



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL EM SAÚDE DA CRIANÇA
E DO ADOLESCENTE

MARTA REJANE COSTA FEITOSA

ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E MOLECULARES DA LEUCEMIA MIELOIDE
AGUDA NA INFÂNCIA

FORTALEZA-CEARÁ

2019

MARTA REJANE COSTA FEITOSA

ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E MOLECULARES DA LEUCEMIA MIELÓIDE
AGUDA NA INFÂNCIA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Saúde da Criança e do Adolescente do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Saúde da Criança e do Adolescente. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Valeska Siebra e Silva.

FORTALEZA-CEARÁ

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Feitosa, Marta Rejane Costa .

Alterações citogenéticas e moleculares da leucemia mieloide aguda na infância [recurso eletrônico] / Marta Rejane Costa Feitosa. - 2019.

1 CD-ROM: il.; 4 ¾ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 40 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Mestrado Profissional em Saúde da Criança e do Adolescente, Fortaleza, 2019.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientação: Prof.^a Dra. Ana Valeska Siebra e Silva.

1. Leucemia mieloide aguda. 2. Criança. 3. Biologia molecular. 4. Cariótipo. 5. Prognóstico. I. Título.

MARTA REJANE COSTA FEITOSA

ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E MOLECULARES DA LEUCEMIA MIELÓIDE
AGUDA NA INFÂNCIA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Saúde da Criança e do Adolescente do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Saúde da Criança e do Adolescente. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Aprovada em: 23 de dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Ana Valeska Siebra e Silva
Universidade Estadual do Ceará – UECE



Prof.ª Dr.ª Edna Maria Camelo Chaves
Universidade Estadual do Ceará – UECE



Prof.ª Dr.ª Mardênia Gomes Vasconcelos Pitombeira
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Ao meu marido e aos meus filhos, pelo amor, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu a oportunidade de um ir um pouco mais além, além das minhas expectativas, dos meus planos, do que eu achava que pudesse chegar. Que me mostrou o caminho a ser seguido; guiou meus passos e que mesmo em meio às dificuldades que o mundo nos apresenta, ainda sim, devemos acreditar.

Ao meu marido que me apoiou em todas as decisões, sendo meu porto seguro, me estimulando a continuar na caminhada.

Aos meus filhos, pelo apoio e amor incondicional.

À equipe do CMPSCA que me acompanhou na trajetória acadêmica e me auxiliou a andar sozinha nesta caminhada de luta, enfrentamento, mudanças e exigências.

E um carinho especial a minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Ana Valeska Siebra e Silva, que me incentivou a fazer o mestrado, me orientou, mas que também deixou que eu trilhasse o meu caminho, auxiliando a amadurecer as decisões.

E hoje, com a conclusão da dissertação, querida Amiga, mesmo tendo se passado alguns anos sua frase: “Cuidado com o que você deseja, porque você pode conseguir”, continua a fazer parte do meu cotidiano. E essa conquista agradeço, também, a Deus por permitir que esse desejo se concretizasse.

“Toda narrativa de vida inclui sempre um movimento de descentramento de si, em direção aos outros, para um território familiar, para a lógica das relações sociais”.

(Michel Legrand)

RESUMO

O prognóstico do câncer na infância tem melhorado a cada dia, graças os grandes avanços que vem acontecendo na oncologia pediátrica, estando diretamente associado à precocidade do diagnóstico. Compreender as mutações que ocorrem nos casos de leucemia mieloide aguda tem auxiliado na condução da prática clínica de crianças portadoras desta doença. O Objetivo do presente estudo foi identificar a frequência de mutações que ocorrem na leucemia mieloide aguda (LMA) e que podem configurar bom ou mau prognóstico, bem como investigar sua relação com o estudo de cariótipo e imunofenotipagem. Trata-se de uma revisão integrativa de literatura, sendo selecionados, por meio de busca eletrônica artigos nas bases de dados SCIELO, PUMED e LILACS, em ingleses e portugueses e publicados na íntegra no período de 2000 a 2019. Para a busca dos artigos foram adotados os seguintes descritores como indexadores, selecionados mediante consulta aos Descritores em Ciências da Saúde (DeCs): leucemia mieloide aguda, infância, mutações. Foram identificados 80 artigos, e ao final, selecionados 45. Os resultados evidenciaram que a leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença fenotípica e geneticamente heterogênea, caracterizada por uma proliferação clonal de precursores mieloides anormais na medula óssea, que a identificação de fusões gênicas permite a definição de subtipos moleculares nas leucemias pediátricas, com importante papel para a avaliação do prognóstico e como marcador único e estável para acompanhamento da resposta ao tratamento e que na LMA, o cariótipo é fundamental na decisão da terapêutica pós-remissão, podendo os fatores moleculares definir o tratamento em indivíduos de cariótipo normal. Conclui-se, portanto, que a detecção das alterações moleculares no manuseio da leucemia mieloide aguda em crianças e uma correta estratificação prognóstica, podem contribuir para uma melhor evolução destes pacientes.

Palavras-chave: Leucemia mieloide aguda. Criança. Biologia molecular. Cariótipo. Prognóstico.

ABSTRACT

The prognosis of childhood cancer has improved every day, thanks to the great advances that have been happening in pediatric oncology, being directly associated with the early diagnosis. Understanding the mutations that occur in cases of acute myeloid leukemia has helped to guide the clinical practice of children with this disease. The objective of the present study was to identify the frequency of mutations that occur in acute myeloid leukemia (AML) and that can configure a good or bad prognosis, as well as to investigate its relationship with the study of karyotype and immunophenotyping. It is an integrative literature review, and articles in the SCIELO, PUMED and LILACS databases were selected, using electronic search, in English and Portuguese and published in full between 2000 and 2019. For the search for the articles, the following descriptors were adopted as indexers, selected in consultation with the Health Sciences Descriptors (DeCs): acute myeloid leukemia, childhood, mutations. Eighty articles were identified, and at the end, 45 were selected. The results showed that acute myeloid leukemia (AML) is a phenotypic and genetically heterogeneous disease, characterized by a clonal proliferation of abnormal myeloid precursors in the bone marrow, which the identification of gene fusions allows the definition of molecular subtypes in pediatric leukemia's, with an important role in the evaluation of the prognosis and as a single and stable marker for monitoring the response to treatment and that in AML, the karyotype is fundamental in the decision of post-remission therapy, and the factors molecules define treatment in normal karyotype individuals. It is concluded, therefore, that the detection of molecular changes in the management of acute myeloid leukemia in children and a correct prognostic stratification, may contribute to a better evolution of these patients.

Keywords: Acute myeloid leukemia. Kid. Molecular biology. Karyotype. Prognosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação simplificada da diferenciação Hematopoiética Adaptado de WANG & WAGERS, 2011.....	15
Figura 2 – Representação do critério diagnóstico FAB da LMA.....	21
Figura 3 – Mieloblastos com presença de Bastonetes de Auer (corante de mieloperoxidase).....	22
Figura 4 – Classificação prognóstica segundo anormalidades citogenéticas e moleculares.....	26
Figura 5 – Classificação da LMA de acordo com o prognóstico pela citogenética e molecular.....	27
Figura 6 – Fluxograma da seleção dos artigos incluídos na revisão integrativa, 2014	29
Figura 7 – Sistema de classificação das evidências, segundo níveis hierárquicos de qualidade.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANAE	Alfa-Naftil Acetato Esterase
BAALC	Brain And Acute Leukemia Gene
CEA	Cloroacetatoesterase
CEPBA	Enhancer binding protein (proteína ligadora do gene)
CMF	Citrometria de Fluxo
DeCS	Descritores em Ciência da Saúde
ERG	Etserytoblastosis virus E26 oncogene-like
FLT3	Fms - Related Tyrosine Kinase 3
IFT	Imunofenotipagem
INV	Inversão
LA	Leucemias Agudas
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
MLL PTD	Myeloid - Lymphoid ou Mixed-Lineage Leukemia
MPO	Mieloperoxidade
NPM1	Nucleofosmina
NRAS	Neuroblastoma RAS Viral Oncogene
OMS	Organização mundial da saúde
SBB	Sudanblack B

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	GERAL.....	15
2.2	ESPECÍFICOS.....	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1	LEUCEMIA AGUDA INFANTIL NA ATUALIDADE.....	16
3.1.1	Doenças onco-hematológicas	16
3.2	CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DA LMA.....	18
3.3	NOVA CLASSIFICAÇÃO DA LMA PELA OMS.....	18
3.3.1	Diagnóstico laboratorial	19
3.4	COLORAÇÃO CITOQUÍMICA.....	20
3.4.1	Imunofenotipagem	23
3.4.2	Biologia molecular da LMA	23
4	METODOLOGIA	28
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	28
4.1.1	Desenvolvimento de estratégia de busca	28
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	29
4.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	30
4.4	CATEGORIZAÇÃO DOS DADOS OBTIDOS.....	30
5	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	32
5.1	MUTAÇÃO NO GENE NPM1.....	36
5.2	MUTAÇÃO NO GENE FLT3.....	37
6	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, ocorreram inúmeros avanços no campo da biologia molecular das leucemias infantis, o que contribuiu para a melhor compreensão dos aspectos patológicos e diagnósticos das síndromes mieloproliferativas. (ARAGÃO, 2011).

No âmbito mundial, o câncer representa de 0,5% a 3% de prevalência entre as crianças, se comparadas à população em geral. No Brasil, a partir dos dados obtidos do registro de câncer de base populacional, observou-se que o câncer infantil varia de 1% a 4,6%. No Brasil, 12 a 13 mil crianças manifestam algum tipo de neoplasia maligna. (BARRETO, 2005).

Dentre as neoplasias infantis, a leucemia é o tipo mais comum, representando cerca de 30% de todos os cânceres diagnosticados e a segunda causa de mortalidade entre crianças e adolescentes em todo o Brasil. O câncer é considerado a primeira causa de morte por doença na infância (GALLI; SILVA; MINUZZI, 2014; MARANHÃO; VELOSO; BATISTA, 2012).

O cuidado curativo envolve as fases de diagnóstico, tratamento e controle. O diagnóstico clínico é estabelecido pelos sinais e sintomas apresentados pelo paciente em conjunto com os achados laboratoriais. Laboratorialmente, inicia-se pelo hemograma, no entanto, as alterações na leucometria podem não ser aparentes, podendo-se detectar apenas algum grau de anemia e/ou trombocitopenia, sendo, assim, limitada sua capacidade diagnóstica, o que intensifica a necessidade de estudos mais elaborados para o diagnóstico, como o estudo genético. (RATZ; GATZKE; FRIZZO, 2016).

As leucemias são distúrbios malignos e consistem em uma proliferação ilimitada de leucócitos imaturos nos tecidos hematopoiéticos do organismo. Existem dois tipos principais de células progenitoras no sistema hematopoético: as células progenitoras mieloides que originam as células das linhagens mieloides, eritróide, megacariocítica e monocítica; e as células progenitoras linfóides (Linfoblastos), que originam principalmente os linfócitos T e B. (REILLY, 2005).

A análise molecular se tornou parte essencial tanto no diagnóstico, como no prognóstico e tratamento da leucemia, uma vez que apresenta capacidade de detecção singular para anormalidades moleculares associadas ao desenvolvimento da doença. (VELLOSO et al., 2011).

Atualmente as técnicas de biologia molecular são mais rápidas, sensíveis e específicas para a detecção de anormalidades moleculares em pacientes com Leucemia Mieloide Aguda - LMA, possibilitando ainda que estudos de cariotipagem, como o FISH (Hibridização in situ por fluorescência) e sequenciamento de DNA sejam utilizados para prever o aparecimento da doença, antes mesmo que ela se constitua. (VELLOSO et al., 2011).

O interesse pela temática surgiu mediante a vivência da autora como pediatra e oncologista de um hospital de referência terciária para o tratamento do câncer na infância, cuja incidência de novos diagnósticos só cresce.

Espera-se que as contribuições da pesquisa proporcione também aos profissionais, de medicina uma melhor compreensão acerca da importância do estudo molecular das leucemias mieloides na infância, além de estimular o desenvolvimento de novos estudos na área.

O estudo trouxe como questões norteadoras:

- a) Quais mutações genéticas que ocorrem nas leucemias mieloides agudas infantis, sua frequência e o impacto na sobrevivência desses pacientes?
- b) Qual a relação dessas mutações com o tipo de leucemia ao diagnóstico?

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Identificar os tipos de genes mutados na proliferação da hematopoese que são responsáveis pelo aparecimento de alguns tipos de LMAs na infância,

2.2 ESPECÍFICO

- a) Investigar a relação do tipo de leucemia ao diagnóstico, suas características imunofenotípicas, citogenéticas e o impacto no prognóstico.

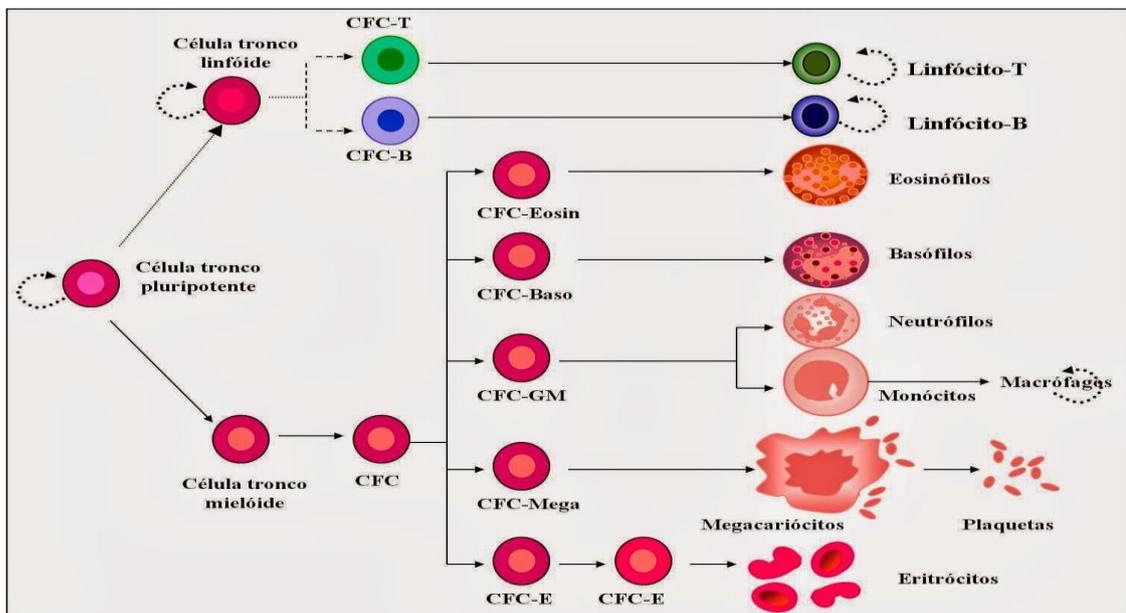
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 LEUCEMIA AGUDA INFANTIL NA ATUALIDADE

3.1.1 Doenças onco-hematológicas

As doenças neoplásicas hematopoiéticas ocorrem a partir de uma ou mais mutações em uma célula progenitora multipotente, com consequente supressão da hematopoese normal. As células malignas substituem progressivamente a população de células sanguíneas saudáveis, podendo resultar em anemia, neutropenia e plaquetopenia (ZAGO et al., 2014).

Figura 1 – Representação simplificada da diferenciação Hematopoiética



Fonte: Adaptado de Wang; Wagers (2011).

As leucemias agudas (LA) pediátricas são neoplasias heterogêneas com maior incidência nas crianças nos primeiros cinco anos de vida, se originam a partir de mutações e adquirem caráter maligno, com o estabelecimento de um ou mais clones pré-leucêmicos durante a vida intrauterina. Seu desenvolvimento envolve um processo multifatorial, provavelmente durante a embriogênese, em que esses fatores refletem alterações genéticas que contribuem para a transformação

leucêmica das células precursoras linfóides e mielóides. Como consequência, ocorrem alterações das funções celulares e processos regulatórios essenciais, manutenção ou intensificação da capacidade de auto-renovação celular ilimitada e dos controles de proliferação normal, bloqueando a diferenciação e promovendo resistência à apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Na Leucemia Aguda ocorre uma parada maturativa celular na fase de blastos, levando à redução dos elementos normais no sangue periférico. O evento inicial que determina a proliferação neoplásica é desconhecido, mas é resultante de mutação somática e ocorre na célula-tronco (stemcell) comprometendo a maturação.

A LMA representa cerca de 15-20% das leucemias agudas da infância. (INCA, 2017).

Na maioria dos casos não há evidência da influência de fatores genéticos, assim como não há diferenças de incidência entre as raças americana, africana e caucasiana, ao contrário da leucemia linfóide aguda (REGO, 2016).

O estágio de maturação das células pode variar e deste modo determinar qual tipo de LMA o paciente tem (QUIXABERA, 2008).

O conhecimento das alterações moleculares que levam ao desenvolvimento de uma neoplasia mielóide, como a leucemia mielóide aguda, é fundamental para definição da conduta terapêutica de cada paciente atualmente. Pacientes com um mesmo diagnóstico apresentam evolução clínica muito diversa, a depender das mutações causadoras da doença.

A biologia molecular das leucemias mielóides agudas tem sido estudada há décadas e pensávamos ter descoberto a maioria dos genes comuns para leucemia.

Nos últimos anos, uma série de anormalidades genéticas foram descobertas nas LMAs com cariótipo normal, particularmente mutações nos genes NPM1 (nucleofosmina), FLT3 (fms-related tyrosine kinase 3); CEPBA (CCAAT/enhancer binding protein α); MLL PTD (myeloid-lymphoid ou mixed-lineage leukemia), NRAS- (neuroblastoma RAS viral oncogene), BAALC (brain and acute leukemia gene), ERG (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene-like), entre outros. Aproximadamente 45% dos casos de LMA possuem cariótipo normal, sendo que, dentre estes, as mutações dos genes NPM1 e FLT3 são as mais prevalentes, correspondendo, respectivamente, a 45 a 55% e a 35 a 45% dos casos.

3.2 CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DA LMA

A primeira tentativa para classificar a LMA foi feita pelo Grupo FAB (Franco-Americano-Britânico), com base apenas na porcentagem dos blastos, na morfologia e no grau de diferenciação da linhagem celular. (VARDIMAN et al., 2009).

O grau de diferenciação dos subtipos FAB M0 - FAB M7 era realizado inicialmente pela citoquímica e posteriormente pela imunofenotipagem das células imaturas. A classificação FAB é baseada essencialmente no conteúdo granular e nos aspectos nucleares dos blastos. (VARDIMAN et al., 2009).

A citometria de fluxo multiparamétrica é essencial na caracterização das neoplasias mieloides e analisa grande volume de células em curto período de tempo, caracterizando vários antígenos por célula. A identificação de antígenos de diferenciação leucocitária, na membrana e intracitoplasmática, possibilita detectar fenótipos mistos, aberrantes e acompanhar doença residual mínima. A expressão de certos antígenos, como CD7, CD11b, CD14, CD56 e CD34 pode estar associada a prognósticos adversos. Fenótipos aberrantes são encontrados em pelo menos 75% das LMAs(13). (VARDIMAN et al., 2009).

A imunofenotipagem mostra características peculiares na LMA com NPM1 mutado, ou seja: expressão antigênica de CD13, CD33 e MPO concomitante com expressões de antígenos monocíticos CD14 e CD11b, e ausência de expressão de CD34. (VARDIMAN et al., 2009).

Como a associação morfologia-genótipo nem sempre apresenta uma correlação exata, e as alterações genéticas podem influenciar as propriedades biológicas e o prognóstico da LMA mais consistentemente que a morfologia, a OMS resolveu classificar as LMAs de acordo com os subtipos citogenéticos e moleculares específicos, com o objetivo de unificar os subtipos e as alterações genéticas das doenças (VARDIMAN et al., 2009).

3.3 NOVA CLASSIFICAÇÃO DA LMA PELA OMS

A nova classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), baseada nas anormalidades citogenéticas ou na citogenética molecular, subdivide a LMA em diversas entidades genético-clínicopatológicas: O advento das técnicas de imunofenotipagem e da citogenética contribuíram para a determinação do subtipo

celular comprometido e das alterações citogenético-moleculares que caracterizam e classificaram as LMAs, que são adotadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (SWERDLOW et al., 2008) A porcentagem de blastos exigida para o diagnóstico de LMA é 20% ou mais de mieloblastos ou monoblastos/promonócitos ou megacarioblastos no SP ou na MO. Havendo menos do que 20% de blastos no SP ou na MO, o diagnóstico de LMA também pode ser feito quando há $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)(p13.1q22)$, $t(16;16)(p13.1;q22)$ ou $t(15;17)(q22;q12)$. (OMS, 2018).

O diagnóstico de leucemia eritróide aguda é feito nos casos com 50% ou mais de precursores eritróides na MO, associado a 20% ou mais de blastos de células não eritróides da MO. Mieloblastos, monoblastos e megacarioblastos são incluídos na contagem dos blastos. Na LMA com diferenciação monocítica ou mielomonocítica, os monoblastos e promonócitos, mas não os monócitos anormais, são considerados e contados como blastos. Eritroblastos não são contados como blastos, exceto no caso da leucemia eritroide pura. (OMS, 2018).

3.3.1 Diagnóstico laboratorial

A contagem diferencial das células sanguíneas é realizada a partir do hemograma, mielograma e da biopsia da MO, nos exames são encontrados na maioria das vezes plaquetopenia, níveis baixos de hemoglobina, anemias geralmente normocíticas e normocrômicas e neutropenia, e a presença de células anormais e imaturas (blastos) na circulação periférica e na MO. A morfologia e a contagem dos blastos são realizadas tanto no sangue periférico como no da MO, esses parâmetros servem como uma suspeita clínica da patologia (GIGLIO, 2007; OLIVEIRA, 2007).

Para classificação e diferenciação do subgrupo de LMA, são feitos testes laboratoriais como colorações citoquímicas, imunofenotipagem, citogenética e a biologia molecular. A classificação do subgrupo da LMA e a determinação do gene acometido não servem somente como base para o diagnóstico, ela é imprescindível também na determinação do melhor tratamento da LMA e estabelece qual será o prognóstico da doença no paciente (SILVA et al., 2006).

3.4 COLORAÇÃO CITOQUÍMICA

A coloração citoquímica é utilizada para diferenciar a linhagem da leucemia mielóide da linfóide, correlacionando-a com outros testes servem como base na classificação das LMA. As colorações foram muito utilizadas na classificação de um grupo de hematologistas francoamericano-britânico (FAB) em 1976 (Tabela 1), porém ela sofreu muitas mudanças e modificações ao longo dos tempos, como o acréscimo da imunofenotipagem durante a sua utilização, já nos dias atuais não é muito usual para classificar as LMAs, mas ela é utilizada para o diagnóstico diferencial da doença (BUENO, 2004; FIGUEIREDO, 2011).

Figura 2 – Representação do critério diagnóstico FAB da LMA

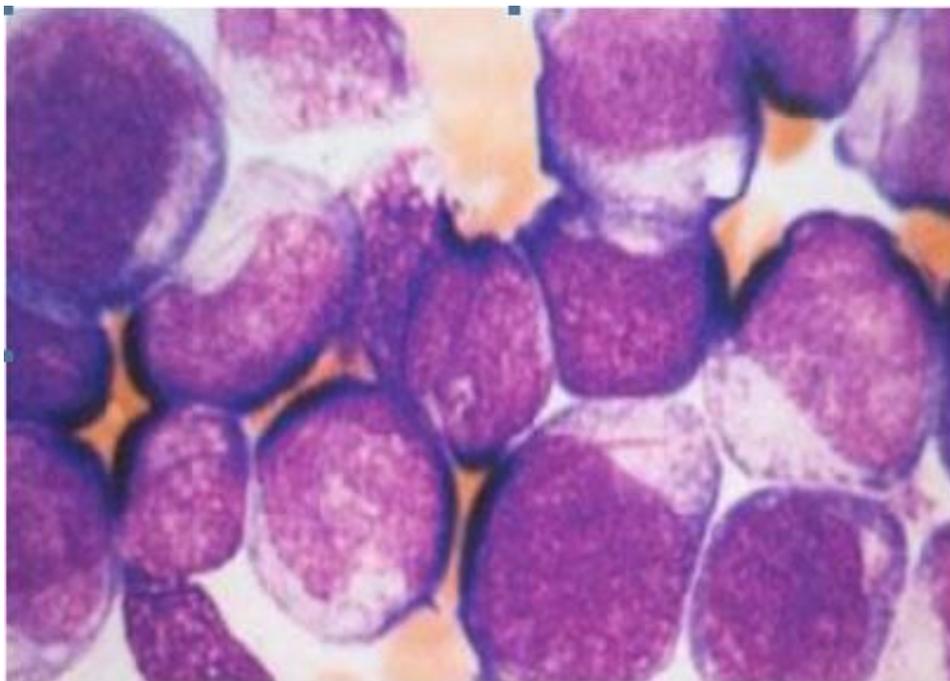
Tipo	Nomenclatura FAB	Crterios para diagnstico
M0	LMA minimamente diferenciada	≥30% de blastos na MO; blastos (+) para pelo menos um marcados monoclonal mielóide (CD13, CD33, MPO, CD11b ou CD15).
M1	LMA sem maturação	≥30% de blastos na MO; Presença de bastonetes de Auer variável, mieloperoxidase (MPO) e sudan Black B (SBB) (+) em > 3% dos blastos.
M2	LMA com maturação	Blastos indiferenciados e diferenciados até a fase promielócito que contém granações primárias abundantes. Bastonetes de Auer são frequente, MPO e SBB Black (+) em > 3% dos blastos.
M3	Leucemia promielocítica aguda hipergranular	Alta % de promielocitos hipergranulares, com ou sem bastonetes de Auer. MPO e SBB (+).
M4	Leucemia mielomonocítica aguda	≥30% de blasto na MO; mieloblastos até segmentados neutrófilos de 30 a 79%; somatório de monoblastos, promonócitos e monócitos de 20 a 80%; alfa-naftil acetato esterase (ANAE) (+) nas células monocíticas; MPO e SBB (+).
M5a	Leucemia monocítica aguda sem maturação	Blastos grandes, com citoplasma abundante, levemente basófilo e com projeções citoplasmáticas. SBB e MPO (-); Bastonetes de Auer raros; ANAE (+) nas células monocíticas. > 80% das células monocíticas.
M5b	Leucemia monocítica aguda com maturação	>80% das células do sangue monocítico ou promonócitos. Na medula óssea, as células são mais indiferenciadas. <20% das células são cloracetato esterase+. Alfaftil esterase + nas células monocíticas.
M6	Leucemia eritróide aguda	>30% de blastos mieloides e >50% de blastos da série vermelha (eritroblastos); Frequentemente te >30% de megaloblastos, formas bizarras.
M7	Leucemia megacariocítica aguda	Células indiferenciadas >30%; Pequenas, semelhantes à linfoblastos no sangue. SBB e MPO (-); blastos demonstrados

Fonte: Adaptado de Wang; Wagers (2011).

Blastos que apresentam bastões de Auer, ou blastos com alguns grânulos azurófilos e com citoquímica positiva para peroxidase ou sudanBlack podem ser classificados como blastos da linhagem mielóide. Os bastões de Auer (Figura 2) estão presentes nos subtipos da classificação FAB como M2, M3, M4 e raros na M5a, já em alguns subgrupos só a utilização da citoquímica não basta para classificação ai entram outros métodos como a imunofenotipagem e a citogenética (OLIVEIRA, 2007).

As colorações mais utilizadas para a classificação citoquímica são a mieloperoxidase (MPO); sudanblack B (SBB); fosfatase alcalina e ácida; naftol AS-D; cloroacetatoesterase (CEA); alfa-naftil acetato esterase (ANAE). A reação positiva nas colorações de MPO e SBB classifica a leucemia como LMA em 60% dos subtipos da LMA os bastonetes de Auer são corados com esses corantes (SILVA et al., 2006).

Figura 3 – Mieloblastos com presença de Bastonetes de Auer



Fonte: SILVA et al. (2006).

3.4.1 Imunofenotipagem

A imunofenotipagem utiliza a técnica de citometria de fluxo (CMF) para diagnosticar, diferenciar a linhagem (mielóide ou linfóide), classificar e monitorar a LMA. A CMF utiliza anticorpos monoclonais marcados com fluorescência que avaliam propriedades celulares, essa técnica analisa um grande número de células em um curto período de tempo, através da citometria de fluxo. Para preparação das lâminas utilizou-se corante eosina e hematocilina.

3.4.2 Biologia molecular da LMA

O conhecimento das alterações moleculares que levam ao desenvolvimento de uma neoplasia mieloide, como a leucemia mieloide aguda, é fundamental para definição da conduta terapêutica de cada paciente atualmente. (OMS, 2018).

Pacientes com um mesmo diagnóstico apresentam evolução clínica muito diversa, a depender das mutações causadoras da doença. Pesquisas apontam que a carência de informações clínicas, como as provenientes das pesquisas de mutações moleculares, dificultam a correta estratificação de risco e o tratamento dos pacientes infantis com LMA no Brasil. Sendo assim, mais que uma tendência da medicina atual, testes como esses são essenciais para a adequada definição terapêutica em hematologia. (INCA, 2017).

Nos estágios iniciais da leucemia, o seu diagnóstico é difícil, porque os sintomas desta doença são semelhantes aos de outras doenças. Conforme as células leucêmicas que ficam acumuladas na medula óssea eliminam a expansão das células progenitoras hematopoiéticas normais, desencadeiam-se inúmeras manifestações clínicas que são observadas no diagnóstico da leucemia aguda, como: anemia, infecções e hemorragias. Relativamente às leucemias mieloides, muito agressivas e de rápido avanço, podendo evoluir para o óbito rapidamente. (INCA, 2017).

Nesse sentido destaca-se a necessidade da realização de um diagnóstico precoce, sensível e que possa inferir acerca do prognóstico e tratamento para possibilitar uma maior chance de cura ao paciente. (INCA, 2017).

As alterações moleculares que ocorrem nas LMAs pediátricas são caracterizadas, em sua maioria, por mutações pontuais e pequenas inserções e deleções gênicas, além de alterações numéricas e estruturais nos cromossomos, como hiperdiploidias e translocações. (OMS, 2018).

As translocações cromossômicas originam subtipos genéticos que apresentam padrões de expressão gênicos únicos e geram fusões gênicas pela recombinação ou justaposição de genes que em condições normais estariam separados, resultando, na maioria dos casos, na formação de uma proteína de fusão com propriedades oncogênicas. O desenvolvimento da LMA na infância tem sido associado a fatores de predisposição genética (síndromes genéticas, como anemia de Fanconi, síndrome de Bloom) e à susceptibilidade genética. (OMS, 2018).

Essa última pode ser representada, entre outras, por polimorfismos nos genes da família da glutathione-S-transferase (GST), que estão envolvidos no metabolismo de várias substâncias cancerígenas, como aquelas presentes na fumaça do tabaco e o benzeno. Além disso, foram descritas mutações germinativas em genes como TP53, RUNX1, GATA2 e CEBPA, identificadas em famílias com uma alta incidência de LMA, sugerindo uma predisposição familiar para o desenvolvimento da doença (HAHN et al., 2011; LINK, 2011; SMITH et al., 2004)

O cariótipo das células leucêmicas, entretanto, é o fator mais importante para se prognosticar a resposta à quimioterapia de indução e a sobrevida global do paciente. (SWIRSKY; RICHARDS, 2011).

Pacientes com citogenética normal e historicamente considerados de prognóstico intermediário são agora divididos em subgrupos moleculares com significativa implicação prognóstica. Por exemplo, a presença da duplicação interna em tandem (ITD) do gene FLT3 (FLT3-ITD) tem sido associada a doença agressiva e de mau prognóstico. (SWIRSKY; RICHARDS, 2011).

Em contraste, pacientes com o gene CEBPA e NPM1 (nucleofosmina1) sem mutações concomitantes com o FLT3 têm um prognóstico significativamente favorável ao tratamento. Algumas mutações, como por exemplo, o gene KIT (receptor tirosinoquinase classe III) associado a t(8;21), podem afastar a classificação inicial "favorável" da LMA. (SWIRSKY; RICHARDS, 2011).

Técnicas de diagnóstico permitem a identificação do tipo celular envolvido na leucemogênese, o que é fundamental para orientar a terapêutica e prever, até certo ponto, o prognóstico das LMAs De acordo com a OMS, para o estabelecimento

do cariótipo da LMA é necessária uma análise citogenética completa, técnica que compreende a análise dos cromossomos em núcleos metafásicos das células da MO. (SWIRSKY; RICHARDS, 2011).

Anormalidades citogenéticas adquiridas são identificadas em 75%-85% de pacientes com LMA (CREUTZIG et al., 2012).

O gene NPM1, localizado no cromossomo 5q35, codifica uma fosfoproteína nucleolar que realiza o transporte entre o núcleo e o citoplasma, e está envolvida diretamente na regulação e estabilidade de proteínas nucleares. A mais frequente mutação consiste na duplicação de quatro pares de bases no éxon 12 (85% dos casos), mas também podem ocorrer outros tipos de inserção de quatro pares de bases na mesma região. Essa mutação causa a localização aberrante da proteína NPM1 no citoplasma. (WECHSLER et al, 2002).

Trabalhos têm demonstrado que as LMAs com cariótipo normal e mutação nos genes NPM1 e CEBPA, ou em ambos, possuem prognósticos favoráveis, enquanto que mutações no gene FLT3 possuem prognóstico desfavorável. Já os casos em que ocorrem mutações simultâneas nos genes FLT3 e NPM1 possuem prognóstico intermediário. (WECHSLER et al, 2002).

A classificação da LMA foi se modificando ao longo dos tempos, no passado era classificada pelas características morfológicas das células, e pela coloração citoquímica que foram muito utilizadas pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) para classificação da doença, que nos tempos atuais não são muito usuais, mais serve como base na diferenciação das LMAs. (ESTEY; DÖHNER, 2007).

A classificação estabelecida como a melhor para definir cada subtipo da LMA e a da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2008, que utiliza por meio da citogenética classificar as LMAs (LICÍNIO, 2010).

Acredita-se que mais de um evento mutagênico seja necessário para a gênese da doença, envolvendo mecanismos de proliferação celular (mutações de classe I, como exemplos BCR-ABL, FLT3, RAS, c-Kit, PTPN11, NF1, TEL-PDGR β) e bloqueio da diferenciação (mutações de classe II, como exemplos CBF β -MYH11, AML1-ETO, TEL-AML1, PML-RARA, MLL, NUP98-HOXA9, PU.1, C/CEP α , AML1, AMLAMP19, CEBPA, NPM1).

Figura 4 – Classificação prognóstica segundo anormalidades citogenéticas e moleculares

Risco prognóstico	Indicadores citogenéticos	Anormalidades moleculares
Prognóstico favorável	inv(16) ou t(16;16) t(8;21) t(15;17)	Citogenética normal: com mutação NPM1 ou mutação CEBPA isolada na ausência de mutação FLT3-ITD
Prognóstico Intermediário	Citogenética normal Trissomia do 8 t(9;11) Outros não definidos	t(8;21), inv(16), t(16;16): com mutação c-KIT
Prognóstico desfavorável	Cariótipo complexo (≥ 3 anormalidades clonais cromossômicas) -5, 5q-, -7, 7q- 11q23 – sem t(9;11) inv(3), t(3;3) t(6;9) t(9;22)	Citogenética normal: com mutação FLT3-ITD

Fonte: OMS (2018).

Figura 5 – Classificação da LMA de acordo com o prognóstico pela citogenética e molecular

Prognóstico	Alteração citogenético e molecular
Favorável	t(15,17)(q22;q21)-PML-RARA t(8;21)(q22;q22)-RUNX1T1-RUNX1 inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.;q22)-CBFβ-MYH11 NPM1 mutado (cariótipo normal)
Intermediário I	CEBPA mutado (cariótipo normal) NPM1 mutado e com FLT3-ITD (cariótipo normal) NPM1 selvagem e com FLT3-ITD (cariótipo normal) NPM1 selvagem e sem FLT3-ITD (cariótipo normal)
Intermediário II	T(9;11)(p22;q23)- MLLT3-MLL Anormalidades citogenéticas não favoráveis ou desfavoráveis
Desfavorável	Inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.3)-RPN1-EV11

Fonte: American Cancer Society (2018).

4 METODOLOGIA

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

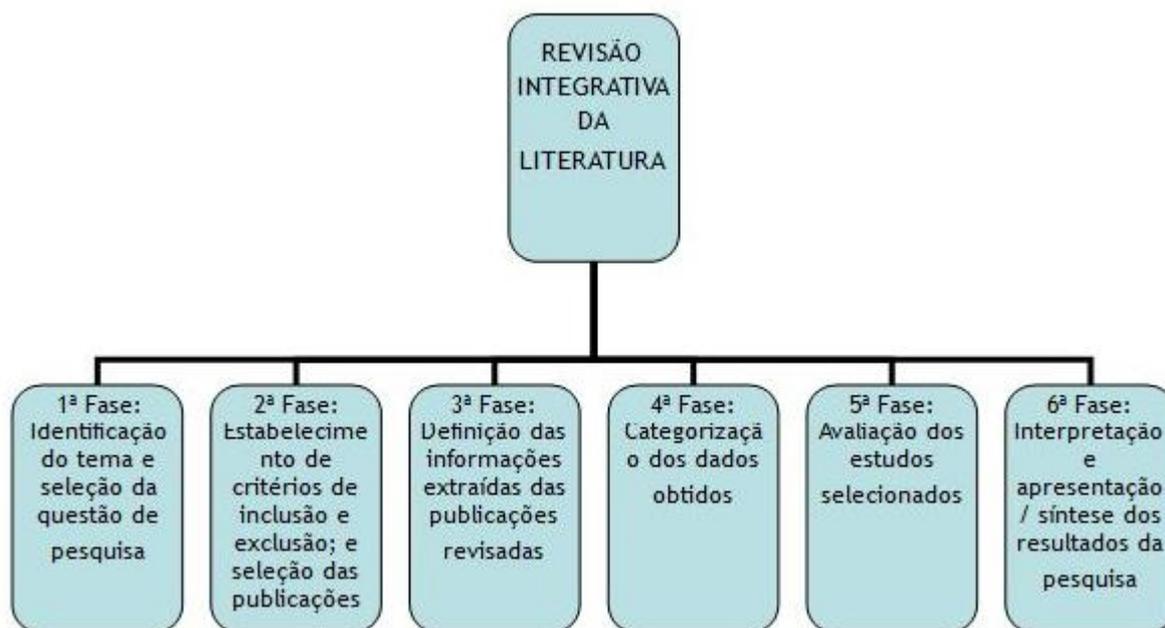
Foi realizada uma revisão da literatura, utilizando a etapa da revisão integrativa, para sistematizar a coleta dos dados.

4.1.1 Desenvolvimento de estratégia de busca

As seguintes fases foram percorridas, conforme preconiza a literatura, estabelecida na figura 3 abaixo:

- a) Estabelecimento da questão de pesquisa;
- b) Estratégias de busca (estabelecimentos dos critérios de inclusão e exclusão, base de dados e seleção dos estudos);
- c) Categorizações dos estudos (extração, organização e sumarização dos dados);
- d) Avaliação dos estudos incluídos na revisão;
- e) Interpretação dos resultados
- f) Síntese do conhecimento.

Figura 6 – Fluxograma da seleção dos artigos incluídos na revisão integrativa



Fonte: Mendes; Galvão e Silveira (2008).

Foram selecionados os seguintes Descritores em Ciência da Saúde (DeCS) e MESH: Leucemia e genética, leucemia e biologia molecular, leucemia, criança e cariótipo, biologia molecular e LMA, LMA e genética, prognóstico e LMA na infância, genética e LMA, cromossomo e LMA, sobrevida e LMA.

Os descritores foram cruzados separadamente e em combinação nas seguintes bases de dados: *Lilacs*, *Pubmed (Medline)* e *scielo*.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os artigos incluídos no estudo atenderam aos critérios de inclusão: artigos publicados cuja temática respondessem ao problema de investigação; população de investigação ter sido crianças, idioma em português e inglês, e disponíveis na íntegra.

Foram incluídos no trabalho os artigos de metodologia quantitativa ou qualitativa, sobre os achados genéticos e moleculares da leucemia mieloide aguda na infância e sua relação com o prognóstico e sobrevida livre de doença, publicados nos idiomas português e inglês, entre 2010 a 2019, disponíveis nas bases de dados

selecionadas. Os anos selecionados tem relação com a descoberta da genética câncer e certamente pela escassez de artigos científicos.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

O critério de exclusão adotado foi a indisponibilidade dos artigos na íntegra.

Os critérios de exclusão utilizados foram publicações que não abordavam questões específicas ao tema.

4.4 CATEGORIZAÇÃO DOS DADOS OBTIDOS

Para auxiliar na escolha da melhor evidência possível, foi realizada uma hierarquia das evidências, segundo o delineamento da pesquisa, a fim de compor a amostra de estudos.

Essa classificação está apresentada na Figura 7.

Figura 7 – Sistema de classificação das evidências, segundo níveis hierárquicos de qualidade

Nível de Evidência	Descrição
1	Evidências resultantes da meta-análise de múltiplos estudos clínicos controlados e randomizados
2	Evidências obtidas em estudos individuais com delineamento experimental
3	Evidências de estudos quase-experimentais;
4	Evidências de estudos descritivos (não-experimentais) ou com abordagem qualitativa
5	Evidências provenientes de relatos de caso ou de experiência;
6	Evidências baseadas em opiniões de especialistas

Fonte: Brasil (2014).

A busca nas bases de dados encontrou o seguinte número de estudos: LILACS (53); PUBMED (65); SCIELO (36) totalizando 154 estudos a serem revisados.

Após a exclusão das duplicatas, restaram 80 artigos a serem analisados. Muitos estudos foram excluídos após a leitura dos resumos, uma vez que não iam de encontro aos critérios de inclusão. Alguns estudos mostravam resumos relevantes, no entanto, foram excluídos após a leitura completa pelo autor da investigação por não tratarem de prognóstico relacionado a biologia molecular na leucemia infantil. Outros estudos foram excluídos por não estarem de acordo com os critérios metodológicos da classificação de nível de evidência. Após análise rigorosa dos estudos, foram selecionados 9 artigos.

Quadro 1 – Artigos selecionados, cruzamentos e base de dados

CRUZAMENTOS	BASES DE DADOS		
	Lilacs	Pubmed	SciELO
Leucemia aguda e citogenética			
Biologia molecular na leucemia infantil	20	23	10
Cariótipo e leucemia	15	17	07
Imunofenotipagem e leucemia	05	10	05
Mutações na leucemia mieloide aguda	10	15	14
Total de artigos pré selecionados	53	65	36
Após leitura dos artigos	15	20	10
Amostra final	01	07	01

Fonte: Elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Quadro 2 – Nível de evidência dos artigos

N	Autores	Delineamento do Estudo	Nível de Evidência
1	Reilly JT. WANG & WAGERS, 2011	Leucemia mieloide aguda e a inv do cromossomo 16	1
2	O. Bacher U, Schnittger S, Haferlach T.	Testes genéticos e avaliação do prognóstico	3
3	Schoch C, Kern W, Schnittger S, Büchner T, Hiddemann W, Haferlach T.	Genética molecular na leucemia mieloide aguda infantil	1
4	Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Chen H, Kittles RA, Vukosavljevic	Aberrações cromossômicas na LMA infantil	2
5	Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, Van Zelderen-Bhola SL, GerssenSchoorl KB, Mellink CH, et al	Mutações e prognóstico na leucemia mieloide aguda	1
6	Vardiman JW, Bruning RD, Arber DA, Le Beau MM, Porwit A, Tefferi A	Citogenética da LMA	1

Fonte: Elaborado pela autora.

A OMS (2008) estabeleceu, para leucemia mieloide aguda (LMA), sete subcategorias: LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes, LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia, neoplasias mieloides associadas ao tratamento, LMA não categorizada nos itens anteriores, sarcoma mieloide, proliferação mieloide relacionada com síndrome de Down e neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitoides.

Embora alguns trabalhos mostrem que os critérios citogenéticos sejam importantes para a diferenciação de prognóstico em favorável, intermediário e desfavorável, outros demonstram que a avaliação apenas do cariótipo não é satisfatória para uma correta estratificação do prognóstico de pacientes com LMA. Além disso, sabe-se que só as alterações cromossômicas não são suficientes para o desenvolvimento das leucemias agudas e que cerca de 45% dos pacientes com LMA possuem cariótipo normal.

Assim, torna-se cada vez mais evidente que as alterações que desregulam genes envolvidos na regulação de vias intracelulares de transdução de sinais de morte e proliferação celular atuam em colaboração com os fatores resultantes das modificações citogenéticas.

Desse modo, a investigação de possíveis alterações é determinante para estratificação do prognóstico, o que serve de ferramenta para prever o risco de recaída, a resistência à terapia e a sobrevida livre de doença.

Speck e Gilliland sugerem a seguinte classificação das mutações encontradas em pacientes com LMA: aquelas que conferem vantagens proliferativas e/ou de sobrevivência aos progenitores hematopoéticos, mas não afetam a diferenciação (mutações de classe I) e aquelas que afetam a transcrição ou componentes do complexo transcricional e prejudicam a diferenciação hematopoética (mutações de classe II).

Assim, as mutações no gene FLT3, cKIT e N-RAS pertencem às mutações de classe I, e as mutações no gene NPM1, C/EBPA e AML1/ETO e anormalidades em CFBF/MYH11, PML/RARA e MLL são mutações de classe II. A classificação proposta pela OMS, em 2008, sugere um novo subtipo, de caráter provisório, na subcategoria LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes: a LMA com mutação no gene NPM1.

Segundo a OMS, as mutações no gene FLT3 estão associadas a mais de uma subcategoria e, por esse motivo, não receberam subtipo especial para tal mutação, não obstante possuam importância clínica. Com isso, vários grupos de pesquisa enfatizam que se deve fazer a pesquisa das mutações no gene FLT3 e no gene NPM1, pois possuem relevância clínica, indicada para todos os pacientes portadores de LMA, como fator determinante para uma correta estratificação de prognóstico.

Sabe-se que mutações no gene FLT3 estão associadas a maior propensão de recaída e menor sobrevida global livre de doença, possuindo conseqüentemente prognóstico desfavorável, enquanto a presença da mutação no gene NPM1 é de prognóstico favorável, com maior sobrevida livre de doença para indivíduos com LMA.

A importância clínica das mutações em FLT3 na LMA foi estabelecida a partir da correlação entre a presença de DIT associada com leucocitose, alto percentual de blastos e resposta terapêutica desfavorável. Alguns grupos detectaram ainda a presença da mutação do tipo FLT3-DIT concomitante a outras alterações, como, por exemplo, a t(15;17), indicando prognóstico favorável; já a presença da t(6;9) está associada a prognóstico desfavorável.

No entanto, o valor prognóstico da DIT no gene FLT3, associado a outras alterações, ainda não foi bem estabelecido, uma vez que a literatura traz trabalhos com DIT associado a altos níveis de recaída, com os níveis de remissão iguais aos do grupo sem essa mutação, ou até mesmo associado à resposta clínica favorável.

Mutações pontuais no gene FLT3 acometem a alça de ativação do segundo domínio quinase, e a mutação mais comum resulta da substituição de um resíduo de ácido aspártico na posição 835 do éxon 20 (anteriormente conhecido como éxon 1 por um resíduo de tirosina (D835).

A alça de ativação é um componente comum aos receptores tirosina-quinase e tem como função bloquear o acesso de ATP e do substrato ao domínio quinase quando o receptor está inativo. Com uma mutação pontual nessa região, o receptor se encontra autoativado e, assim, como na presença da DIT, o controle da cascata de sinalização promovido por FLT3 é perdido, o que leva à proliferação celular.

A mutação do tipo FLT3-D835, também conhecida por FLT3-TKD, foi descrita em cerca de 5%-10% dos pacientes com LMA e tem sido relacionada a um prognóstico desfavorável. Na presença das duas alterações em FLT3, a baixa incidência (1,7%) relatada dificulta a avaliação do valor clínico; no entanto, o prognóstico desfavorável parece prevalecer e estudos *in vitro* sugerem o desenvolvimento de resistência a terapias convencionais e específicas para o receptor.

De maneira geral, as alterações em FLT3 têm sido consideradas como fator de prognóstico, já incorporadas para determinação de risco e intensificação terapêutica nos protocolos recém-atualizados nos países desenvolvidos.

Por mais que haja discordâncias quanto à agressividade da doença, todos os estudos revelaram leucometria elevada e menor taxa de remissão na presença da mutação. Alguns estudos avaliam também a possibilidade de utilização das alterações em FLT3 como marcadores tumorais para identificação de doença residual mínima.

O fato é que foram observados ganhos e perdas de mutações no decorrer do tratamento, o que restringe o valor de FLT3 como marcador indicativo de recaída. Pacientes portadores de LMA com mutação no gene NPM1 estão associados a um prognóstico favorável; porém, se esse paciente apresentar

concomitantemente a DIT para o gene FLT3, seu prognóstico será considerado desfavorável.

A Citogenética e a Biologia molecular (BM) são utilizadas para a determinação dos genes mutados, com isso determinar o tipo de prognóstico e tratamento do paciente, e também para o acompanhamento evolutivo do tratamento da doença, se não houve uma recidiva. O prognóstico é determinado pelas alterações cromossômicas, como translocações, inversões, deleções e alterações de expressão gênica. Os métodos para a detecção dessas alterações no cromossomo são a reação polimerase em cadeia da transcrição reversa (RT-PCR) e a hibridização por fluorescência in situ (FISH) (PASQUALUCCI et al., 2006; QUIXABEIRA, 2008).

A translocação é o resultado de uma mudança de posição de um determinado gene ou fragmento para outro local do cromossomo, comprometendo assim a função normal do cromossomo. A deleção e inversões de fragmentos de cromossomos também estão relacionadas no aparecimento da LMA. Com o avanço da citogenética e a BM a determinação do gene mutado esta bem mais rápida e fidedigna, e dependendo do gene mutado da para saber se a doença é de bom prognostico ou não.

As alterações cromossômicas $t(8;21)(q22;q22)$ e $inv(16)(p13;q22)$, que geram os rearranjos gênicos RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO) e CBFβ-MYH11, respectivamente, fazem parte do grupo citogenético de prognóstico favorável.

Fisiopatologicamente, essas duas alterações são relacionadas, uma vez que alteram as subunidades alfa e beta, respectivamente, do complexo proteico chamado core bindingfactor (CBF), sendo, então, classificadas como leucemias CBF.

Porém, cerca de 50% dos pacientes portadores de leucemia CBF apresentarão recaída da doença e altas taxas de mortalidade. Detecção de mutações dos éxons 8 e 17 do gene KIT Como as mutações no gene KIT presentes em CBF LMA concentram-se nos éxons 8 e 17.

As mutações genéticas são classificadas em dois grupos, mutações de classe I que estão envolvidos nos mecanismos de proliferação celular e as de classe II que são mutações que afetam a transcrição, que prejudicam a diferenciação hematopoiética. Nas mutações cerca de 50% das LMAs são de cariótipo normal, as mutações mais frequentes são as mutações dos genes NPM1 classificado com

classe II com cerca de 45 a 55% dos casos e FLT3 classe I com 35 a 45% dos casos de LMAs, as mutações menos frequentes são a: MLL (leucemia de linhagem mista), NRAS, BAALC, ERG e entre outras (VELLOSO et al, 2011).

5.1 MUTAÇÃO NO GENE NPM1

O gene NPM1 é responsável pela síntese da nucleofosmina, conhecida também como B23, numatrina1 e ou NO38, localiza-se no cromossomo 5q35, esse gene contém 12 éxons, ele inclui um domínio N-terminal necessária para a formação de dímeros e hexâmeros NPM, a heterodimerização domínio implicado no direcionamento de outras proteínas, tais como nucleolin, ciclina-dependente e inibidor da quinase, e também um C-terminal de ligação de ácido nucleico domínio essencial, para a associação com o RNA envolvido em processamento ribossomal de RNA (CHEN et al., 2006).

A NPM1 é uma fosfoproteína nucleolar que realiza o transporte entre o núcleo e o citoplasma e tem contato com várias outras proteínas. A mutação mais frequente e a que ocorre a duplicação de quatro pares de bases no éxon 12 ocorre em cerca de 85% dos casos. As alterações no gene como inserções ou deleções de fragmentos, as alterações no gene e classificado de A a F (Figura 5), em estudos recentes revelam que cerca de 75 a 80% dos casos das alterações no gene NPM1 são classificadas como tipo A.

Mutações NPM1 classificadas com A são de prognóstico favorável e os classificados com não A são de prognóstico desfavorável (SUZUKI et al. 2005; LICÍNIO, 2010; VELLOSO et al, 2011).O gene NPM1 está envolvido também com o processamento de RNA, manutenção genômica, participação nos processos de reparo do DNA e na regulação da transcrição por meio da condensação e descondensação da cromatina.

As mutações NPM1 estão presentes em várias células mieloides e são detectadas nas linhagens mieloides, monocíticas, eritróides e megacariócitos (PASQUALUCCI et al., 2006; RAU, 2009). Além da detecção das alterações no gene pela genética, existe um meio de detectar as alterações pelas características fenotípicas analisando a proteína anormal no gene NPM1. A maioria dos casos das mutações no gene NPM1 é de cariótipo normal e uma minoria de anormal, entre os

dois casos não existe diferença na sobrevida dos pacientes, por isso independente do cariótipo elas são consideradas como um só subtipo (LICÍNIO,2010).

5.2 MUTAÇÃO NO GENE FLT3

O gene FLT3 é um membro da família da tirosina de classe III do receptor de tirosinoquinase, responsável pela sobrevida, proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas, esse gene localiza-se no cromossomo 13q12.

Nessa mutação ocorre uma modificação na estrutura do receptor, assim causando a super expressão da proteína FLT3, resultando na ativação do receptor tirosina-quinase permanentemente independente de ligante, então acarretando no aumento proliferativo descontrolado, e na inibição da apoptose das células mieloides anormais ou com alterações, aproximadamente 30% dos casos de LMA fazem parte da mutação do gene FLT3 (VELLOSO et al, 2010; WHITMAN et al, 2001; OLIVEIRA, 2008).

A mutação é dividida em dois tipos principais de alteração: Duplicação Interna em Tandem (DIT) e mutações pontuais.

O subtipo DIT e uma alteração que ocorre nos éxons 14 ou 15 acometem cerca de 20 a 35% dos casos de LMA é ela e a segunda mutação mais frequente na LMA, a incidência de FLT3-DIT para pessoas de mais de 60 anos e de 30 a 35% dos casos e já em crianças são de 20 a 25% dos casos.

A alteração DIT é responsável pela autofosforilação dos receptores FLT3 e assim promovendo a ativação permanente desse receptor, e então aumentando a proliferação e ocorrendo um crescimento aberrante das células.

As reações clínicas da alteração nesse gene são a leucocitose e alto percentual de blastos na medula e na circulação sanguínea, essa mutação e determinada como prognóstico desfavorável.

Em alguns estudos realizados quando a mutação FLT3-DIT conjunto com outra mutação como na t(15;17) ela e estabelecida como uma mutação de prognóstico favorável, mais já com a t(6;9) e de prognóstico desfavorável (LICÍNIO, 2008).

Mutação pontual D835 ou FLT3-TKD ela ocorre na posição 835 do éxon 20, por isso chamada de D835, acomete cerca de 8 a 12% dos casos de LMA, ela e de um prognóstico desfavorável, em estudos in vitro demonstram que ela e

resistentes a terapias convencionais, e só respondem ao tratamento se for específicas para o receptor.

A mutação D835 altera a funcionalidade da alça do segundo domínio quinase que esta localizada nos receptores de tirosina-quinase, a função dele e de bloquear o acesso de ATP e do substrato para o domínio quinase, quando o receptor está inativo. A mutação D835 provoca a ativação permanente do receptor quinase provocando uma proliferação descontrolada de blastos na MO (YANADA et al, 2005; OLIVEIRA, 2008; LICÍNIO, 2010).

O prognóstico das mutações da LMAs é muito relativo, pois a estudos que relatam que a presença de mais de uma mutação em pacientes, cujo uma mutação e considerado de prognóstico favorável com a presença de outra desfavorável, essa mutação será considerada de prognóstico.

Ressalta-se a importância da realização de mais estudos sobre esta temática, tendo em vista a escassez de pesquisas, uma vez que as recomendações da OMS (2018), traz como objetivos o subsidio de novas pesquisas dentro da biologia molecular, visto a relevância clínica como meta de cura da leucemia mieloide aguda em 60% das crianças fato que justifica as limitações do presente estudo.

6 CONCLUSÃO

Após o término deste estudo, foi possível observar que o estudo da biologia molecular vem evoluindo cada vez mais com o avanço da tecnologia e com as novas técnicas, fato esse, que proporciona o diagnóstico cada vez mais preciso e rápido da doença.

Os estudos mostram que a melhora, rapidez e eficácia do diagnóstico da leucemia mieloide aguda foram possível pela utilização do vários métodos laboratoriais, como a utilização do hemograma, mielograma, colorações citoquímicas, imunofenotipagem, citogenética e a biologia molecular favorecendo a descoberta da doença cada vez mais precocemente e com uma melhor exatidão na determinação do tipo de leucemia mieloide aguda, assim, estabelecendo o tratamento adequado ao paciente.

Conclui-se também que com o auxílio da citogenética e da biologia molecular para o diagnóstico da doença, foi possível determinar as duas principais mutações nos genes causadores da leucemia mieloide aguda como a mutação no gene NPM1 e FLT3, assim, com a determinação do gene mutado é de suma importância na determinação do prognóstico e do tratamento adequado da doença, observou-se também que a frequência das mutações no gene NPM1 e de um prognóstico favorável, ou seja, de maior chance de remissão e regressão completa da doença, ao contrario do gene FLT3 que e de um prognóstico desfavorável.

Por intermédio do estudo observou-se também a importância das diversas áreas como a hematologia, citoquímica, imunologia, citogenética e a biologia molecular, juntas, auxiliam no diagnóstico da doença.

REFERÊNCIAS

ARAGÃO, J. Introdução aos estudos quantitativos utilizados em pesquisas científicas. **Revista Praxis**, v. 3, n. 6, ago. 2011. Disponível em: <<http://web.unifoa.edu.br/praxis/numeros/06/59.pdf>>. Acesso em: 5 out. 2014.

BARRETO, E. M. T. Acontecimentos que fizeram a história da oncologia no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 267-275, 2005. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/rbc/n_51/v03/pdf/historia_inca.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. **Diretrizes metodológicas: Sistema GRADE**. Manual de graduação da qualidade da evidência e força de recomendação para tomada de decisão em saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 72 p.

BYRD, J. C. et al. Patients with t(8;21)(q22;q22) and acute myeloid leukemia have superior failure-free and overall survival when repetitive cycles of high-dose cytarabine are administered. **J Clin Oncol.**, v.17, n. 12, p. 3767-3775, 1999.

CAIROLI, R. et al. Prognostic impact of c-KIT mutations in core bindingfactor leukemia's: an Italian retrospective study. **Blood**, v. 107, n. 9, p. 3463-3468, 2006.

DÖHNER H. et al., European Leukemia Net. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. **Blood**, v. 115, n. 3, p. 453-474, 2010.

ESTEY, E.; DÖHNER, H. Acute myeloid leukaemia. **Lancet**, v. 368, p. 9550-:1894-907, 2006.

GARI, M. et al. c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol.**, v. 105, n. 4, p. 894-900, 1999.

GUPTA, V.; TALLMAN, M. S.; WEISDORF, D. J. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia: myths, controversies, and unknowns. **Blood.**, v. 117, n. 8, p. :2307-2318, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER . Leucemias agudas na infância e na adolescência. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 245-5, 2001.

REILLY, J. T. Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? **Br J Haematol.**, v. 128, n. 1, p. 18-34, 2005.

VELLOSO, E. D. et al. Molecular and cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia: review and case studies. **Einstein**, v. 9, n. 2, p. 184-189, 2011.

WANG, L. D.; WAGERS, A. J. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 12, n. 10, p. 643-55, set. 2011.

WECHSLER, J. Et al. Acquired mutations in GATA-1s in the mega karyoblastic leukemia of down syndrome: *Nature Genetics*, v. 32, p. 148-152, 2002.

ZERBINI, M. C. N. et al . Classificação da Organização Mundial da Saúde para os tumores dos tecidos hematopoético e linfóide. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 57, n. 1, p. 6-73, fev. 2011.