

HEMATOLOGIA MOLECULAR: UM NOVO MOMENTO

Paulo Cesar Naoum,
Biomédico, professor titular pela UNESP, diretor da Academia de Ciência e Tecnologia de
São José do Rio Preto, SP.

Resumo

A hematologia molecular surgiu *de fato* em 1949 quando Pauling e colaboradores descreveram a Hb S como uma doença molecular⁽¹⁾. A partir desse momento a evolução do conhecimento molecular de doenças hematológicas de causas genéticas tiveram contínuos progressos. No ano 2000, Provan e Gribben publicaram o livro *Molecular Haematology*⁽²⁾ onde descreveram as principais alterações moleculares das hemoglobinopatias, leucemias e linfomas, síndrome mielodisplásica, mieloma múltiplo, trombofilias e hemofilias. Atualmente o conhecimento molecular além de facilitar a diferenciação doenças parecidas, quer sob o ponto de vista clínico ou citológico, avança também em direção às terapias-alvo. A introdução a seguir mostra alguns exemplos do momento atual da hematologia molecular.

Introdução

Um dos maiores triunfos da biologia molecular aplicada à medicina foi a demonstração de que quase todos os casos de *leucemia mielóide crônica* (LMC) são induzidos por um gene anormal conhecido por BCR/ABL. Esse gene é resultante das quebras de partes de dois cromossomos (9 e 22), cujas junções quebradas fazem com que em um deles (cromossomo 22) dois genes independentes (BCR e ABL) se juntem e formem um gene quimérico com a atividade anormal. Dentro da célula tronco afetada, o gene quimérico BCR/ABL estimula de forma descontrolada as sinalizações celulares de AKT e RAS, resultando em contínuas divisões das células mielóides jovens da linhagem de neutrófilos, sem a devida complementação dos seus ciclos de maturação⁽³⁾. As células leucêmicas da LMC liberam proteínas anormais que podem ser visualizadas em

leucócitos leucêmicos hemolisados e submetidos à eletroforese (figura 1).

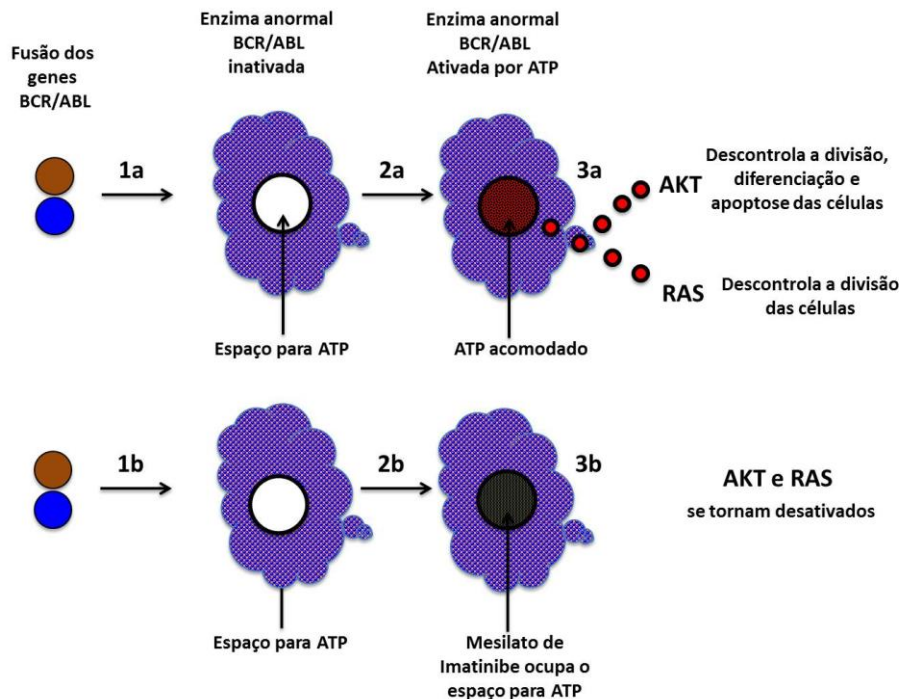


Figura 1 – Eletroforese alcalina em acetato de celulose de proteínas anormais obtidas de células leucêmicas hemolisadas em comparação com hemolisados de hemoglobinas normais e proteínas séricas.

É importante destacar que alguns anos após esta descoberta, os pesquisadores construíram por meio de engenharia biomédica uma droga conhecida por *Mesilato de imatinibe*⁽⁴⁾ cuja intervenção terapêutica se caracteriza por bloquear a ação desencadeante da divisão celular que resulta em LMC e, assim, controlar de forma efetiva a celularidade leucocitária das pessoas portadoras desta doença. A figura 2 mostra por meio de esquemas a ação estimuladora do gene BCR/ABL para as sinalizações de AKT e RAS, bem como a ação inibidora da droga Mesilato de imatinibe.

Eletroforese Alcalina

Arquivo científico da AC&T

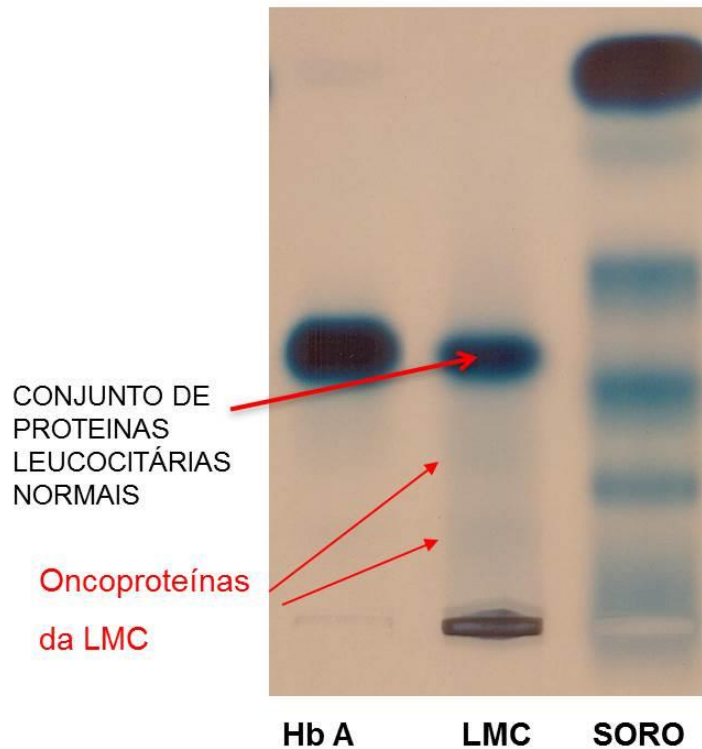


Figura 2- Esquema das ações patológicas da enzima anormal sintetizada pelo gene BCR/ABL e do bloqueio da ação do gene BCR/ABL pela droga Mesilato de imatinibe.

1a/1b – O gene quimérico ABL/BCR sintetiza a enzima anormal BCR/ABL.
2a/2b – Para que a enzima anormal BCR/ABL funcione é preciso que a molécula de ATP ocupe o seu espaço estrutural. Ao ocupar o espaço, ATP gera energia para que produtos químicos sejam liberados pela enzima BCR/ABL e estimulem as sinalizações de RAS e AKT.
3a- As sinalizações de RAS e AKT aumentam a proliferação das células afetadas, inibem a apoptose celular e prejudicam a diferenciação da linhagem celular.

A policitemia vera (PV), uma outra doença hematológica que também ocorre por descontrole na proliferação de eritrócitos, se deve à mutação no gene JAK-2 presente na célula progenitora dos eritrócitos, o proeritroblasto. Esse gene estimula as reações em cascata da sinalização celular de AKT. Sinalizações em cascata acontecem de forma controlada em

todas as células nucleadas, através da qual se dividem, diferenciam, criam mobilidade e induzem a sua própria morte. Quando algo interfere neste controle fisiológico, a célula pode se tornar tumoral. Na PV a mutação que afeta o gene JAK-2 induz continuamente o estímulo das proteínas GSK e FOXO. Como se sabe, GSK e FOXO regulam o grau de divisão celular do proeritroblasto em suas células seguintes: eritroblastos basófilos, policromáticos e ortocromáticos, estes últimos amadurecendo em reticulócitos e, em seguida, se tornando eritrócitos⁽⁴⁾. A figura 2 mostra a sinalização celular de AKT com destaque para o grupo de enzimas Janus kinase (JAK-1), cuja ação é semelhante à de JAK-2.

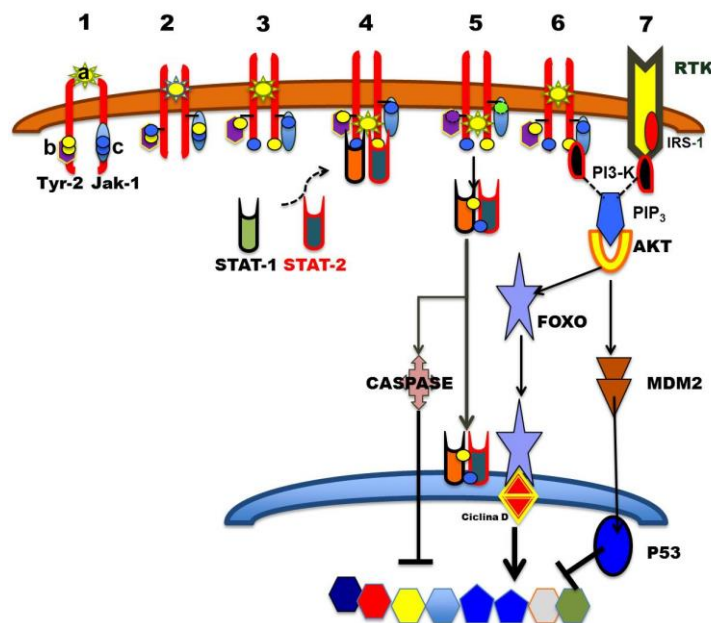


Figura 3 – Sinalização clássica de AKT. Os itens 1 a 7 destacam a importância de vários receptores e proteínas envolvidas na sinalização de AKT, com destaques para o receptor JAK-1 e proteína FOXO na diferenciação das células. Quando há mutação na proteína JAK o nível de fosforilação de sua molécula se torna elevado, desencadeando, conseqüentemente, múltiplas sinalizações que induzem a divisão celular descontrolada das células afetadas

1) Receptores de citocinas (a) ligados à tirosina-quinase ou Tyk-2 (b) e à Janus-quinase ou Jak-1 (c), ambos com átomos de fosforo representados e diferenciados por círculos amarelos e azuis

para facilitar a interpretação do esquema de sinalização. **2)** Quando a citocina penetra entre os receptores ocorrem reações fazendo-os se aproximarem um do outro. Essa aproximação desloca moléculas de Tyr-2 e de Jak-1 para as laterais de cada receptor e provoca a troca de átomos de fósforos entre elas (transforilação). **3)** Tyr-2 e Jak-1 cedem, cada um, átomos de fósforos que se acomodam nas bases dos dois receptores. **4)** As moléculas sinalizadores de transcrição e transdução **STAT1** e **STAT2** (**S**ignal **T**ransducers and **A**ctivator of **T**ranscription **1** and **2**) são atraídas em direção aos receptores de citocinas e recebem átomos de fosforo, fosforilando-as e tornando-as ativadas. **5)** STAT1 e STAT2 ativadas sinalizam as caspases para desencadear o controle da apoptose celular. **6)** O receptor de citocinas Jak-1 fosforilado reage com a molécula **PI3-K** (**P**hospho **I**nositide **3-K**inase), e esta sinaliza **PIP₃** (**P**hosphatidyl **I**nositol 3,4,5 **T**ri³-**P**hosphate) que, em seguida, estimula a molécula de AKT para realizar múltiplas **sinalizações** que ativam outras moléculas, com destaques para **FOXO** (**F**orkhead **B**OX -**F**actors **O**f **T**ransition), **MMD2** (**M**onocyte to **M**acrophage **D**ifferentiation associated **2**), **mTOR** (**m**ammalian **T**arget **O**f **R**apamycin), **GSK** (**G**licogen **S**ynthase **K**inase) e **Bad** (**B**cl-2 **A**ssociated **D**eath **P**romoter). Neste esquema representamos apenas a cascata reativa de FOXO e MMD2. **7)** A sinalização de AKT é induzida, também, por meio do receptor de tirosina-quinase RTK, que está ligado à molécula conhecida por receptora de substrato de insulina (IRS-1). Esse conjunto RTK-IRS-1 estimula PI3-K e PIP₃, que em seguida também ativa a molécula de AKT.

Pessoas com PV têm suas medulas ósseas completamente tomadas por células eritróides em diferentes fases evolutivas, notadamente de eritroblastos (figura 3). Dessa forma a, produção de eritrócitos se torna muita aumentada e, assim, o sistema hematopoiético da medula óssea transfere grande parte dessas células para o sangue circulante, causando aumento de viscosidade sanguínea e múltiplas consequências patológicas para o doente.

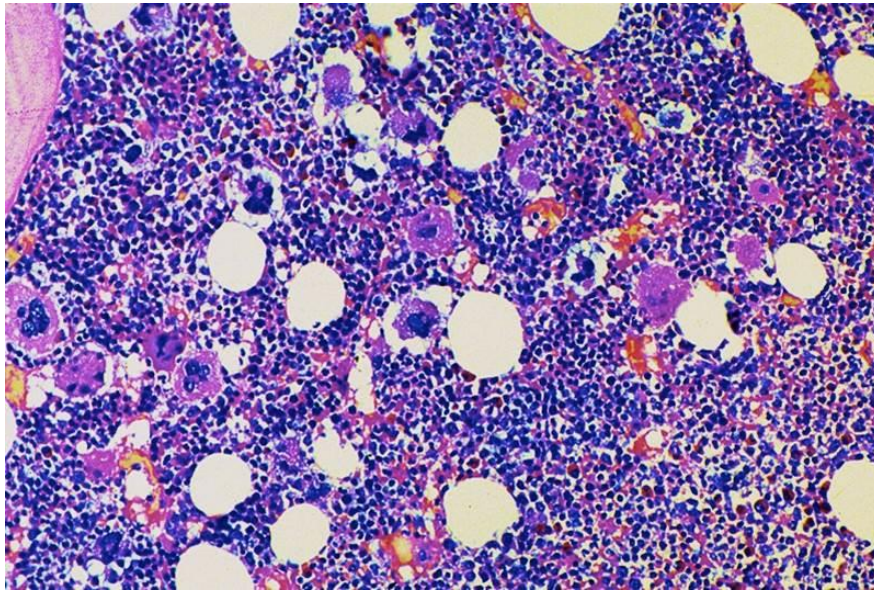


Figura 4 – Biópsia de medula óssea em uma pessoa com policitemia vera. A medula óssea é hipercelular por células eritróides em diferentes fases evolutivas e também pela presença de megacariblastos e megacariócitos.

A policitemia vera também pode ter outra causa, devido à mutação (amplificação) no receptor EPOR que facilita introdução de eritropoietina (EPO) para o interior das células tronco mielóide (figura 4). O descontrole na entrada de EPO estimula a contínua transformação de células tronco mielóides em precursores eritroblásticos, que resulta em quantidades altíssimas de eritrócitos circulantes⁽⁵⁾.

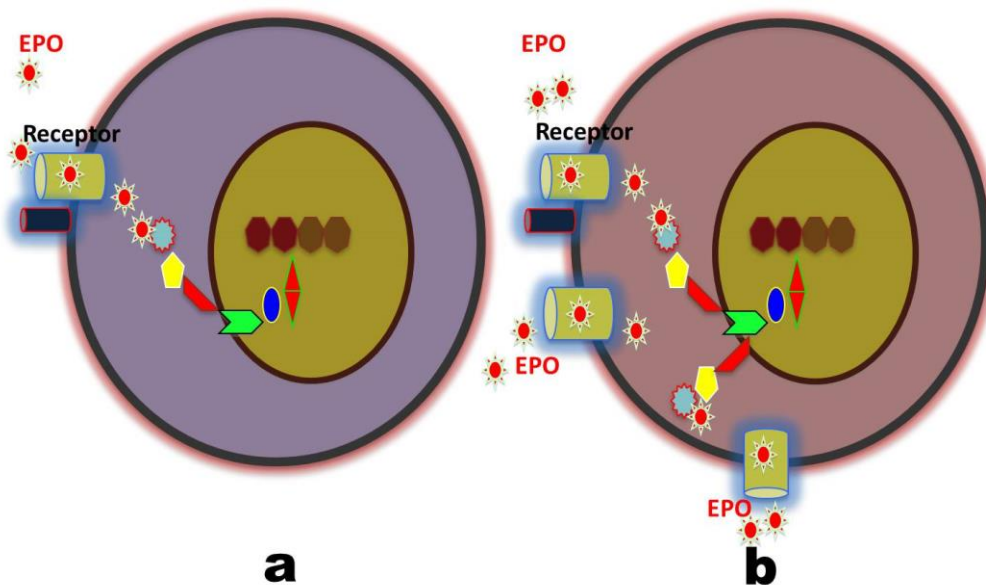


Figura 5 – Esquema representativo de uma célula tronco mielóide normal (a) em comparação com uma célula tronco mielóide afetada pela amplificação do receptor EPOR (b). Em (a) há um controle na recepção de eritropoietina que sinaliza a diferenciação da célula tronco mielóide em proeritroblasto. Em (b) o número aumentado de receptores para eritropoietina permite maior fluxo de eritropoietina para dentro da célula, tornando seu ciclo celular mais rápido que a célula normal no processo de transformação em proeritroblastos. Dessa maneira se formam mais proeritroblastos que desencadeiam a proliferação de maior número de eritroblastos e, conseqüentemente, de eritrócitos.

Uma outra doença hematológica mieloproliferativa conhecida por Trombocitemia essencial (TE) se caracteriza pelo descontrole na produção de plaquetas. É mais complexa sob o ponto de vista molecular que a LMC e a PV pela ocorrência de mutações em três genes diferentes: JAK-2, MPL

e CRL. Quando a mutação ocorre no gene JAK-2, que regula a capacidade proliferativa dos megacarioblastos, há a indução contínua da produção de plaquetas, congestionando a medula óssea com megacariócitos e o sangue circulante com excesso de plaquetas (ver figura 2). O gene MPL, por sua vez, regula a produção de proteínas que compõe o receptor de tromboietina, hormônio estimulador da produção de plaquetas. Quando há mutação no gene MPL, o resultado é o aumento na quantidade de receptores para trombopoietina. Mutações nesse gene aumenta a captação de trombopoietina pelo megacarioblasto, desencadeando contínua divisão celular dessas células em megacariócitos que, por fim, produz elevada quantidade de plaquetas⁽⁶⁾. Recentemente, demonstrou-se que há pessoas que padecem de TE, porém com análises moleculares normais para os genes JAK-2 e MPL. Essa situação foi solucionada em 2014 quando se descobriu que uma mutação em outro gene, o CALR, era responsável pela causa de 30% das Trombocitemia essencial. A sigla CALR significa *calreticulum*, proteína citoplasmática ligada à organela reticuloendoplasma e que depende do estímulo de JAK-2 e MPL. Quando mutante, o gene CALR induz a proteína CALR a desencadear a proliferação descontrolada de megacariócitos, resultando na produção de expressivas quantidades de plaquetas que são liberadas para o sangue circulante⁽⁶⁾.

Essa breve introdução destaca a dependência do diagnóstico molecular para algumas importantes doenças hematológicas e que já são determinantes na escolha de terapias específicas para seus controles. Apresentaremos, a seguir, um resumo de alterações moleculares de algumas das mais importantes doenças hematológicas em eritrócitos, leucócitos e plaquetas.

Doenças moleculares de *Eritrócitos*:

1) As análises moleculares diferenciam os tipos de talassemias alfa e beta em relação às funcionalidades dos seus genes. As funcionalidades se revelam por meio de deleções nos genes

alfa-globina e beta-globina que podem ter bloqueio total nas sínteses de globinas alfa (α^0) ou de globinas beta (β^0), bem como do bloqueio parcial nas sínteses de globinas alfa (α^+) ou de globinas beta (β^+). Talassemias com bloqueios total de sínteses de globinas alfa ou beta (Tal. α^0 ou Tal. β^0) resultam quadros patológicos mais intensos quando comparados com as de bloqueios parciais (Tal. α^+ ou Tal. β^+). Além dessas análises que revelam bloqueios de sínteses, há também investigação molecular de talassemias alfa e beta causadas por mutações pontuais. São mais de uma centena de mutações que afetam cada um dos genes, quer seja alfa ou beta. Embora as implicações patológicas podem ter relações com algumas das mutações pontuais, essas análises tem sido importantes para fornecerem informações sobre as origens étnicas das talassemias^(7,8).

2) A heterogeneidade da anemia falciforme motivou estudos moleculares com o objetivo de obter relações entre a gravidade da doença e os tipos de mutações em introns situados no grupo de genes tipo beta ($\epsilon_Y_d_beta^s$) conhecidos por haplotipos de globinas β^s . Esses estudos revelaram que há cinco haplótipos relacionados com as regiões de onde provieram o sangue para análises moleculares (Bantu ou Região Centro-Africana, Benin, Camarões, Senegal, Arábia e Índia). Observaram, por exemplo, que pessoas com anemia falciforme que apresentavam maior gravidade clínica pertenciam ao haplotipo homozigoto Bantu/Bantu⁽⁹⁾. A tabela 1 resume os cinco haplotipos, gravidade clínica e concentração de Hb Fetal. Estudos moleculares referentes aos haplotipos realizados no Brasil mostraram que 60 a 70% das pessoas com anemia falciforme tem o haplotipo Bantu/Bantu, 20 a 30% Benin/Benin, e 1 a 3% o haplotipo Senegal.

Tabela 1- Relação entre haplotipos de Hb S, gravidade clínica e concentração de Hb Fetal

Haplotipos	Gravidade clínica	Concentração de Hb F
Bantu/Bantu	Muito grave	0 a 5%

Benin/Benin	Grave	0 a 5%
Camarões/Camarões	Moderada	0 a 5%
Senegal/Senegal	Discreta	0 a 10%
Árabe/Indiano	Discreta	> 10%

3) Mutações na sinalização celular que afetam a proteína JAK-2 e mutação no receptor EPOR podem causar a *Policitemia Vera*, conforme foi detalhada na introdução deste artigo.

4) Mutações em genes que sintetizam proteínas de membrana de eritrócitos, por exemplo, Espectrina, Banda 3, Banda 4.1, etc. causam deformações dessas células e que resultam eritrócitos esferócitos, eliptócitos e piropoiquilocitos.

Doenças moleculares de leucócitos

1) Quase todos os casos de Tricoleucemias (ou *Leucemias das células cabeludas*) podem ter como causa uma simples mutação no gene BRAF que sintetiza a proteína RAF. A proteína BRAF faz parte da sinalização celular de RAS e quando alterada pode, entre outras alterações, estimular a proliferação de células linfoides jovens e alterar sua diferenciação celular (figura 6).

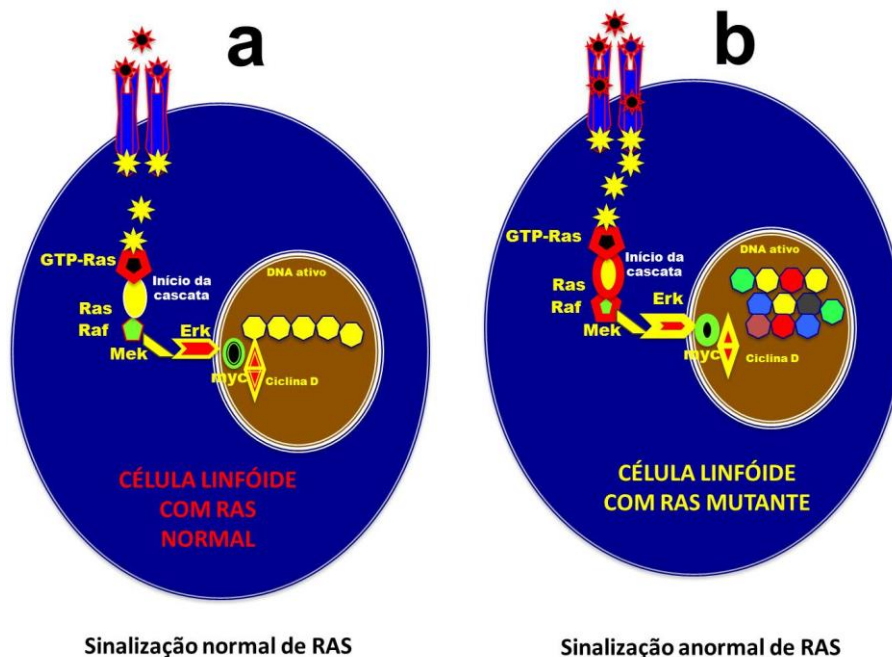


Figura 6- Esquema representativo de mutação da proteína BRAF na sinalização de RAS. (a) Célula precursora linfóide normal, com sinalização de RAS normal; (b) Célula precursora linfóide anormal, com sinalização mutante de RAS.

2) Disfunções nos genes que sintetizam proteínas que compõem o telômero, importante estrutura que envolve cada um dos cromossomos, é uma das causas que resulta na Leucemia Linfocítica Crônica. Nestes casos, a formação incompleta do telômero cria “buracos” em sua estrutura e facilita a entrada de compostos químicos que interferem nos genes do(s) cromossomo(s) afetados(s)⁽¹⁰⁾.

3) O gene quimérico BCR/ABL, conforme foi exposto na introdução deste artigo, é a principal causa de Leucemia Mielóide Crônica.

4) Mutações nos genes p53, E2H2, ETV6, RUNXS e ASXL1 podem estar associadas à progressão da Síndrome Mielodisplásica. As proteínas anormais resultantes dessas mutações afetam o tecido hematopoiético medular e interfere nos processos fisiológicos que regem a diferenciação e mobilidade das células precursoras de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Como consequência a medula se torna hiper celular

e o sangue periférico citopênico, com deficiência numérica de eritrócitos, leucócitos e plaquetas

5) O gene quimérico PML/RARA, proveniente da combinação de pedaços quebrados de cromossomos, causa a Leucemia Promielocítica⁽¹⁾.

Doenças moleculares de plaquetas

1) Mutações nos genes JAK-2, MPL e CARL são causas de Trombocitemia Essencial, conforme foi exposto na introdução deste artigo.

2) Mutações nos genes que sintetizam os fatores VIII e IX da cascata de coagulação são causas das Hemofilias do tipo A e B, respectivamente.

3) Mutações no gene vW (von Willebrand) são causas da doença hemorrágica por deficiência do fator de von Willebrand.

Referências bibliográficas

1- Pauling L, Itano HA, Singer SJ – Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science*, 110: 543-548, 1949.

2- Provan D, Gribben J – Molecular haematology. Blackwell Science Publisher, Oxford, 2000, 240p.

3- Salesse S, Verfalle C. – BCR/ABL: from molecular mechanismss of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*, 21: 8547-8559, 2002.

4- Cazzola M, Kralovics R. - From Janus Kinase 2 to calreticulum: the clinacally relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 123: 3714-3719, 2014.

5- Emanuel PD, Eaves CJ, Broudy VC – Familial and congenital polycythemia in three unrelated families. *Blood*, 79: 3019-3030, 1992.

- 6- Kim SY, Im K, Park SN – CALR, JAK-2 and MPL mutation profiles in patients with four diferente subtypes of myeloproliferative neoplasms: primary myelofibrosis, essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Am J Clin Pathol*, 143: 635-644, 2015.
- 7- Cao A, Galanello R – Beta-thalassemia. *Genetics in Medicine*, 12: 61-76, 2010.
- 8- Galanello R, Cao A – Alpha-thalassemia. *Genetica in Medicine*, 13: 83-88, 2011.
- 9- Naoum PC – Frequência de haplotipos de hemoglobina S em diferentes cidades e estados do Brasil. *Rev Bras Hemat Hemot*, 33: 7-9, 2010.
- 10- Naoum PC, Naoum FA – *Biologia médica do câncer humano*. Editora Mc Will, São Paulo, 2016, 213p.
- 11- Diverio D, Riccioni R, Mandelli F – The PML/RARA alpha fusion gene in the diagnosis and monitoring of acute promyelocyte leukemia. *Haematologica*, 80: 155-160, 1995.