

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Jéssica Monise Arantes, biomédica e aluna do curso de Pós-Graduação Lato Sensu em Hematologia Laboratorial e Imunohematologia de Banco de Sangue (Abril de 2017 a Julho de 2018) da Academia de Ciência e Tecnologia e Instituto Naoum de Hematologia.

E-mail: jessicamarantees@outlook.com

Resumo

A Leucemia Mielóide Crônica é uma doença mieloproliferativa crônica que representa 20% de todas as leucemias, sendo caracterizada por uma leucocitose com desvio a esquerda, esplenomegalia e presença do cromossomo Philadelphia (Ph) que resulta de uma translocação entre os braços longos dos cromossomos 9q34 e 22q11, gerando uma proteína chamada BCR-ABL que resulta de uma hiperproliferação celular anormal e inibidores da apoptose. A doença evolui em três fases: crônica (FC) onde ocorre a proliferação clonal maciça das células granulocíticas, mantendo estas a capacidade de diferenciação, posteriormente num período de tempo variável, o clone leucêmico perde sua capacidade de diferenciação e a doença passa a ser de difícil controle sendo a esta fase acelerada (FA) e progride para uma leucemia aguda tornando-se a fase de crise blástica (CB). O diagnóstico da LMC pode ser feito por vários métodos entre eles o exame microscópico do sangue periférico e da medula óssea, incluindo análises por citometria de fluxo, citogenética e biologia celular. Este estudo apresenta uma revisão bibliográfica sobre a história natural e os diferentes métodos de diagnósticos da doença.

Palavras chave: leucemia mielóide crônica (LMC), cromossomo Philadelphia, diagnóstico laboratorial.

INTRODUÇÃO

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) constitui uma desordem mieloproliferativa, que se caracteriza pela presença de uma mutação adquirida, a qual afeta a célula tronco hematopoiética. A LMC representa cerca de 20% das leucemias do adulto e

ocorre com a mesma frequência ao redor do mundo. Sua incidência anual é de 1,6 casos/100.000 habitantes/ano, havendo um discreto predomínio masculino (1,4/1,3), com mediana de idade a apresentação de 55 anos. Menos de 10% dos casos ocorrem em pacientes com menos de 20 anos (CORTES, 2004).

OBJETIVOS

Objetivos gerais

- Realizar uma revisão bibliográfica sobre a história natural da Leucemia Mielóide Crônica e os diferentes métodos de diagnósticos promovendo o conhecimento dos mesmos.

Objetivos específicos

- Mostrar a fisiopatologia da Leucemia Mielóide Crônica.
- Listar os principais métodos diagnósticos.

MATERIAL E MÉTODO

Para elaboração dessa revisão bibliográfica foi realizada buscas em publicações de artigos científicos com fontes citadas no presente trabalho a fim de ressaltar os diagnósticos utilizados na Leucemia Mielóide Crônica.

DESENVOLVIMENTO

1.0 – FISIOPATOLOGIA

Em 1960, um pequeno cromossomo foi identificado em pacientes com LMC (NOWELL; HUNGERFORD, 1960).

Pela primeira vez na história da Medicina, foi descrita a associação entre uma anormalidade cromossômica e uma doença oncológica. Posteriormente, demonstrou-se que essa alteração cromossômica era resultado de uma translocação recíproca e balanceada entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, $t(9;22)(q34;q11)$, sendo denominado cromossomo Filadélfia (Ph). Presente em 95% dos pacientes com LMC, o cromossomo Ph resulta de uma translocação balanceada entre o gene ABL (*Abeldon Murine Leukemia*) localizado no cromossomo 9, com o gene BCR

(*breakpoint cluster region*) no cromossomo 22 (NOWELL; HUNGERFORD, 1960; GEARY, 2000).

O gene híbrido resultante, o BCR-ABL, codifica uma proteína de fusão anormal que contém atividade tirosina quinase (TK) continuamente ativada na região ABL, sendo responsável pelo desenvolvimento da leucemia. A partir da identificação da patogênese molecular da LMC, esforços têm sido feitos com o objetivo de identificar as vias de sinalização que influenciam a atividade TK do BCR-ABL, ligando essas vias às alterações características da LMC. Essas alterações incluem: aumento da proliferação celular (ativação da via RAS); diminuição da apoptose (via STAT5); hiperativação da molécula antiapoptótica (BCLxl); inativação da molécula pró-apoptótica (BAD via AKT); desregulação da citoadesão celular havendo liberação prematura de células mielóides imaturas na circulação (efeito da CRKL); alterações na angiogênese; e aumento da instabilidade genética responsável pela progressão da doença (MELO; DEININGER, 2004; DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000).

1.2 – CURSO CLÍNICO

Classicamente, a doença evolui em três fases: crônica (FC), acelerada (FA) e crise blástica (CB). Na FC ocorre proliferação clonal maciça das células granulocíticas, mantendo estas a capacidade de diferenciação, sendo a doença facilmente controlada (CORTES; KANTARJIAN, 2003). Ao diagnóstico, cerca de 20 a 40% dos pacientes são assintomáticos porém quando sintomáticos, apresentam sintomas de hipercatabolismo (fadiga, perda ponderal, sudorese noturna e febre) e desconforto abdominal decorrente da esplenomegalia. Complicações trombóticas ou hemorragia ocorrem em menos de 5% dos casos em FC (GEORGII; BUESCHE; KREFT, 1998).

Posteriormente, num período de tempo variável, o clone leucêmico perde a capacidade de diferenciação e a doença passa a ser de difícil controle (FA) e progride para uma leucemia aguda ou (CB) (CORTES; KANTARJIAN, 2003).

1.3- DIAGNÓSTICO

- **Hemograma**

O diagnóstico da LMC pode ser feito por vários métodos, incluindo o exame microscópico do sangue periférico e da medula óssea, análise por citometria de fluxo, citogenética e biologia molecular. Pacientes com LMC apresentam, no sangue periférico leucocitose de aproximadamente $225.000/\text{mm}^3$ com variação de 20.000 a $600.000/\text{mm}^3$ e intenso aumento de granulócitos na circulação. A granulocitose é caracterizada por pequena proporção de blastos leucêmicos e promielócitos, predomínio de formas intermediárias como mielócitos e metamielócitos, além de neutrófilos em processo de maturação e já totalmente maduros como os bastonetes e segmentados. Proporções de 15 a 20% de basófilos e eosinófilos podem ser encontradas (CHARLES; SAWYERS, 1999; DULLEY; HAMERSCHLACK, 2004).

Na LMC, é comum a presença de anemia discreta e de trombocitose. Os valores de hemoglobina oscilam em torno de $9,7\text{g/dL}$ com variação de $5,4$ a $14,4\text{g/dL}$, notando-se pequena correlação entre a concentração de hemoglobina e o número total de glóbulos brancos circulantes. O número de plaquetas oscila em torno de $485.000/\text{mm}^3$, podendo variar de 25.000 a $1.400.000/\text{mm}^3$, lembrando que esses valores variam de acordo com a fase da doença. A atividade da fosfatase alcalina dos leucócitos fica reduzida em quase todos os pacientes e pode ser usada para distinguir a LMC de outras doenças mieloproliferativas (CHARLES; SAWYERS, 1999; DULLEY; HAMERSCHLACK, 2004; JAMUR, 2005).

- **Mielograma e Biópsia de Medula**

O mielograma revela hiper celularidade à custa do aumento marcante de neutrófilos e células precursoras, levando a relação leuco-eritroblástica para 20:1. A sequência de diferenciação é mantida, mas com predomínio de células mais jovens como promielócitos e mielócitos. O número de megacariócitos também é aumentado. A biópsia de medula óssea também mostra hiper celularidade intensa com aumento de granulócitos e de megacariócitos. Fibrose reticulínica medular detectada por meio de coloração de Hematoxilina & Eosina habitual, com evidente aumento de fibras de reticulina também pode ser observada (CHARLES; SAWYERS, 1999; HAMERSCHLACK, 2004).

- **Citometria de Fluxo**

A técnica de citometria de fluxo, criada em meados da década de 50, permite avaliar características físico- químicas de células ou partículas suspensas em meio fluido. Esta tecnologia utiliza anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos como ferramenta de investigação em diversas análises e necessita de controles isotípicos para a definição da região negativa (*background*). Estes controles são representados por imunoglobulinas do mesmo isotipo marcadas pelos mesmos fluorocromos dos anticorpos testes, sendo o isotiocinato de fluoresceína (FITC) o marcador fluorescente mais utilizado na conjugação dos anticorpos. Os controles isotípicos tem como função definir a fluorescência inespecífica (células negativas) e as regiões fluorescentes (células positivas). Desta forma verifica-se a proporção total de células brancas e cada tipo das mesmas (GOLIM et al., 2007).

- **Citogenética**

Quanto á citogenética, a presença de cromossomo Philadelphia (Ph) representa o alvo mais explorado, mas é importante ressaltar que o Ph não é patognomônico da LMC, uma vez que está presente em 25% dos indivíduos adultos e em 3 a 5% de crianças com leucemia linfoblástica aguda (LLA) (JAMUR,2005).

A metodologia clássica por banda G é o exame de escolha para identificar essa anormalidade cromossômica, seja pela possibilidade de detectar alterações adicionais que poderiam indicar evolução clonal ou Ph variante, seja pelo seu menor custo, porém essa análise não é rápida. A sensibilidade do método é superior a 90%, com um limite de detecção de celular de 1:20 (uma célula maligna para vinte células normais) (JAMUR,2005; VENDRAME-GOLONI et al., 2006).

O exame citogenético é realizado preferencialmente em células de medula óssea colhidas com heparina ou em meio de cultura especial. Alternativamente, pode ser usado o sangue periférico colhido com heparina de forma estéril, mas a sensibilidade é bem menor do que o exame em medula óssea. Em 10% dos pacientes em critérios compatíveis para LMC, nenhum Ph é detectado, mas em cerca da metade desses, o rearranjo BCR-ABL é identificado por métodos moleculares (FISH ou RT-PCR). Nos restantes, nem Ph nem rearranjo BCR-ABL são identificados e,

aparentemente, estes pacientes têm a doença mais agressiva (CHARLES; SAWYERS,1999; CHAUFFAILLE et al., 2001; VENDRAME-GOLONI et al., 2006).

- **Southern Blotting**

A análise por Southern blotting para detectar o rearranjo BCR-ABL também já foi usada, empregando o DNA genômico após digestão com endonucleases de restrição. O DNA empregado pode ser extraído de células colhidas a fresco ou congeladas a partir do sangue periférico ou da medula óssea. A sensibilidade do método é dependente da distribuição espacial dos pontos de quebra e da combinação da sonda com a enzima de restrição. A sensibilidade desse método é de aproximadamente 98%, com um limite de detecção celular de 1:20 a 1:100, sendo mais sensível que a citogenética clássica (JAMUR,2005).

- **Biologia Molecular**

Já os métodos mais modernos e eficazes para a detecção dos transcritos BCR-ABL são baseados em técnicas de biologia molecular. Os mais frequentes incluem a hibridização fluorescente *in situ* (FISH – *fluorescent in situ hybridization*) e a reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) após a conversão do mRNA extraído das células leucêmicas em DNA complementar (cDNA). Para esta etapa inicial, utiliza-se uma enzima conhecida como *transcriptase reversa* (RT), daí o nome do método: RT-PCR (CHARLES; SAWYERS,1994; CHAUFFAILLE et al., 2001; VENDRAME-GOLONI et al.,2006; GOUVEIA, 2007; SAHAY; SCHIFFER, 2008).

A etapa subsequente é a amplificação da sequência gênica a ser estudada, usando um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e a detecção dos transcritos (HOCHHAUS et al., 2000).

Uma variante do método de RT-PCR, com potencial de oferecer resultados quantitativos para o transcrito BCR-ABL, vem se mostrando útil no seguimento dos pacientes com LMC. Trata-se da RT-PCR em tempo -real ou real-time PCR. Como consequência da detecção com química fluorescente, o método é mais sensível para o diagnóstico definitivo da LMC e também para a identificação de doença residual mínima após o transplante de medula óssea ou durante tratamento com o Mesilato de Imatinibe (MI). Além disso, essa metodologia é mais rápida, possibilitando melhores

controles de qualidade e permitindo a padronização do processo de amplificação e a eliminação de contaminação no laboratório. A menor chance de contaminação com o método RT-PCR em tempo real ocorre porque o tubo de reação não precisa ser aberto ao seu final, uma vez que a detecção e a quantificação dos transcritos são feitas em tempo-real durante os ciclos de amplificação (GOUVEIA, 2007).

A RT-PCR em tempo real é um grande aliado do oncologista clínico em busca de melhores resultados terapêuticos, porque ajuda na definição do tratamento, que pode ser mais ou menos agressivo de acordo com a resposta de cada paciente. Com essas características, a RT-PCR em tempo real permite o acompanhamento dos pacientes portadores de LMC ao longo de intervenções que promovem remissão duradoura da doença (CHARLES; SAWYERS, 1999; VENDRAME-GOLONI et al., 2006; GOUVEIA, 2007).

1.4 - DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA

A resposta do paciente oncológico ao tratamento para LMC deve ser avaliada sob três aspectos. Além da resposta clínica, caracterizada pela ausência do quadro sintomatológico de leucemia, é necessário pesquisar: a resposta hematológica, definida pela normalização de valores quantitativos no sangue periférico e avaliação do tamanho do baço; a resposta citogenética, definida pela proporção de metáfases Ph-positivas residuais; e a resposta molecular, definida por meio da avaliação da transcrição gênica (mRNA) ou da detecção de proteínas BCR-ABL residuais (EDER et al., 1999; HOCHHAUS et al., 2000; PALLOTTA et al., 2006; FRAZER et al., 2007; ALMEIDA; SADDI, 2007).

Assim, após o tratamento da LMC, a presença de células leucêmicas residuais sem evidências clínicas de doença é conhecida como doença residual mínima (DRM), na qual os níveis de leucemia estão abaixo da detecção pela microscopia convencional. A PCR quantitativa em tempo real, entretanto, traduz de forma legítima os níveis de DRM, sendo atualmente o “padrão ouro” para seu monitoramento, uma vez que o método fornece informações a respeito do número e da cinética das outras células tumorais residuais (ALMEIDA; SADDI, 2007).

1.5 -TRATAMENTO

Nos últimos anos, houve uma revolução no tratamento da LMC. Surgiram os chamados inibidores de tirosino-quinase. O imatinibe foi o primeiro deles a ser aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), nos EUA, e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil. Apresentou respostas hematológicas e citogenéticas surpreendentes, somente demonstradas anteriormente com o transplante de medula óssea. Esta medicação tornou-se hoje o padrão de tratamento. Funciona melhor nas fases mais precoces da doença, diminuindo sua eficiência à medida que a leucemia progride para as fases acelerada e blástica (DRUKER et al., 2006; BACCARANI et al., 2006).

Descrevem-se mecanismos de resistência primária e secundária ao uso de imatinibe, com superexpressão do BCR-ABL, evolução clonal e mutações do ABL. Novos medicamentos, como o desatinibe e o nilotinibe, aprovados pelo FDA, são usados para superar a refratariedade ou a intolerância de pacientes ao imatinibe, porém sua utilização em crianças é ainda incipiente e está sendo testada em estudos clínicos. A utilização deles em primeira linha também está reservada, pelo menos no momento, a estudos clínicos em desenvolvimento (KANTARJIAN et al., 2007; CORTES et al., 2007).

1.6 - CONCLUSÃO

Diante da revisão realizada, evidencia-se a necessidade do diagnóstico precoce, rápido e preciso dessa doença, destacando a metodologia da RT-PCR em tempo real como o método mais moderno e eficaz para esse fim, porém a análise do hemograma correta é importante para direcionar o médico aos exames complementares para diagnóstico e melhor método de tratamento.

Destaca-se a eficácia do Mesilato de Imatinibe em relação às demais estratégias terapêuticas, mas mesmo durante ou após o tratamento, deve-se realizar avaliação periódica dos pacientes para a detecção precoce de uma possível doença residual mínima (DRM).

1.7- REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P.S.R.; SADDI, V.A. **Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mieloide crônica por PCR em tempo real.** Rev. Bras. Hematol Hemoter, v. 29, n. 4, p. 387-391, 2007.

BACCARANI, M.; SAGLIO, G.; GOLDMAN, J.; HOCHHAUS, A.; SIMONSOON, B.; APPELBAU, F. et al. **Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf on the European Leukemia.net.** Blood, v. 20, n. 1, p. 108-809, 2006.

CORTES J. **Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia.** Hematol Oncol Clin North Am 2004, v.18, n.3, p.84-569.

CORTES, J.; Kantarjian, H. **Advanced-phase chronic myeloid leukemia.** Semin Hematol, v.40, n. 1, p. 79-86, 2003.

CORTES, J.; ROUSSELOT, P.; KIM, D.W.; RITCHIE, E.; HAMERSCHLAK, N.; COUTRE, S. et al. **Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis.** Blood, v. 13, n. 13, p. 109-207, 2007.

CHARLES, L.; SAWYERS, M.D. **Chronic myeloid leukemia.** The New England Journal of Medicine, v.340, n.17, p. 1990-1340, 1999.

CHAUFFAILLE et al. **Fluorescent in situ hybridization (FISH) for BCR/ABL in chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation.** S. Paulo Med. Jorn., v. 119, n. 1, p. 16-18, 2001.

DEININGER, M.W; Goldman, J.M; Melo, J.V. **The molecular biology of chronic myeloid leukemia.** Blood, v. 96, n. 10, p.56-3343, 2000.

DRUKER, B.J.; GUILHOT, F.; BRIEN, S.G.; GATHMANN, I.; KANTARJIAN, H.; GATTERMANN, N. et al. **Five year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia**. N. Engl. J. Med., v. 17, n. 2, p. 355 -408, 2006.

DULLEY, F.; HAMERSCHLACK, N. **Leucemia mielóide crônica**. Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia, n. 25, p. 11-12, 2004.

EDER et al. **Monitoring of BCR-ABL expression using real-time RT-PCR in CML after bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation**. Leukemia, n. 13, p. 1383-1389, 1999.

FRAZER, R.; IRVINE, A. E.; MCMULLIN, M. F. **Chronic myeloid leukaemia in The 21 st Century**. Ulster Med J., v. 76, n. 1, p.8-17, 2007.

GEARY CG. **The story of chronic myeloid leukemia**. Br J Haematol, v. 110, n. 1, p. 2-11, 2000.

GEORGII, A.; Buesche, G; Kreft, A. **The histopathology of chronic myeloproliferative diseases**. Baillieres Clin Haematol, v. 11, n. 4, p. 49-721, 1998.

GOLIM et al. **Conjugação e validação de controle isotópico IgG-FITC para uso de citometria de Fluxo**. Rev. Bras. Hematol. Hemoter, v. 29, n. 4, p. 361-368, 2007.

GOUVEIA, M.E. **Análise do padrão de metilação em genes supressores de tumor na Leucemia Mielóide Crônica**. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.

HOCHHAUS et al. **Detection and quantification of minimal residual disease in chronic myelogenous leukemia**. Leukemia, n. 14, p. 988-1005, 2000.

JAMUR, V.R. **Estudo citogenético de pacientes com leucemia mielóide crônica tratados com o Mesilato de Imatinibe.** Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

KANTARJIAN, H.; PASQUINI, R.; HAMERSCHLAK, N.; ROUSSELOT, P.; HOLOWIECKI, J.; JOOTAR, S. et al. **Desatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of first-line imatinib: a randomized phase 2 trial.** Blood, v. 50, n. 5, p. 109-143, 2007.

MELO, J.V.; Deininger, M.W. **Biology of chronic myelogenous leukemia-signaling pathways of initiation and transformation.** Hematol Oncol Clin North Am., v. 18, n. 3, p. 68-545, 2004.

NOWELL, P.C; Hungerford, D.A. **A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia.** Science, v. 132, p.1497-3438, 1960.

PALLOTTA et al. **Tratamento da recidiva da leucemia mielóide crônica após transplante de medula óssea alogênico utilizando mesilato de imatinibe.** Rev. Bras. Hematol. Hemoter, v. 28, n. 2, p.157-160, 2006.

SAHAY, T.; SCHIFFER, C.A. **Monitoring minimal residual disease in patients with chronic myeloid leukemia after treatment with tyrosine kinase Inhibitors.** Curr Opin Hematol, v. 15, n. 2, p. 134-139, 2008.

VENDRAME-GOLONI et al. **Análise do rearranjo BCR-ABL por bandeamento GTG e FISH: comparação das frequências ao diagnóstico da LMC.** Arq. Ciênc. Saúde, v. 13, n. 1, p.7-11, 2006.

INTRODUÇÃO

