complexo	11	8
2 alterações	1	6

Translocação	2	14
Deleção	1	1
Adição	0	1
Inversão	0	2
Total:	15	32
p-valor:	0,0442	

Legenda: LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda; LMA: Leucemia Mieloide Aguda. **Fonte:** Dados da pesquisa.

Foi possível constatar que a maior parte das alterações nos cariótipos analisados eram correspondentes a cariótipos com translocações e a cariótipos complexos, ou seja, cariótipos com três ou mais alterações concomitantes (adições, deleções, translocações, inversões) (**Figura 9**).

Figura 9. Alterações observadas no exame de cariótipo.



Legenda: LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda; LMA: Leucemia Mieloide Aguda. **Fonte:** Dados da pesquisa.

Também foi realizada a classificação dos cariótipos alterados dos pacientes participantes de acordo com a classificação estabelecida pelo Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenômica Humana de 2016 (ISCN), que leva em consideração do número

de cromossomos observados nos cariótipos analisados (**Tabela 16**) (MCGOWAN-JORDAN; SIMONS; SCHIMID, 2016).

Tabela 16. Classificação dos cariótipos de acordo com ISCN 2016.

	Número de cromossomos	LMA	LLA
Hipodiploidia	35-45	2	1
Diploidia	46	26	9
Hiperdiploidia	47-57	4	4
Hipotriploidia	58-68	0	1
Hipertriploidia	70-80	0	0

Legenda: LMA: Leucemia Mieloide Aguda; LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda. **Fonte:** Dados da pesquisa.

Dos 77 pacientes portadores de LMA, 8 pacientes (10,4%) apresentavam risco favorável, 36 (46,7%) possuíam risco intermediário e 15 (19,5%) apresentavam risco adverso. Não foi possível realizar a estratificação de risco de 18 pacientes (23,4%) devido à ausência de resultados. Já dos 40 pacientes com LLA, 17 pacientes (42,5%) apresentavam risco padrão enquanto 23 (57,5%) possuíam risco adverso.

Quanto à ocupação laboral dos pacientes, as seguintes foram reportadas: agricultor(a), dona de casa, autônomo(a), comerciante, bombeiro, mecânico(a), motorista, aviador(a), professor(a), segurança, engenheiro(a), pedreiro, cozinheiro(a), presidiário(a), policial, confeitaria, costureira, pescador, técnico(a) de informática, técnico(a) de enfermagem, técnico(a) de segurança do trabalho, móveis projetados e fábrica de calçados. Ao todo, 39 pacientes portadores de LMA e 21 pacientes com LLA não informaram a ocupação no formulário, respectivamente (**Tabela 17**).

Tabela 17. Ocupação laboral de pacientes com LLA e LMA.

Ocupação	LLA	LMA	Total
Agricultor(a)	2	6	8
Autônomo(a)	0	3	3
Aviador (a)	1	0	1
Bombeiro(a)	2	0	2
Comerciante	2	6	8

Confeiteiro(a)	0	1	1
Costureiro(a)	0	1	1
Cozinheiro(a)	1	0	1
Dona de Casa	2	5	7
Fábrica de calçados	0	1	1
Mecânico(a)	1	2	3
Motorista	1	2	3
Móveis projetados	1	0	1
N.I	21	32	53
Pedreiro	3	2	5
Pescador(a)	0	1	1
Policia	0	1	1
Presidiário(a)	1	0	1
Professor(a)	0	3	3
Segurança	1	0	1
T.I	1	0	1
Téc. De Enfermagem	0	1	1
Téc. Segurança do Trabalho	1	0	1

Legenda: N.I: Não informado; T.I: Técnico de Informática; LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda; LMA: Leucemia Mieloide Aguda. **Fonte:** Dados da pesquisa.

Após o diagnóstico, os pacientes foram tratados com protocolos de quimioterapia padronizados e determinados pelo ministério da saúde. Até o momento, 27 pacientes com LMA e 11 pacientes com LLA foram a óbito devido à refratariedade aos tratamentos ou a quadros de choque sépticos, correspondendo a taxas de óbitos de 35% e 27,5% respectivamente.

O teste Chi-Quadrado (**Tabela 18**) foi aplicado com o intuito de comparar a provável influência entre duas variáveis clínicas. Os resultados parciais foram obtidos pelas comparações entre a estratificação de risco dos pacientes e as seguintes variáveis: idade, gênero, procedência, contagem de leucócitos, presença de blastos em sangue periférico, cariótipo, LDH, ocupação laboral e óbitos. O p valor estatisticamente significativo, assume o nível de significância de 99% ($p \leq 0,01$) e 95% ($p \leq 0,05$), e demonstra a provável influência na correlação entre as variáveis comparadas.

Não foi possível constatar correlação significativa em grande parte das comparações. Entretanto, ao comparar a estratificação de risco com os resultados de cariótipos, foi verificada uma provável influência entre essas variáveis ($p < 0,01$). Pacientes com o cariótipo alterado costumam apresentar riscos intermediários ou adversos.

Tabela 18. Análise de Chi-Quadrado dos dados Clínico-Epidemiológicos dos pacientes portadores de leucemias agudas participantes do estudo.

		LLA		LMA				
		Estratificação de Risco		Estratificação de Risco				
		Risco padrão	Risco adverso	Favorável	Intermediário	Adverso	Sem resultado	
Idade	<i>p-valor</i>	0,1827		<i>p-valor</i>	0,5061			
	<20 anos	0	3	<20 anos	1	1	1	0
	20-39	7	11	20-39	3	11	6	5
	40-59	7	3	40-59	4	11	3	5
	60-79	3	5	60-79	0	13	5	8
	>80 anos	0	1	>80 anos	0	0	0	1
Gênero	<i>p-valor</i>	0,9733		<i>p-valor</i>	0,0031			
	H	11	15	H	5	21	13	3
	M	6	6	M	3	15	2	12
Região	<i>p-valor</i>	0,5535		<i>p-valor</i>	0,3509			
	Fortaleza	9	10	Fortaleza	2	21	8	8
	Outros	8	13	Outros	6	15	7	10
WBC (10³)/mm³	<i>p-valor</i>	0,156		<i>p-valor</i>	0,7097			
	<10	8	11	<10	6	18	6	10
	>10	9	8	>10	2	11	6	6
	>100	0	4	>100	0	7	3	2
Blastos em SP	<i>p-valor</i>	0,9617		<i>p-valor</i>	0,8829			
	Sim	9	10	Sim	4	21	10	11
	Não	8	11	Não	4	15	5	7
Cariótipo	<i>p-valor</i>	<0,0001		<i>p-valor</i>	<0,0001			
	Alterado	1	14	Alterado	8	10	14	0
	Normal	10	0	Normal	0	23	0	0
	Sem resultado	6	9	Sem resultado	0	3	1	13
LDH (U/L)	<i>p-valor</i>	0,5352		<i>p-valor</i>	0,2995			

	<400	5	4	<400	3	15	6	3
	>400	7	7	>400	1	12	4	7
	>1000	4	9	>1000	0	4	3	1
	Sem resultado	1	3	Sem resultado	4	5	2	4
	<i>p-valor</i>	0,2167		<i>p-valor</i>	0,249			
Ocupação	Agricultor(a)	0	2	Agricultor(a)	1	2	0	3
	Bombeiro(a)	0	2	Autônomo(a)	1	1	1	0
	Dona de Casa	0	2	Dona de Casa	0	1	1	3
	Comerciante	1	1	Comerciante	0	2	1	3
	T.I	1	0	Policia	1	0	0	0
	Mecânico(a)	1	0	Mecânico(a)	0	0	2	0
	Motorista	1	0	Motorista	0	1	1	0
	Aviador	1	0	Pescador(a)	0	0	1	0
	Segurança	0	1	Professor(a)	0	2	0	1
	Engenheiro(a)	0	1	Fábrica de calçados	0	0	0	1
	Pedreiro	0	3	Téc. De Enfermagem	0	1	0	0
	Cozinheiro(a)	1	0	Costureira	0	1	0	0
	Téc. Segurança do Trabalho	0	1	Confeiteira	0	0	0	1
	Presidiário	0	1	Pedreiro	0	1	1	0
	N.I	10	10	N.I	5	22	7	6
	<i>p-valor</i>	0,117		<i>p-valor</i>	0,4208			
Óbito	Sim	2	8	Sim	2	12	8	5
	Não	14	15	Não	6	24	7	12

Legenda: LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda; LMA: Leucemia Mieloide Aguda; p-valor: Probabilidade de Significância; H: Homens; M: Mulheres; WBC: Contagem de Células Brancas; SP: Sangue Periférico; LDH: Lactato Desidrogenase; T.I: técnico de informática; N.I: não informado. **Fonte:** Dados da pesquisa.

5.2 Investigação do painel de endógenos

A classificação dos genes de acordo com o GeNorm indica que a *TBP* é o gene com a expressão mais estável para pacientes adultos com LLA (0,098) e LMA (0,073), e *HPRT* é o gene com a expressão mais estável tanto para pacientes pediátricos com LLA (0,059) quanto para amostras normais (0,040) (**Tabela 19**).

O NormFinder identificou um resultado diferente do GeNorm, provavelmente porque foi possível identificar os diferentes grupos amostrais durante a análise. O gene *ACTB* foi o mais estável (0,47), seguido pelo gene *RPLPO* (0,52). O candidato a gene de referência menos estável foi o *GAPDH* (1,78) (**Tabela 19**).

Tabela 19. Ranking de valores de estabilidade dos endógenos.

Ranking		NormFinder
	Gene	Valor de Estabilidade (p)
Geral*		
1	<i>ACTB</i>	0.47
2	<i>RPLPO</i>	0.52
3	<i>HPRT</i>	0.72
4	<i>ABL</i>	0.86
5	<i>TBP</i>	0.91
6	<i>GAPDH</i>	1.78
GeNorm		
	Gene	Valor de Estabilidade (M)
LLA		
1	<i>TBP</i>	0.098
2	<i>HPRT</i>	0.100
3	<i>ACTB</i>	0.104
4	<i>ABL</i>	0.113
5	<i>RPLPO</i>	0.121
6	<i>GAPDH</i>	0.128
LMA		
1	<i>TBP</i>	0.073
2	<i>ACTB</i>	0.083
3	<i>ABL</i>	0.087
4	<i>GAPDH</i>	0.090
5	<i>RPLPO</i>	0.091
6	<i>HPRT</i>	0.098
Controle		
1	<i>HPRT</i>	0.040
2	<i>RPLPO</i>	0.044

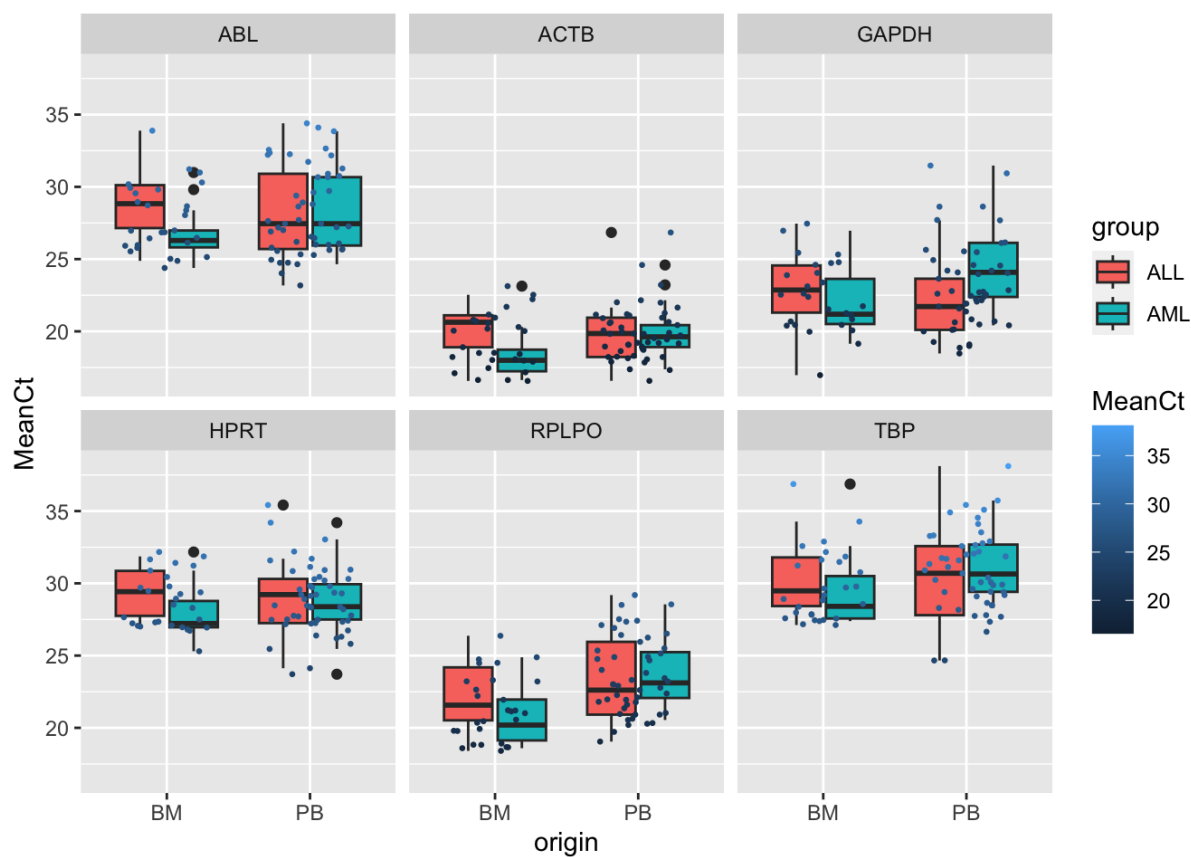
3	<i>TBP</i>	0.044
4	<i>ABL</i>	0.045
5	<i>ACTB</i>	0.052
6	<i>GAPDH</i>	0.067

*O programa normalizador NormFinder permitiu uma única análise de todas as amostras do estudo subdivididas por grupos (LMA, LLA e Controle), identificando os genes de referência com melhor desempenho global. O programa GeNorm não permitiu a identificação dos diferentes grupos em suas análises, portanto, cada grupo foi analisado separadamente. **Fonte:** Dados da pesquisa.

O software R permitiu uma análise aprofundada, considerando que essa ferramenta é capaz de realizar análises intergrupos e intragrupos, garantindo uma avaliação mais adequada do endógeno. Foi possível observar que o gene *ACTB* apresentou um desempenho muito bom, com baixos valores de média e desvio padrão (1,52 e 1,69, respectivamente), bem como pouca diferença no desvio padrão entre os grupos.

Os níveis de expressão de muitos desses genes flutuam dramaticamente dentro e entre os conjuntos de dados e a origem da amostra (sangue periférico ou medula óssea) revelou que ela pode ter uma influência na expressão dos genes de referência (**Figura 10**).

Figura 10. Média de expressão dos diferentes candidatos a endógenos para leucemia aguda.



Legenda: All samples: Todas as amostras; Mean Ct: Média do limite de ciclo; ALL: leucemia linfoblástica aguda; AML: leucemia mieloide aguda; Control: controle; Group: grupo; Origin: origem; BM: medula óssea; PB: sangue periférico. O software R permitiu uma análise aprofundada, considerando que essa ferramenta é capaz de realizar análises intergrupos e intragrupos, garantindo uma avaliação mais adequada do endógeno. Os níveis de expressão de muitos desses genes também flutuam dramaticamente dentro da origem da amostra, revelando que isso pode ter influência na expressão dos genes de referência. **Fonte:** Dados da pesquisa.

A análise realizada neste estudo mostrou que os genes *GAPDH* e *HPRT* não puderam ser classificados como bons genes de referência, uma vez que apresentaram alto desvio padrão e grande variabilidade entre os grupos, indicando baixa estabilidade. A partir desses resultados, pode-se considerar que o *GAPDH* e *HPRT* não se comportam como um bom endógeno para a análise da expressão de amostras de leucemia aguda, portanto, não devem ser utilizados.

Além disso, foi possível identificar que o conjunto endógeno composto por *ACTB*, *ABL*, *TBP* e *RPLPO* apresentou bons desempenhos e expressões estáveis entre os grupos analisados. Este conjunto endógeno é indicado para a análise da expressão de amostras de leucemia aguda.

5.3 Validação de *primers* e sondas

Para a validação dos primers utilizados na *Nested*-PCR e na RT-qPCR foi realizado o processo de Blast das sequências. Utilizou-se o programa Primer-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que consiste em buscar e comparar sequências biológicas contra um banco de dados (GenBank), indicando as sequências mais similares referentes à sequência pesquisada (YE *et al.*, 2012).

A similaridade das sequências listadas na **Tabela 20** prova que a técnica de PCR em tempo real com utilização de sondas TaqMan é uma boa alternativa de metodologia para a realização do diagnóstico molecular nas leucemias agudas de forma confiável, sensível e rápida.

Tabela 20. Blast de *primers* e sondas

Primers <i>Nested</i>-PCR	Sondas RT-qPCR
BCR-A (F): GACTGCAGCTCCAATGAGAAC ABL-B (R): GTTTGGGCTTCACACCATTCC BCR-C (F): CAGAACTCGCAACAGTCCTTC ABL-D (R): TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA BCR-E3' (F): TGACTGGCGTGATGTAGTTGCTT	Hs03024844_ft GCGGCCAGTAGCATCTG
TCF3-A (F): CACCAGCCTCATGCACAAC PBX1-B (R): TCGCAGGAGATTCATCACG TCF3-C (F): CACCCTCCCTGACCTGTCT PBX1-D (R): GGCCTGCTCGTATTTCTCC PBX1-E3' (R): TGAACTTGCGGTGGATGAT	Hs03024664_ft CTGTCTCGGCCTCCCGA
KMT2A-A (F): CCGCCTCAGCCACCTAC AFF1-B (R): TGTCACTGAGCTGAAGGTCG KMT2A-C (F): AGGACCGCCAAGAAAAGA AFF1-D (R): CAAATTCTCAGCAAGGAACG KMT2A-E5' (F): AAGCCCGTCGAGGAAAAG	Hs03043614_ft TCATGGCCGCTCCTTT
ETV6-A (F): TGCACCCTCTGATCCTGAAC RUNX1-B (R): AACGCCTCGCTCATCTTGC ETV6-C (F): AAGCCCATCAACCTCTCTCATC RUNX1-D (R): TGGAAGGCGGCGTGAAGC ETV6-E5' (F): CGCACCAGGAGAACAACCAC	Hs03043640_ft GCCGCCGCTTACGCC
SIL-A (F): TCCCGCTCCTACCCTGCAA TAL1-B (R): GTCATCGAACTGGGCGCG TAL1-D (R): TAGAGGGACGGGACGCGG TAL1-E3' (R): GACTTAAAGGGCCGCGACG	Hs03296414_ft

FLT3-ITD (F): GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC FLT3-ITD (R): GGTTGCCGTCAAATGCTGAAAG	Hs00174690_m1 GAAGCGATGTATCAGAA
RUNX1 (F): GCTGGCAATGATGAAAACACTC RUNX1T1 (R): ACCAGTTCATTTACACCGACAAC	Hs03024752_ft AGAGCCATCAAATCAC
CBFB-A (F): GTTATCTGGAAAGGCTGGATTG MYH11-A (R): AGATCCATCCTCACTCCTCGTA MYH11-D (R): GAGACGAGAGGACATTCCACAT CBFB-E (F): TATGGGCTGTCTGGAGTTTGAT MYH11-E (R): AAGAACGACAACCTCCTCACGAT	Hs03460064_ft
PML-A (F): CCGTCATAGGAAGTGAGGTCTT RARA_B (R): AAGAAGTGCATCATCAACAAGG PML-C (F): CAGGTCAACGTCAATAGGGTC PML-E (F): AGCTCTTGCATCACCCAGGGGA RARA-E (R): ACTATGGGGTCAGCGCCTGTGAG	Hs03024794_ft AGGACCTCAGCTCTTGC

A **Tabela 21** demonstra a análise realizada *in silico* do anelamento dos primers e sondas utilizados no estudo, permitindo a validação de ambos.

Tabela 21. Análise *in silico* do anelamento de primers e sondas

<i>Análise in silico</i>
<i>BCR::ABL1</i>
GTACCAGCCCTACCAGAGCATCTACGTCGGGGGCATGATGGAAGGGGAGGGCAAGGGCCCGCTCTGCGCAGCCAGAG CACCTCTGAGCAGGAGAAGCGCCTTACCTGGCCCCGAGGTCTACTCCCCCGGAGTTTTGAGGATTGCGGAGGGCGG TATACCCCGGACTGTCAGCTCCAATGAGAACCTCACCTCCAGCGAGGAGGACTTCTCCTCTGGCCAGTCCAGCCGCGTGT CCCAAGCCCCACCACCTACCGCATGTTCCGGGACAAAAGCCGCTCTCCCTCGCAGAAGTCCGCAACAGTCCCTTGACAGC AGCAGTCCCCCAGCCGAGTGCATAAGCGGCACCGGCACTGCCCCGTTGTCGTGTCCGAGGCCACCATCGTGGGGC TCCGCAAGACCGGGCAGATCTGGCCCAACGATGGCGAGGGCGCCTTCCATGGAGACGCAGAAGCCCTTCAAGCGCCAGT AGCATCTGACTTTGAGCCTCAGGGTCTGAGTGAAGCCGCTCGTTGGAAGTCCAAGGAAAACCTTCTCGCTGGACCCAGT GAAAATGACCCCAACCTTTTTCGTTGCACTGTATGATTTTGTGGCCAGTGGAGATAAACTCTAAGCATAACTAAAGGTGA AAAGCTCCGGGTCTTAGGCTATAATCACAATGGGAATGGTGTGAAGCCCAACCAAAAATGGCCAAGGCTGGGTCCCA AGCAACTAACTCAGCCAGTCAACAGTCTGGAGAAACACTCCTGGTACCATGGGCTGTGTCCCGCAATGCCGCTGAGT ATCTGTGAGCAGCGGGATCAATGGCAGCTTCTTGGTGCCTGAGAGTGAAGCAGTCCCTGGCCAGAGGTCCATCTCGCT GAGATACGAAGGGAGGGTGTACCATTACAGGATCAACACTGCTTCTGATGGCAAGCTCTACGCTCTCCTCCGAGAGCCG TTCAACACCCTGGCCGAGTTGGTTTCATCATCATTCAACGGTGGCCGACGGGCTCATCACCAGCTCCATTATCCAGCCCC AAAGCGCAACAAGCCCACTGTCTATGGTGTGTCCCCCAACTACGACAAGT
<i>TCF3::PBX1</i>
GGCTACCAGCTGCATGGAGCAGAGGTGAACGGAGGGCTCCCATCTGCATCCTCCTTCTCCTCAGCCCCGGAGCCACGT ACGGCGTCTCCAGCCACACGCCGCTGTACGCGGGGCCACAGCCTCCTGGGCTCCCGAGGGACCACAGCTGGCAGCTC CGGGGATGCCCTCGGCAAGACACTGGCCTCGATCTACTCCCCGGATCACTCAAGCAATAACTTCTCGTCCAGCCCTTCTA CCCCGTGGGCTCCCCAGGGCTGGCAGGAACGTACAGTGGCCTCGAGCAGGAGCCCCGGTGCCTTATCGCCCCAG CTACGACGGGGTCTCCACGGCCTGCAGAGTAAGATAGAAGACCACCTGGACGAGGCCATCCACGTGCTCCGAGCCAC GCCGTGGGCACAGCCGGCAGATGCACACGCTGCTGCCTGGCCACGGGGCGCTGGCCTCAGTTTTACCCGGCCCCATGT CACTGGGCGGGCGGCACGCAGGCCTGGTTGGAGGCAGCCACCCGAGGACGGCCTCGCAGGCAGCACCAGCCTCATGC ACAACACGCGGCCCTCCCCAGCCAGCCAGGCACCCTCCCTGACCTGTCTCGGCCTCCCGAATCCTACAGTGTTTTGTGAGT ATCCGAGGAGCCCAGGAGGAGGAACCCACAGACCCCCAGCTGATGCGGCTGGACAACATGCTGTAGCGGAAGGCGTG GCGGGGCTGAGAAGGGCGGAGGGTGGCGGCAGCGGCGGAGCGGCGGGCTTCTGGAGGGGCAGGTTACAGACAAC

TCAGTGGAGCATTACAGATTACAGAGCCAACTCTCACAGATCAGACAAATCTACCATACGGAGCTGGAGAAATACGAGC
 AGGCC TGCAACGAGTTACCACCCA CGTGATGAATCTCCTGCGA GAGCAAAGCCGGACCAGGCCATCTCCCAAAGGA
 GATTGAGCGGATGGTCAGCATCATCCACCGCAAGTTCAGCTCCATCCAGATGCAGCTCAAGCAGAGCACGTGCGAGGCG
 GTGATGATCCTGCGTTCCCGATTT
 CTGGATGCGCGGCGGAAGAGACGGAATTTCAACAAGCAAGCGCACAGAAATCCTGAATGAATATTTCTATTCCCATCTCA
 GCAACCCTTACCCAGTGAGGAAGCCAAAGAGGAGTTAGCCAAGAAGTGTGGCATCACAGTCTCCAGGTATCAAACCTG
 GTTTGGAAATAAGCGAATCCGGTACAAGAAGAACATAGGTAAATTTCAAGAGGAAGCCAATATTTATGCTGCCAAAACA
 GCTGTCACTGCTACCAATGTGTGTCAGCCATGGAAGCCAAGCTAACTCGCCCTCAACTCCCAACTCGGCTGGTTCTTCCAG
 TTCTTTTAAACATGTCAAACCTCTGGAGATTTGTTTCATGAGCGTGCAGTCACTCAATGGGGATTCTTACCAAGGGGCCAGG
 TTGGAGCCAACGTGCAATCACAGGTGGATACCCTTCGCCATGTTATCAGCCAGACAGGAGGATACAGTGTGGACTCGC
 AGCCAGTCAGATGTACAGTCCGCAGGGCATCAGTGCTAATGGAGGTTGGCAGGATGCTACTACCCCTTCATCAGTGACC
 TCCCCTACAGAAGGCCCTGGCAGTGTTCACTGTGATACCTCCAACCTGATCTCCAGCAATCGCATCCCGGCTGACCCTGT
 GCCCAGTTGGGGCAGGGGCAGGAGGGGAGGTTTCTCTCCCAACCTGTAAGCGGTCAGACTGGAGGTGGAAGCAATCA
 GCAAACACAATAAGAGTCTCTTCTCTTCTTCTTGGGATGCTATTTTCAGCCAATCTGGACACTCTTTATACTCTTCT
 CCTTTTTTTCTGGGTAGAAGCCACCCTTCCCTGCTCCAGCTGTCAGCCTGGTTTTCTGTCATCTTCCCTGCCCTGTGCCT
 CTGTCTAGACTCCCGGGTCCCGCCCTCTCTCATATCACTGAAGGATATTTTCAACAATTGAAGGAATTTAAAGAGCA
 AAAAAATTACAAAGAAAATAATAAAAGTGTGTACGTTTTT

KMT2A::AFF1

GCAAACAGAAAAAGTGGCTCCCGCCCAAGTATCCCTGTAAAAACAAAAACAAAAAGGAAATGACCCATTCAT
 GGCCCGCTCCTT GACAGCAATACATACGCTAGTACAGTACAGCCATCCAAGTTTCTTCCCTACAAAGGACTCTCAG
 CATGTCAGTTCTGTAAACCCAAAACAAAAACAATATGATACATCTTAAAAAAGTCACTCAAATCTCAGCAAGGAACGT
 CATCCATGCTCGAAGA CGACCTTCAGCTCAGTGACA GTGAGGACAGTGCAGTGAACAAACCCAGAGAAAGCCTCCCTC
 CTCATCTGCACCTCCAAGTGTCCACAGTCCCTTCCAGAACCAGTGGCATCAGCACATTCCAGCAGTGCAGAGTCAGAA
 AGCACCAGTGACTCAGACAGTTCTCAGACTCAGAGAGCGAGAGCAGTTCAAGTG

ETV6::RUNX1

CTGCATAGGGAAGGGAAGCCCATCAACCTCTCTCATCGGGAAGACCTGGCTTACATGAACCACATCATGGTCTCTGTCTC
 CCCGCTGAAGAGCAGCCATGCCATGGGAGAAATAGCAGGAAAAAGAATGGGAGGAGTCAGCAAAGACCAAGAAT
 GCATACTGGAAATGAATCCTTCTAGAGAGCTCCACGATGCCAGCACGA GCCGCGCTTTCACGCGCCCTTCCA CCGCGCTG
 AGCCAG GCAAGATGAGCGAGGCGTTA

SIL::TALI

*

FLT3-ITD

GCGCCGCTCCAGGCGGCATCGCAGGGCTGGGCGGCGCGGCTGGGGACCCCGGGCTCCGGAGGCCATGCCGGCGTTG
 GCGCGCAGGGCGGCCAGCTGCCGCTGCTCGTTGTTTTCTGCAATGATATTTGGGACTATTACAAATCAAGATCTGCC
 TGTGATCAAGTGTGTTTTAATCAATCATAAGAACAATGATTCATCAGTGGGGAAGTCATCATCATATCCCATGGTATCAG
 AATCCCGGAAGACCTCGGGTGTGCGTTGAGACCCAGAGCTCAGGGACAGTGTACGAAGCTGCCGCTGTGGAAGTGG
 TGTATCTGCTTCCATCACACTGCAAGTGTGTCGACGCCCCAGGGAACATTTCTGTCTCTGGGTCTTTAAGCACAGCT
 CCCTGAATTGCCAGCCACATTTTGATTTACAAAACAGAGGAGTTGTTCCATGGTCAATTTGAAAATGACAGAAACCCAA
 GCTGGAGAATACCTACTTTTTATTAGAGTGAAGCTACCAATTACACAATATTGTTTACAGTGAGTATAAGAAATACCT
 GCTTTACACATTAAGAAGACCTTACTTTAGAAAAATGGAAAACAGGACGCCCTGGTCTGCATATCTGAGAGCGTTCCA
 GAGCCGATCGTGAATGGGTGCTTTGCGATTACAGGGGAAAGCTGTAAAGAAGAAAGTCCAGCTGTTGTTAAAAAG
 GAGGAAAAAGTCTTCATGAATTTTGGACGGACATAAGGTGCTGTGCCAGAAATGAACTGGGAGGAAATGCACC
 AGGCTGTTACAATAGATCTAAATCAAACCTCCTCAGACCACATTGCCACAATTTTCTTAAAGTAGGGGAACCCATTAG
 GATAAGGTGCAAAGCTGTTTCATGTGAACCATGGATTCCGGGCTCACCTGGGAATTAGAAAACAAAGCACTCGAGGAGGG
 CAACTACTTTGAGATGAGTACCTATTCAACAAACAGAATATGATACGGATTCTGTTTGTATCATCAGTGGCAA
 GAAACGACACCGGATACTACACTGTTCTTCAAAGCATCCCAGTCAATCAGCTTTGGTTACCATCGTAGAAAAGGGA
 TTTATAAATGCTACCAATCAAGTGAAGATTATGAAATGACCAATATGAAGAGTTTTGTTTTCTGTCCAGGTTAAAGC
 CTACCCACAAATCAGATGTACGTGGACCTTCTCTCGAAAAATCATTTCCTTGTGAGCAAAGGGTCTTGATAACGGATA
 GCATATCCAAGTTTGAATCATAAGCACCAGGAGAAATATATTTCCATGCAGAAAATGATGATGCCAATTTTAC
 CAAAATGTTACGCTGAATATAAGAAGGAAACCTCAAGTGTCCAGAAAGCATCGGCAAGTCAGGCGTCTGTTTCTCG
 GATGGATACCCATTACCATCTTGGACCTGGAAGAAGTGTTCAGACAAGTCTCCCAACTGCACAGAAGAGATCACAGAAG
 GAGTCTGGAATAGAAAGGCTAACAGAAAAGTGTGTTGGACAGTGGGTGTCGAGCAGTACTCTAAACATGAGTGAAGCCA
 TAAAAGGGTTCCCTGGTCAAGTGTGTCATACAATCCCTTGGCACATCTGTGAGACGATCCTTTTAAACTCTCCAGGC
 CCTTCCCTTTCATCCAAGACAACATCTCATTCTATGCAACAATTGGTGTGTTGCTCCTCTTCAATGTGCTTTTAAACCCTGC
 TAATTTGTCACAAGTACAAAA GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC TACAGATGGTACAGGTGACCGGCTCCTCAGATAA
 TGAGTACTTCTACGTTGATTTACAGAGAATATGAATATGATCTCAAATGGGAGTTTCCAAGAGAAAAATTAGAGTTGGGA
 AGGTACTAGGATCAGGTGCTTTTGGAAAAGTGAAGTGAACGCAACAGCTTATGGAATTAGCAAACAGGAGTCTCAATCCA
 GGTGCGCGTCAAATGCTGAAAG AAAAAGCAGACAGCTCTGAAAGAGAGGCACTCATGTGAGAACTCAAGATGATGAC
 CCAGCTGGGAAGCCACGAGAATATTGTGAACCTGCTGGGGCGTGCACACTGTCAGGACCAATTTACTTGATTTTTGAAT
 ACTGTTGCTATGGTATCTTCTCAACTATCTAAGAAGTAAAAGAGAAAAATTTACAGGACTTGGACAGAGATTTTCAA
 GGAACACAATTTAGTTTTTACCCACTTTCCAATCACATCCAATTTCCAGCATGCCTGGTTCAAGAGAAGTTTACAGATA
 ACCCGGACTCGGATCAAATCTCAGGGCTTCATGGGAATTCATTTCACTCTGAAGATGAAATTTGAATATGAAAACAAAA
 AAGGCTGGAAGAAGAGGAGGACTTGAATGTGCTTACATTTGAAGATCTTCTTGTGCTTGCATATCAAGTTGCCAAAGGA

ATGGAATTTCTGGAATTTAAGTCGTGTGTTACACAGAGACCTGGCCGCCAGGAACGTGCTTGTACCCACGGGAAAGTGG
 TGAAGATATGTGACTTTGGATTGGCTCGAGATATCATGAGTGATTCCAACATATGTTGTCAGGGGCAATGCCCGTCTGCCT
 GTAAAATGGATGGCCCCGAAAGCCTGTTTGAAGGCATCTACACCATTAAGAGTGATGTCTGGTCATATGGAATATTACT
 GTGGGAAATCTTCTCACTTGGTGTGAATCCTTACCCTGGCATTCCGGTTGATGCTAACTTCTACAAACTGATTCAAAATG
 GATTTAAAATGGATCAGCCATTTTATGCTACAGAAGAAATATACATTATAATGCAATCCTGCTGGGCTTTTACTCAAGG
 AAACGGCCATCCTTCCCTAATTTGACTTCGTTTTAGGATGTCAGCTGGCAGATGCAGAA**GAAGCGATGTATCAGAA**TGT
 GGATGGCCGTGTTTCGGAATGTCCTCACACCTACCAAAACAGGCGACCTTTCAGCAGAGAGATGGATTTGGGGCTACTC
 TCTCCGCAGGCTCAGGTCGAAGATTCGTAGAGGAACAATTTAGTTTTAAGGACTTCATCCCTCCACCTATCCCTAACAGG
 CTGTAGATTACCAAAACAAGATTAATTTTCATCACTAAAAGAAAATCTATTATCAACTGCTGCTTCACCAGACTTTTCTCT
 AGAAGCTGTCTGCGTTTACTCTTGTTTTCAAAGGGACTTTTGTAAAATCAAATCATCCTGTACAAGGCAGGAGGAGCTGA
 TAATGAACTTTATGGAGCATTGATCTGCATCCAAGGCCCTTCTCAGGCTGGCTTGAGTGAATTGTGTACCTGAAGTACAG
 TATATTCTTGAAATACATAAAACAAAAGCATTTTGCTAAGGAGAAGCTAATATGATTTTTTAAAGTCTATGTTTTAAAAT
 AATATGTAAATTTTTCAGCTATTTAGTGATATATTTTATGGGTGGGAATAAAAATTTCTACTACAGAATGGCCATTATTGA
 ATATTACATGGTATAAATTAGGGCAAGTCTTAACTGGAGTTCACGAACCCCTGAAATTGTGCACCCATGCCACCTAC
 ACATTCCTTCCAGAGCACGTGTGCTTTTACCCCAAGATACAAGGAATGTGTAGGCAGCTATGGTTGTACAGCCTAAGAT
 TTCTGCAACAACAGGGGTTGTATTGGGGGAAGTTTATAATGAATAGGTGTTCTACCATAAAGAGTAATACATCACCTAG
 ACACTTTGGCGCCTTCCAGACTCAGGGCCAGTCAGAAGTAACATGGAGGATTAGTATTTTCAATAAAGTTACTCTTGT
 CCCACA

RUNX1::RUNX1I

GTGGTGGCCCTAGGGGATGTTCCAGATGGCACTCTGGTCACTGTGATG**GCTGGCAATGATGAAA**ACTACTC**GGCTGAGC**
 TG**AGAAATGCTACCGCAGCCATGAA**GAACCAGGTTGCAAGATTTAATGACCTCAGGTTTGTGCGTCAAGTGGAAAGAGA
 TCGTACTGAGAAGCACTCCACAATGCCAGACTCACCTGTGGATGTGAAGACGCAATCTAGGCTGCTCCTCCAACAATGC
 CACTCCCCCACTACTCAAGGAGCTCCAAGA**ACCAGTTCATTTACACCGACAAC**GT

CBFB::MYH11

GTATATTTGAAGGCTCCCATGATTCTGAATGGAGTCTGT**GTTATCTGGAAAGGCTGGATTG**ATCTCCAAAGACTGGATGG
TATGGGCTGTCTGGAGTTTGATGAGGAGCGAGCCAGGAGATTTGGACGCTCCGGCCTGGGAGGTGCGTCAGATCCGAG
 CTCGCCATCCAGTTTCTCTCCACTAGTCCCCCAGTTGGAGATCTGGGACCAACAAGGCACCATGGCGCAGAAGGGCC
 AACTCAGTGACGATGAGAAGTTCTCTTTGTGGACAATAAAGGATCAACAGCCAGCCAGTGGCCAGGCTGACTGGGGCGC
 CAAGAGACTCGTCTGGGTCCCCTCGGAGAAGCAGGGCTTCGAGGCAGCCAGCATTAAAGGAGGAGAAGGGGGATGAGGT
 GGTTGTGGAGCTGGTGGAGAATGGCAAGAAGGTACGGTTGGGAAAGATGACATCCAGAAGATGAACCCACCCAAGTT
 CTCCAAGGTGGAGGACATGGCGGAGCTGACGTGCCTCAACGAAGCCTCCGTGCTACACAACCTGAGGGAGCGGTACTTC
 TCAGGGCTAATATATACGTACTCTGGCCTCTTCTGCGTGGTGGTCAACCCCTATAAACACCTGCCATCTACTCGGAGAA
 GATCGTCGACATGTACAAGGGCAAGAAGAGGCAGAGATGCCGCCTCACATCTACGCCATCGCAGACACGGCCTACCG
 GAGCATGCTTCAAGATCGGGAGGACCAGTCCATTCTATGCACAGGCGAGTCTGGAGCCGGGAAAACCGAAAACACCAA
 GAAGGTCACTCAGTACGAAAGTTTGGCCCTTCTCCCAAGGGCAAGAAAGACACAAGTATCACGGGAGAGCTGGA
 AAAGCAGCTTCTACAAGCAAAACCGATTCTGGAGGCTTTCGGCAACGCCAAAACAGTGAAGAACGACAACCTCCTCACGA
 TTCGGCAAATTCATCCGCATCAACTTCGACGTACGGGTTACATCGTGGGAGCCAACATTGAGACCTATCTGCTAGAAAA
 ATCACGGGAATTCGCCAAGCCAGAGACGAGAGGACATTTCAACTCTTTTACTACATGATTGCTGGAGCCAAGGAGAAG
 ATGAGAAGTGACTTGCTTTTGGAGGGCTTCAACAACCTACACCTTCTTCCAATGGCTTTGTGCCATCCCAGCAGCCCA
 GGATGATGAGATGTTCCAGGAAACCGTGGAGGCCATGGCAATCATGGGTTTCAGCGAGGAGGAGCAGCTATCCATATTG
 AAGTGGTATCATCGTCTGCAGCTTGGAAATATCGTCTTCAAGAAGGAAAGAAACACAGACCAGGCTCCATGCCAG
 ATAACACTGCTCAGTACGAAAGTTTGGCCCTCATGGAAATTAATGTGACAGATTTACC**AGATCCATCTCACTCTCGT**
ATCAAGGTTGGCGGAGATGTGGTACAGAAAGCTCAGACAAAAGAACAGGCTGACTTTGCTGTAGAGGCTTTGGCCAAG
 GCAACATATGAGCGCCTTTTCCGCTGGATACTACCCCGGTGAACAAAGCCCTGGACAAGACCCATCGGCAAGGGGCTT
 CCTTCTGGGATCCTGGATATAGCTGGATTTGAGATCTTTGAGGTGAACTCCTTCGAGCAGCTGTGCATCAACTACACC
 AACGAGAAGCTGCAGCAGCTTCAACCACCCATGTTTCATCCTGGAGCAGGAGGAGTACCAGCGGAGGGCATCGAGT
 GGAATTCATCGACTTTGGGCTGGACCTACAGCCCTGCATCGAGCTCATCGAGCGACCGAACAACCCCTCCAGGTGTGCT
 GGCCCTGCTGGACGAGGAATGCTGGTTCCCCAAAGCCACGGACAAGTCTTTTCGTGGAGAAGCTGTGCACGGAGCAGGGC
 AGCCACCCAAAGTTCCAGAAGCCCAAGCAGCTCAAGGACAAGACTGAGTTCTCCATCATCCATTATGTGGGAAGGTGG
 ACTATAATGCGAGTGCCTGGCTGACCAAGAATATGGACCCGCTGAATGACAACGCTGACTTCCCTGCTCAATGCCTCCTCC
 GACAAGTTTGTGGCCGACCTGTGGAAGGACGTGGACCGCATCGTGGCCTGGACCAGATGGCCAAGATGACGGAGAGC
 TCGTGTCCAGCGCCTCCAAGACCAAGAAGGGCATGTTCCGCACAGTGGGGCAGCTGTACAAGGAGCAGCTGGGCAAG
 CTGATGACCAGCTACGCAACACCACGCCAACTTCTGTCGCTGCATATCCCAACCACGAGAAGAGGTCCGGCAAGC
 TGGATGCGTTCTGGTGTGGAGCAGCTGCGGTGCAATGGGGTGTGGAAGGCATTTCGCATCTGCCGGCAGGGCTTCCC
 CAACCGGATCGTCTTCCAGGAGTTCCGCCAACGCTACGAGATCTTGGCGGCGAATGCCATCCCCAAAGGCTTCATGGAC
 GGGAAAGCAGGCTGCATTTCTATGATCAAAGCCCTGGAACCTGACCCCAACTTATAACAGGATAGGGCAGAGCAAAATCT
 TCTTCCGAAGTCCGCTCCTGGCCACCTAGAGGAGGAGCAGATTTGAAGATCACCGATGTCATCGCTCCCTCCAGGC
 GATGTGTCGTGGCTACTTGGCCAGAAAGGCTTTTGGCAAGAGGCAGCAGCAGCTGACCGCCATGAAGGTGATTACAGAGG
 AACTGCGCCGCTACCTCAAGCTGCGGAACTGGCAGTGGTGGAGGCTTTTACCAAAGTGAAGCCACTGCTGCAGGTGA
 CACGGCAGGAGGAGGAGATGCAGGCCAAGGAGGATGAACTGCAGAAGACCAAGGAGCGGCAGCAGAAGGCAGAGAAT
 GAGCTTAAGGAGCTGGAACAGAAGCACTCGCAGCTGACCGAGGAGAAGAACCTGCTACAGGAACAGCTGCAGGCAGAG
 ACAGAGCTGTATGCAGAGGCTGAGGAGATGCGGGTGCGGCTGGCGGCCAAGAAGCAGGAGCTGGAGGAGATACTGCAT
 GAGATGGAGGCCCGCCTGGAGGAGGAGGAAGACAGGGGCCAGCAGCTACAGGCTGAAAGGAAGAAGATGGCCCAGCA
 GATGCTGGACCTTGAAGAACAGCTGGAGGAGGAGGAAGCTGCCAGGCAGAAGC

PML::RARA

CATCTACTGCCGAGGATGTTCCAAGCCGCTGTGCTGCTCGTGCGCGCTCCTTGACAGCAGCCACAGTGAGCTCAAGTGCG
 ACATCAGCGCAGAGATCCAGCAGCGACAGGAGGAGCTGGACGCCATGACGCAGGCGCTGCAGGAGCAGGATAGTGCCTT
 TGGCGCGGTTACGCGCAGATGCACGCGGCCGTCGGCCAGCTGGGCCGCGCGCTGCCGAGACCGAGGAGCTGATCCGC
 GAGCGCGTGCGCCAGGTGGTAGCTCACGTGCGGGCTCAGGAGCGCGAGCTGCTGGAGGCTGTGGACGCGCGGTACCAGC
 GCGACTACGAGGAGATGGCCAGTCGGCTGGGCCGCTGGATGCTGTGCTGCAGCGCATCCGCACGGGCAGCGCGTGGT
 GCAGAGGATGAAGTGCTACGCCTCGGACCAGGAGGTGCTGGACATGCACGGTTTCCTGCGCCAGGCGCTCTGCCGCTG
 CGCCAGGAGGAGCCCCAGAGCCTGCAAGCTGCCGTGCGCACCGATGGCTTCGACGAGTTCAAGGTGCGCCTGCAGGACC
 TCAAGCTCTGCATCACCCAGGGGAAGCCATTGAGACCCAGAGCAGCAGTTCTGAAGAGATAGTGCCAGCCCTCCCTCG
 CCACCCCTCTACCCCGCATCTACAAGCCTTGCTTTGTCTGTCAGGACAAGTCCTCAGGCTACCAGTATGGGGTCAGCGCC
 TGTGAGGGCTGCAAG

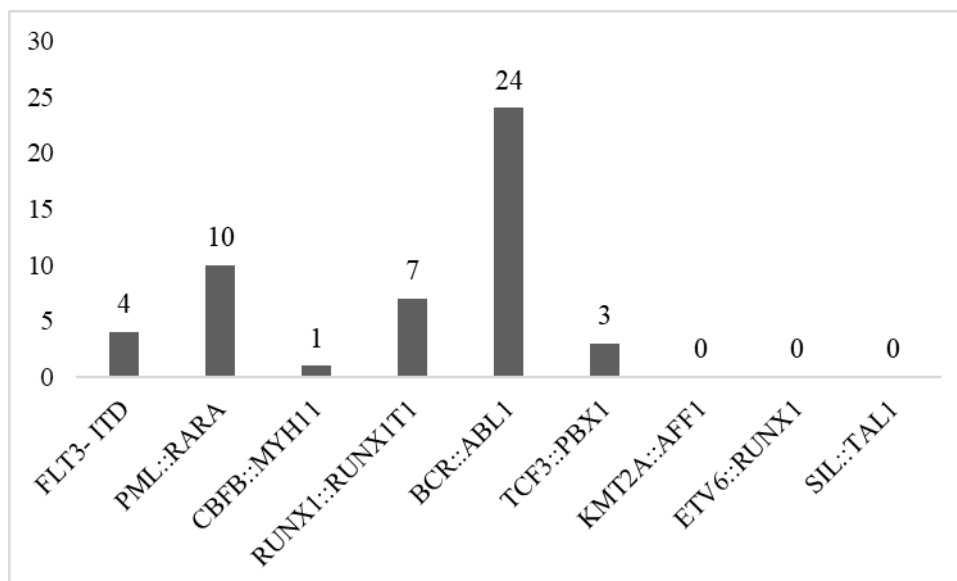
Legenda: Rosa: Sequências de primer Forward; Verde: Sequências de primer Reverse; Amarelo: Sequências das sondas. * Não foi possível realizar análise *in silico* por se tratar de uma deleção cromossômica. **Fonte:** Dados da pesquisa.

5.4 Comparação de sensibilidade das técnicas de *Nested-PCR* e RT-qPCR

Após a obtenção dos respectivos diagnósticos de leucemia mieloide aguda e leucemia linfoblástica aguda, todas as amostras foram submetidas a análises qualitativas através da técnica de *Nested-PCR* e a análises de expressão quantitativa através da técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR). Os pacientes com LMA foram submetidos à análise das seguintes alterações: *FLT3-ITD*, *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11* e *PML::RARA*, enquanto foram pesquisadas as fusões *BCR::ABL1*, *TCF3::PBX1*, *KMT2A::AFF1*, *ETV6::RUNX1* e *SIL::TAL1* nas amostras dos pacientes com LLA.

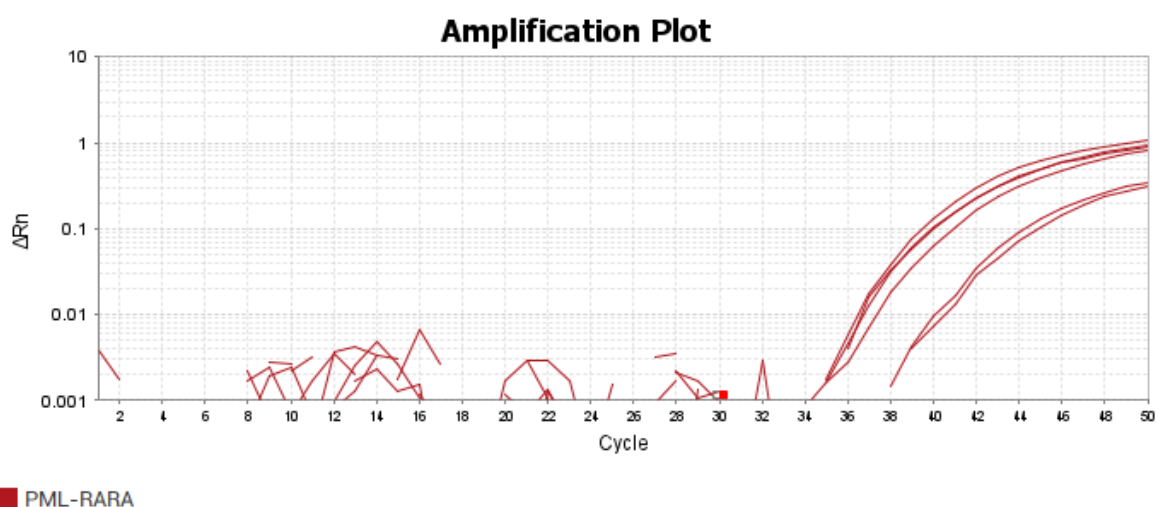
Além disso, todos os pacientes também foram submetidos à análise de expressão de genes de referência para controle. Os genes *GAPDH* e *HPRT* foram utilizados como genes de referência na técnica da *Nested-PCR*. Já na técnica de RT-qPCR, foram utilizados os genes *ACTB*, *ABL* e *TBP*, que correspondem ao conjunto de endógenos validados pelo estudo de normalização realizado.

Entre todos os 77 pacientes com LMA, foram detectados 4 pacientes com presença da mutação *FLT3-ITD*, 7 pacientes com presença da translocação *RUNX1::RUNX1T1*, 10 pacientes com a translocação *PML::RARA* e 1 paciente com a translocação *CBFB::MYH11*. Já entre os 40 pacientes portadores de LLA, observou-se a presença de 24 pacientes com a translocação *BCR::ABL1* e 3 pacientes com a translocação *TCF3::PBX1* (**Figura 11**).

Figura 11. Frequência de alterações citogenéticas nos pacientes da pesquisa.

Fonte: Dados da pesquisa.

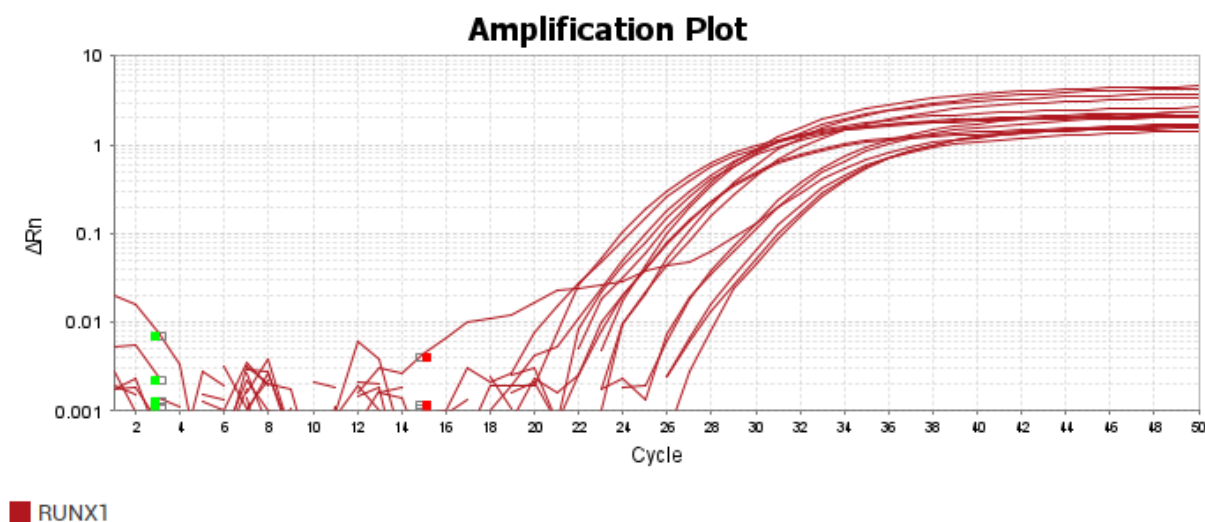
Através da técnica de RT-qPCR, observou-se que cerca de 13% dos pacientes portadores de LMA apresentavam a alteração *PML::RARA*, predominando em pacientes do sexo masculino, com média de idade de 40,5 anos, não residentes da capital (Fortaleza). Apenas 5 pacientes apresentavam a translocação característica t(15;17)(q24;q21.3) nos cariótipos analisados (**Figura 12**). Dos 10 pacientes diagnosticados com a fusão, 5 já evoluíram a óbito (**Tabela 22**). A análise através da *Nested-PCR* não foi capaz de identificar a presença da fusão *PML::RARA* em pacientes portadores da alteração.

Figura 12. Curva de amplificação de amostras de LMA com detecção de *PML::RARA*.

Legenda: Amplification Plot: Curva de amplificação; Cycle: Ciclo. **Fonte:** Dados da pesquisa.

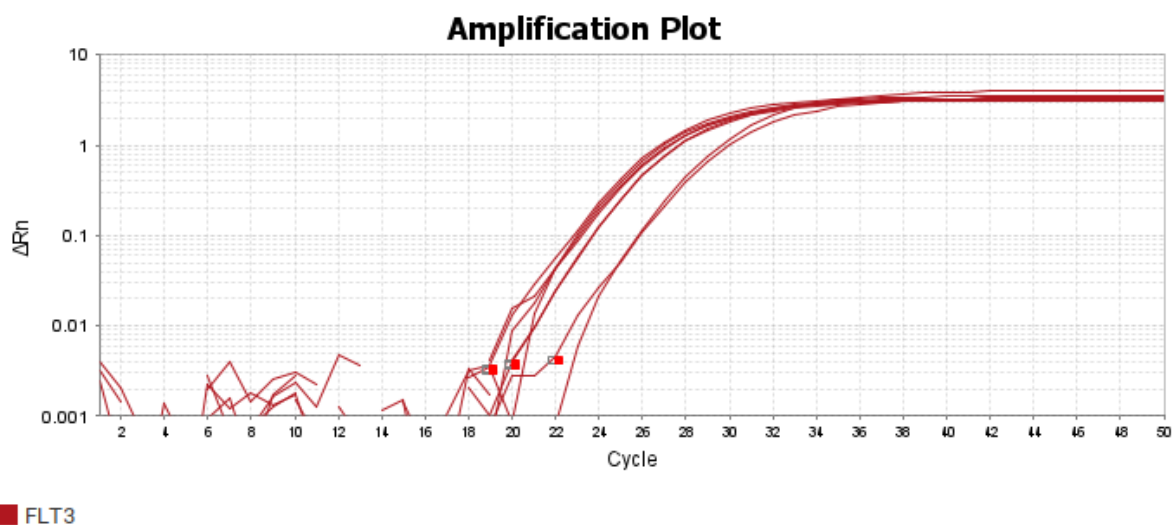
Ao todo, identificou-se por meio de RT-qPCR que em torno de 9% dos pacientes com LMA eram portadores da alteração *RUNX1::RUNX1T1* (**Figura 13**). Observou-se que essa anormalidade também era mais frequente em pacientes do sexo masculino, com média de idade de 31 anos, não residentes da capital. Todos os pacientes com *RUNX1::RUNX1T1* possuíam contagem de leucócitos abaixo de 10.000/mm³ no momento do diagnóstico. Apenas 3 pacientes apresentavam a translocação característica t(8;21)(q22;q22) nos cariótipos analisados. Apenas 1 paciente, dos 7 diagnosticados, evoluiu a óbito (**Tabela 22**). Nesse caso, a técnica de *Nested-PCR* também não foi capaz de identificar a presença da fusão *RUNX1::RUNX1T1* nos pacientes sabidamente positivos.

Figura 13. Curva de amplificação de amostras de LMA com detecção de *RUNX1::RUNX1T1*.



Legenda: Amplification Plot: Curva de amplificação; Cycle: Ciclo. **Fonte:** Dados da pesquisa.

Cerca de 5,2% dos pacientes portadores de LMA apresentavam a mutação *FLT3-ITD*, detectada através de RT-qPCR (**Figura 14**). Foi possível identificar a predominância dessa alteração em pacientes residentes da capital, com uma média de idade de 50,2 anos. Dos 4 pacientes diagnosticados, 3 apresentavam cariótipos normais (**Tabela 22**). Assim como as outras alterações citogenéticas pesquisadas na LMA, a mutação *FLT3-ITD* também não foi identificada através da técnica de *Nested-PCR*.

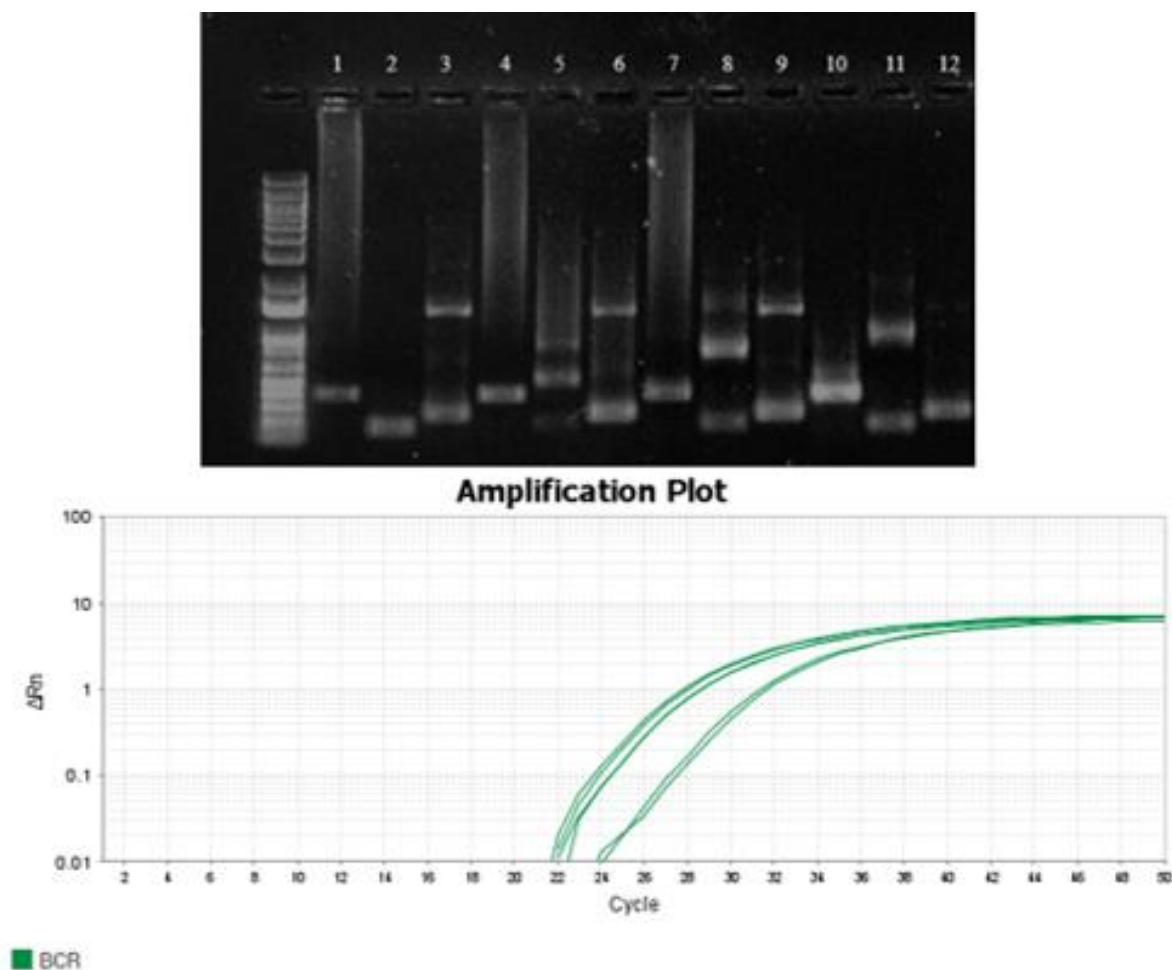
Figura 14. Curva de amplificação de amostras de LMA com detecção de *FLT3-ITD*.

Legenda: Amplification Plot: Curva de amplificação; Cycle: Ciclo. **Fonte:** Dados da pesquisa.

No total, a técnica de RT-qPCR detectou que 60% dos pacientes portadores de LLA apresentavam a mutação *BCR::ABL1*. A presença dessa alteração predominou em pacientes do sexo masculino, com média de idade de 41,8 anos, residentes de Fortaleza. Entre os cariótipos analisados observaram-se que 5 eram complexos, 8 eram normais, 9 não apresentavam resultados e apenas 1 possuía a translocação clássica $t(9;22)(q34;q11.2)$. Dos 24 pacientes diagnosticados, 4 evoluíram a óbito (**Tabela 22**).

A técnica de *Nested-PCR*, por sua vez, foi capaz de identificar a presença da alteração *BCR::ABL1* em amostras de pacientes sabidamente positivos (**Figura 15**). Diferentemente das análises realizadas nas amostras de LMA, dessa vez foi possível identificar a formação de banda nas pesquisas dos genes de referência bem como da fusão de interesse.

Figura 15. *Nested*-PCR e curvas de amplificação de amostras de pacientes portadores de LLA com *BCR::ABL1*.



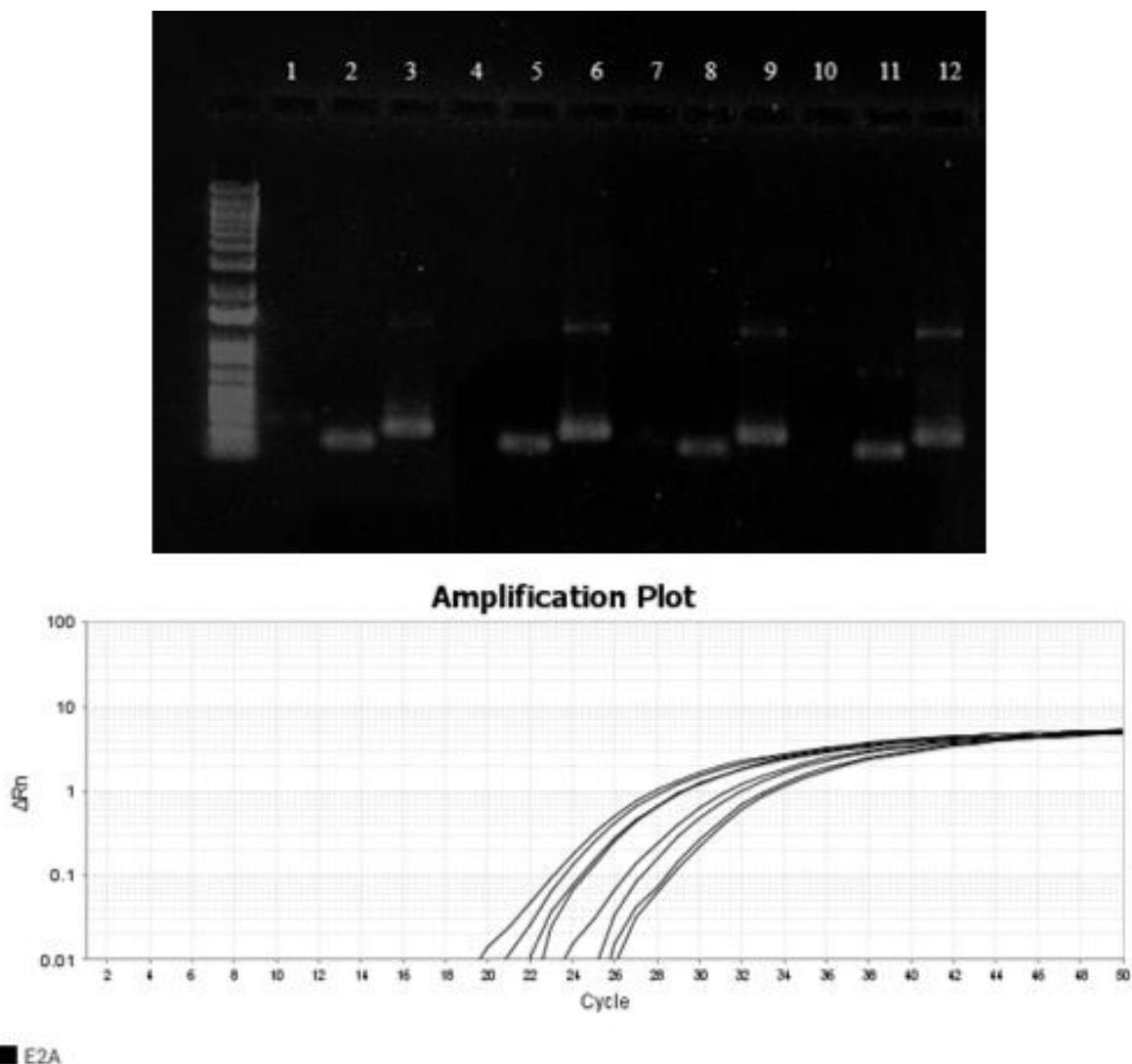
Legenda: (1 e 7): pesquisa de *BCR::ABL1* em amostra de medula óssea de pacientes portadores de LMA com *BCR::ABL1* confirmado por RT-qPCR; (2 e 8): pesquisa do gene de referência *GAPDH* em amostras de medula óssea de pacientes portadores de LMA com *BCR::ABL1* confirmado por RT-qPCR; (3 e 9): pesquisa do gene de referência *HPRT* em amostras de medula óssea de pacientes portadores de LMA com *BCR::ABL1* confirmado por RT-qPCR; (4 e 10): pesquisa de *BCR::ABL1* em amostra de sangue periférico de pacientes portadores de LMA com *BCR::ABL1* confirmado por RT-qPCR; (5 e 11): pesquisa do gene de referência *GAPDH* em amostras de sangue periférico de pacientes portadores de LMA com *BCR::ABL1* confirmado por RT-qPCR; (6 e 12): pesquisa do gene de referência *HPRT* em amostras de sangue periférico de pacientes portadores de LMA com *BCR::ABL1* confirmado por RT-qPCR. **Fonte:** Dados da pesquisa.

Observou-se que 7,5% dos pacientes com LLA possuíam a alteração *TCF3::PBX1*, detectada através de RT-qPCR. A presença dessa mutação aparentou estar associada a pacientes do sexo masculino, com média de idade de 32,6 anos, não residentes da capital. Foi possível identificar que 2 pacientes possuíam cariótipo complexo e 1 paciente apresentava cariótipo normal. Dos 3 pacientes diagnosticados, 2 evoluíram a óbito (**Tabela 22**).

Além disso, a técnica de *Nested*-PCR também foi capaz de identificar a presença da alteração *TCF3::PBX1* em amostras de pacientes cujos exames realizados pelo hospital apontava a detecção da fusão (**Figura 16**). Nesse caso, foi possível detectar a alteração apenas nas amostras de medula óssea dos pacientes, mesmo com taxas acima de 20% de blastos

circulantes em sangue periférico, demonstrando mais uma vez falhas na sensibilidade dessa técnica.

Figura 16. *Nested-PCR* e curvas de amplificação de amostras de pacientes portadores de LLA com *TCF3::PBX1*.



Legenda: (1 e 7): pesquisa de *TCF3::PBX1* em amostra de medula óssea de pacientes portadores de LMA com *TCF3::PBX1* confirmado por RT-qPCR; (2 e 8): pesquisa do gene de referência *GAPDH* em amostras de medula óssea de pacientes portadores de LMA com *TCF3::PBX1* confirmado por RT-qPCR; (3 e 9): pesquisa do gene de referência *HPRT* em amostras de medula óssea de pacientes portadores de LMA com *BCR::ABL1* confirmado por RT-qPCR; (4 e 10): pesquisa de *TCF3::PBX1* em amostra de sangue periférico de pacientes portadores de LMA com *TCF3::PBX1* confirmado por RT-qPCR; (5 e 11): pesquisa do gene de referência *GAPDH* em amostras de sangue periférico de pacientes portadores de LMA com *TCF3::PBX1* confirmado por RT-qPCR; (6 e 12): pesquisa do gene de referência *HPRT* em amostras de sangue periférico de pacientes portadores de LMA com *TCF3::PBX1* confirmado por RT-qPCR. **Fonte:** Dados da pesquisa.

Tabela 22. Características clínico-epidemiológicas dos pacientes com alterações citogenéticas identificadas.

	Nº de pacientes	Gênero	Idade (Média)	Região	Hb	WBC	Blastos em SP	Cariótipo	Estratificação de risco	Óbitos
LMA										
<i>PML::RARA</i>	10	Homem: 8 Mulher: 2	40,5 anos	Fortaleza: 3 Outros: 7	Hb<10: 9 Hb>10: 1	WBC<10.000: 7 WBC>10.000: 3	Sim: 5 Não: 5	Complexo: 1 Translocação clássica: 5 Normal: 1 Sem resultado: 3	Favorável: 3 Intermediário: 6 Adverso: 1	5
<i>RUNX1::RUNX1T1</i>	7	Homem: 4 Mulher: 3	31 anos	Fortaleza: 2 Outros: 5	Hb<10: 6 Hb>10: 1	WBC<10.000: 7	Sim: 3 Não: 4	Complexo: 2 Translocação clássica: 3 Normal: 1 Duas alterações: 1	Favorável: 4 Intermediário: 1 Adverso: 2	1
<i>FLT3-ITD</i>	4	Homem: 2 Mulher: 2	50,2 anos	Fortaleza: 3 Outros: 1	Hb<10: 4	WBC<10.000: 2 WBC>10.000: 2	Sim: 2 Não: 2	Normal: 3 2 alterações: 1	Intermediário	0
<i>CBFB::MYH11</i>	1	Homem: 1	54 anos	Outros: 1	Hb<10: 1	WBC>10.000: 1	Sim: 1	Translocação clássica: 1	Favorável: 1	0
LLA										
<i>BCR::ABL1</i>	24	Homem: 15 Mulher: 9	41,8 anos	Fortaleza: 13 Outros: 11	Hb<10: 21 Hb>10: 3	WBC<10.000: 10 WBC>10.000: 13	Sim: 11 Não: 13	Complexo: 5 Normal: 8 Sem resultado: 9 Translocação clássica: 1 Deleção: 1	Padrão: 11 Adverso: 13	4
<i>TCF3::PBX1</i>	3	Homem: 3	32,6 anos	Fortaleza: 1 Outros: 2	Hb<10: 3	WBC<10.000: 2 WBC>10.000: 1	Sim: 3	Complexo: 2 Normal: 1	Padrão: 1 Adverso: 2	2

Legenda: Hb: Hemoglobina; WBC: Contagem de glóbulos brancos; SP: Sangue Periférico; LMA: Leucemia Mieloide Aguda; LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda. **Fonte:** Dados da pesquisa.

Ademais, foi possível observar que 71,4% dos pacientes portadores de LMA não apresentavam nenhuma das alterações citogenéticas pesquisadas nesse estudo. Esse perfil predominou em pacientes do sexo masculino, com média de idade de 54,2 anos, residentes da capital. Em relação às características clínicas, esses pacientes costumavam apresentar Hb<10g/dL, contagem de leucócitos >10.000/mm³ e blastos circulantes em sangue periférico. Dos 55 pacientes, 18 não possuíam resultados de cariótipo, 17 apresentavam cariótipos normais e 17 apresentavam cariótipo com alterações, como translocações, adições e inversões. 45,5% dos pacientes possuíam estratificação de risco intermediário e 21,8% de risco adverso. Os 32,7% restantes não possuíam estratificação devido à falta de resultados de citogenética e biologia molecular. No total, 21 pacientes evoluíram a óbito (**Tabela 23**).

Apenas 12 pacientes com LLA não apresentavam nenhuma das alterações citogenéticas pesquisadas no estudo. A maioria desses pacientes era do sexo masculino, com média de idade de 43 anos, não residentes da capital. A análise dos exames de cariótipo identificou 4 cariótipos complexos, 2 normais, 2 com a presença de translocações e deleções e 4 pacientes não apresentavam resultados. 7 pacientes dos 12 possuíam estratificação de risco adverso e 5 de risco padrão. Ao todo, 5 pacientes evoluíram a óbito (**Tabela 23**).

Tabela 23. Características clínico-epidemiológicas dos pacientes sem alterações citogenéticas identificadas.

	Nº de pacientes	Gênero	Idade (Média)	Região	Hb	WBC	Blastos em SP	Cariótipo	Estratificação de risco	Óbitos
LMA	55	Homem: 30 Mulher: 25	54,2 anos	Fortaleza: 32 Outros: 23	Hb<10: 53 Hb>10: 2	WBC<10.000: 24 WBC>10.000: 31	Sim: 35 Não: 20	Complexos: 5 Translocação: 6 Normal: 17 Adição: 1 2 alterações: 4 Inversão: 1 Sem resultado: 18	Intermediário: 25 Adverso: 12 Sem resultado: 18	21
LLA	12	Homem: 7 Mulher: 5	43 anos	Fortaleza: 3 Outros: 9	Hb<10: 11 Hb>10: 1	WBC<10.000: 6 WBC>10.000: 6	Sim: 6 Não: 6	Complexos: 4 Normal: 2 2 alterações: 1 Translocações: 1 Sem resultado: 4	Padrão: 5 Adverso: 7	5

Legenda: Hb: Hemoglobina; WBC: Contagem de glóbulos brancos; SP: Sangue Periférico; LMA: Leucemia Mieloide Aguda; LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda. **Fonte:** Dados da pesquisa.

A **Tabela 24** demonstra a comparação entre a sensibilidade das técnicas de citogenética clássica, metodologia utilizada na prática do diagnóstico hospitalar, e das técnicas de biologia molecular, *Nested-PCR* e RT-qPCR. Foi possível observar que a citogenética clássica (cariótipo) apresentou baixa sensibilidade na detecção de alterações genéticas. Provavelmente, isso ocorre devido à baixa quantidade de metáfases analisadas por estudo e, muitas vezes, à dificuldade em coletar amostras satisfatórias para a realização do teste. Além disso, a técnica de *Nested-PCR* também demonstrou baixa sensibilidade, tendo em vista que em determinados casos, como nos pacientes com *TCF3::PBX1*, a detecção só foi possível em amostras de medula óssea. Já a técnica de RT-qPCR, observou-se que, no geral, a sensibilidade é satisfatória tanto em amostras de medula óssea como em amostras de sangue periférico.

Tabela 24. Comparação entre a sensibilidade das técnicas de citogenética clássica, *Nested-PCR* e RT-qPCR.

	Número de detecções	Citogenética Clássica		<i>Nested-PCR</i> +		RT-qPCR	
		MO	SP*	MO	SP	MO	SP
LMA							
<i>PML::RARA</i>	10	6	-	0	0	3	7
<i>RUNX1::RUNX1T1</i>	7	6	-	0	0	6	7
<i>CBFB::MYH11</i>	1	1	-	0	0	0	0
<i>FLT3-ITD</i>	4	-	-	0	0	4	4
LLA							
<i>BCR::ABL1</i>	24	4	-	6	10	15	22
<i>TCF3::PBX1</i>	3	2	-	2	1	2	3
<i>KMT2A::AFF1</i>	0	0	-	0	0	0	0
<i>ETV6::RUNX1</i>	0	0	-	0	0	0	0
<i>SIL::TAL1</i>	0	0	-	0	0	0	0

Legenda: LMA: Leucemia Mieloide Aguda; LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda; MO: Medula óssea; SP: Sangue periférico. * A técnica de citogenética clássica é realizada apenas com amostras de medula óssea. † A técnica *Nested-PCR* foi realizada apenas nas amostras de pacientes em que alguma das alterações genéticas já havia sido detectada.

Em relação à metodologia da *Nested-PCR*, das 5 alterações genéticas referentes a pacientes portadores de LLA pesquisadas, apenas 2 foram detectadas, sendo elas *BCR::ABL1* e *TCF3::PBX1*. Não foi possível detectar nenhuma das 4 alterações genéticas pesquisadas referentes a pacientes com LMA através dessa técnica.

Após todas as análises foi possível estabelecer que a metodologia de RT-qPCR apresentava alta sensibilidade para detecção de alterações moleculares tanto em amostras de medula óssea como de sangue periférico de pacientes portadores de leucemias agudas. O contrário foi observado nas análises de *Nested-PCR*, onde a detecção das alterações ocorria em sua grande parte em amostras de medula óssea, mesmo que os pacientes apresentassem alta leucometria e uma quantidade $\geq 20\%$ de blastos circulantes.

Além disso, foi estabelecido um panorama ideal para a detecção das alterações citogenéticas através de técnicas de biologia molecular (**Tabela 25**). Identificou-se que amostras de sangue periférico com leucometria abaixo de 4.000/mm³, independentemente da quantidade de blastos circulantes, dificultavam a detecção das alterações genéticas pela técnica de RT-qPCR.

Tabela 25. Panorama clínico para detecção de alterações genéticas.

	Média de WBC	Blastos em SP (Média %)
LMA		
<i>PML::RARA</i>	13.080	5 (78,6%)
<i>RUNX1::RUNX1T1</i>	3.900	3 (18,3%)
<i>CBFB::MYH11</i>	35.400	1 (65%)
<i>FLT3-ITD</i>	29.900	2 (48%)
LLA		
<i>BCR::ABL1</i>	48.713	11 (67,5%)
<i>TCF3::PBX1</i>	21.900	3 (43,3%)
<i>KMT2A::AFF1</i>	-	-

<i>ETV6::RUNX1</i>	-	-
<i>SIL::TAL1</i>	-	-

Legenda: WBC: Contagem de glóbulos brancos; SP: Sangue periférico.

6 DISCUSSÃO

Apenas para o ano de 2020 foram previstos 470 novos casos de leucemias no Estado do Ceará, dos quais 140 eram correspondentes à capital Fortaleza. Segundo os dados observados, em 2020 Fortaleza era a quarta capital do país com o maior número de novos casos de leucemias por ano, empatada com Porto Alegre e Salvador. Atualmente, em 2023, Fortaleza é a terceira capital do país com maior número de novos casos por ano. E de fato, esse aumento do número de novos casos é alarmante e perceptível nos hospitais de referência (INCA, 2019; INCA, 2023)

Os achados do presente estudo corroboraram com dados de outros estudos que reportam uma maior taxa de incidência de LMA em pacientes do sexo masculino e com idades ≥ 60 anos (APPELBAUM *et al.*, 2006; DESCHLER; LÜBBERT, 2006; FORMAN *et al.*, 2003; GURNEY JG, SEVERSON RK, SCOTT D, 1995). Entretanto, em relação a incidência de LLA, os resultados observados nesse estudo diferem dos achados comuns. A prevalência de casos da doença costuma ser maior em pacientes do sexo masculino com idades ≥ 50 anos, porém na população estudada, a frequência de casos de LLA foi maior em pacientes do sexo masculino com idades entre 20-39 anos (GROVES; LINET; DEVESA, 1995; JABBOUR, E. J.; FADERL; KANTARJIAN, 2005; KATZ *et al.*, 2015; MEYERS; ALBITAR; ESTEY, 2005; MOORMAN *et al.*, 2010; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

Como mencionado anteriormente, apesar da etiologia da leucemia ainda não ser completamente elucidada, sabe-se que a exposição a fatores de risco como tabagismo, etilismo, agrotóxicos e agentes químicos pode estar associada ao desenvolvimento da doença. Devido a falhas no preenchimento do formulário no momento da coleta, não foi possível estabelecer nenhum tipo de relação entre as leucemias e a ocupação laboral dos pacientes participantes, contrariando o que normalmente é visto na literatura (BETHWAITE *et al.*, 2001; ILHAN; KARAKUS; ANDIC, 2006; MCNALLY; PARKER, 2006; MIRMOHAMMADI *et al.*, 2010; MORAES *et al.*, 2017; TEBBI, 2021).

Os pacientes participantes desse estudo apresentaram características clínicas, como valores de hemoglobina, contagem de leucócitos, percentagem de blastos circulantes em sangue periférico e contagem de plaquetas semelhantes ao que normalmente é relatado na literatura. Sabe-se que pacientes portadores de leucemias agudas costumam apresentar valores baixos de hemoglobina, contagem aumentada de leucócitos e quadros de plaquetopenia. Além disso, observou-se também que a incidência de casos de hiperleucocitose (leucócitos $\geq 100.000/\text{mm}^3$) nos participantes da pesquisa condizia com o resto da literatura, que prevê

frequências de 5-15% em LMA e 10-30% em LLA (APPELBAUM *et al.*, 2006; BLACKBURN; BENDER; BROWN, 2019; GANZEL *et al.*, 2012; ROSE-INMAN; KUEHL, 2017).

Além disso, anormalidades cromossômicas são constantemente encontradas na maioria dos pacientes com leucemias agudas no momento do diagnóstico. Em geral, a incidência de cariótipos anormais é maior em crianças e menor em adultos. As principais anormalidades cromossômicas identificadas nas leucemias agudas são aberrações estruturais e numéricas, como translocações recíprocas, inversões, inserções, deleções, translocações desbalanceadas, isocromossomos, cromossomos isodicêntricos, trissomias isoladas e monossomias (BAGER *et al.*, 2018; BECKER *et al.*, 2020; HAFERLACH *et al.*, 2005; HARRISON *et al.*, 2010; MRÓZEK; HEEREMA; BLOOMFIELD, 2004; PELLOSO *et al.*, 2003; VON NEUHOFF *et al.*, 2010).

Um estudo realizado por Leung e colaboradores em 2019, foi capaz de avaliar os tipos de alterações cariotípicas mais frequente em uma grande coorte de pacientes. Esses pesquisadores observaram que em torno de 48% dos pacientes com leucemias agudas apresentavam cariótipos normais, 13% possuíam translocações cromossômica e 10% eram portadores de um cariótipo complexo. Nesse estudo observou-se um maior número de cariótipos complexos, especialmente em pacientes com LLA, onde 73,3% dos cariótipos alterados eram cariótipos complexos. Levando em consideração os 80 pacientes com resultados de cariótipo, foram identificados que 28,2% representavam cariótipos normais, 13,6% apresentavam translocações cromossômicas e 16,2% eram considerados cariótipos complexos (LEUNG *et al.*, 2019).

Em relação à normalização da expressão gênica em um grupo de amostras, sabe-se que é um método necessário para validar a estabilidade da expressão de um gene de referência em condições experimentais antes de sua utilização em estudos. Na literatura, é possível observar que a maioria dos trabalhos utiliza os programas de padronização GeNorm e NormFinder para buscar os genes de referência mais adequados para seus estudos. No entanto, embora essas ferramentas sejam capazes de analisar genes endógenos em diferentes grupos para tentar identificar comportamentos específicos para cada um deles, não o fazem de forma completamente satisfatória (AYAKANNU; TAYLOR; KONJE, 2020).

Atualmente, os genes de referência mais utilizados para estudos de expressão geral são a *B-actina* (*ACTB*), a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e a hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1 (*HPRT1*) (GHANI; SATO; ROGAEVA, 2013;

HUGGETT *et al.*, 2005; JELINEK *et al.*, 2003; JOSHI *et al.*, 2007; KIENLE *et al.*, 2010; NUCKEL *et al.*, 2009).

A análise deste estudo determinou que o gene *GAPDH* apresentou o comportamento mais instável entre os endógenos analisados. Os achados da pesquisa corroboram com vários outros estudos que examinaram a estabilidade do gene de referência comumente conhecido *GAPDH* e demonstraram que ele deve ser usado com cautela, pois sua expressão variou consideravelmente e, conseqüentemente, foi inadequado como gene de referência em alguns casos (BEDNARZ-MISA *et al.*, 2020; DEINDL *et al.*, 2002; GLARE *et al.*, 2002; TONG, Z. *et al.*, 2009; VALCECKIENE *et al.*, 2010). Entretanto, alguns estudos têm mostrado resultados diferentes quanto à estabilidade da expressão do *GAPDH*, uma vez que este foi identificado como um dos melhores genes de referência na análise de uma grande variedade de tipos de tecidos (BARBER *et al.*, 2005; TAN *et al.*, 2012; ULLMANNOVÁ; HAŠKOVEC, 2003).

O gene *HPRT* também é amplamente utilizado como controle endógeno em muitos estudos de expressão gênica em diferentes tipos de câncer. Entretanto, nosso estudo também identificou que o gene *HPRT* apresenta baixa estabilidade em amostras de pacientes com leucemias agudas e não é indicado como endógeno adequado. Alguns outros estudos também relataram que esse gene exibe alta variabilidade de expressão e o classificaram como um gene de referência inadequado, corroborando os dados encontrados neste trabalho (RADONIĆ *et al.*, 2004; TOWNSEND *et al.*, 2019).

Utilizando o método descrito anteriormente, os endógenos *GAPDH* e *HPRT* foram retirados da análise devido ao baixo desempenho. Ambos os genes apresentaram alto desvio padrão e alta variabilidade entre os grupos analisados, caracterizando um mau comportamento para os genes de referência. Portanto, o estudo propõe o conjunto de endógenos *ACTB*, *ABL*, *TBP* e *RPLPO* como os mais apropriados para a análise de ensaios de expressão de amostras de leucemia aguda.

Quanto à incidência de alterações citogenéticas observadas nos pacientes participantes foi possível constatar que os achados do presente estudo foram parcialmente compatíveis com os dados expostos na literatura.

A fusão *PML::RARA* foi detectada em 13% dos pacientes com LMA participantes da pesquisa, corroborando com os achados da literatura que estabeleceram que essa alteração é encontrada em aproximadamente 5-20% de todos os casos da doença (GASPAROVIC *et al.*, 2020; GRIGNANI *et al.*, 1993; IACCARINO *et al.*, 2019).

Entretanto, as outras anormalidades citogenéticas observadas em LMA foram detectadas em menores frequências em comparação a outros estudos. Nesse trabalho, 9% dos pacientes possuíam a translocação *RUNX1::RUNX1T1*, 1,2% apresentava a fusão *CBFB::MYH11* e 5,2% possuíam a mutação *FLT3-ITD*. Porém as frequências normalmente descritas na literatura são de cerca de 15%, 5-7% e 20-25%, respectivamente (DAVER *et al.*, 2019; GRINEV *et al.*, 2021; KINDLER; LIPKA; FISCHER, 2010; MESHINCHI *et al.*, 2006; PESSOA *et al.*, 2023; QUESADA *et al.*, 2021; SCHWIND *et al.*, 2013; SWART; HEIDENREICH, 2021; TSE *et al.*, 2001).

O contrário foi observado nos pacientes com LLA. Este estudo apresentou incidências de 60% da translocação *BCR::ABL1* e de 7,5% da fusão *TCF3::PBX1*. Essas frequências são maiores do que é normalmente reportado na literatura, onde *BCR::ABL1* e *TCF3::PBX1* representam 50% e 5% dos casos de LLA adulta, respectivamente (DIAKOS *et al.*, 2014; FADERL *et al.*, 2000; FELICE *et al.*, 2011; GESTRICH *et al.*, 2023; KAGER *et al.*, 2007; MAINO *et al.*, 2014; RECKEL *et al.*, 2017).

Ademais, esse estudo foi capaz de comparar a eficiência das técnicas de *Nested-PCR* e RT-qPCR no diagnóstico de alterações citogenéticas em pacientes com leucemias agudas, demonstrando que o método de PCR em tempo real apresenta uma sensibilidade consideravelmente maior do que a *Nested-PCR*.

Na literatura, observam-se resultados controversos em relação à técnica de *Nested-PCR*. Alguns trabalhos, como os de Lin *et al.* (2019), Strom *et al.* (1998), Grote *et al.* (2002) e Lan *et al.* (1994) determinaram essa metodologia como um método confiável e com alta sensibilidade para o diagnóstico de diversas doenças (GROTE *et al.*, 2002; LAN *et al.*, 1994; LIN *et al.*, 2019; STROM; RECHITSKY, 1998). Entretanto, estudos de Alvarez-Martínez *et al.* (2006), Hafez *et al.* (2005) e Kortela *et al.* (2021) corroboram com os dados da presente pesquisa que indica a utilização de métodos mais eficientes como a RT-qPCR (ALVAREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2006; HAFEZ *et al.*, 2005; KORTELA *et al.*, 2021). No geral, a utilização da técnica *Nested-PCR* tem sido indicada em casos em que o diagnóstico por PCR convencional simples não é o suficiente (GREGORY *et al.*, 2011; ŠELIGOVÁ *et al.*, 2020; YU, G. *et al.*, 2015).

Apesar da técnica de PCR em tempo real apresentar algumas desvantagens como: alto custo do equipamento, alta habilidade técnica, aumento do risco de resultados falso-negativos devido ao erro humano, ainda é considerada uma das melhores técnicas para diagnóstico rápido e eficaz de diversas doenças (ALVAREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2006; LEMMON; GARDNER, 2008). É inegável que a RT-qPCR revolucionou o diagnóstico

molecular de diversas doenças e que, após a pandemia de COVID-19, encontra-se difundida em boa parte dos laboratórios especializados em diagnóstico em todo o mundo. Essa é uma técnica eficaz, rápida e com uma sensibilidade maior quando comparada a outros métodos de PCR e outras técnicas moleculares (KLEIN, 2002; KRALIK; RICCHI, 2017; TROVATO *et al.*, 2022; VALASEK; REPA, 2005).

O presente estudo demonstrou que a técnica de RT-qPCR apresentou uma sensibilidade maior em comparação à técnica de *Nested*-PCR no momento do diagnóstico das amostras de leucemias agudas estudadas. Isso também foi visto nos trabalhos de Alvarez-Martínez *et al.* (2006), da Costa Lima *et al.* (2013) e Hafez *et al.* (2005) que demonstraram que a metodologia de RT-qPCR é mais sensível e rápida na detecção de diversas doenças quando comparada à *Nested*-PCR. A RT-qPCR se mostrou muito eficiente para o diagnóstico rápido e sensível de alterações genéticas em ambos os tipos de amostras analisadas no estudo. Apesar da *Nested*-PCR ainda ser considerada como metodologia padrão ouro para o diagnóstico de alterações genéticas nas leucemias agudas, é uma metodologia que demanda muita padronização e muito tempo, tornando-se desvantajosa quando comparada com a RT-qPCR (ALVAREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2006; DA COSTA LIMA *et al.*, 2013; HAFEZ *et al.*, 2005).

Como foi relatado na **Tabela 24**, o diagnóstico de alterações citogenéticas através da citogenética clássica, ou seja, através do exame de cariótipo, é insuficiente em muitos casos. Nordkamp *et al.* (2009) realizaram um estudo que demonstrava que, apesar de garantir resultados confiáveis, o exame de cariótipo apresentava baixa sensibilidade na detecção de alterações citogenéticas. Provavelmente, isso ocorre devido à análise de poucas metáfases e à baixa qualidade da amostra coletada. O exame de cariótipo exige a coleta de medula óssea. Porém, em muitos casos, a coleta desse material é insatisfatória ou impossibilitada devido à tamanha infiltração de leucócitos. Além disso, outra problemática desse exame é a demora na entrega de resultados, que muitas vezes impossibilita que os pacientes recebam a intervenção terapêutica mais adequada de forma rápida. Entretanto, a utilização do exame de cariótipo ainda é muito útil em diversos outros casos. Diante disso a OMS sugere a utilização de técnicas de biologia molecular como testes complementares, tendo em vista que são técnicas rápidas e eficientes (ALAGGIO *et al.*, 2022; NORDKAMP *et al.*, 2009).

A proposta desse trabalho de incluir a técnica RT-qPCR na lista de exames para o diagnóstico e monitoramento das leucemias agudas visa justamente permitir a detecção rápida e confiável das alterações genéticas que podem influenciar no prognóstico desses pacientes, garantindo que eles obtenham tratamentos alvo-dirigidos e conseqüentemente, menores taxas

de mortalidade por toxicidade terapêutica e melhor qualidade de vida (BÉNÉ *et al.*, 2015; TONG, Y. Q. *et al.*, 2018).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, a caracterização do perfil-clínico epidemiológico e a estratificação dos pacientes participantes foram realizadas e permitiram traçar um perfil dos pacientes portadores de leucemias agudas no Estado do Ceará. Os participantes são caracterizados como pacientes, em sua maioria, do sexo masculino, com média de idade de 47,3 anos e com apresentação da tríade leucêmica clássica ao diagnóstico, ou seja, presença de anemia, leucocitose e plaquetopenia.

Diante dos achados da avaliação dos endógenos, o estudo sugere que o principal conjunto endógeno para uso como controle/referência para a análise da expressão gênica em amostras de sangue periférico e medula óssea de pacientes com leucemias agudas, é composto pelos genes *ACTB*, *ABL*, *TBP* e *RPLPO*. Através dessa análise foi possível perceber que é extremamente necessária a validação de genes de referência para qualquer estudo de expressão gênica, considerando que o endógeno utilizado influencia na confiabilidade e acurácia desses estudos.

Além disso, foi possível identificar na população analisada a presença de boa parte das alterações genéticas comumente descritas na literatura, como: *BCR::ABL1*, *TCF3::PBX1*, *FLT3-ITD*, *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11* e *PML::RARA*. Entretanto, mostrou-se necessária a pesquisa de outras anormalidades citogenéticas que possam estar afetando os pacientes da região que não apresentaram nenhuma das alterações clássicas pesquisadas. Diante disso, serão selecionados participantes portadores de cariótipo normal para a realização de testes de sequenciamento do genoma, visando identificar mutações possivelmente associadas às leucemias agudas.

Ademais, o estudo demonstrou que a técnica de RT-qPCR apresentou uma sensibilidade maior em comparação à técnica de *Nested-PCR* no momento do diagnóstico das amostras de leucemias agudas estudadas. A técnica de RT-qPCR se mostrou muito eficiente para o diagnóstico rápido e sensível de alterações genéticas em ambos os tipos de amostras analisadas no estudo.

8 CONCLUSÃO

A partir dessa pesquisa, conclui-se que o perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de leucemias agudas no estado do Ceará consiste em casos predominantes no sexo masculino, com uma média de idade de 47,3 anos e com apresentação da tríade leucêmica clássica ao diagnóstico. Os casos de LMA e LLA eram mais incidentes em pacientes entre as faixas etárias de 60-79 anos e 20-39 anos, respectivamente. Não foi possível inferir que tipo de ocupação laboral era mais frequente entre os pacientes participantes, devido à falta de preenchimento dos formulários. Além disso, foi possível detectar as 4 alterações genéticas referentes à LMA (*PML::RARA*, *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11* e *FLT3-ITD*) na população pesquisada. Já nos casos de LLA, das 5 alterações que foram pesquisadas, apenas 2 foram detectadas (*BCR::ABL1* e *TCF3::PBX1*). Este trabalho demonstrou a importância do desenvolvimento de técnicas de biologia molecular mais sensíveis que possam integrar o painel de exames para diagnóstico e monitoramento de leucemias agudas. Foi possível realizar a validação do painel de biomarcadores por detecção de RT-qPCR nos pacientes portadores de leucemias agudas do estado do Ceará. Essa técnica permite o diagnóstico e monitoramento do estado da doença nos pacientes de forma rápida e confiável, podendo ser realizada através de amostras de sangue periférico, evitando coletas de medula óssea, que são mais invasivas e trabalhosas.

9 REFERÊNCIAS

- AGUILERA, Ó. *et al.* Nuclear DICKKOPF-1 as a biomarker of chemoresistance and poor clinical outcome in colorectal cancer. *Oncotarget*, v. 6, n. 8, p. 5903–5917, 2015.
- ALAGGIO, R. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*, v. 36, n. 7, p. 1720–1748, 2022.
- ALEXANDER, T. B. *et al.* *The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia*. [S.l.]: Springer US, 2018. v. 562. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0436-0>>.
- ALIBHAI, S. M. H. *et al.* Quality of life and physical function in adults treated with intensive chemotherapy for acute myeloid leukemia improve over time independent of age. *Journal of Geriatric Oncology*, v. 6, n. 4, p. 262–271, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgo.2015.04.002>>.
- ALTER, B. P. Fanconi's anemia and malignancies. *American Journal of Hematology*, v. 53, n. 2, p. 99–110, 1996.
- ALVAREZ-MARTÍNEZ, M. J. *et al.* Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR for the detection of *Pneumocystis jiroveci* in clinical specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 56, n. 2, p. 153–160, 2006.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 2004.
- APPELBAUM, F. R. *et al.* Age and acute myeloid leukemia. *Blood*, v. 107, n. 9, p. 3481–3485, 2006.
- ARBER, D. A. *et al.* Special Report International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias : integrating morphologic , clinical , and genomic data. v. 140, n. 11, p. 1200–1228, 2022.
- AVET-LOISEAU, H. Fish analysis at diagnosis in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, v. 33, n. 5–6, p. 441–449, 1999.
- AYAKANNU, T.; TAYLOR, A. H.; KONJE, J. C. Selection of Endogenous Control Reference Genes for Studies on Type 1 or Type 2 Endometrial Cancer. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 2–11, 2020.
- BACHER, U. *et al.* Molecular diagnostics in acute leukemias. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 47, n. 11, p. 1333–1341, 2009.
- BAGER, N. *et al.* Complex and monosomal karyotype are distinct cytogenetic entities with an adverse prognostic impact in paediatric acute myeloid leukaemia. A NOPHO-DBH-AML study. *British Journal of Haematology*, v. 183, n. 4, p. 618–628, 2018.
- BARBER, R. D. *et al.* GAPDH as a housekeeping gene: Analysis of GAPDH mRNA

- expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological Genomics*, v. 21, p. 389–395, 2005.
- BARDELLI, V. *et al.* T-cell acute lymphoblastic leukemia: Biomarkers and their clinical usefulness. *Genes*, v. 12, n. 8, p. 1–20, 2021.
- BARRETO, I. V. *et al.* Leukemic Stem Cell: A Mini-Review on Clinical Perspectives. *Frontiers in Oncology*, v. 12, n. June, p. 1–11, 2022.
- BASHARAT, M. *et al.* Immunophenotypic characterisation of morphologically diagnosed cases of acute myeloid Leukaemia (AML). *Pakistan Journal of Medical Sciences*, v. 35, n. 2, p. 470–476, 2019.
- BASSAN, R. *et al.* JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY New Approaches to the Management of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*, v. 36, n. 35, p. 3504–3519, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1200/JCO.2017.>>.
- BATES, S. E. Classical Cytogenetics: Karyotyping Techniques. *Methods in Molecular Biology*, v. 767, p. 177–190, 2011.
- BECKER, H. *et al.* Monosomal karyotype and chromosome 17p loss or TP53 mutations in decitabine-treated patients with acute myeloid leukemia. *Annals of Hematology*, v. 99, n. 7, p. 1551–1560, 2020.
- BEDNARZ-MISA, I. *et al.* Whole blood ACTB, B2M and GAPDH expression reflects activity of inflammatory bowel disease, advancement of colorectal cancer, and correlates with circulating inflammatory and angiogenic factors: Relevance for real-time quantitative PCR. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, v. 29, n. 5, p. 547–556, 2020.
- BÉNÉ, M. C. *et al.* Leukemia diagnosis: Today and tomorrow. *European Journal of Haematology*, v. 95, n. 4, p. 365–373, 2015.
- BENNETT, J. M. *et al.* Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology*, v. 33, n. 4, p. 451–458, 1976.
- BETHWAITE, P. *et al.* Acute leukemia in electrical workers: A New Zealand case-control study. *Cancer Causes and Control*, v. 12, n. 8, p. 683–689, 2001.
- BEZERRA, J. M. M. *et al.* Diagnóstico molecular das leucemias Molecular diagnosis of leukemias. p. 20–34, 2021.
- BHOJWANI, D. *et al.* ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: Improved outcome with contemporary therapy. *Leukemia*, v. 26, n. 2, p. 265–270, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/leu.2011.227>>.
- BICKMORE, W. A. Karyotype Analysis and Chromosome Banding. *eLS*, 2001.
- BIONDI, A.; RAMBALDI, A. Molecular diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, v. 20, n. 10, p. 801–807, 1996.
- BLACKBURN, L. M.; BENDER, S.; BROWN, S. Acute Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Seminars in Oncology Nursing*, v. 35, n. 6, 2019.

- BORNE, H. J. V. D. R. R. V. D. G. J. P. H. C. R. M. B. V. 'T V. C. J. M. M. A. E. G. K. V. D. B. K. VON DEM. Chronic Lymphocytic Leukemia: Immunologic Markers and Functional Properties of the Leukemic Cells. *Cancer*, v. 50, p. 2826–2833, 1982.
- BURKE, V. P.; STARTZELL, J. M. The Leukemias. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, v. 20, n. 4, p. 597–608, 2008.
- BURMEISTER, T. *et al.* Clinical features and prognostic implications of TCF3-PBX1 and ETV6-RUNX1 in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, v. 95, n. 2, p. 241–246, 2010.
- BURNETT, A. K. *et al.* Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid treatment for acute promyelocytic leukaemia in all risk groups (AML17): Results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, v. 16, n. 13, p. 1295–1305, 2015. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00193-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00193-X)>.
- BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 29, n. 1, p. 23–39, 2002.
- BUSTIN, S. A. *et al.* Quantitative real-time RT-PCR - A perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 34, n. 3, p. 597–601, 2005.
- BUSTIN, STEPHEN A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CAMPOS-GALINDO, I. Cytogenetics techniques. *Human Reproductive Genetics: Emerging Technologies and Clinical Applications*, p. 33–48, 2020.
- CASTOLDI, G. *et al.* Acute promyelocytic leukemia: morphological aspects. *Leukemia*, v. 8, 1994.
- CAVALCANTI JÚNIOR, G. B. *et al.* Detecção da proteína p53 em células leucêmicas por citometria de fluxo e Western blot. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 50, n. 3, p. 191–202, 2004.
- CAVÉ, H. *et al.* Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: Results of EORTC studies 58881 and 58951. *Blood*, v. 103, n. 2, p. 442–450, 2004.
- CELLA, D. *et al.* Measuring health-related quality of life in leukemia: The functional assessment of cancer therapy - Leukemia (FACT-Leu) questionnaire. *Value in Health*, v. 15, n. 8, p. 1051–1058, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jval.2012.08.2210>>.
- CHIARETTI, S.; ZINI, G.; BASSAN, R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, v. 6, n. 1, 2014.
- CHOPRA, M.; BOHLANDER, S. K. The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes and Cancer*, v. 58, n. 12, p. 850–858, 2019.
- CLARK, S. S. *et al.* Expression of a distinctive BCR-ABL oncogene in Ph1-positive Acute Lymphocytic Leukemia (ALL). *Science*, v. 239, n. 4841, p. 775–777, 1988.

- COCCARO, N. *et al.* Next-generation sequencing in acute lymphoblastic Leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 12, 2019.
- CONNELLY, S. E.; STEVENS, A. M. Advances in pediatric acute promyelocytic leukemia. *Children*, v. 7, n. 2, 2020.
- CROTTY, P. L. *et al.* Quantitative analysis in molecular diagnostics. *Human Pathology*, v. 25, n. 6, p. 572–579, 1994.
- D'ANGIÒ, M. *et al.* Clinical features and outcome of SIL/TAL1-positive t-cell acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: A 10-year experience of the AIEOP group. *Haematologica*, v. 100, n. 1, p. e10–e13, 2015.
- DA COSTA LIMA, M. S. *et al.* Sensitivity of PCR and real-time PCR for the diagnosis of human visceral leishmaniasis using peripheral blood. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 3, n. 1, p. 10–15, 2013.
- DA SILVA, G. C. *et al.* Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 42, n. 2, p. 77–84, 2006.
- DAVER, N. *et al.* Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*, v. 33, n. 2, p. 299–312, 2019.
- DEANGELO, D. J.; JABBOUR, E.; ADVANI, A. Recent Advances in Managing Acute Lymphoblastic Leukemia. 2023.
- DEBATIN, K. M.; KRAMMER, P. H. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*, v. 23, n. 16 REV. ISS. 2, p. 2950–2966, 2004.
- DEINDL, E. *et al.* Differential expression of GAPDH and β -actin in growing collateral arteries. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 236, n. 1–2, p. 139–146, 2002.
- DELABESSE, E. *et al.* Simultaneous SIL-TAL1 RT-PCR detection of all tal(d) deletions and identification of novel tal(d) variants. *British Journal of Haematology*, v. 99, n. 4, p. 901–907, 1997.
- DESCHLER, B.; LÜBBERT, M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*, v. 107, n. 9, p. 2099–2107, 2006.
- DIAKOS, C. *et al.* Direct and indirect targets of the E2A-PBX1 leukemia-specific fusion protein. *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, 2014.
- DÖHNER, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*, v. 140, n. 12, p. 1345–1377, 2017.
- DÖHNER, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*, v. 140, n. 12, p. 1345–1377, 2022.
- DONG, Y. *et al.* Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. *Experimental Hematology and Oncology*, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2020. Disponível

em: <<https://doi.org/10.1186/s40164-020-00170-6>>.

DONGEN, J. VAN *et al.* Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia : need for sensitive , fast , and standardized technologies. v. 125, n. 26, p. 3996–4009, 2015.

DU, Y.; CHEN, B. Detection approaches for multidrug resistance genes of leukemia. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 11, p. 1255–1261, 2017.

DUFFIELD, A. S.; MULLIGHAN, C. G.; BOROWITZ, M. J. International Consensus Classification of acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Virchows Archiv*, v. 482, n. 1, p. 11–26, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00428-022-03448-8>>.

ERIKSON, J. *et al.* Heterogeneity of chromosome 22 breakpoint in Philadelphia-positive (Ph+) acute lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 83, n. 6, p. 1807–1811, 1986.

ESTEVE, J. *et al.* Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult patients with t(4;11)(q21;q23) KMT2A/AFF1 B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in first complete remission: impact of pretransplant measurable residual disease (MRD) status. An analysis. *Leukemia*, v. 35, n. 8, p. 2232–2242, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41375-021-01135-2>>.

FADERL, S. *et al.* Adult acute lymphoblastic leukemia: Concepts and strategies. *Cancer*, v. 116, n. 5, p. 1165–1176, 2010.

FADERL, S. *et al.* Outcome of philadelphia chromosome-positive adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, v. 36, n. 3–4, p. 263–273, 2000.

FADERL, S.; JEHA, S.; KANTARJIAN, H. M. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, v. 98, n. 7, p. 1337–1354, 2003.

FALZONE, L. *et al.* Current and innovative methods for the diagnosis of COVID-19 infection (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, v. 47, n. 6, p. 1–23, 2021.

FARIAS, MARIELA GRANERO; DE CASTRO, S. M. DIAGNOSTICO LABORATORIAL DAS LEUCEMIAS LINFOIDES AGUDAS. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 40, n. 2, p. 91–98, 2004.

FELICE, M. S. *et al.* Prognostic impact of t(1;19)/ TCF3-PBX1 in childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of Berlin-Frankfurt-Münster-based protocols. *Leukemia and Lymphoma*, v. 52, n. 7, p. 1215–1221, 2011.

FERLAY, J. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, v. 149, n. 4, p. 778–789, 2021.

FOÀ; CHIARETTI; GUARINI; VITALE. Adult acute lymphoblastic leukemia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 31, n. 2, p. 41–47, 2009.

FORMAN, D. *et al.* Cancer prevalence in the UK: Results from the EUROPREVAL study. *Annals of Oncology*, v. 14, n. 4, p. 648–654, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/annonc/mdg169>>.

FRAGA, D.; MEULIA, T.; FENSTER, S. *Real-Time PCR*. [S.l: s.n.], 2014. v. 2014.

FRÖHLING, S. *et al.* Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: A study of the AML study group Ulm. *Blood*, v. 100, n. 13, p. 4372–4380, 2002.

GALIVETI, C. R. *et al.* Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR. *Rna*, v. 16, n. 2, p. 450–461, 2010.

GANZEL, C. *et al.* Hyperleukocytosis, leukostasis and leukapheresis: Practice management. *Blood Reviews*, v. 26, n. 3, p. 117–122, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2012.01.003>>.

GASPAROVIC, L. *et al.* Incidence of differentiation syndrome associated with treatment regimens in acute myeloid leukemia: A systematic review of the literature. *Journal of Clinical Medicine*, v. 9, n. 10, p. 1–20, 2020.

GESTRICH, C. K. *et al.* Mucin 4 protein is expressed in B-acute lymphoblastic leukemia and is restricted to BCR::ABL1-positive and BCR::ABL-like subtypes. *Human Pathology*, v. 136, p. 75–83, 2023.

GHANI, M.; SATO, C.; ROGAEVA, E. Segmental duplications in genome-wide significant loci and housekeeping genes; warning for GAPDH and ACTB. *Neurobiology of Aging*, v. 34, n. 6, p. 1710.e1-1710.e4, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.006>>.

GIUDICE, V. *et al.* Implementation of International Prognostic Index with flow cytometry immunophenotyping for better risk stratification of chronic lymphocytic leukemia. n. May, p. 483–493, 2022.

GLARE, E. M. *et al.* β -actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax*, v. 57, n. 9, p. 765–770, 2002.

GÖKBUGET, N.; HOELZER, D. Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Seminars in Hematology*, v. 46, n. 1, p. 64–75, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.seminhematol.2008.09.003>>.

GOLOMB, H. *et al.* Microgranular Acute Promyelocytic Leukemia: A distinct clinical, ultrastructural and cytogenetic entity. *Blood*, v. 55, n. 2, p. 253–259, 1980.

GONZÁLEZ, Á. *et al.* Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR. *FEMS Microbiology Letters*, v. 254, n. 1, p. 123–128, 2006.

GÖTZ, G. *et al.* Clinical and prognostic significance of the Philadelphia chromosome in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Annals of Hematology*, v. 64, n. 2, p. 97–100, 1992.

GREGORY, L. *et al.* Detecção Do Vírus Da Artrite Encefalite Caprina No Sêmen Através Das Técnicas De Pcr E Nested-Pcr. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 78, n. 4, p. 599–603, 2011.

- GRIGNANI, F. *et al.* The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR α fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell*, v. 74, n. 3, p. 423–431, 1993.
- GRINEV, V. V. *et al.* RUNX1/RUNX1T1 mediates alternative splicing and reorganises the transcriptional landscape in leukemia. *Nature Communications*, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-20848-z>>.
- GRISOLANO, J. L. *et al.* Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences. *Blood*, v. 89, n. 2, p. 376–387, 1997.
- GROTE, D. *et al.* Specific and sensitive detection of *Phytophthora nicotianae* by simple and nested-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, v. 108, n. 3, p. 197–207, 2002.
- GROVES, F. D.; LINET, M. S.; DEVESA, S. S. Patterns of occurrence of the leukaemias. *European Journal of Cancer*, v. 31, n. 6, p. 941–949, 1995.
- GURNEY JG, SEVERSON RK, SCOTT D, R. L. Cancer in Children in the United States. *Cancer*, v. 75, p. 2186–2195, 1995.
- HAFERLACH, T. Acute myeloid leukemia. *HemaSphere*, v. 3, n. S2, p. 1, 2019.
- HAFERLACH, T. *et al.* Modern diagnostics in acute leukemias. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 56, n. 2, p. 223–234, 2005.
- HAFERLACH, T.; SCHMIDTS, I. The power and potential of integrated diagnostics in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, v. 188, n. 1, p. 36–48, 2020.
- HAFEZ, H. M. *et al.* Comparison of the specificity and sensitivity of PCR, nested PCR, and real-time PCR for the diagnosis of histomoniasis. *Avian Diseases*, v. 49, n. 3, p. 366–370, 2005.
- HANAHAN AND WEINBERG. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, v. 100, p. 57–70, 2000.
- HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>.
- HARRISON, C. J. *et al.* Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment Trials AML 10 and 12. *Journal of Clinical Oncology*, v. 28, n. 16, p. 2674–2681, 2010.
- HASLE, H. Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. *Lancet Oncology*, v. 2, n. 7, p. 429–436, 2001.
- HASSAN, K. *et al.* Acute myeloid leukemia-FAB classification and its correlation with clinico-haematological features. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, v. 43, n. 10, p. 200–203, 1993.

HE, L.-Z. *et al.* Distinct interactions of PML-RAR α and PLZF-RAR α with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nature Genetics*, v. 18, p. 126–135, 1998.

HOCHANE, M. *et al.* Low-dose pesticide mixture induces senescence in normal mesenchymal stem cells (MSC) and promotes tumorigenic phenotype in premalignant MSC. *Stem Cells*, v. 35, n. 3, p. 800–811, 2017.

HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, J. E. *Fundamentos em hematologia*. [S.l: s.n.], 2008.

HUGGETT, J. *et al.* Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, v. 6, n. 4, p. 279–284, 2005.

HUGHES, T.; BRANFORD, S. Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia. *Seminars in Hematology*, v. 40, n. 2 SUPPL. 2, p. 62–68, 2003.

IACCARINO, L. *et al.* Identification and monitoring of atypical PML/RARA fusion transcripts in acute promyelocytic leukemia. *Genes Chromosomes and Cancer*, v. 58, n. 1, p. 60–65, 2019.

ILAND, H. J. *et al.* All-trans-retinoic acid, idarubicin, and IV arsenic trioxide as initial therapy in acute promyelocytic leukemia (APML4). *Blood*, v. 120, n. 8, p. 1570–1580, 2012.

ILHAN, G.; KARAKUS, S.; ANDIC, N. Risk factors and primary prevention of acute leukemia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 7, n. 4, p. 515–517, 2006.

ILYAS, A. M. *et al.* Next Generation Sequencing of Acute Myeloid Leukemia: Influencing Prognosis. *BMC Genomics*, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2015.

INCA. *Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2020/2022: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva*. [S.l: s.n.], 2020.

INCA. *Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância*. [S.l: s.n.], 2019.

INCA. *Incidência de Câncer no Brasil*. [S.l: s.n.], 2023.

INFANTE, M. S.; PIRIS, M. Á.; HERNÁNDEZ-RIVAS, J. Á. Molecular alterations in acute myeloid leukemia and their clinical and therapeutical implications. *Medicina Clínica (English Edition)*, v. 151, n. 9, p. 362–367, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.medcle.2018.05.044>>.

JABBOUR, E. *et al.* New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, v. 121, n. 15, p. 2517–2528, 2015.

JABBOUR, E. J.; FADERL, S.; KANTARJIAN, H. M. Adult acute lymphoblastic leukemia. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 80, n. 11, p. 1517–1527, 2005.

JABBOUR, E.; PUI, C. H.; KANTARJIAN, H. Progress and Innovations in the Management of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *JAMA Oncology*, v. 4, n. 10, p. 1413–1420, 2018.

JACOB, F. *et al.* Careful Selection of Reference Genes Is Required for Reliable Performance

- of RT-qPCR in Human Normal and Cancer Cell Lines. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, 2013.
- JASO, J. M. *et al.* B acute lymphoblastic leukemia with clinically aggressive subset of disease. p. 382–389, 2014.
- JELINEK, D. F. *et al.* Identification of a global geneexpression signature of B-chronic lymphocytic leukemia. *Molecular Cancer Research*, v. 1, p. 346–361, 2003.
- JIA, Y. *Real-Time PCR*. [S.l.]: Elsevier, 2012. v. 112. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-405914-6.00003-2>>.
- JOSHI, A. D. *et al.* ATM, CTLA4, MND A, and HEM1 in high versus low CD38 expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research*, v. 13, p. 5295–5304, 2007.
- JULIUSSON, G.; HOUGH, R. Leukemia. *Progress in Tumor Research*, v. 43, p. 87–100, 2016.
- KAGER, L. *et al.* Incidence and outcome of TCF3-PBX1-positive acute lymphoblastic leukemia in Austrian children. *Haematologica*, v. 92, n. 11, p. 1561–1564, 2007.
- KAMASHEV, D.; VITOUX, D.; THÉ, H. DE. PML-RARA-RXR oligomers mediate retinoid and rexinoid/cAMP cross-talk in acute promyelocytic leukemia cell differentiation. *Journal of experimental medicine*, v. 199, n. 8, p. 1163–1174, 2004.
- KANSAGRA, A.; DAHIYA, S.; LITZOW, M. Continuing challenges and current issues in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, v. 59, n. 3, p. 526–541, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1335397>>.
- KANTARJIAN, H. *et al.* Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. *Blood Cancer Journal*, v. 11, n. 2, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41408-021-00425-3>>.
- KANTARJIAN, H. M.; KEATING, M. J.; FREIREICH, E. J. Toward the potential cure of leukemias in the next decade. *Cancer*, v. 124, n. 22, p. 4301–4313, 2018.
- KATZ, A. J. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia: an assessment of international incidence, survival, and disease burden. *Cancer Causes and Control*, v. 26, n. 11, p. 1627–1642, 2015.
- KEARNEY, L. Molecular cytogenetics. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, v. 14, n. 3, p. 645–668, 2001.
- KHALIDI; MEDEIROS; CHANG; BRYNES; SLOVACK; ARBER. The Immunophenotype of Adult Acute Myeloid Leukemia High Frequency of Lymphoid Antigen Expression and Comparison of Immunophenotype, French-American-British Classification, and Karyotypic Abnormalities. *Hematopathology*, 1997.
- KIENLE, D. *et al.* Gene expression factors as predictors of genetic risk and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, v. 95, p. 102–109, 2010.
- KINDLER, T.; LIPKA, D. B.; FISCHER, T. FLT3 as a therapeutic target in AML: Still challenging after all these years. *Blood*, v. 116, n. 24, p. 5089–5102, 2010.

KJELDSEN, E. Congenital Aneuploidy in Klinefelter Syndrome with B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Might Be Associated with Chromosomal Instability and Reduced Telomere Length. *Cancers*, v. 14, n. 9, 2022.

KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, v. 8, n. 6, p. 257–260, 2002.

KORF, B. R.; REHM, H. L. CLINICIAN ' S CORNER. v. 309, n. 14, p. 1511–1521, 2013.

KORTELA, E. *et al.* Real-life clinical sensitivity of SARS-CoV-2 RT-PCR test in symptomatic patients. *PLoS ONE*, v. 16, n. 5 May, p. 1–19, 2021.

KOTTARIDIS, P. D. *et al.* The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: Analysis of 854 patients from the United King. *Blood*, v. 98, n. 6, p. 1752–1759, 2001.

KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, v. 54, n. 4, p. 391–406, 2013.

KRALIK, P.; RICCHI, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. FEB, p. 1–9, 2017.

LAN, J. *et al.* Improved PCR sensitivity for direct genotyping of *Chlamydia trachomatis* serovars by using a nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 2, p. 528–530, 1994.

LE, P. U. *et al.* Increased β -actin expression in an invasive Moloney sarcoma virus-transformed MDCK cell variant concentrates to the tips of multiple pseudopodia. *Cancer Research*, v. 58, n. 8, p. 1631–1635, 1998.

LEE, Y. T.; TAN, Y. J.; OON, C. E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *European Journal of Pharmacology*, v. 834, p. 188–196, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.034>>.

LEMMON, G. H.; GARDNER, S. N. Predicting the sensitivity and specificity of published real-time PCR assays. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 7, 2008.

LEUNG, G. M. K. *et al.* Distinct mutation spectrum, clinical outcome and therapeutic responses of typical complex/monosomy karyotype acute myeloid leukemia carrying TP53 mutations. *American Journal of Hematology*, v. 94, n. 6, p. 650–657, 2019.

LIN, C. *et al.* Use of nested PCR for the detection of trichomonads in bronchoalveolar lavage fluid. *BMC Infectious Diseases*, v. 19, n. 1, p. 1–6, 2019.

LIQUORI, A. *et al.* Acute promyelocytic leukemia: A constellation of molecular events around a single PML-RARA fusion gene. *Cancers*, v. 12, n. 3, 2020.

LO-COCO, F. *et al.* Retinoic Acid and Arsenic Trioxide for Acute Promyelocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, v. 369, n. 2, p. 111–121, 2013.

LOPES E SOUZA, V. C. DE O. CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA FRENCH –

AMERICANBRITISH (FAB) DAS LEUCEMIAS MIELÓIDES AGUDAS M3. *Anais da Academia de Ciências e Tecnologia de São José do Rio Preto*, 2007.

LORAND-METZE, I. Síndromes mielodisplásicas, sua importância no nosso meio. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 28, n. 3, p. 165, 2006.

LOWE, C. AND E. Intrinsic tumour suppression. *Nature*, v. 432, n. NOVEMBER, p. 1–9, 2004. Disponível em: <papers://5680c084-7e9d-4370-be57-26c320af1685/Paper/p109%0Ahttp://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1042932%0Ahttp://file//localhost(null)%0Apapers3://publication/uuid/252871BA-EE6A-486E-8050-E261D2908C1B>.

LÖWENBERG, D.; BURNETT. ACUTE MYELOID LEUKEMIA. *MEDICAL PROGRESS*, p. 1051–1062, 1999.

MAINO, E. *et al.* Current and future management of Ph/BCR-ABL positive ALL. *Expert Review of Anticancer Therapy*, v. 14, n. 6, p. 723–740, 2014.

MALARD, F.; MOHTY, M. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, v. 395, n. 10230, p. 1146–1162, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33018-1>.

MAN, L. M.; MORRIS, A. L.; KENG, M. New Therapeutic Strategies in Acute Lymphocytic Leukemia. *Current Hematologic Malignancy Reports*, v. 12, n. 3, p. 197–206, 2017.

MANSUR, M. B. *et al.* SIL-TAL1 fusion gene negative impact in T-cell acute lymphoblastic leukemia outcome. *Leukemia and Lymphoma*, v. 50, n. 8, p. 1318–1325, 2009.

MARTINEZ-CLIMENT, J. A. Molecular cytogenetics of childhood hematological malignancies. *Leukemia*, v. 11, n. 12, p. 1999–2021, 1997.

MASON, J.; GRIFFITHS, M. Molecular diagnosis of leukemia. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 12, n. 5, p. 511–526, 2012.

MAURER, J. *et al.* Detection of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukaemia by the polymerase chain reaction. *The Lancet*, v. 337, n. 8749, p. 1055–1058, 1991.

MCGOWAN-JORDAN, J.; SIMONS, A.; SCHIMID, M. *International System for Human Citogenomic Nomenclature*. [S.l: s.n.], 2016.

MCNALLY, R. J. Q.; PARKER, L. Environmental factors and childhood acute leukemias and lymphomas. *Leukemia and Lymphoma*, v. 47, n. 4, p. 583–598, 2006.

MCNERNEY, M. E.; GODLEY, L. A.; LE BEAU, M. M. Therapy-related myeloid neoplasms: When genetics and environment collide. *Nature Reviews Cancer*, v. 17, n. 9, p. 513–527, 2017.

MESHINCHI, S. *et al.* Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood*, v. 108, n. 12, p. 3654–3661, 2006.

MEYER, C. *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*, v. 32, n. 2, p. 273–284, 2018.

- MEYERS, C. A.; ALBITAR, M.; ESTEY, E. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer*, v. 104, n. 4, p. 788–793, 2005.
- MIRMOHAMMADI, S. J. *et al.* Environmental Risk Factors for Acute Leukemia and Non-Hodgkin Lymphoma in Children. *Iranian Journal of Pediatric Hematology & Oncology*, v. 1, n. 1, p. 1–3, 2010. Disponível em: <<https://widgets.ebscohost.com/prod/customerspecific/ns000290/authentication/index.php?url=https%3A%2F%2Fsearch.ebscohost.com%2Flogin.aspx%3Fdirect%3Dtrue%26AuthType%3Dip%2Ccookie%2Cshib%2Cuid%26db%3Dedb%26AN%3D67429893%26lang%3Dpt-pt%26site%3Deds-live%26s>>.
- MONTAÑO, A. *et al.* New challenges in targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia by NGS approaches: An update. *Cancers*, v. 10, n. 4, p. 1–24, 2018.
- MOORMAN, A. V. *et al.* A population-based cytogenetic study of adults with acute lymphoblastic leukemia (Blood (2010), 115, 2, (206-214)). *Blood*, v. 116, n. 6, p. 1017, 2010.
- MORAES, E. S. *et al.* Análise de indivíduos com leucemia: Limitações do sistema de vigilância de câncer. *Ciencia e Saude Coletiva*, v. 22, n. 10, p. 3321–3332, 2017.
- MROZEK; HEEREMA; BLOOMFIELD, C. D. Cytogenetics in acute leukemia. p. 115–136, 2004.
- MROŻEK, K. *et al.* Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, v. 30, n. 36, p. 4515–4523, 2012.
- MRÓZEK, K.; HARPER, D. P.; APLAN, P. D. Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 23, n. 5, p. 991–1010, 2009.
- MRÓZEK, K.; HEEREMA, N. A.; BLOOMFIELD, C. D. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Reviews*, v. 18, n. 2, p. 115–136, 2004.
- MULLIGHAN, C. G. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, v. 2012, p. 389–396, 2012.
- MWIRIGI, A.; DILLON, R.; RAJ, K. Acute leukaemia. *Medicine (United Kingdom)*, v. 45, n. 5, p. 280–286, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.02.010>>.
- NARAYANAN, D.; WEINBERG, O. K. How I investigate acute myeloid leukemia. *International Journal of Laboratory Hematology*, v. 42, n. 1, p. 3–15, 2020.
- NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. *Acute Lymphoblastic Leukemia*. [S.l.: s.n.], 2021.
- NEWELL, L. F.; COOK, R. J. Advances in acute myeloid leukemia. *BMJ (Clinical research ed.)*, v. 375, p. n2026, 2021.
- NORDKAMP, L. O. *et al.* Karyotyping, FISH, and PCR in acute lymphoblastic leukemia:

Competing or complementary diagnostics? *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, v. 31, n. 12, p. 930–935, 2009.

NUCKEL, H. *et al.* FCRL2 mRNA expression is inversely associated with clinical progression in chronic lymphocytic leukemia. *European Journal of Haematology*, v. 83, p. 541–549, 2009.

O'DONNELL, M. R. *et al.* NCCN Clinical Practice Guidelines Acute myeloid leukemia. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, v. 10, n. 8, p. 984–1021, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22878824>>.

ORAN, B.; WEISDORF, D. J. Survival for older patients with acute myeloid leukemia: A population-based study. *Haematologica*, v. 97, n. 12, p. 1916–1924, 2012.

PANDOLFI, P. P. *et al.* Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *EMBO Reports*, v. 11, n. 4, p. 1397–1407, 1992.

PAUL, S.; KANTARJIAN, H.; JABBOUR, E. J. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 91, n. 11, p. 1645–1666, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.09.010>>.

PEJOVIC, T.; SCHWARTZ, P. E. Review of Leukemias. *Leukemia*, v. 45, n. 3, p. 866–878, 2002.

PELCOVITS, A.; NIROULA, R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. *Rhode Island medical journal (2013)*, v. 103, n. 3, p. 38–40, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32236160>>.

PELLOSO, L. A. F. *et al.* Cariótipo em leucemia mielóide aguda: importância e tipo de alteração em 30 pacientes ao diagnóstico. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 49, n. 2, p. 150–155, 2003.

PESSOA, F. M. C. DE P. *et al.* Association between Immunophenotypic Parameters and Molecular Alterations in Acute Myeloid Leukemia. *Biomedicines*, v. 11, n. 4, p. 1–13, 2023.

PHILLIPS, R. B.; REED, K. M. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: A review. *Aquaculture*, v. 140, n. 3, p. 197–216, 1996.

PICIOCCHI, A. *et al.* Prognostic impact of KMT2A-AFF1-positivity in 926 BCR-ABL1-negative B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients treated in GIMEMA clinical trials since 1996. *American Journal of Hematology*, v. 96, n. 9, p. E334–E338, 2021.

PIZZO, E. *et al.* Patient and public involvement : how much do we spend and what are the benefits ? p. 1918–1926, 2014.

POTENZA, L. *et al.* Early Palliative Care in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers*, v. 14, n. 3, p. 1–17, 2022.

PRETI, H. A. *et al.* Philadelphia-chromosome-positive adult acute lymphocytic leukemia: Characteristics, treatment results, and prognosis in 41 patients. *The American Journal of Medicine*, v. 97, n. 1, p. 60–65, 1994.

- PUI, C.; EVANS, W. E. TRATAMIENTO LLA nejm pui2006. *The new engl and journal of medicine review*, v. 354, n. 2, p. 166–178, 2006.
- QUESADA, A. E. *et al.* Incidental identification of inv(16)(p13.1q22)/CBFB-MYH11 variant transcript in a patient with therapy-related acute myeloid leukemia by routine leukemia translocation panel screen: Implications for diagnosis and therapy. *Cold Spring Harbor Molecular Case Studies*, v. 7, n. 3, p. 1–14, 2021.
- QUIXABEIRA, V. B. L.; SADDI, V. A. A Importância da Imunofenotipagem e da Citogenética no Diagnóstico das Leucemias : Uma Revisão da Literatura. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 40, n. 3, p. 199–202, 2008.
- RADONIĆ, A. *et al.* Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 313, n. 4, p. 856–862, 2004.
- RAWAT, J. *et al.* Classification of acute lymphoblastic leukaemia using hybrid hierarchical classifiers. *Multimedia Tools and Applications*, v. 76, n. 18, p. 19057–19085, 2017.
- RECKEL, S. *et al.* Differential signaling networks of Bcr-Abl p210 and p190 kinases in leukemia cells defined by functional proteomics. *Leukemia*, v. 31, n. 7, p. 1502–1512, jul. 2017.
- REGO, E. M.; SANTOS, G. A. S. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 31, n. 5, p. 79–87, 2009.
- REIS, SR, MS. *et al.* Childhood Leukemia Incidence in Brazil According to Different Geographical Regions. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 56, n. February, p. 58–64, 2011.
- REIS, R. D. S. *et al.* Early childhood leukemia incidence trends in Brazil. *Pediatric Hematology and Oncology*, v. 33, n. 2, p. 83–93, 2016.
- RICHARD-CARPENTIER, G. *et al.* Outcomes of acute lymphoblastic leukemia with KMT2A (MLL) rearrangement: The MD Anderson experience. *Blood Advances*, v. 5, n. 23, p. 5415–5419, 2021.
- ROMANA, S. . *et al.* The t(12;21) of Acute Lymphoblastic Leukemia Results in a tel-AML1 Gene Fusion. *Blood*, v. 85, n. 12, p. 3662–3670, 1995.
- ROSE-INMAN, H.; KUEHL, D. Acute Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 31, n. 6, p. 1011–1028, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.08.006>>.
- RUBNITZ, J. E. *et al.* TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: A new genetic marker with prognostic significance. *Journal of Clinical Oncology*, v. 15, n. 3, p. 1150–1157, 1997.
- SALA TORRA, O. *et al.* Next-Generation Sequencing in Adult B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 23, n. 4, p. 691–696, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.12.639>>.
- SALEH; FERNANDEZ; PASQUIER. Treatment of Philadelphia Chromosome-Positive

Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *Cancer*, v. 14, 2022.

SAMRA, B. *et al.* Evolving therapy of adult acute lymphoblastic leukemia: State-of-the-art treatment and future directions. *Journal of Hematology and Oncology*, v. 13, n. 1, p. 1–17, 2020.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SCHNITTGER, S. *et al.* Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: Correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*, v. 100, n. 1, p. 59–66, 2002.

SCHOCH, C.; HAFERLACH, T. Cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Current oncology reports*, v. 4, n. 5, p. 390–397, 2002.

SCHWIND, S. *et al.* Inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia with non-type A CBFβ-MYH11 fusions associate with distinct clinical and genetic features and lack KIT mutations. *Blood*, v. 121, n. 2, p. 385–391, 2013.

ŠELIGOVÁ, B. *et al.* Diagnostic reliability of nested PCR depends on the primer design and threshold abundance of *Helicobacter pylori* in biopsy, stool, and saliva samples. *Helicobacter*, 2020.

SHALLIS, R. M. *et al.* Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Reviews*, v. 36, p. 70–87, 2019.

SHIMONY, S.; STONE, R. M.; STAHL, M. Venetoclax combination therapy in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. p. 63–73, 2022.

STAUDT, L. M. Molecular Diagnosis of the Hematologic Cancers. *New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 18, p. 1777–1785, 2003.

STONE, R. M.; DONNELL, M. R. O.; SEKERES. Acute Myeloid Leukemia. *American Society of Hematology*, 2004.

STROM, C. M.; RECHITSKY, S. Use of nested PCR to identify charred human remains and minute amounts of blood. *Journal of Forensic Science*, v. 43, n. 3, p. 696–700, 1998.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SWART, L. E.; HEIDENREICH, O. The RUNX1/RUNX1T1 network: translating insights into therapeutic options. *Experimental Hematology*, v. 94, p. 1–10, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.11.005>>.

TALLMAN, M. S. *et al.* Acute myeloid leukemia, version 3.2019. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, v. 17, n. 6, p. 721–749, 2019.

TAMAI, H. *et al.* Amlexanox downregulates S100A6 to sensitize KMT2A/AFF1-positive

acute lymphoblastic leukemia to TNF α treatment. *Cancer Research*, v. 77, n. 16, p. 4426–4433, 2017.

TAN, S. C. *et al.* Identification of valid housekeeping genes for quantitative RT-PCR analysis of cardiosphere-derived cells preconditioned under hypoxia or with prolyl-4-hydroxylase inhibitors. *Molecular Biology Reports*, v. 39, n. 4, p. 4857–4867, 2012.

TAYLOR, A. M. R. *et al.* Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood*, v. 87, n. 2, p. 423–438, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1182/blood.V87.2.423.bloodjournal872423>>.

TAYLOR, K. N.; ESKANDER, R. N. PARP inhibitors in epithelial ovarian cancer. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, v. 13, p. 145–158, 2017.

TEBBI, C. K. Etiology of acute leukemia: A review. *Cancers*, v. 13, n. 9, p. 1–19, 2021.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*, v. 7, n. 6, 2017.

The R Project for Statistical Computing.

THOMAS, D.; MAJETI, R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*, v. 129, n. 12, p. 1577–1585, 2017.

THOMAS, M. *et al.* Targeting MLL-AF4 with short interfering RNAs inhibits clonogenicity and engraftment of t(4;11)-positive human leukemic cells. *Blood*, v. 106, n. 10, p. 3559–3566, 2005.

TISO, F. *et al.* Genetic diversity within leukemia-associated immunophenotype-defined subclones in AML. *Annals of Hematology*, v. 101, n. 3, p. 571–579, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00277-021-04747-x>>.

TOMASZEWSKI, E. L. *et al.* The Patient Perspective on Living with Acute Myeloid Leukemia. *Oncology and Therapy*, v. 4, n. 2, p. 225–238, 2016.

TONG, Y. Q. *et al.* New rapid method to detect BCR-ABL fusion genes with multiplex RT-qPCR in one-tube at a time. *Leukemia Research*, v. 69, n. March, p. 47–53, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.04.001>>.

TONG, Z. *et al.* Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, v. 10, p. 1–13, 2009.

TOWNSEND, M. H. *et al.* Falling from grace: HPRT is not suitable as an endogenous control for cancer-related studies. *Molecular and Cellular Oncology*, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/23723556.2019.1575691>>.

TRAN, V. T. *et al.* The diagnostic power of CD117, CD13, CD56, CD64, and MPO in rapid screening acute promyelocytic leukemia. *BMC Research Notes*, v. 13, n. 1, p. 1–6, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13104-020-05235-7>>.

TROVATO, L. *et al.* Use of real time multiplex PCR for the diagnosis of dermatophytes onychomycosis in patients with empirical antifungal treatments. *Journal of Infection and*

Public Health, v. 15, n. 5, p. 539–544, 2022. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2022.03.019>>.

TSE, K.-F. *et al.* Inhibition of FLT3-mediated transformation by use of a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia*, v. 15, p. 1001–1010, 2001.

TYAGI, S.; BRATU, D. P.; KRAMER, F. R. discrimination. p. 49–53, 1998.

ULLMANNOVÁ, V.; HAŠKOVEC, C. The use of housekeeping genes (HKG) as an internal control for the detection of gene expression by quantitative real-time RT-PCR. *Folia Biologica*, v. 49, n. 6, p. 211–216, 2003.

USTWANI, O. AL *et al.* Clinical updates in adult acute lymphoblastic leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 99, p. 189–199, 2016. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.12.007>>.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*, v. 29, n. 3, p. 151–159, 2005.

VALCECKIENE, V. *et al.* Selection of reference genes for quantitative polymerase chain reaction studies in purified B cells from B cell chronic lymphocytic leukaemia patients. *British Journal of Haematology*, v. 151, n. 3, p. 232–238, 2010.

VAN DELFT, F. W. *et al.* Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, v. 117, n. 23, p. 6247–6254, 2011.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, v. 3, n. 7, 2002.

VILÀ, M. R. *et al.* Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in renal cell carcinoma identified by RNA-based, arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Cancer*, v. 89, n. 1, p. 154–164, 2000.

VOLPI, E. V.; BRIDGER, J. M. FISH glossary: An overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *BioTechniques*, v. 45, n. 4, p. 385–409, 2008.

VON NEUHOFF, C. *et al.* Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98. *Journal of Clinical Oncology*, v. 28, n. 16, p. 2682–2689, 2010.

VORUZ, S. *et al.* Daratumumab and venetoclax in combination with chemotherapy provide sustained molecular remission in relapsed/refractory CD19, CD20, and CD22 negative acute B lymphoblastic leukemia with KMT2A-AFF1 transcript. *Biomarker Research*, v. 9, n. 1, p. 1–5, 2021.

WALTER, M. J. *et al.* Acquired copy number alterations in adult acute myeloid leukemia genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 31, p. 12950–12955, 2009.

WALTER, R. B. *et al.* Significance of FAB subclassification of “acute myeloid leukemia, NOS” in the 2008 WHO classification: Analysis of 5848 newly diagnosed patients. *Blood*, v. 121, n. 13, p. 2424–2431, 2013.

- WATT, C. D.; BAGG, A. Molecular diagnosis of acute myeloid leukemia. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 10, n. 8, p. 993–1012, 2010.
- WEINBERG, R. A. *The Biology of Cancer*. [S.l: s.n.], 2013. v. 53.
- WESTBROOK, C. A. *et al.* Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: A cancer and leukemia group B study (8762). *Blood*, v. 80, n. 12, p. 2983–2990, 1992.
- WHITLOCK, J. A. Down syndrome and acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, v. 135, n. 5, p. 595–602, 2006.
- WILHELM, J.; PINGOUD, A. Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem*, v. 4, n. 11, p. 1120–1128, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *International Agency for Research on Cancer*. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lis-46560?src=similar docs&utm_medium=email&utm_source=transaction>.
- YAMASAKI, M. *et al.* Multicenter phase I/II study of docetaxel, cisplatin and fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced or recurrent squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncology*, v. 80, n. 5–6, p. 307–313, 2011.
- YE, J. *et al.* art%3A10.1186%2F1471-2105-13-134. *BMC Bioinformatics*, v. 13, n. 134, 2012.
- YU, G. *et al.* Nested PCR biases in interpreting microbial community structure in 16S rRNA gene sequence datasets. *PLoS ONE*, v. 10, n. 7, p. 1–12, 2015.
- YU, J. *et al.* Gene mutational analysis by NGS and its clinical significance in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology and Oncology*, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40164-019-0158-5>>.
- ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. *Hematologia: fundamentos e prática*. [S.l: s.n.], 2004.
- ZEISIG, B. B. *et al.* Reconstruction of Human AML Using Functionally and Immunophenotypically Defined Human Haematopoietic Stem and Progenitor Cells as Targeted Populations. *Bio-protocol*, v. 11, n. 24, p. 1–17, 2021.
- ZHOU, M. H. *et al.* Detection of ETV6 gene rearrangements in adult acute lymphoblastic leukemia. *Annals of Hematology*, v. 91, n. 8, p. 1235–1243, 2012.
- ZUNA, J. *et al.* Significantly lower relapse rate for TEL/AML1-positive ALL [1]. *Leukemia*, v. 13, n. 10, p. 1633, 1999.

ANEXO 1: COMPROVANTE DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: RASTREAMENTO GENÉTICO PARA A DETECÇÃO PRECOCE DE BIOMARCADORES EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIAS AGUDAS NO

Pesquisador: MANOEL ODORICO DE MORAES FILHO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 38680520.9.0000.5054

Instituição Proponente: NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.339.719

ANEXO 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Nome: _____ Idade _____ Data de
 Nascimento ____/____/____ Sexo () M () F
 Naturalidade: _____ Procedência _____
 Endereço _____
 Telefones: _____ Profissão _____

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “RASTREAMENTO GENÉTICO PARA A DETECÇÃO PRECOCE DE BIOMARCADORES EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIAS AGUDAS NO ESTADO DO CEARÁ

NOME DO INVESTIGADOR PRINCIPAL: DR MANOEL ODORICO DE MORAES FILHO

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é conhecer melhor as características da doença a qual você é portador. Nós vamos analisar a idade, sexo e outras características clínicas em portadores da sua doença, bem como informações do seu prontuário. Serão coletadas amostras do seu sangue para estudo do seu material genético e será avaliada a presença de alterações nesse material, juntamente com a sua resposta ao tratamento realizado, gerando resultados que favoreçam uma melhor compreensão do surgimento e progressão desta doença.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

A amostra biológica utilizada nesta pesquisa é o sangue do participante. A coleta será realizada por profissional qualificado e uma agulha adequada e descartável será utilizada para punção (introdução) na sua veia. Serão coletados, aproximadamente, 5 mL de sangue. Após a coleta de sangue, serão coletados dados pessoais (sexo e idade), história clínica e checagem dos exames laboratoriais indicados tais como: hemograma completo (“exame de sangue”), citologia e histologia (análise microscópica das células), bem como outras informações do prontuário médico. Com essa pesquisa, esperamos contribuir para o diagnóstico e tratamento da doença em novos pacientes, além de obter o perfil da doença no Ceará. O seu material biológico (sangue) será utilizado para estudar e conhecer melhor a sua doença.

É de sua responsabilidade: comparecer nas datas e horários informados com o propósito de verificar os procedimentos e dados do estudo, sem, no entanto, violar a condição de que tais informações são confidenciais. Você concordando em assinar o presente termo,

fica autorizado por você, participante da pesquisa, o armazenamento do material em biorrepositório dentro da nossa instituição por 5 anos, onde serão realizados os estudos necessários. Após o fim do prazo do presente estudo, os pesquisadores poderão necessitar de uma extensão do mesmo. Assim, fica autorizado por você a permanência do armazenamento das amostras para futuros estudos no material genético, onde você e/ou seus descendentes poderão ter acesso às informações. Nós pesquisadores, a cada necessidade de extensão ou novas avaliações no seu material genético, submeteremos o novo estudo ao comitê de ética da nossa instituição.

Seus dados clínicos e resultados obtidos com este projeto serão publicados em revistas científicas e apresentados em congressos e reuniões científicas, sendo mantido o sigilo quanto à sua identidade. A qualquer momento você poderá ter acesso aos resultados encontrados na pesquisa.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento em que desejar. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador responsável ou a qualquer membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento nesta instituição. Independentemente de seu desejo e consentimento, sua participação no estudo poderá ser interrompida, em função da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo, do não cumprimento das normas estabelecidas, de qualquer outro motivo que, a critério do pesquisador, seja do interesse de seu próprio bem-estar ou dos demais participantes e, por fim, da suspensão do estudo como um todo. O Laboratório de Farmacogenética do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) comunicar-se-á, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Os registros relacionados à sua identidade serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. Você não será identificado por ocasião da publicação dos resultados obtidos. Contudo, o(s) monitor(es) do estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, ou autoridades do(s) órgão(s) regulamentar(es) envolvido(s) terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, como o propósito de verificar os procedimentos e dados do estudo, sem, no entanto, violar a condição de que tais informações são confidenciais.

RISCOS OFERECIDOS AO PARTICIPANTE

Os riscos relacionados à coleta de sangue são mínimos, podendo ocorrer dor leve e formação de mancha roxa no local por pequena saída de sangue mancha arroxeadada (equimose) ao redor do local da punção, a qual desaparece em poucos dias. Excepcionalmente, pode ocorrer sangramento local e, raramente, infecção local. É importante salientar que uma nova coleta deste material pode ser necessária, em poucos casos, se a amostra for insuficiente ou inadequada para análise.

BENEFÍCIOS OFERECIDOS AO PARTICIPANTE

A participação no estudo é voluntária, não existindo nenhuma remuneração para os participantes. Seu seguimento ambulatorial e seu tratamento será conduzido da mesma forma independente da participação nessa pesquisa. Os benefícios oferecidos por esta pesquisa incluem a determinação do perfil das Leucemias Agudas em adultos (câncer no sangue) no Ceará. Esses resultados contribuirão para o desenvolvimento de métodos diagnósticos (métodos capazes de identificar sua doença), terapias farmacológicas (tratamento com novos medicamentos) e para o entendimento dos pacientes acometidos com Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) (câncer no sangue) e Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (câncer no sangue). Suas dúvidas quanto à sua doença e a pesquisa serão respondidas a qualquer momento pela equipe responsável.

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja algum imprevisto ou dúvidas, você deverá entrar em contato direto com o pesquisador responsável pelo estudo: Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho (85-999893459), Médico, no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (Laboratório de Farmacogenética), localizado na Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo ou pelo telefone 3366-8255.

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (Horário: 08:00-12:00 horas). Somente assine este termo se você tiver a certeza de que recebeu todos os esclarecimentos e informações para decidir conscientemente sobre a sua participação neste estudo.

ASSINATURAS

Autorizo o acesso dos membros da equipe de pesquisadores às minhas informações de saúde, nas condições estabelecidas e descritas nos itens acima. Não renunciei a qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste estudo. Eu, por fim, declaro que li cuidadosamente todo este documento, denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após a assinatura, tive oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo e também sobre o referido estudo, recebendo explicações que responderam por completo às minhas dúvidas e reafirmando estar livre e

espontaneamente decidido a participar do estudo, ficando munido de uma via do documento assinado pelo pesquisador responsável.

Assinatura do voluntário	
Nome de quem está obtendo o TCLE	Assinatura
Nome Testemunha (quando aplicável)	Assinatura

TELEFONES PARA CONTATO

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes (Investigador Principal)	(85) 3366.8201 / 85-999893459
--	-------------------------------

ANEXO 3: QUESTIONÁRIO CLÍNICO PARA PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIAS

Nome:					
Data de nascimento					
Nome da mãe:					
Nome do pai:					
Naturalidade:					
Procedência:					
Ocupação (ou ocupação anterior, se aposentado):					
Manipulação ou exposição a corantes, derivados de petróleo, agentes químicos em geral/ agrotóxicos. (sim ou não; se SIM, QUAIS?)					
SINAIS E/OU SINTOMAS			SIM	NÃO	IGNORADO
Dor de cabeça					
Alteração visual (redução de campo visual)					
Galactorreia (secreção de leite nas mamas)					
Alta de menstruação por período prolongado					
Redução na libido					
Infertilidade					
Diarreia crônica					
Desmaio					
Pedra nos rins					
Aumento de extremidades					
Aumento do volume da urina					
Diminuição de pelos no corpo					
Tumor na pele (lesões cutâneas)					
História anterior de retirada de tumor	DATA	TIPO DE TUMOR		LOCAL DO CORPO	