

AS TÉCNICAS DA BIOLOGIA MOLECULAR PARA DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS

MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES FOR DIAGNOSIS OF LEUKEMIA

FRANCA, Victor¹; CARBONEZE, Emanueli²; PEGO, Caroline³;

Professor Mestre Victor França do Curso de BIOMEDICINA da Universidade SÃO FRANCISCO;

victor.f@usf.edu.br

RESUMO.

O câncer de leucemia é uma doença grave que afeta pessoas de todas as idades e é caracterizada pelo acúmulo de células malignas na medula óssea, podendo ser fatal. A medula é o local onde as células-tronco se desenvolvem para formar glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas. Existem mais de 12 tipos de leucemias, mas são classificadas em quatro principais: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica (LLC).

O objetivo deste estudo é caracterizar leucemias linfocíticas e mielocíticas, sendo elas agudas ou crônicas, com ênfase em suas características clínicas e moleculares, diagnóstico, tratamento e complicações. Foram realizadas pesquisas em bases de dados como SCIELO, Pub-Med, Google Acadêmico, bem como em livros didáticos relacionados ao tema, utilizando descritores como leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda e leucemia mieloide crônica.

Os resultados e pesquisas apontam que a leucemia mieloide aguda (LMA) é mais comum em adultos, em torno dos 40 anos, com uma observação anormal de células precursoras mielóides na medula óssea. A leucemia mieloide crônica (LMC) é caracterizada pela transformação maligna de células-tronco hematopoiéticas, gerando principalmente granulócitos imaturos, com maior incidência em adultos. A leucemia linfocítica crônica (LLC) é predominante em pacientes em torno dos 50 anos e é caracterizada por um acúmulo lento e progressivo de linfócitos B malignos. Já a leucemia linfocítica aguda (LLA) têm maior prevalência em crianças e é caracterizada pela rapidez de rotina de células progenitoras hematopoiéticas malignas.

As principais características dos quatro tipos de leucemia envolvidos nesta reflexão são definidas principalmente com base em um sistema de classificação de neoplasias hematopoiéticas desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Este sistema é classificado como leucemias com base em características clínicas, morfológicas, imunofenotípicas e genéticas, considerando uma porcentagem de células malignas na medula óssea (aguda ou crônica) e sua linhagem predominante (mieloide ou linfóide). A compreensão dessas características é fundamental para o diagnóstico, tratamento e manejo eficaz das leucemias, incluindo a perspectiva da biologia molecular, que tem um papel crucial na identificação de alvos terapêuticos e estratégias personalizadas de tratamento para pacientes com leucemia.

Palavras-chave: biologia molecular; hematologia; leucemias; técnicas moleculares.



ABSTRACT.

Leukemia cancer is a serious disease that affects people of all ages and is characterized by the accumulation of malignant cells in the bone marrow, which can be fatal. The marrow is where stem cells develop to form white blood cells, red blood cells and platelets. There are more than 12 types of leukemias, but they are classified into four main types: acute myeloid leukemia (AML), chronic myeloid leukemia (CML), acute lymphocytic leukemia (ALL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL).

The objective of this study is to characterize lymphocytic and myelocytic leukemias, whether acute or chronic, with emphasis on their clinical and molecular characteristics, diagnosis, treatment and complications. Searches were carried out in databases such as SCIELO, Pub-Med, Google Scholar, as well as in textbooks related to the topic, using descriptors such as acute lymphocytic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, acute myeloid leukemia and chronic myeloid leukemia.

The results and research indicate that acute myeloid leukemia (AML) is more common in adults, around the age of 40, with an abnormal observation of myeloid precursor cells in the bone marrow. Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by the malignant transformation of hematopoietic stem cells, generating mainly immature granulocytes, with a higher incidence in adults. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is predominant in patients around the age of 50 and is characterized by a slow and progressive accumulation of malignant B lymphocytes. Acute lymphocytic leukemia (ALL) is more prevalent in children and is characterized by the rapid occurrence of malignant hematopoietic progenitor cells.

The main characteristics of the four types of leukemia involved in this reflection are defined mainly based on a classification system for hematopoietic neoplasms developed by the World Health Organization (WHO). This system is classified as leukemias based on clinical, morphological, immunophenotypic and genetic characteristics, considering a percentage of malignant cells in the bone marrow (acute or chronic) and their predominant lineage (myeloid or lymphoid). Understanding these characteristics is fundamental for the diagnosis, treatment and effective management of leukemias, including the perspective of molecular biology, which plays a crucial role in identifying therapeutic targets and personalized treatment strategies for patients with leukemia.

Keywords: molecular biology; hematology; leukemias; molecular techniques.



INTRODUÇÃO

A leucemia é uma doença maligna das células tronco hematopoiética, na qual apresenta subtipos definidos de acordo com sua citologia celular (BRUTUS; CARMO; SOARES, 2019). Ademais, a classificação das leucemias se dá a partir da linhagem linfocítica e mielóide, com a capacidade de se manifestar como crônica ou aguda (MORAIS et al., 2017). Da mesma maneira, à medida que a pesquisa tem-se aumentado gradativamente sobre o assunto, ao decorrer dos anos foi-se possível definir os subtipos da leucemia de acordo com suas linhagens apresentadas: Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Leucemia Mielóide Crônica (LMC) (SALAH et al., 2019).

Por conseguinte, a linhagem aguda afeta a maior parte das células que ainda estão em desenvolvimento na medula e sua característica se dá pela rápida progressão e acúmulo de blastos. Já a linhagem crônica, diferencia-se com um lento avanço, permitindo com que as demais células realizem sua função normalmente (KLIEGMAN; STANTON, 2013, p. 1723, 1726).

A classe linfocítica aguda tem maior prevalência em crianças, alcançando 80% dos casos infantis e apenas 20% dos casos em adultos, sua principal característica é a alta proliferação celular com menor grau de diferenciação (MOREIRA et al., 2018); segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a mesma é dividida em dois precursores: B e T, o que refere-se a uma linhagem linfocítica com presença de linfócitos, sendo B responsável por maior parte dos casos apresentados, permitindo acreditar que a leucemia adquirida ao longo da vida está relacionada à alterações genéticas (PUI; ROBSON; LOOK, 2008; SILVA, 2009). Na crônica, as células atingidas também são aos linfócitos B, no entanto a faixa etária atingida é a mais elevada (BARROS, 2009) e dentre suas anomalias, destaca-se a trissomia, translocação, deleção e bandas, revelando a importância da citogenética para seu diagnóstico (CHAUFFAILLE, 2005).

Desse modo, a linhagem mielóide aguda é caracterizada pela progressão incontrolável das células mielóides na medula óssea, sendo 20% dos casos representados por crianças, o que não exclui a classe adulta e para que a identificação desta doença ocorra é preciso $\geq 20\%$ de blastos presentes no sangue ou até mesmo na medula. (STONOGA; STROPARO, 2020; CHAVES, 2010; LIMA et al., 2016). Sendo sua maior incidência em pacientes com 40 anos, a mesma diferencia-se ao apresentar sua anomalia em genes dos cromossomos 9 e 22 translocados (SANTOS et al., 2019; BORTOLHEIRO; CHIATTONE, 2008).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) a leucemia participa de 5,2% dos casos de câncer no Brasil (INCA, 2018); e visualiza-se que as doenças onco-hematológicas têm-se aumentado anualmente, o que gera um alerta na humanidade devido a capacidade que este câncer possui em proliferar suas células, nas quais são responsáveis pelos eritrócitos normais do nosso organismo (DOMINGUEZ. et al., 2020). Vale lembrar também, que em 2020 foram registrados mais de 400.000 casos de leucemia por todo o mundo e, em média, 311.500 mortes (GLOBOCAN. 2020).

O diagnóstico desta doença se dá através dos sinais e sintomas que o indivíduo apresenta, além das características morfológicas das células fornecidas na análise do hemograma. De forma que a origem da leucemia parte de alterações genéticas adquirida pelos glóbulos brancos, as informações apresentadas com simples exames laboratoriais não são o suficiente para o seu diagnóstico, todavia a biologia molecular se faz necessária, já que por si só revela a importância do material genético presente na maioria das células do corpo humano e a partir do desenvolvimento e aprimoramento de suas técnicas, tais como: Fluorescent In Situ



Hybridization (FISH), Células Car-T, Cariótipo Banda G, Hibridização Genômica Comparativa (CGH), Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Perfil de Expressão Gênica (GEP), Reação em Cadeia Polimerase (PCR), torna-se possível tratamentos e diagnósticos precisos. (REIS; VISENTAINER; MACEDO, 2017). À proporção que o número de pacientes portadores desta deficiência tem-se tornado significativo, é notório a importância clínica que essas técnicas oferecem a cada história, não só pela rapidez do diagnóstico, mas também pela capacidade que todas elas têm em auxiliar no monitoramento da proliferação das células na medula (IACOBUCCI; MULLIGHAN, 2017).

A partir das informações apresentadas, evidencia-se que o diagnóstico precoce da leucemia possibilita rápida intervenção aos acometidos, melhorando a qualidade de vida de cada um. Por fim, temos como objetivo reunir informações e investigar os mecanismos moleculares desta doença, no propósito de identificar os marcadores genéticos relevantes, visando aprimorar diagnósticos, prognósticos e desenvolvimento de terapias mais eficazes para pacientes portadores desta anomalia.

METODOLOGIA

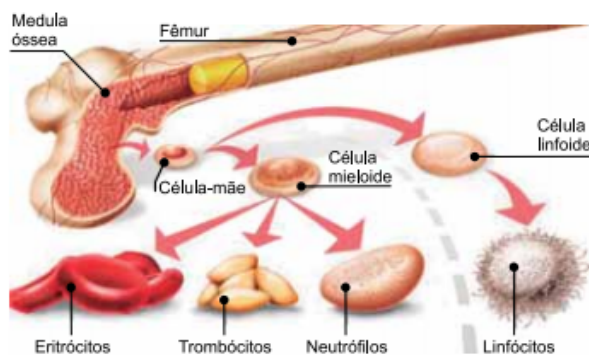
Este artigo trata-se de uma revisão bibliográfica em que as bases de dados utilizadas para desenvolvimento deste trabalho foram: Scientific Electronic Library Online (SciELO) e Pubmed. Os descritores utilizados foram: biologia molecular, hematologia, leucemias, técnicas e diagnóstico. Como critérios de inclusão foram utilizados artigos científicos relacionados ao tema e dados publicados a partir de 2001.

DISCUSSÃO

1.0 LEUCEMIAS

A hematopoiese é o processo responsável pela produção das células sanguíneas na medula óssea (figura 1), como os eritrócitos (responsáveis pelo transporte de oxigênio no organismo), leucócitos (denominados nossas células de defesa) e as plaquetas (fragmentos presente na corrente sanguínea que auxiliam na coagulação do sangue). Todavia, a leucemia é caracterizada pela proliferação anormal das células produzidas na medula, gerando lesões genéticas.

Figura 1 - Composição do tecido hematopoiético.



Fonte: planejativo.com



1.1 LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA

A leucemia de linhagem linfocítica aguda acomete 80% dos casos infantis, tendo maior prevalência em idade de 2-5 anos. A causa da Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) não é totalmente conhecida, mas há várias predisposições genéticas e celulares que influenciam no acometimento da mesma (MOREIRA et al., 2018). Os principais sintomas apresentados por esta anomalia são dor óssea, palidez cutânea/mucosa, náuseas, cefaléia, sepse, adenomegalia e febre (SCHMIEGELOW et al., 2008).

A Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) pode ser especificada em dois principais tipos: precursores B e T, sendo o B responsável por 80% dos casos (SILVA, 2009). Alterações genéticas desempenham um papel importante na Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), incluindo translocações genéticas que ativam fatores de transcrição e efeitos no ciclo celular. A translocação (12;21) TEL-AML1 é comum na Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) pediátrica e apresenta bom prognóstico, de qualquer forma é importante saber qual o tipo de alteração genética apresentada para designar um tratamento específico a este câncer (PUI; ROBISON; LOOK, 2008; SILVA, 2009).

O padrão ouro para a Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) é a quimioterapia de longo prazo, que inclui três fases terapêuticas: indução, consolidação e manutenção. A fase de indução visa destruir o máximo de células leucêmicas e alcançar a remissão. A transferência tem como objetivo eliminar as células remanescentes no corpo e a manutenção é uma profilaxia para evitar recidivas (ABRALE, 2019; CAVALCANTE; HAMERSCHLAK, 2008; ROSA; TORRES, 2017).

1.2 LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA.

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é uma forma de câncer que afeta os linfócitos atípicos, ou seja, envolve normalidade de uma única linhagem de células anormais. A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é mais comum em caucasianos do que em negros e ocorre com maior frequência em faixas etárias mais elevadas (BARROS, 2009).

Esta doença apresenta várias anomalias genéticas com diferentes implicações prognósticas tais como:

- Trissomia 12: associada a uma sobrevida de aproximadamente 9 anos;
- Translocação ou deleção do braço longo do cromossomo 13: esta alteração genética tem um bom prognóstico, com uma sobrevida por volta de 11 anos;
- Modificação envolvendo o braço longo do cromossomo 11, banda q22-23: está associado a uma sobrevida de aproximadamente 6,6 anos.;
- Deleção do braço curto do cromossomo 17: relacionada a uma sobrevida de 2,5 anos;
- Deleção do braço longo do cromossomo 6: alteração genética também observada na Leucemia Linfocítica Crônica (LLC).

Além disso, translocações envolvendo o braço longo do cromossomo 14 são comuns em cerca de 60% dos casos no diagnóstico, e a avaliação prognóstica da leucemia linfocítica crônica (LLC) pode ser auxiliada com técnicas de citogenética, como Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) e o cariótipo por banda G. A Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) é uma técnica rápida, específica e sensível capaz de identificar deleções genéticas e outras

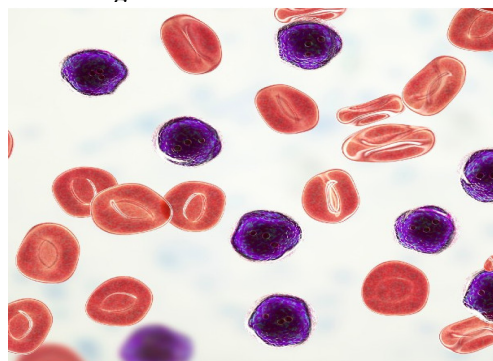


alterações, que auxiliam além da sensibilidade do cariótipo por banda G (CHAUFFAILLE, 2005).

Os sintomas característicos da Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) são: perda de apetite, saciedade precoce, fadiga, sudorese noturna, infecções recorrentes, hematomas, aumento dos gânglios linfáticos (linfonodomegalia), aumento do baço (esplenomegalia) e aumento do fígado (hepatomegalia) (YAMAMOTO; FIGUEIREDO, 2005; GONÇALVES et., 2009; MIR, 2016).

O tratamento desta leucemia inicialmente envolve quimioterapia com medicamentos Clorambucil e Ciclofosfamida, análogos de purina também são usados, mas podem causar depressão na imunidade dos linfócitos TCD4 e TCD8. Anticorpos monoclonais como Rituximab e Alemtuzumab muitas vezes combinados com outras drogas, são opções terapêuticas adicionais, no entanto o rituximabe pode limitar a quantidade de linfócitos B na corrente sanguínea, o que leva a uma diminuição das imunoglobulinas, mas normalmente apresenta baixo risco de infecção. Por outro lado, o Alemtuzumab reduz tanto os linfócitos B quanto os linfócitos T e está associado a um alto risco de infecções, incluindo pneumocistose, herpes zoster e infecções fúngicas, portanto ainda ambos os medicamentos tenham efeitos na redução de linfócitos, o Alemtuzumab apresenta risco maior de infecção grave. No Brasil, novos medicamentos como Ibrutinib e Venetoclax apresentam resultados promissores no tratamento da Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), já o transplante de células progenitoras hematopoiéticas, incluindo transplantes alogênicos, pode ser considerado em casos específicos, mas está associado a riscos como infecções (ABRALE, 2020).

Figura 2 - Leucemia linfocítica



Fonte: <https://www.minhavidacom.br/>

1.3 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é uma neoplasia mencionada pela revisão descontrolada e diferenciação anormal das células precursoras mielóides na medula óssea. Com o aumento dessas células imaturas (blastos) na medula, as mesmas podem se espalhar para o sangue periférico e ocasionalmente para outros tecidos. Para o diagnóstico inicial da Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é necessário constatar a presença de 20% ou mais de blastos no sangue periférico ou na medula óssea. Essa característica é um marcador importante para a identificação e definição desta doença (STONOGA; STROPARO, 2020).

O tratamento mais conhecido atualmente para Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é uma terapia de indução, que busca controlar a doença, mas não resulta especificamente em uma cura definitiva. Durante esta terapia a doença deixa de ser detectável nos métodos de controle. A terapia de indução é uma parte fundamental do tratamento desta anomalia e é seguida por



medicamentos de manutenção. O método de indução pode variar de acordo com a faixa etária de cada paciente e é dividida em duas etapas: remissão, que envolve o uso de dois ciclos de medicamentos tais como a Daunorrubicina, Idarrubicina e Citarabina; e consolidação da remissão, que consiste em dois ciclos de altas doses de Citarabina, possivelmente associada ao transplante de medula óssea. Os medicamentos mais usados na quimioterapia para Leucemia Mielóide Aguda (LMA) são os agentes alquilantes, uma classe de antineoplásicos que causam mielodepressão e podem interromper a terapia celular, levando à morte das células em divisão. Como último recurso terapêutico, a radioterapia é mencionada, mas sua eficácia é limitada na destruição de tumores sólidos que podem estar presentes em órgãos como baço, cérebro ou outros locais com a presença de células leucêmicas (SANTOS et al, 2019).

A coleta de células-tronco para o transplante de medula óssea (TMO) pode ser realizada por meio da punção no osso do quadril, onde uma agulha é inserida para extrair as células-tronco facilmente. Nos primeiros 100 dias após o TMO, ocorre uma fase de aplasia medular, na qual há uma redução significativa de todas as células sanguíneas, deixando o paciente vulnerável a infecções devido à supressão do sistema imunológico. Para combater essa disposição a infecções, são necessários tratamentos que incluem o uso de antibióticos, antivirais e medicamentos que estimulam a produção de glóbulos brancos (ABRALE, 2021).

Nas Leucemias Mielóides Agudas (LMA's) com cariótipo normal, foram apontadas diversas anormalidades genéticas, com realce para mutações em genes NPM1 (nucleofosmina), FLT3 (tirosina quinase 3 relacionada a fms), CEPBA (CCAAT/enhancer binding protein α), MLL PTD (leucemia mielóide-linfóide ou de linhagem mista), NRAS (oncogene viral do neuroblastoma RAS), BAALC (gene da leucemia cerebral e aguda), e ERG (vírus da eritroblastose v-ets E26 oncogene-like). Cerca de 45% dos casos de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) apresentam cariótipo normal, sendo as mutações nos genes NPM1 e FLT3 as mais prevalentes. O gene FLT3, localizado no cromossomo 13q12, codifica um receptor com atividade tirosina quinase, desempenhando papel crucial na ativação de vias de sinalização celular responsáveis pela célula, principalmente em ações iniciais de células precursoras mielóides. Por outro lado, o gene NPM1, situado no cromossomo 5q35, codifica uma fosfoproteína nuclear que conecta o núcleo ao citoplasma e está envolvida na regulação e estabilidade de proteínas nucleares (VELOZZO et al., 2011).

1.4 LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é mais comum em pacientes adultos, geralmente em torno dos 40 anos de idade. Ela pode se apresentar de forma assintomática ou sintomática. Entre os sintomas associados, incluem-se fadiga, cefaléia, astenia (fraqueza), irritabilidade, febre, sudorese noturna e perda de peso. Devido à esplenomegalia, que é o aumento do baço, os pacientes também podem sentir desconforto na região do hipocôndrio esquerdo. A presença e gravidade desses sintomas podem variar de acordo com a fase da doença (SANTOS et al., 2019).

O tratamento da Leucemia Mielóide Crônica (LMC) teve início com o uso do imatinibe, um inibidor de tirosina quinase que tem como alvo a proteína BCR-ABL, associada à translocação cromossômica 9:22. O imatinibe bloqueia as atividades dessa via de sinalização, ajudando na obtenção da remissão molecular e clínica. Tanto o imatinibe quanto o nilotinibe atuam inibindo o BCR-ABL através da ligação a um segmento da enzima que controla sua cinase e impede que ela se ligue ao substrato doador de fosfato, o ATP. Esse mecanismo de



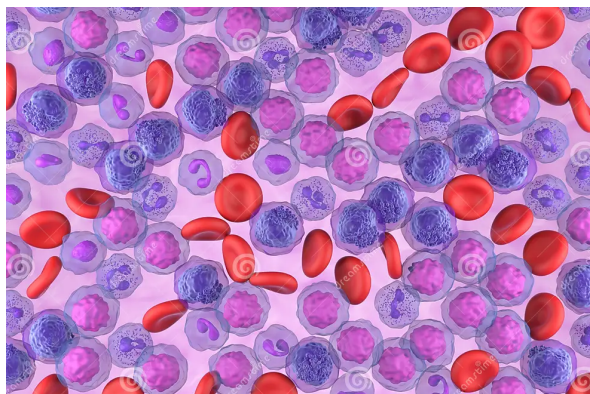
ação resulta na prevenção eficaz da atividade do BCR-ABL, contribuindo para o tratamento da Leucemia Mielóide Crônica (LMC) (HAMERSCHLAK, 2008).

As proteínas tirosina quinase desempenham um papel fundamental na via de transdução de sinais, regulando o crescimento e a adaptação das células ao ambiente extracelular. Muitas neoplasias envolvem a ativação anormal dessas proteínas, o que contribui para a transformação tumoral. No tratamento convencional da Leucemia Mielóide Crônica (LMC) são utilizadas terapias que incluem hidroxiureia, interferon-alfa, bussulfano ou citarabina em doses baixas, infusão de linfócitos e transplante de células medulares. Essas condutas visam controlar a progressão da doença e em alguns casos, buscar a possível remissão. Cada uma dessas terapias pode ser indicada com base no estágio da doença e nas características individuais de cada paciente (SANTOS et al., 2019; LEITE et al., 2012).

De acordo com Bortolheiro (2007), a Leucemia Mielóide Crônica (LMC) pode ser dividida em três fases distintas: crônica, acelerada e blástica.

- Fase Crônica: a Leucemia Mielóide Crônica (LMC) pode durar vários anos e tende a ser mais benigno. Os sintomas podem ser menos intensos e a progressão da doença geralmente é mais lenta;
- Fase Acelerada: a doença progride mais rapidamente, variando de meses a alguns anos. É identificado pelo aumento no número de blastos na medula óssea e no sangue periférico. Esta fase é mais adversa do que a crônica e requer intervenção terapêutica mais imediata;
- Fase Blástica: fase mais avançada e agressiva da doença. Nesta etapa, há um rápido crescimento no número de blastos, que incluem tanto células linfóides como mielóides. A fase blástica é muito grave e pode levar o paciente a óbito em um período curto de tempo, geralmente entre 3 a 6 meses.

Figura 3 - Leucemia mielóide



Fonte: <https://pt.dreamstime.com/>

2.0 TÉCNICAS MOLECULARES

Na maioria dos casos de leucemia, os estudos genéticos para um bom diagnóstico e recursos terapêuticos são indispensáveis e para que um resultado satisfatório seja alcançado, parte da medula óssea ou sangue periférico são levados até o laboratório de análise e a partir de achados morfológicos e patológicos pode-se encontrar uma boa resposta (VIGIL et al., 2018; AZEVEDO, 2013)

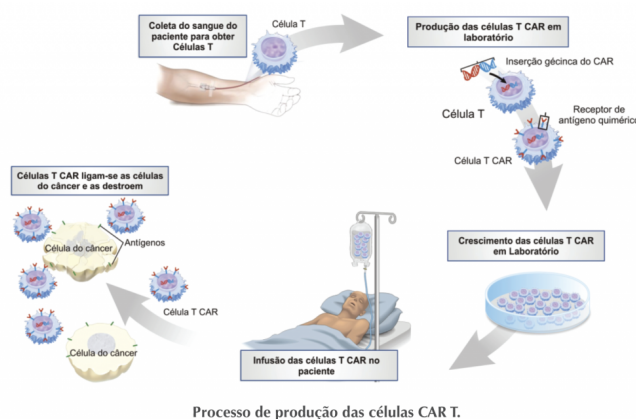
Ademais, de grande relevância, a história da leucemia nos revela que em 1968 foi quando ocorreu o primeiro transplante de medula óssea bem sucedido no exterior, em duas crianças com deficiência imunológica ligada a seus cromossomos e no ano de 1979, aconteceu o primeiro transplante de medula óssea no Brasil. O Dr. E. Donnal Thomas, em consequência a isso, desenvolveu um estudo que permitiu tratamento eficaz para esta anomalia, como a radioterapia e a quimioterapia, ambos respondem até hoje à redução da taxa de mortalidade em pacientes com leucemia (BIO-EM-FOCO, 2018).

No ano de 1987, a partir de estudos, cientistas desenvolveram em laboratório a célula CAR-T, que se liga à célula tumoral e a destrói. Afirma-se que esta técnica foi o primeiro método desenvolvido para o tratamento de leucemias, mas atualmente encontra-se outros métodos e técnicas, principalmente pela biologia molecular, para o bom diagnóstico desse câncer (HEMOCENTRO-USP RIBEIRÃO PRETO, 2023).

2.1 CÉLULAS CAR-T

Células que partem dos linfócitos T, produzidas em laboratório. O princípio de sua produção são as próprias células T do paciente, onde é realizada a coleta do material, o mesmo é levado até o laboratório, são modificadas e se transformam em células CAR-T, para depois retornarem novamente ao organismo do paciente e com isso, estas células atacam as células cancerígenas presentes no organismo do paciente leucêmico (figura 4) (CTC - CENTRO DE TERAPIA CELULAR, 2023).

Figura 4 - Processo de produção das células car-t

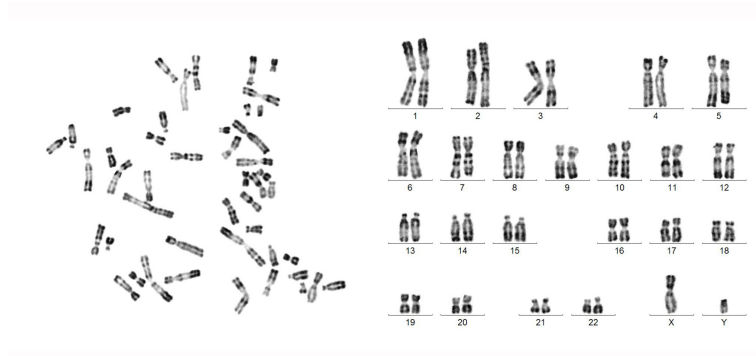


Fonte: <https://ctcusp.org>

2.2 CARIÓTIPO BANDA G

Nesta técnica, uma amostra da medula óssea deve ser cultivada, mas quando inativa, pode ser substituída pelo sangue. No momento em que os cromossomos das células encontram-se visíveis e bem condensados, o ciclo celular da mesma é interrompido, os cromossomos são processados e tingidos pela coloração Giemsa, produzindo consequentemente um padrão de bandas que permitirá uma análise individual dos cromossomos (HUMANA PRESS, NY, EUA, 2007).

Figura 5 - Cariótipo



Fonte: <https://genomaes.com.br/>

Com este tipo de análise torna-se possível detectar algumas translocações e alterações genéticas comuns na linhagem aguda da leucemia, além de fornecer uma varredura de todo o genoma e detecção de alguns rearranjos. No entanto, ela apresenta algumas desvantagens como: resolução limitada, sensibilidade e a dificuldade quando algumas células apresentam baixo índice mitótico, ou seja, isso nos revela que as alterações cromossômicas só podem ser identificadas a partir de determinada proporção leucêmica e desta forma muitos defeitos nos estudos desta anomalia poderão ser encobertos, por outro lado a análise citogenética é capaz de entregar um diagnóstico preciso ao detectar os rearranjos patognomônicos na Leucemia Mielóide Crônica (LMC), por exemplo. Já na Leucemia Mielóide Aguda (LMA), com os achados citogenéticos recorrentes desta técnica um bom prognóstico poderá ser definido, influenciando no transplante de células-tronco (FABARIUS A, LEITNER A, HOCHLAUS A et. al.).

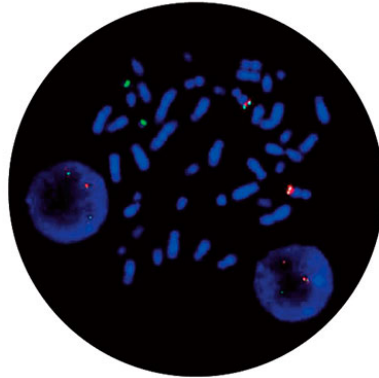
Vale ressaltar que uma anomalia genética só poderá ser identificada através de pelo menos duas alterações celulares presentes no cromossomo, ainda que quaisquer alterações não sejam provenientes da leucemia, ainda assim poderá ser detectada (HUMANA PRESS, NY, EUA, 2007).

2.3 FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)

Técnica baseada no uso de sondas específicas para detecção de pequenos fragmentos de interesse do DNA. Estas sondas nada mais são que a sequência de nucleotídeos presentes nos segmentos de DNA, nas quais estão ligadas a um marcador fluorescente capaz de identificar as anomalias cromossômicas (figura 6). Para alterações encontradas na leucemia, é usada uma abordagem que utiliza número limitado de sondas, além disso é uma técnica que não fornece uma ampla avaliação do genoma, como a técnica citada anteriormente (IRMÃOS J., 2010).

Nessa técnica os resultados podem ser obtidos rapidamente já que não é preciso cultivo de células e ocorre na fase interfase da divisão celular, além do mais é uma técnica mais sensível e de alta resolução, facilitando no diagnóstico de leucemias com anormalidades indefinidas, mas que demanda atenção para evitar falsas análises. Exemplo disso é a translocação T (12 e 21), presente na Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) pediátrica e as deleções TP53 da Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) (MACIEJEWSKI JP, TURV, O'KEEFE C., IR., 2009).

Figura 6 - Técnica de FISH na leucemia mielóide crônica



Fonte: <https://labnetwork.com.br/>

2.4 HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA (CGH)

A CGH é utilizada para comparação de material genético de um indivíduo portador da leucemia (TESTE) e um indivíduo que não está com a doença (REFERÊNCIA), o DNA de ambos é assimilado em pequenos fragmentos marcados com fluoróforo distinto (figura 7) (SARGENT R, JONES D, ABRUZZO LV et al., 2009).

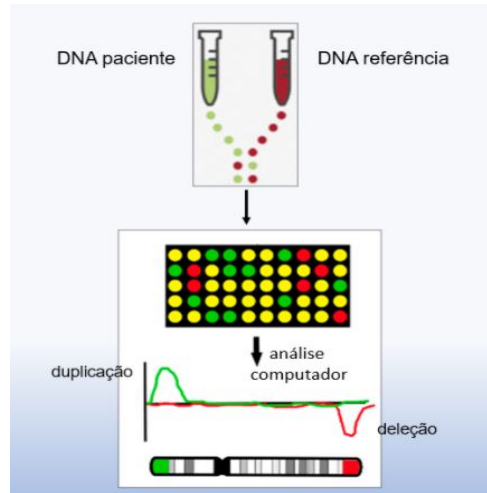
A técnica baseia-se no uso de sondas e sua resolução é determinada a partir de diversos fatores, desde a qualidade do DNA até os algoritmos usados para a análise no software, além do mais o que permitirá a identificação das alterações cromossômicas em grande proporção nos pacientes com leucemia é a matriz de varredura do genoma e espera-se que as inúmeras anomalias sejam identificadas para a precisão de um bom diagnóstico (SARGENT R, JONES D, ABRUZZO LV et al., 2009).

As matrizes presentes na hibridização partem de um número significativo de sondas espaçadas pelo genoma, nas quais serão direcionadas especificamente para a região associada com a doença. A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), como exemplo, baseia-se em ganhos e perdas de cromossomos, sendo assim a técnica se torna ideal para análise de suas matrizes, por isso foi validado uma plataforma para estudo clínico desta prática (HAGENKORD JM, CHANG CC., 2009).

Vale ressaltar que em tempos remotos a hibridização do DNA era realizada com spreads, mas para melhor resolução, alterou-se para microarranjos e um ponto negativo da CGH é a sua incapacidade de detectar rearranjos equilibrados, o que são comuns em leucemias (MACIEJEWSKI JP, MUFTI GJ., 2008).

Hibridização genômica comparativa (CGH), mesmo diante a alterações cromossômicas recorrentes, tem-se mostrado uma ferramenta precisa para o estudo da Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) (GUNN S, HIBBARD M, ISMAIL S et al., 2009).

Figura 7 - Exame de Hibridização Genômica Comparativa (CGH)



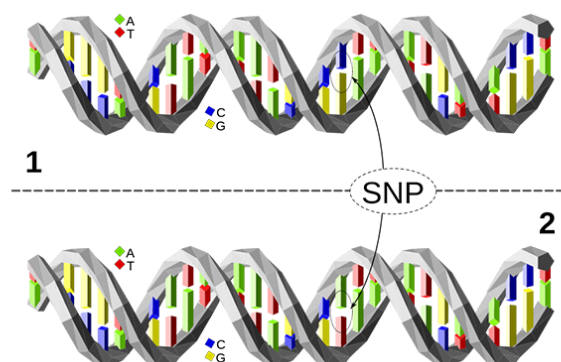
Fonte: <https://www.dasagenomica.com/>

2.5 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP)

Diferentemente da técnica de hibridização genômica, as matrizes SNP não dependem de um DNA referência, mas sim dos polimorfismos genotípicos presente em cada um deles, ou seja, possuem grande capacidade no fornecimento de informações de genotipagem e a partir da intensidade de sinal em suas sondas, anunciará não só o número de cópias presente em cada gene da leucemia, mas também mínimas alterações detectadas em cada um deles (figura 8) (ENGLE LJ, SIMPSON CL, LANDERS JE., 2006).

Esses arranjos têm-se mostrado promissores para a análise de Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), uma vez que as anomalias no número de cópias neste caso foram detectadas (GUNNARSSON R, MANSOURI L, ISAKSSON A., 2011).

Figura 8 -Single Nucleotide Polymorphism (SNP).



Fonte: <https://www.biomedicinapadiao.com.br/>

2.6 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA (GEP)

O uso de microarrays tem sido muito usado para o estudo de expressão gênica global, aferindo milhares de transcrições gênicas. A partir de um projeto denominado Microarray Innovations in Leukemia (MILE), o GEP ficou caracterizado como único para subdivisão das

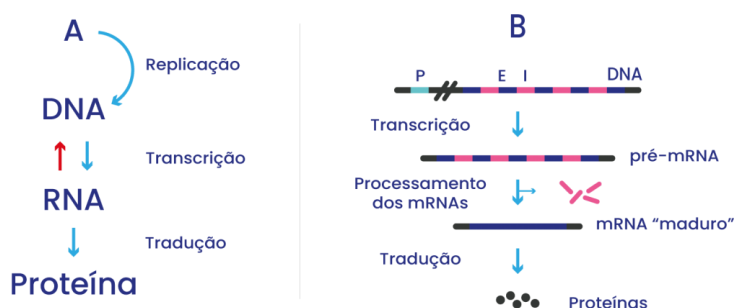


linhagens leucêmicas com base em seus genes de expressão (HAERLACH T, KOHLMANN A, WIECZOREK L. J., 2010).

Em 2011 foi lançado um chip capaz de detectar as mutações gênicas presentes na leucemia, o que tem sido muito promissor, uma vez que o método supera até três técnicas da biologia molecular para diagnóstico e tratamento de leucemias (HAERLACH T, KOHLMANN A, WIECZOREK L. J., 2010).

Uma das desvantagens da GEP na Leucemia Mielóide Aguda (LMA), por exemplo, é que anormalidades significativas nos genes podem não ser facilmente diagnosticadas. Por outro lado, é um método utilizado para fácil descobertas e identificação de leucemias, sendo que sua finalidade é o processamento e a conversão das informações presentes no DNA em um produto único e final (figura 9) (WOUTERS BJ, LOWENBERG B, DELWEL R. S, 2009).

Figura 9 - Processo final da técnica de expressão gênica (GEP).



Fonte: <https://blog.varsomics.com/>

2.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Técnica que consiste na amplificação e replicação de segmentos mínimos e específicos de DNA seguidos por eletroforese em gel de agarose, permitindo a visualização de seus fragmentos. A PCR envolve três etapas: desnaturação (a fita de DNA se desnatura com elevado grau de temperatura, tornando-se uma só fita), anelamento (onde os primers complementam a sequência de DNA que será amplificada) e extensão (a enzima DNA-polimerase se juntam as bases complementares e formam uma nova fita de DNA). As técnicas de PCR podem ser subdivididas em RT-PCR, onde as moléculas do RNA (responsáveis pelas síntese de proteínas) são convertidas em DNA complementar (cDNA), para serem sintetizados e amplificados, seguindo o mesmo procedimento da técnica de PCR convencional; e qPCR, que recebe esse nome por também ser considerada uma técnica quantitativa e sua maior finalidade ser quantificar o material amplificado em tempo real (BUSTIN, S.; BENES, V., NOLAN, T., & PFAFFL, M., 2005).

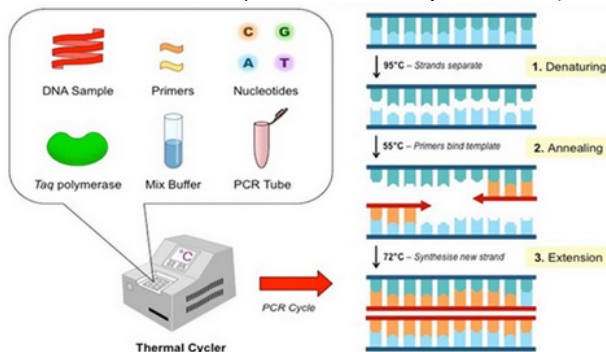
Através de alguns estudos, afirma-se que a técnica de RT-PCR demonstra-se útil, rápida e sensível para confirmar a presença de fusão genética na leucemia e de modo que esta técnica baseia-se no uso de RNA, o mesmo tem-se mostrado importante, pois com seu auxílio, facilmente as translocações cromossômicas podem ser detectadas. No entanto, um dos pontos negativos desta molécula é que o material precisará ser levado ao laboratório rapidamente após a coleta, para que não ocorra a degradação do material (MASON J, AKIKI S, GRIFFITHS MJ. J.CLIN PATHOL., 2011).

Indispensavelmente, a técnica de qPCR é considerada conveniente, por sua especificidade e sensibilidade, além de não requerer processamento após a amplificação, o uso desta técnica



tornou-se significativo para alcançar um bom resultado (VAN DONGEN JJ, LANGERAK AW, BRUGGEMAN M. et al., 2003).

Figura 10 - Técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)



Fonte: <https://www.vetprofissional.com.br/>

Por fim, outros métodos na biologia molecular vem ganhando reconhecimento na pesquisa com foco em leucemia, sendo um deles a amplificação por sonda de ligação multiplex (MLPA), técnica desenvolvida para identificar as alterações no número de cópias do material genético, a partir da hibridização de oligonucleotídeos (SCHOUTEN JP, McGUINN CJ, WAAIJER R, ZWIJNENBURG D, DIEPVENS F, PALS G.; NÚCLEO ÁCIDOS RES., 2002).

CONCLUSÃO

Este estudo aborda o perfil genômico das leucemias e suas implicações na prática clínica. As leucemias são doenças hematológicas malignas complexas que envolvem alterações genéticas e através de técnicas avançadas de análise genômica, como o sequenciamento da próxima geração, tornou-se possível identificar mutações específicas, rearranjos cromossômicos e variações genéticas associadas a diferentes subtipos de leucemia.

Nas leucemias crônicas, as células atingem um estado de maturidade, mas devido a erros genéticos, tornam-se malignas levando a um crescimento anormal. Por outro lado, as leucemias agudas são originadas de células sanguíneas que não completam seu processo de maturação, resultando em um rápido crescimento de células embrionárias.

O perfil genômico fornece informações cruciais para o diagnóstico preciso e estratificação de risco, permitindo uma abordagem terapêutica personalizada. Terapias direcionadas e baseadas no perfil genético do paciente, têm-se demonstrado eficaz na gestão das leucemias, melhorando as taxas de sobrevivência e qualidade de vida dos portadores desta doença, além disso, o perfil genômico desempenha um papel fundamental na previsão do prognóstico, auxiliando os médicos na escolha das melhores opções terapêuticas. A pesquisa continua nesse campo e o avanço das técnicas moleculares promete abrir novas perspectivas de tratamento para as leucemias no futuro.

Destacou-se a importância do perfil genômico na compreensão desta anomalia, identificando mutações específicas e variações genéticas associadas a diferentes subtipos da doença. Além disso, as implicações clínicas são evidenciadas, fornecendo bases sólidas para o diagnóstico, tratamento e prognóstico dos pacientes.

Portanto, compreender o perfil genômico das leucemias e suas implicações clínicas é primordial para melhorar o manejo desta doença, fornecendo tratamentos eficazes e perspectivas positivas para os pacientes.



REFERÊNCIAS

Abrale associação brasileira de linfoma e leucemia. (s.d.). CROMOSSOMO FILADÉLFIA E O BCR-ABL. Acesso em 30 de 10 de 2023, disponível em <https://www.abrale.org.br/doencas/leucemia/lmc/cromossomo-filadelfia-e-o-bcr-abl/>

amille Maria Mendes Bezerra, A. d. (2021). Diagnóstico molecular das leucemias. Acesso em 20 de 09 de 2023, disponível em ARQUIVOS CIENTÍFICOS (IMMES): file:///C:/Users/Renan%20Santana/Downloads/529-Texto%20do%20artigo-2119-1-10-20220815.pdf

BIOEMFOCO. (12 de 10 de 2021). Leucemia e o gene BCR-ABL: Uma explicação genética para a doença. Acesso em 10 de 09 de 2023, disponível em BIOEMFOCO: <https://bioemfoco.com.br/noticia/leucemia-gene-bcr-abl/#:~:text=Uma%20das%20muta%C3%A7%C3%B5es%20relacionadas%20a,relacionado%20diretamente%20com%20a%20LMC>

Braga, G. A. (s.d.). LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA: REVISÃO DE LITERATURA. Acesso em 20 de 08 de 2023, disponível em ciencia news: https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/hematologia/serie_branca/leucemias_linfomas_mieloma/leucemias/21-Leucemia-mieloide-aguda.pdf

Carolina Santos de Sousa, J. S., & Emanuella, G. D. (2022). Citogenética e biologia molecular no curso clínico e diagnóstico da leucemia mieloide crônica. Acesso em 10 de 09 de 2023, disponível em repositório anima educação: https://repositorio.animaeducacao.com.br/bitstream/ANIMA/22667/1/Citogen%C3%A9tica%20e%20biologia%20molecular%20no%20diagnostico%20da%20LMC_ARTIGO%20FINAL%20%281%29.pdf

filho, R. d. (21 de 04 de 2022). Como funciona uma translocação cromossômica? Acesso em 19 de 10 de 2023, disponível em Mater Prime Clínica de Produção humana: <https://materprime.com.br/translocacao-cromossomica/>

GARCIA, A. C. (2018). MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE DOENÇAS INFECTOCONTAGIOSAS. Acesso em 20 de 08 de 2023, disponível em repositório uniceub: <https://repositorio.uniceub.br/jspui/bitstream/prefix/13059/1/21502973.pdf>

GARCIA, A. C. (s.d.). MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE DOENÇAS INFECTOCONTAGIOSAS.

Gomes, G. M. (13 de 08 de 2021). Leucemia Linfóide e Mieloide: Uma breve revisão narrativa. Acesso em 15 de 08 de 2023, disponível em Ojs brazilian journals : <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/34429/pdf>

Júnior, M. d. (s.d.). LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. Acesso em 20 de 10 de 2023, disponível em ciencia news: https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/hematologia/serie_branca/leucemias_linfomas_mieloma/leucemias/46-



Leucemia-linfoide-aguda.pdf

Murad, a. m. (02 de 11 de 2021). Entendendo a técnica de FISH. Acesso em 20 de 10 de 2023, disponível em OncoNews: <https://www.onconews.com.br/site/atualizacao-cientifica/drops-de-gen%C3%B4mica/6114-entendendo-a-t%C3%A9cnica-fish.html>

Naoum, P. C. (30 de 06 de 2001). Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. Acesso em 22 de 08 de 2023, disponível em Scielo: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/yfXWsTrvF9zyWfN5bpCxbCM/#:~:text=Aplica%C3%A7%C3%A3o%20da%20biologia%20molecular%20em,identifica%C3%A7%C3%A3o%20dos%20hapl%C3%B3tipos%20da%20Hb>

Ribeiro, A. C. (02 de 03 de 2022). Diagnóstico hematológico e molecular das neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL negativas. Acesso em 15 de 10 de 2023, disponível em RBA Revista Brasileira de Análises Clínicas : <https://www.rbac.org.br/artigos/diagnostico-hematologico-e-molecular-das-neoplasias-mieloproliferativas-cronicas-bcr-abl-negativas/>

Rosenberg, C. (31 de 03 de 2020). Exame CGH Array/SNP-array: o que é o exame e quais as suas aplicações. Acesso em 20 de 10 de 2023, disponível em Dasa Genômica: <https://www.dasagenomica.com/blog/exame-cgh-array-snp-array/>

Silva, J. P. (2018). AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA EM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA COM ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS EM PACIENTES ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO (HU/UFSC). Acesso em 20 de 08 de 2023, disponível em repositório ufsc : <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/234367/J%C3%A9ssica%20Pires%20da%20Silva%20TCC%202018%20Repositorio%20UFSC.pdf?sequence=1>

VET Profissional. (s.d.). Técnica de reação em cadeia da polimerase PCR para que serve? Acesso em 22 de 10 de 2023, disponível em VET Profissional : <https://www.vetprofissional.com.br/artigos/tecnica-de-reacao-em-cadeia-da-polimerase-pcr-para-que-serve>

Ziegler, M. F. (15 de 12 de 2021). Descoberta mutação genética que desencadeia leucemia aguda grave. Acesso em 20 de 10 de 2023, disponível em Agência FAPESP: <https://agencia.fapesp.br/descoberta-mutacao-genetica-que-desencadeia-leucemia-aguda-grave/37565>

Ziegler, M. F. (15 de 12 de 2021). Descoberta mutação genética que desencadeia leucemia aguda grave. Acesso em 15 de 09 de 2023, disponível em LIM LABORATÓRIOS DE INVESTIGAÇÃO MÉDICA:





<https://limhc.fm.usp.br/portal/descoberta-mutacao-genetica-que-desencadeia-leucemia-aguda-grave/#:~:text=De%20acordo%20com%20a%20pesquisa,suficiente%20para%20originar%20a%20leucemia>

