

EXPRESSÃO DO GENE HÍBRIDO BCR-ABL RESULTANTE DA TRANSLOCAÇÃO ENTRE OS CROMOSSOMOS 9 E 22 NA OCORRÊNCIA DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

EXPRESSION OF THE BCR-ABL HYBRID GENE RESULTING FROM THE TRANSLOCATION BETWEEN CHROMOSOMES 9 AND 22 IN THE OCCURRENCE OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

ALINE LEAO OLIVEIRA REIS¹, JOZIEL DA SILVA VASCONCELOS¹, LORRAYNE CRISTINA ALVES DA SILVA¹, LUY HENRIQUE SIQUEIRA AREDES¹, MARIANA CORREA NANTES¹, RAFAELA ARAÚJO GUEDES¹, ARILTON JANUÁRIO BACELAR JÚNIOR^{2*}, JANE LUIZA DOS SANTOS³, MARINA DE OLIVEIRA PARO⁴

1. Acadêmicos do curso de graduação em Biomedicina da Faculdade Única de Ipatinga; 2. Professor de Imunologia do curso de Farmácia e Biomedicina da Faculdade Única de Ipatinga -MG; 3. Docente do Curso de Graduação em Biomedicina da Faculdade Única de Ipatinga, Especialista em Farmacologia e Toxicologia; 4. Coordenadora e Docente do Curso de Graduação em Biomedicina da Faculdade Única de Ipatinga.

* Rua Salermo, 299, Betânia, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil. CEP: 35164-779. dr.arilton@gmail.com

Recebido em 14/11/2018. Aceito para publicação em 10/12/2018

RESUMO

A Leucemia Mielóide Crônica é uma doença mieloproliferativa caracterizada pela presença do cromossomo *Philadelphia*, o qual expressa um gene que codifica uma proteína com atividade acentuada de uma tirosina quinase, que ocasiona amplificação das vias de sinalização do processo celular, induzindo a medula óssea gerar clones malignos constantemente. É constituída de três fases: a crônica, pode ser assintomática ou apresentar alguns sintomas como esplenomegalia; acelerada, observa-se perda da diferenciação celular e a blástica, evidencia quadro leucêmico agudo. O diagnóstico é realizado por meio de exames físicos e laboratoriais; além dos exames citogenéticos e testes de biologia molecular. **Objetivos:** Realizar uma revisão bibliográfica sobre a expressão do gene híbrido BCR-ABL na ocorrência da Leucemia Mielóide Crônica de forma a entender a hematopoiese, identificar as vias sinalizadoras que regulam os processos celulares; conceituar e citar incidência da doença; identificar as fases clínicas e suas respectivas sintomatologias, caracterizar o diagnóstico clínico e laboratorial, além dos exames citogenéticos e de biologia molecular. **Metodologia:** O presente trabalho consistiu em uma revisão de literatura com caráter descritivo, sendo utilizados somente livros e documentos publicados entre os anos de 2013 e 2018 encontrados nas bases de dados eletrônicas publicados em periódicos nacionais, como Google Acadêmico e SciELO.

PALAVRAS-CHAVE: Leucemia, gene, diagnóstico.

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia is a myeloproliferative disease characterized by the presence of the Philadelphia chromosome, which expresses a gene that encodes a protein with a marked tyrosine kinase activity, that causes amplification of cell signaling pathways, inducing the bone marrow to generate malignant clones constantly. It consists of

three phases: chronic, which may be asymptomatic or present some symptoms such as splenomegaly; accelerated, where there is loss of cell differentiation and blast, which shows acute leukemia. The diagnosis is made through physical and laboratory tests; in addition to cytogenetic tests and molecular biology tests. **Objectives:** To carry out a bibliographic review on the expression of the hybrid BCR-ABL gene in the occurrence of Chronic Myeloid Leukemia in order to understand hematopoiesis, to identify the signaling pathways that regulate cell processes; conceptualize and cite incidence of the disease; identify the clinical phases and their respective symptomatologies, characterize the clinical and laboratory diagnosis, besides the cytogenetic and molecular biology exams. **Methodology:** The present work consisted of a literature review with a descriptive character, using only books and documents published between the years of 2013 and 2018 found in the electronic databases published in national journals, such as Google Academic and SciELO.

KEYWORDS: Leukemia, gene, diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é definida como uma doença mieloproliferativa clonal das *stem cells* da medula óssea, caracterizada por leucocitose com desvio á esquerda não escalonado e esplenomegalia. Cerca de 95% dos casos é decorrente da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 que resulta no cromossomo Philadelphia (Ph), em que há a expressão de um gene híbrido devido a junção do gene *abl* do cromossomo 9 e do gene *bcr* do cromossomo 22¹.

A expressão do gene BCR-ABL produz uma proteína quimérica com atividade tirosina-quinase (TK) anormal, o que ocasiona a amplificação das vias de sinalização reguladoras do processo hematopoiético. A desregulação das vias induz a medula óssea a proliferar

excessivamente clones da linhagem mielóide, resultando em perda progressiva da diferenciação celular e com a capacidade de defesa reduzida, tornando o indivíduo mais susceptível a infecções oportunistas².

Esta neoplasia hematológica expressa quadro clínico heterogêneo tanto na sintomatologia quanto nas análises laboratoriais. É classificada em três fases: a fase crônica (FC), podendo ser assintomática ou apresentar alguns sintomas como fraqueza e perda ponderal de peso e ainda observa-se grau de maturação celular; a fase acelerada (FA) em que há perda da diferenciação celular e manifesta-se evidentemente a anemia e a fase blástica (FB), em que a doença evolui-se para um quadro leucêmico agudo³.

Justifica-se a realização deste estudo quanto à alteração cromossômica na Leucemia Mielóide Crônica, por a mesma apresentar alto índice de morbimortalidade e difícil cura, uma vez que é diagnosticada tardiamente, em virtude disto, vem se tornando cada vez mais alvo de gestores de saúde pública no quesito de diagnóstico e tratamento.

Os objetivos deste trabalho foram realizar uma revisão bibliográfica sobre a expressão do gene híbrido BCR-ABL resultante da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 na ocorrência da Leucemia Mielóide Crônica, bem como entender a formação da célula hematopoiética, além de identificar as vias sinalizadoras que regulam os processos celulares; conceituar a Leucemia Mielóide Crônica; citar sua incidência; correlacionar o cromossomo *Philadelphia* e sua influência na ocorrência desta doença; identificar as fases clínicas e suas respectivas sintomatologias; caracterizar o diagnóstico clínico e laboratorial, além dos exames citogenéticos e de biologia molecular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho consistiu em uma revisão de literatura com caráter descritivo. Essa busca literária foi criteriosa, foram selecionados 44 materiais de acordo com o objetivo do estudo e o ano de publicação, sendo utilizados somente livros e documentos publicados entre os anos de 2013 e 2018.

Realizou a pesquisa a partir de textos encontrados nas bases de dados eletrônicas publicados em periódicos nacionais, como Google Acadêmico, SciELO, utilizando as seguintes palavras-chave: sistema hematopoiético, hematopoiese, leucemia mielóide crônica, vias de sinalização da hematopoiese, translocação entre os cromossomos 9 e 22.

Selecionou-se artigos, dissertações, teses, monografias e livros cujo critério de inclusão foi assuntos relacionados ao tema, utilizando materiais bibliográficos da língua vernácula e estrangeira (inglês e espanhol).

3. DESENVOLVIMENTO

Sistema Hemapoiético

O tecido hematopoiético ou tecido sanguíneo é originado a partir de uma única célula estaminal hematopoiética (CEH) indiferenciada, a qual é responsável por produzir todos os componentes celulares do sangue através de um processo complexo hierárquico e sob influência de fatores de crescimento e de diferenciação².

As primeiras células-tronco hematopoiéticas (CTH) surgem no decorrer da formação fetal (0 a 4ª semana) no saco vitelino, porém, não são as CTH definitivas, por ainda serem incapazes de restaurar a hematopoiese. São nas regiões conhecidas como Aorta-Gônada-Mesonéfrons e na placenta que são encontradas as primeiras células com características funcionais de células-tronco (CT) adultas. Posteriormente, entre a 4ª e 31ª semanas, as CT migram para o fígado, principal local de expansão destas células, e também para o baço; próximo ao nascimento a produção passa a suceder-se na medula óssea (MO), que é o principal sítio hematopoiético na vida adulta⁴.

A CEH apresenta duas características: a autorrenovação, onde a CT é capaz de fabricar uma nova célula idêntica a ela, para que ocorra a manutenção das CTs disponíveis; e a diferenciação, a qual é capaz de gerar células distintas de si, que são chamadas de células progenitoras multipotentes (CPM)⁵.

É através da CPM que todos os precursores das linhagens sanguíneas são formados: uma célula mielóide progenitora (CMP) que formará a linhagem mielóide; outra célula linfóide progenitora (CLP) que originará a linhagem linfóide. O processo de proliferação e diferenciação das células ocorre através de fatores estimuladores de crescimento, os quais vão direcionar o percurso da CT antes de se iniciar a maturação. Os principais fatores de crescimento são: fatores de CT, que agem exclusivamente nas CT e os fatores estimuladores de colônia, onde mais de uma unidade formadora de colônia (CFU) pode possuir receptores para o mesmo fator estimulador. Quanto ao processo de formação da série vermelha, a eritropoietina é fundamental para que a eritropoiese ocorra de forma correta⁶.

As CLPs formarão os linfócitos B e T e as células *natural killer*, já as CMPs constituirão os granulócitos, macrófagos, as plaquetas e os eritrócitos como representa o esquema da Figura 1. Ao final do processo hematopoiético, as células do sangue diferenciadas atingem a circulação periférica com a finalidade de exercerem suas funções específicas no sistema imune⁷.

Para que esses processos ocorram de maneira adequada, há uma regulação muito fina que se dá através das interações das CTHs com os diversos tipos celulares que compõem o estroma hematopoiético, o qual é promovido por sinalizações moleculares induzidas pelos nichos, ligados a fatores intrínsecos. A via vírus do sarcoma de rato (RAS) juntamente com a via janus quinase - sinal transdutor e ativador de transcrição (JAK-STAT) são responsáveis pela diferenciação e proliferação das CEHs; já a via

fosfatidilinositol 3 – quinase (PI3K) possui papel fundamental no processo de sobrevivência e apoptose celular; outra via importante na hematopoiese é a quinase de adesão focal (FAK), pois regula a sobrevivência e a adesão celular das CTs em seus nichos⁸.

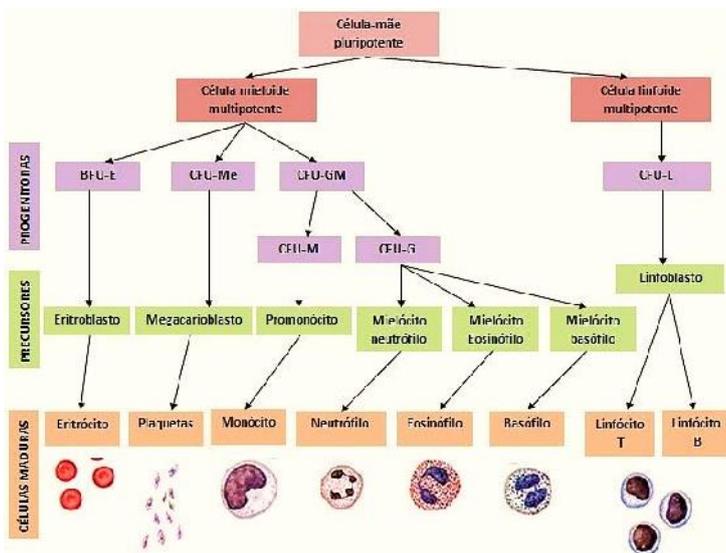


Figura 1. Cascata de diferenciação hematopoiética. (BFU-E: Unidade formadora de blastos eritróides, CFU-Me: CFU megacariocítica; CFU-GM: CFU granulomonocítica; CFU-M: CFU monocítica; CFU-G: CFU granulocítica; CFU-L: CFU linfocítica). **Fonte:** Fernandes, 2016.

Existem dois tipos distintos de nicho localizados na MO para as CTHs: o nicho endosteal ou osteoblástico e o nicho vascular⁹. No nicho endosteal as CTHs estão em contato íntimo com os osteoblastos presentes na superfície interior da cavidade do osso. Já o nicho vascular, é localizado na região sinusoidal próximo aos vasos sanguíneos, este microambiente promove a proliferação e diferenciações das CTHs. A hematopoiese ocorre nos espaços extravasculares entre os vasos sinusoidais da MO¹⁰.

Leucemia Mielóide Crônica
Definição e Epidemiologia

A LMC é uma neoplasia mieloproliferativa clonal caracterizada por leucitose á esquerda não escalonado, com a presença do cromossomo *Philadelphia* (Ph), resultando na proliferação desordenada das células da linhagem mielóide produzidas pelas células-tronco multipotentes da MO¹¹.

Esta neoplasia hematológica corresponde epidemiologicamente 15 a 20% dos casos de leucemias e com incidência de um a dois casos por 100.000 habitantes/ano¹². É uma doença de acometimento de ambos os sexos, sendo 1,4 para os homens e 1,0 em mulheres e de todas as idades, principalmente entre 40 e 60 anos¹³.

Etiopatologia

A LMC é uma neoplasia associada a alterações citogenéticas ocasionada pela translocação recíproca

entre os braços longos do cromossomo 9 (q34) com o 22 (q11). Essa translocação ocorre devido a junção do proto-oncogene do seguimento 3’ do gene *abl* do cromossomo 9 com o seguimento 5’ do gene de manutenção *bcr* do cromossomo 22, o que resulta no gene híbrido *bcr-abl* no cromossomo 22¹⁴. Isso acontece porque há um rompimento dos segmentos dos cromossomos das células sanguíneas, esses segmentos sofrem um ponto de fusão sendo encurtados e denominados agora como Cromossomo Ph¹.

No gene *bcr* são descritos três pontos de quebra: o ponto de quebra maior (M-bcr), o ponto de quebra menor (m-bcr) e o micro (μ-bcr). Cada um desses pontos produz transcrições de diferentes tamanhos que possuem capacidade de codificar várias proteínas quiméricas, denominadas p190, p210 e p230, que estão relacionadas com a diferenciação dos fenótipos leucêmicos¹⁵. O proto-oncogene *abl* pode se fundir nessas três regiões distintas, no entanto o que provoca o fenótipo maligno da LMC é o ponto de quebra M-bcr, que abrange os éxons e12-e16 (denominado por éxons b1b5) e está diretamente interligado na parte central do gene *bcr* que traduz a proteína p210, a qual é codificada por dois transcritos quiméricos o b2a2 e b3a2¹⁶.

A Figura 2 indica os pontos de quebra dos genes *bcr* e *abl*, bem como as regiões de M-bcr, m-bcr e μ-bcr. Os transcritos quiméricos gerados a partir destas fusões são: e1a2 (p190^{BCR-ABL}); b2a2 e b3a2 (p210^{BCR-ABL}); e19a2 (p230^{BCR-ABL}).

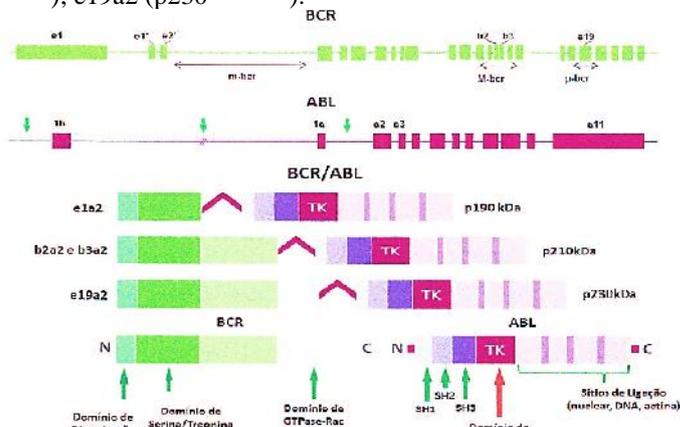


Figura 2. Biologia molecular da t(9:22)(q34;q11). **Fonte:** Leal, 2014²².

Este gene originado da fusão é transcrito em ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) BCR-ABL e depois traduzido em uma proteína quimérica BCR-ABL¹⁷. Em condições normais, a atividade do gene *bcr* está ligada a codificação de uma proteína relacionada com a regulação da divisão celular, já o gene *abl*, à codificação de uma proteína TK que atua participando da resposta a estresse genotóxico e da regulação do ciclo celular. Entretanto a formação do gene quimérico BCR-ABL resultante da translocação, codifica uma proteína com função acentuada de uma TK¹⁸. Ainda não se conhece a causa da translocação, entretanto,

estudos têm associado à exposição à radiação ionizante¹⁹.

Enzimas proteicas com atividade de TK são responsáveis por se ligarem ao trifosfato de adenosina (ATP), pois servem como um ponto de apoio em uma rede complexa de moléculas sinalizadoras interdependentes que atuam na transdução do sinal afetando a transcrição gênica do núcleo. Normalmente, as atividades das TKs são reguladas por dimerização mediada por ligante, seguida pela ativação de múltiplas vias que controlam a sobrevivência e a proliferação em cascata²⁰.

O responsável pela ativação da enzima TK é o oncogene BCR-ABL²¹. Fisiologicamente, a proteína ABL é transportada livremente entre o núcleo e o citoplasma, no entanto, a proteína quimérica BCR-ABL perde esta capacidade e a passa a ser retida no interior do citoplasma e interage com a maior parte das proteínas interligadas com as vias de sinalização celular. A acentuação da atividade do domínio da TK da proteína ABL, pela justaposição BCR, propicia a dimerização ou tetramerização e subsequente a auto fosforilação. Com isso o número dos resíduos de fosfotirosina na proteína BCR-ABL aumenta e, por conseguinte, os sítios de ligação para os domínios de homólogo em SCR 2 (SH2) de ligação a outras proteínas. A região terminal do *bcr* na proteína quimérica BCR-ABL apresenta um sítio de fosforilação de serina/treonina quinase que viabiliza a ligação do domínio SH2 à proteína adaptadora GRB2²².

Por conseguinte, o aumento na atividade da TK causará amplificação de diversas outras vias de sinalização que fazem parte do processo celular, induzindo a medula óssea a gerar clones malignos constantemente, além de provocar alterações na adesão destas a células estromais e a matriz extracelular; comprometer a manutenção do sinal mitótico e estimular a resistência celular a apoptose. Dessa forma, os granulócitos chegam à circulação sanguínea com pouco grau de maturação e com a capacidade de defesa reduzida, tornando o indivíduo mais susceptível a infecções².

No organismo a proteína BCR-ABL interage com outras moléculas de característica adaptadoras que estão ligadas ao receptor fator de crescimento ligado a proteína 2 (GRB2), pela semelhança com o SH2. O GRB2 ligado ao BCR-ABL vai recrutar a proteína homóloga ao gene *son-of-sevenless* (SOS) e formar o complexo BCR-ABL/GRB2/SOS e promover a fosforilação das proteínas guanosina difosfato (GDP) da família RAS e das proteínas de ligação 2 associadas a GRB2 (GAB2), como apresenta a Figura 3²³.

De modo consequente, ocorre a ativação da via de sinalização RAS, que ativado interage com proto-oncogene serina/treonina-proteína quinase (RAF), que é a primeira proteína da via proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). A proteína RAF tem a função de ativar a quinase regulada pela sinalização extracelular 1 e 2 (ERK1/ERK2), que atuam regulando a função de diversas moléculas intracelulares e

citossólicas responsáveis pela manutenção do equilíbrio celular. Como resultado da estimulação dessas vias, os processos de crescimento das células se alteram e tornam-se independentes a quaisquer sinalizadores deste fator de crescimento celular²⁴.

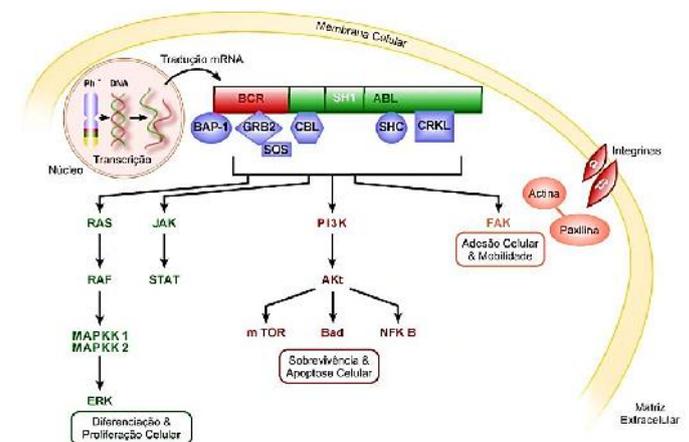


Figura 3. Vias de sinalização influenciadas pela expressão da proteína oncogene BCR-ABL. **Fonte:** Ribeiro, Santos, Reis, Santos, 2016.

A proteína BCR-ABL também influencia no aumento da proliferação celular, alterando as atividades da via de sinalização JAK-STAT. Nos casos de LMC a ativação de JAK ocorre através da associação direta das STATs aos domínios de SH2 da proteína BCR-ABL formando o complexo JAK-STAT. As principais STATs envolvidas são as STAT3 e STAT5, elas são responsáveis pela regulação do ciclo celular e pela proliferação das diferentes células²⁵.

O gene quimérico BCR-ABL também vai interagir e ativar a via PI3K/AKT, promovendo uma maior sobrevivência das células por meio da degradação proteossomal de p27 e pela ativação da proteína alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR). Esta proteína estimula a fosforilação de PI3K que é a proteína responsável por transportar AKT do citoplasma para dentro da membrana plasmática, onde se encontra as quinases regulatórias que vão promover sua fosforilação e ativação. A proteína AKT regula os mecanismos anti-apoptóticos fosforilando as famílias de proteínas BCL-2, BCL-X e caspases nove diretamente²⁶.

Na via AKT participam diversas proteínas e enzimas sinalizadoras produzidas por oncogêneses com atividades ligadas ao controle da apoptose, divisão e diferenciação celular e da angiogênese. A ativação desta via de sinalização induzida por PI3K desencadeia uma cascata no qual tem influência direta na inibição da neoangiogênese pela mTOR, pois controlam a apoptose através da *Bcl-2 Associated Death Promoter* (Bad). Quando algum fator causa alteração no funcionamento desta via amplificando as proteínas envolvidas na atividade desta sinalização de AKT, leva a uma maior sobrevivência das células tumorais, proporcionando-lhes condições favoráveis de obterem mutações sequenciais²⁷.

A via NF- κ B (fator nuclear kappa B) cuja

evidências científicas relatam, ela desempenha um papel importante nas diversas funções das CTHs em processos fisiológicos e patológicos. Sugerindo que as anormalidades de diferenciação e proliferação dos precursores na síndrome mielodisplásica pode estar diretamente relacionada também à desregulação desta via NF-Kb¹⁰.

O BCR-ABL também diminui a adesão celular ao se associar aos componentes da FAK e ativando a proteína similar a CRK- *like* (CRKL)²⁸.

A CRKL está relacionada a processos de regulação da adesão celular á matriz extracelular e ao estroma. Ela funciona como adaptadora para que a proteína quimérica se ligue a paxilina e vinculina, duas proteínas que apresentam características de adesões focais. Este complexo pode traduzir constitutivamente sinais que são regulados geralmente pelas integrinas ou ativar receptores de fatores de crescimento e alterar a adesão e mobilidade das células leucêmicas, por meio da mediação das proteínas envolvidas na sinalização das integrinas. A fosforilação e ativação de várias proteínas de adesão focal mantêm as indisponíveis para a sinalização das integrinas, acarretando assim na diminuição da adesão dos progenitores malignos²⁹.

As FAKs são enzimas vinculadas as integrinas, que estão localizadas no meio citoplasmático³⁰. Na função celular, esta enzima é um elemento chave no processo de sinalização, ativando diversos biosensores e estímulos que estão integrados juntamente com o controle de mobilidade celular. Mediante as conexões moleculares, esta enzima FAK pode então influenciar nas estruturas de adesão celular e sítios que regulam a motilidade celular e o citoesqueleto³¹. São consideradas importantes, pois diferentes tipos de vias de sinalização intracelular estão diretamente relacionados à ativação da FAK, incluindo sinalização de fator de crescimento, migração celular, sobrevivência e progressão do ciclo celular. Por isso, em doença como o surgimento de tumores malignos, a atividade desta enzima FAK pode ser encontrada alterada em células cancerígenas³².

Manifestações Clínicas

Embora a doença seja originada de uma alteração gênica o quadro clínico é heterogêneo e inespecífico, e as manifestações clínicas vão variar de acordo com a fase e a gravidade da doença. Os principais sinais e sintomas estão correlacionados com aos distúrbios provocados pela proliferação intensa e descontrolada de células na medula óssea e a saída das mesmas para o sangue periférico³³.

A LMC evolui por intermédio de três fases distintas entre si e caracterizadas por agravo tanto no quadro clínico quanto laboratorial. São elas: a FC também chamada de fase inicial, frequentemente é assintomática, podendo persistir durante anos por ser uma forma mais branda, entretanto pode apresentar sintomas como esplenomegalia, fadiga, suor, fraqueza, sudorese noturna, febre, sintomas de hipermetabolismo e parestesia palmar³⁴. A evolução desta fase para outros estágios da doença está relacionada à instabilidade

genética e evolução clonal, como por exemplo, anormalidades originadas pelas proliferações celulares devido ao gene BCR-ABL³⁵.

Por conseguinte, por uma FA ou intermediária, que é a fase onde ocorre a transição da doença e apresenta uma perda progressiva da diferenciação celular e onde a anemia manifesta-se mais evidentemente e por fim a FB ou avançada que envolve a transformação da LMC para um quadro de leucemia aguda. Os sinais clínicos desta fase incluem palidez, aumento da hepatoesplenomegalia, equimoses fáceis e refratariedade ao tratamento, até então eficaz na fase crônica. Além da ocorrência de sangramentos, falência de múltiplos órgão e infecções, com sobrevida de três a seis meses para pacientes sem tratamento. Apesar disso, nem todos os pacientes vão passar por essa ordem, sendo assim, podem progredir da FC para a FB sem uma fase intermediária de aceleração, de forma brusca¹⁵.

Diagnóstico

O diagnóstico é caracterizado pela avaliação clínica-laboratorial. É de extrema importância que seja realizado precocemente para uma maior qualidade no tratamento, assim, torna-se necessário que o profissional de saúde esteja ciente dos sintomas clínicos baseado no histórico do paciente para a correta interpretação dos achados laboratoriais. Os testes laboratoriais envolvem analisar os aspectos do sangue através dos exames de hemograma, mielograma, imunofenotipagem por citometria de fluxo, além de testes citogenéticos e de biologia molecular³⁶.

Diagnóstico Clínico

A apresentação clínica é inespecífica, no entanto o diagnóstico clínico é realizado pela anamnese e exame físico, visando coletar informações sobre a história clínica do paciente para o correto direcionamento aos exames laboratoriais. Em geral, o paciente apresenta-se com queixa de fraqueza há cerca de um a três meses, perda ponderal de peso, hipertemia, dor óssea e no quadrante superior esquerdo do abdômen, falta de ar e sangramentos. No exame físico, observam-se também hematomas, petéquias e palidez o que condiz com a anemia e o sangramento, além de apresentar hepatoesplenomegalia³⁷.

Diagnóstico Laboratorial

Para que o diagnóstico da doença seja determinado é necessário realizar uma avaliação baseado na citometria e morfologia das células hematológicas no sangue periférico (SP) e na MO. Esses dados são expressos através do hemograma e consiste em uma contagem e observação em primeira instância do SP, sendo que, nos casos da LMC demonstra uma leucocitose de aproximadamente 250.000/mm³, variando de 20.000 a 600.000/mm³, além de um aumento significativo de granulócitos na circulação, geralmente, compostos por blastos, promielócitos e predomínio de formas intermediárias de mielócitos e

metamielócitos; granulócitos já completamente maduros como bastonetes e neutrófilos segmentados, além da presença de eosinofilia e basofilia¹⁵.

Na série eritrocitária é expressa a anemia, podendo ser discreta anemia normocítica normocrômica ou acentuada, dependendo do grau de evolução da doença. O valor da hemoglobina fica em torno de 9,7g/dL variando de 5,4 a 14,4g/dL. Já as plaquetas apresentam-se em torno de 485.000/mm³, oscilando entre 25.000 e 1.400.000/mm³²⁵.

No âmbito medular, a avaliação se dá por meio do mielograma, o qual consiste na coleta de sangue por meio de punção da MO (geralmente na crista ilíaca ou osso esterno). A medula óssea do paciente é hiperplasmática, expressando um aumento das células sanguíneas em todas as etapas de maturação, as hemácias encontram-se diminuídas; há presença de leucócitos, eosinofilia com aumento de granulócitos, desvio à esquerda, basofilia, proliferação de megacariócitos, além de diferentes graus de fibrose reticulínica e vascularização³⁵.

As características de cada fase clínica da LMC no hemograma estão expressas no Quadro 1, segundo critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Quadro 1. Perfil do Hemograma nas diferentes fases da LMC, conforme critérios da OMS

Fase Crônica	Fase Acelerada	Fase blástica
Ausência de critérios de fase acelerada ou blástica	Blastos 10-19% no SP ou MO;	
	Trombocitopenia < 100 x 10 ⁹ /L (não relacionada com a Terapêutica);	
	Trombocitose > 1000 x 10 ⁹ (apesar da terapêutica);	Blastos > 20% no SP ou MO
	Basofilia > 20% no SP; Leucocitose pouco responsiva a terapêutica; Esplenomegalia progressiva; Evolução clonal por citogenética.	Sarcomas granulócitos

Fonte: Peixoto, 2017.

A imunofenotipagem tem como objetivo identificar a proporção total de cada linhagem dos leucócitos por meio das propriedades celulares de cada célula através da técnica de citometria de fluxo, sendo essa útil no diagnóstico, classificação, monitoramento e caracterização das células hematopoiéticas leucêmicas. Esses dados são obtidos através da passagem de células do sangue periférico ou da MO por uma corrente estreita contendo um feixe de laser e sinais óticos que são simultaneamente expostos a amostra a fim de mensurar informações como tamanho, granulosidade ou complexidade das células³⁸.

Exames Citogenéticos

A detecção de alterações citogenéticas tem grande importância no ponto de vista clínico, pois busca identificar modificações nos genes envolvidos na

doença. Para a realização desses exames são utilizadas células preferencialmente coletadas da medula, por conterem uma maior quantidade de material de análise. Essas células são escolhidas de acordo com seu estágio mitótico, onde são extraídos todos os cromossomos das mesmas que, por conseguinte são realocados em pares para uma melhor avaliação. No caso da LMC é possível notar uma translocação entre os braços longos do cromossomo 9 (q34) com o 22 (q11), conhecida como Cromossomo Ph¹⁷.

O método escolhido para identificar o cromossomo Ph é o bandeamento G, visto que, além de identificar modificações cromossômicas adicionais, possui um menor custo benefício e uma maior sensibilidade em relação as outras técnicas¹⁵. O teste consiste na adição de colchicina nas células para interromper a mitose em metáfase, acrescenta-se a metodologia para banda G que baseia no tratamento com tripsina e coloração de Giemsa e em seguida é realizado o pareamento dos cromossomos, de forma a facilitar a identificação estrutural e numérica, tendo como base a morfologia, tamanho e presença de bandas equilibradas ou não. No cariótipo por banda G é possível a detecção de translocações que diferenciam as neoplasias mieloproliferativas³⁹.

Dentre os exames citogenéticos, destaca-se o exame de *hibridação in situ* por fluorescência (FISH), um procedimento no qual se baseia na criação de uma sonda complementar que pretende detectar alterações nos genes BCR-ABL, ou seja, permite a identificação da translocação recíproca de material entre os cromossomos 9 e 22. Existem três gerações de sondas, a primeira consiste na visualização de sinais identificados por cores, por exemplo, gene ABL, representado pela cor vermelha, e o gene BCR, cor verde, sendo assim a expressão BCR-ABL é representado pelas cores verde e vermelha. Pode existir uma justaposição desses sinais, sugerindo um falso diagnóstico, portando, houve a criação das sondas de segunda geração, expressando o cromossomo 9. E a terceira geração, que possibilita a detecção de deleções nos cromossomos 9 e 22¹⁶.

Exames de Biologia Molecular

Os métodos de biologia molecular baseiam-se na transcrição da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir da produção de inúmeras cópias análogas da amostra original do DNA, com o intuito de constatar a presença do gene BCR-ABL, além de detectar células leucêmicas residuais após tratamento com quimioterapia. Os testes são classificados em quantitativo, oferecendo informações acerca da presença dos transcritos através do exame *quantitative real time PCR* (RT-qPCR) ou qualitativo avaliando a expressão através do PCR convencional (cPCR)⁴⁰. Em uma correlação com os outros métodos citogenéticos, apresenta-se uma qualidade superior de resultados, tornando-se padrão-ouro⁴¹.

A cPCR se dá na amplificação *in vitro* de uma sequência de bandas específicas de DNA com o auxílio

de *primers* pré-determinados para expressão do gene. Consiste em primeira instância na desnaturação das fitas do DNA, hibridização dos *primers* e após inicia-se a criação de uma nova fita. Essas reações ocorrem de acordo com temperaturas de incubação específicas de cada etapa, que, posteriormente em uma etapa final realiza-se uma extensão dos produtos de amplificação⁴². O procedimento é um importante diagnóstico da doença, pois através de sequências específicas é possível observar a mutação JAK2 V617F, indicado no diagnóstico do transcrito BCR/ABL, nos casos onde o cariótipo não detecta o Ph³⁹.

A análise da RT-qPCR consiste na aplicação de sondas de hidrólise para explorar a atividade exonuclease 5'-3' da DNA polimerase termoestável (taq) de forma a detectar e quantificar produtos de PCR específicos enquanto a reação prossegue. É colocada uma sonda de oligonucleotídeos de corante duplo juntamente com fluorocromo repórter (FR) na extremidade 5' e fluorocromo quencher (FQ) na 3' sendo possível apenas a observação da fluorescência emitida pelo FQ. No entanto, na fase de hibridização as sondas se ligam a sequências alvo com qual são complementares, onde são hidrolisadas pela atividade exonuclease 5'-3' da taq, de forma a gerar um aumento da fita complementar, além da emissão de fluorescência do FR, o que consequentemente o torna detectável pelo equipamento em tempo real⁴³.

Durante cada ciclo a luz emitida aumentará, portanto, o número de multiplicações de PCR onde é detectado um aumento da fluorescência é diretamente proporcional ao número de cópias de DNA da reação. A RT-qPCR para os genes BCR-ABL permite uma detecção de uma célula leucêmica a cada 10⁵ a 10⁶ normais⁴⁴.

4. CONCLUSÃO

Compreende-se que a expressão do cromossomo *Philadelphia* na ocorrência da Leucemia Mielóide Crônica se dá através da expressão do gene híbrido BCR-ABL com atividade acentuada de uma tirosina quinase que causa alterações no sistema hematopoiético, como a desregulação das vias sinalizadoras que controlam a proliferação, diferenciação, sobrevivência, apoptose, mobilidade e adesão das células da linhagem mielóide em seus nichos.

O sistema hematopoiético é formado por meio um processo hierárquico, o qual é responsável por produzir todos os componentes celulares sanguíneos, sob a influência de fatores de crescimento e de diferenciação. Para que esse processo de regulação ocorra, há interações das células-tronco hematopoiéticas com seus microambientes, os quais são promovidos por sinalizações moleculares para que a hematopoiese ocorra de maneira adequada.

A leucemia mielóide crônica é caracterizada por leucocitose à esquerda não escalonado, em que há a presença do cromossomo *Philadelphia*, resultando na

proliferação exacerbada das células mielóide pela medula óssea. É uma doença mieloproliferativa de acometimento de ambos os sexos, principalmente entre 40 e 60 anos, correspondendo de 15 a 20% dos casos de leucemia.

É uma neoplasia hematológica heterogênea, apresenta fases clínicas tanto na sintomatologia quanto nas análises laboratoriais. É constituída de três fases: a fase crônica, a qual é assintomática e ainda observa-se grau de maturação nas células; fase acelerada, estágio onde há perda progressiva da maturação e manifesta-se anemia evidente; e a fase blástica, em que se evolui para um quadro leucêmico agudo e apresenta hepatoesplenomegalia e palidez.

O diagnóstico da doença é realizado por meio dos dados obtidos do exame físico do paciente e as análises laboratoriais estão relacionadas a alterações no hemograma, mielograma, imunofenotipagem por citometria de fluxo; além dos exames citogenéticos que buscam identificar os genes envolvidos, através do bandeamento G e do *FISH*; e os de biologia molecular, buscando constatar a presença do gene BCR-ABL através do PCR quantitativo e qualitativo.

Em suma, é imprescindível que seja realizado um acompanhamento médico visando uma melhor qualidade e principalmente ampliar a expectativa de vida destes pacientes por meio do diagnóstico precoce.

REFERÊNCIAS

- [1] Ribeiro LS. Alterações Cromossômicas, Prognóstico E Diretrizes Terapêuticas Na Leucemia Mielóide Crônica. Faculdade Alfredo Nasser, Instituto De Ciências Da Saúde, 2015.
- [2] Ribeiro LS, Santos M de O, Reis AA da S, Santos R da S. Polimorfismos genéticos da família citocromo P450 (CYP) associado à resistência ao mesilato de imatinibe, e a opção terapêutica pela segunda e terceira geração para pacientes com leucemia mielóide crônica. Saúde & Ciência em ação, v. 2, n. 1, p. 38-55, 2016.
- [3] Ferreira LAM. Potenciais microRNAs circulantes como biomarcadores de Leucemia Mielóide Crônica-Fase Crônica: recém diagnosticada e tratada com mesilato de imatinibe. Dissertação de Mestrado (Fisiopatologia em clínica médica) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.
- [4] Melo R de CC. Investigação funcional de CXCR7 na hematopoese normal e leucêmica. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.
- [5] Silva CA da. Avaliação de quimiorresistência em leucemias pediátricas agudas. Dissertação (Mestrado em biologia celular e molecular) – Centro de biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- [6] Marcelino BM de M. Eosinofilia associada às Geohelmintoses: uma revisão literária. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.
- [7] Maba IK. Análise morfofuncional e morfoquantitativa dos constituintes dos tecidos mielóides e linfóides. Monografia (Bacharelado em Biomedicina) – Faculdade de Biomedicina, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

- [8] Chen S, Lewallen M, Xie T. Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development*, v. 140, n. 2, p. 255-265, 2013.
- [9] Xavier F, Martins J. Autorrenovação de células-tronco hematopoiéticas: papel da via Hedgehog na mielodisplasia e da Arhgap21 na hematopoiese. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, São Paulo, 2015.
- [10] Lopes MR. Caracterização das células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea de pacientes com síndromes mielodisplásicas e leucemia mieloide aguda e o estudo da biologia da interleucina-32 no microambiente medular. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, São Paulo, 2016.
- [11] Silva JV da, Coelho EE, Knupp L da S, Ferreira JR, Silva SS. Ações da enfermagem ao portador de leucemia: uma revisão integrativa. *BJSCR*, Vol.21, n.2, pp.164-171, 2017.
- [12] Maciel JB, Júnior AS de C, Lima MLC de, Carvalho WV de F. Leucemia mieloide crônica: Aspectos básicos e diagnóstico laboral. *Mostra Científica em Biomedicina*, v. 2, n. 1, 2017.
- [13] Melo B da SL, Gonçalves D da SS. Atuação do enfermeiro no tratamento da leucemia mieloide crônica. *Revista Transformar*, v. 9, p. 129-140, 2016.
- [14] Nascimento MM do. Ocorrência de eventos adversos relacionados a inibidores de tirosina quinase de primeira e segunda geração: revisão de literatura. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, João Pessoa, 2016.
- [15] Peixoto PP de A. Leucemia mieloide crônica: uma revisão de literatura. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina)- Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2017.
- [16] Do Lago C, Petroni TF. Fisiopatologia e Diagnóstico da Leucemia Mieloide Crônica. *Revista Saúde UniToledo*, v. 1, n. 1, 2017.
- [17] Moraes AB de. Importância do diagnóstico acurado em casos de leucemia mieloide: distinção das leucemias e processos reacionais. Faculdade de Biomedicina, Centro Universitário de Maringá, Centro de Ciências Biológicas da Saúde, Maringá, 2017.
- [18] Frizzo MN; Da Silva FC, Araújo L da S. Neoplasias hematológicas no idoso: Uma revisão. *Revista Saúde Integrada*, v. 8, n. 15-16, 2016.
- [19] Marchão NSR. Leucemia e Saúde oral - O papel do médico dentista. Monografia de Investigação (Mestrado Integrado em Medicina Dentária) - Área Pré-Clínica (Medicina Dentária Preventiva e Saúde Oral Comunitária) Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, Porto, 2016.
- [20] Ferreira IM de L. Estudo por simulação molecular do sistema proteína quinase-inibidores. 58 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.
- [21] De Azevedo LD, Bastos MM, De Oliveira AP, Boechat N. Sínteses e propriedades de fármacos inibidores da tirosina quinase BCR-ABL, utilizados no tratamento da leucemia mieloide crônica. *Química Nova*, v. 40, n. 7, p. 791-809, 2018.
- [22] Leal CBQ de S. Avaliação de doença residual mínima em pacientes com leucemia mieloide crônica. Dissertação (Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Genética) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2014.
- [23] Redorat FS. Avaliação in vitro da inibição da atividade de proteínas RAS por derivados de quinolonas no modelo câncer pancreático humano. Vi, 58 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2017.
- [24] De Sousa VC, Fonseca IM, Cordeiro A, Lopes MJP. Manifestações Cutâneas das Rasopatias. *Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia*, v. 75, n. 1, p. 9-18, 2017.
- [25] Alves MRN. Leucemia Mieloide Crônica: Desafios no tratamento da fase blástica. Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2014.
- [26] Stern ACB. Análise da influência da restrição nutricional na modulação proteica de células de leucemia mieloide crônica (K562). Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- [27] Naoum PC. Sinalização celular do câncer humano. *Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto*, São Paulo, 2015.
- [28] Dias LP. Avaliação da associação do plasma rico em plaquetas (PRP) e Bacillus Calmette Guérin (BCG) para o tratamento do câncer de bexiga. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.
- [29] Bian X, Liang Z, Feng A, Salgado E, Shim H. hdac inhibitor suppresses proliferation and invasion of breast cancer cells through regulation of mir-200c targeting Crkl. *Biochemical pharmacology*, v. 147, p. 30-37, 2018.
- [30] Oliveira DAB de. Estudo teórico de inibidores da proteína quinase de adesão focal. 116 f., il. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- [31] Vasconcelos AC. Avaliação da via de sinalização HGF/C-MET em neoplasias benignas e malignas das glândulas salivares. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- [32] Flores APC. Avaliação das cinases de adesão focal (FAKS) em diferentes zonas no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e sua relação com TNM. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- [33] Da Silva PH, Alves HB, Comar SR, Henneberg R, Merlin JC, Stinghen ST. *Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos*. Artmed Editora, 2015.
- [34] Tipan C, Alexandra E. Leucemia mieloide crônica. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidad Técnica de Ambato-Facultad de Ciencias de la Salud-Carrera Medicina, 2015.
- [35] Sossela FR. Leucemia Mieloide Crônica: aspectos clínicos, diagnóstico e principais alterações observadas no hemograma. *Review Article*, v. 49, n. 2, p. 127-30, 2017.
- [36] De Souza AD. Sistematização do processo de criação de definições formais em ontologias biomédicas: uma investigação no domínio das leucemias mieloides agudas. *Perspectivas em Ciência da Informação*, v. 20, n. 4, p. 219, 2018.

- [37] Giroto AV da S. A infecção em pacientes neutropênicos com diagnóstico de leucemia. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Enfermagem e Licenciatura) – Escola de Enfermagem Aurora de Afonso Costa, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2016.
- [38] Costa AF de O. Influência de novos marcadores imunofenotípicos no prognóstico e sobrevida de leucemias mielóides agudas: uma revisão sistemática e meta-análise. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2017.
- [39] Macedo LC, Silva DM. Aplicação das técnicas moleculares no diagnóstico das neoplasias mieloproliferativas. SaBios-Revista de Saúde e Biologia, v. 12, n. 1, p. 57-65, 2018.
- [40] Coelho MGB. Expressão de DIDO em células Bcr-Abl+: associação com resistência a apoptose e fisiopatologia da leucemia mielóide crônica. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.
- [41] Rego MFN do. Leucemia mielóide crônica: aspectos clínicos e fatores que influenciaram a resposta citogenética em pacientes tratados com imatinibe no estado do Piauí. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.
- [42] Bennour A, Saad A; Sennana H. Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays. Elsevier Ireland Ltd, 2015.
- [43] Carvalho FR. Avaliação de ensaios comerciais de RT-qPCR para monitoramento de doença residual mínima em pacientes com leucemia mielóide crônica. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- [44] Villalba AR, Verkuil EVP, Gunst QD, Ruitjer JM, Hoff MJBVD. Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). Biomolecular detection and quantification, v. 14, p. 7-18, 2017.